

# COMPATIBILIDADE DO FUNGO *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. (DEUTEROMYCETES) COM O ÓLEO EMULSIONÁVEL E EXTRATO AQUOSO DE SEMENTES DE NIM

Rogério A. DEPIERI<sup>1</sup> E-mail: rdepieri@sercomtel.com.br, Sueli S. MARTINEZ<sup>2</sup> e Ayres O. MENEZES JR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ex-bolsista CBP&D/Cafê - Instituto Agronômico do Paraná, Mestrando em Agronomia - Universidade Estadual de Londrina, <sup>2</sup>Área de Proteção de Plantas, Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR. <sup>3</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

## Resumo:

A compatibilidade de uma formulação comercial de óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) (OEN) e do extrato aquoso de sementes (EAS) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., foi avaliada *in vitro*. Foram conduzidos dois experimentos para avaliar o efeito do OEN e EAS no crescimento vegetativo, e na produção e viabilidade dos conídios do fungo entomopatogênico. Os produtos foram incorporados ao meio de cultura (BDA+E) e distribuídos em placas de Petri, nas concentrações 0,5; 1 e 1,5% (OEN) e 1; 2 e 4% (EAS). Com base no crescimento vegetativo e na produção de conídios, o OEN e o EAS foram caracterizados segundo o modelo T para classificação de produtos. O EAS mostrou-se menos prejudicial a *B. bassiana* que o OEN. O OEN nas concentrações testadas, não foi compatível com *B. bassiana*, inibindo significativamente o crescimento vegetativo, e reduzindo a produção e a viabilidade dos conídios com efeitos mais acentuados nas concentrações mais altas. O EAS foi compatível com o entomopatôgeno em todas as concentrações testadas. O EAS afetou o crescimento vegetativo e a produção de conídios, mas não afetou a viabilidade dos esporos produzidos.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*, seletividade, controle biológico, fungo entomopatogênico

## COMPATIBILITY OF FUNGUS *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. (DEUTEROMYCETES) WITH THE NEEM EMULSIFYING OIL AND NEEM AQUOUS SEEDS EXTRACT

### Abstract:

The compatibility of a commercial formula of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss.) (OEN), aqueous neem seeds extract (EAS), with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., was evaluated *in vitro*. Two experiments were developed to test the effect of OEN and EAS on vegetative growth, conidia production and viability of the entomopathogenic fungi. The products were incorporated on a culture media (PDAS) at the concentrations 0.5, 1 and 1.5% (OEN) and 1, 2 and 4% (EAS) and poured on petri dishes. Based on vegetative growth and conidia production, OEN and EAS were characterized according to the T model for product classification. The EAS was less toxic to *B. bassiana*. The OEN at the concentrations tested, was not compatible with *B. bassiana* and significantly inhibited the vegetative growth, and reduced the conidia production and viability, with major effects at higher concentrations. The EAS was compatible with the entomopathogen at the concentrations tested. The EAS affected the vegetative growth and conidia production, but did not affect conidia viability.

Key words: *Azadirachta indica*, selectivity, biological control, entomopathogenic fungi

## Introdução

O controle biológico, em particular quando realizado com fungos entomopatogênicos, é um fator importante na redução da densidade populacional de pragas em programas de Manejo Integrado (MIP). Assim, deve ser observada a conservação desses entomopatôgenos, sejam eles de ocorrência natural ou quando introduzidos para o controle de insetos (Oliveira *et al.* 2003). Para isso, é fundamental conhecer a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos com outras práticas agrícolas, como o uso de produtos inseticidas, que em maior ou menor grau podem inibir o desenvolvimento e a reprodução dos patógenos (Malo 1993).

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), é uma das principais pragas do cafeeiro, e ataca os frutos em todas as fases de desenvolvimento. O organoclorado endossulfam ainda é o tratamento mais utilizado contra *H. hampei*, apesar de seu efeito fungitóxico sobre *Beauveria bassiana* (Mourão *et al.* 2003, Oliveira *et al.* 2003), um dos patógenos naturais mais importantes da broca-do-café. A utilização continuada do endossulfam também pode promover a seleção de populações resistentes ao inseticida e a outros produtos do mesmo grupo químico (Brun *et al.* 1989, 1994), além de causar problemas ambientais e de intoxicação ao agricultor.

Por isso, buscaram-se alternativas para o controle da broca, como o uso de extratos e óleos de plantas inseticidas. O nim, *Azadirachta indica* (Meliaceae), apresenta menor impacto à fauna benéfica e ao ambiente (Schmutterer 1995, Martinez 2002). Sua utilização para o controle da broca revelou-se promissora (Sponagel 1994, Rodrigues-Lagunes *et al.* 1998, Depieri *et al.* 2003). Entretanto, seu efeito sobre inimigos naturais, em especial sobre os fungos entomopatogênicos, deve ser esclarecido.

Estudos envolvendo a compatibilidade de *B. bassiana* com o nim têm apresentado resultados discordantes. Alguns autores observaram que o óleo emulsionável de nim inibe o crescimento micelial (Bajan *et al.* 1998, Hirose *et al.* 2001), a produção e a germinação de esporos de *B. bassiana* (Hirose *et al.* 2001). Entretanto, outros trabalhos não relatam efeitos fungitóxicos provocados pelo óleo emulsionável (Rodriguez-Lagunes *et al.* 1997), exceto em concentrações acima de 4% (Quintela & Pinheiro não publicado), ou por extrato de sementes de nim em concentrações abaixo de 2,5% (Rodriguez-Lagunes *et al.* 1997).

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro*, a compatibilidade entre o fungo *B. bassiana* com o óleo emulsionável e com o extrato de sementes de nim, em concentrações que mostraram potencial para a redução do ataque da broca-do-café em estudo anterior (Depieri *et al.* 2003).

## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Manejo Ecológico de Pragas e Plantas Inseticidas do Instituto Agrônomo do Paraná, IAPAR, em câmara climatizada B.O.D. à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotofase de 12h.

Foram conduzidos dois experimentos em que se avaliou, separadamente, o efeito do óleo emulsionável de nim Dalneem (OEN) (0,5, 1 e 1,5%) (i.a. principal azadiractina 0,1%) e do extrato aquoso de sementes (EAS) (1, 2 e 4%), incorporados em meio BDA+E (batata-dextrose-ágar com sulfato de estreptomicina), sobre o crescimento vegetativo, produção de conídios e viabilidade dos esporos de *B. bassiana*. Cada experimento teve um tratamento testemunha com meio BDA+E.

**Isolamento e Cultivo *in Vitro* de *B. bassiana*.** Foi obtido um isolado de *B. bassiana* a partir de conídios retirados de espécimes mortos de broca-do-café, *H. hampei*, coletados em frutos de café cultivados organicamente em Londrina/PR. O isolado foi mantido em placas de Petri (100 mm de diâmetro) contendo meio BDA+E, em câmara climatizada B.O.D. nas mesmas condições utilizadas para os experimentos, até a completa esporulação.

**Incorporação do OEN em Meio de Cultura.** O óleo emulsionável de nim foi diluído no meio BDA+E ainda não solidificado ( $45^\circ\text{C}$ ), para se obterem as concentrações 0,5; 1 e 1,5%. Foram preparados 1000 ml de meio de cultura tratado para cada tratamento e depois vertidos em 50 placas de Petri, para posterior inoculação de *B. bassiana*.

**Preparo do EAS e Incorporação ao Meio de Cultura.** Frutos maduros de nim, provenientes de árvores plantadas há dez anos no campo experimental do IAPAR, em Paranavaí, PR, foram despolpados em água corrente e suas sementes foram secas à sombra por sete dias, e armazenadas sob refrigeração ( $8-10^\circ\text{C}$ ) por aproximadamente 30 dias. As sementes foram trituradas em liquidificador na proporção de 80 g para 200 ml de água destilada esterilizada (ADE) para o preparo de EAS a 40%. O extrato foi mantido em repouso por aproximadamente 24h em temperatura ambiente e ao abrigo da luz e em seguida filtrado em tecido de poliéster para a retirada dos componentes sólidos. Em seguida, 100 ml do EAS a 40% foram misturados a 900 ml de meio BDA+E a  $45^\circ\text{C}$ , preparado com 100 ml de ADE a menos, reduzindo-se a concentração para 4%. Mais 100 ml de EAS a 40% foram submetidos a diluições seriadas em ADE para se obter 100 ml de EAS a 20% e 100 ml de EAS a 10%. Os extratos foram incorporados separadamente em 900 ml de meio BDA+E a  $45^\circ\text{C}$ , para obtenção das concentrações a 2% e 1%, respectivamente. Os meios tratados após a homogeneização foram vertidos no mesmo número de placas do experimento anterior.

**Preparo e Inoculação do Entomopatógeno em Meios BDA+E Tratados.** Os esporos do isolado obtido foram suspensos em tubos de ensaio com 10 ml de ADE com Tween 20 (0,02%) com agitação mecânica para desagregar os conídios, e em seguida padronizada em  $2,5 \times 10^7$  conídios/ml.

Alíquotas de 0,1 ml da suspensão foram distribuídas por placa de Petri de 100 mm com meio de cultura BDA. As placas foram mantidas em câmara climatizada B.O.D. durante dois dias para a germinação dos conídios. Após este período de incubação, cortaram-se discos de quatro mm de diâmetro do meio de cultura com micélio. O lado do disco contendo o micélio em crescimento foi colocado em contato com o meio BDA+E solidificado com as concentrações obtidas de OEN e EAS.

**Avaliação do Crescimento Vegetativo do Fungo.** Após três dias de incubação foram selecionadas aleatoriamente 35 colônias por tratamento; estas foram medidas com um paquímetro em dois sentidos transversais e descontando-se quatro mm, para determinar o diâmetro médio das colônias. Obteve-se o diâmetro médio das colônias após seis dias de incubação utilizando-se dos mesmos procedimentos.

**Avaliação da Produção de Conídios.** No sexto dia de incubação, recortou-se da borda de cada colônia medida um disco de quatro mm de diâmetro para a quantificação dos conídios. Cada disco foi colocado em um tubo de ensaio contendo 10 ml de ADE com Tween 20 (0,02%) e agitado durante 30 segundos em vortex, para a retirada dos conídios da superfície do meio. Uma alíquota da suspensão de cada tubo foi pipetada em câmara de Neubauer para a contagem do número de conídios por ml.

**Avaliação da Viabilidade dos Conídios.** As suspensões obtidas para a contagem dos conídios produzidos nos meios tratados foram diluídas para a concentração aproximada de  $10^6$  conídios/ml. As suspensões de conídios produzidos em cada uma das concentrações avaliadas foram pulverizadas durante um segundo sobre três lâminas de microscopia com uma camada de ágar-água, em cinco repetições por tratamento. Esse material foi incubado por aproximadamente 20 horas em câmara climatizada B.O.D. Após esse período, foi determinada a viabilidade dos conídios através da contagem dos esporos germinados sob microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

**Cálculo de compatibilidade.** A compatibilidade foi calculada com a fórmula proposta por Alves *et al.* (1998) para classificar produtos químicos conforme sua toxicidade aos fungos entomopatogênicos *in vitro*. Essa classificação baseia-se no cálculo do fator T, relacionando os valores de crescimento vegetativo (CV) e esporulação (conidiogênese) (ESP) com o

controle (%):  $T = [20 (CV) + 80 (ESP)]/100$ . Os valores de T são classificados de forma que para a faixa de 0 a 30 o produto é considerado muito tóxico, de 31 a 45 é considerado tóxico, de 46 a 60 é considerado moderadamente tóxico, e para valores acima de 60, é compatível com o fungo estudado.

**Análise Estatística.** O delineamento foi inteiramente casualizado para todos os experimentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

O OEN nas concentrações avaliadas reduziu significativamente o crescimento vegetativo das colônias e a conidiogênese de *B. bassiana* em relação ao tratamento testemunha. A 1% e 1,5%, o OEN também reduziu significativamente a viabilidade dos esporos produzidos pelas colônias ( $P \leq 0,05$ ). De modo geral, a ação do óleo de nim nos diversos parâmetros foi dependente da concentração, embora as diferenças observadas nem sempre tenham sido significativas (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro das colônias (média  $\pm$  E.P.), número médio de esporos e porcentagem de esporos viáveis, produzidos por *B. bassiana* em meio BDA+E com diferentes concentrações de óleo emulsionável de nim (OEN). Temp.:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotofase: 12h.

Óleo de nim (%)	Diâmetro da colônia (n = 35)				Número de esporos (n = 35)		Viabilidade dos esporos (n = 15)	
	3 dias		6 dias		(x 10 <sup>5</sup> /ml)	redução (%)	redução (%)	redução (%)
	cm	redução (%)	cm	redução (%)				
0	1,33 $\pm$ 0,02 a	0,00	2,09 $\pm$ 0,07 a	0,00	49,2 $\pm$ 4,33 a	0,00	91,5 $\pm$ 0,87 a	0,00
0,5	0,75 $\pm$ 0,01 b	43,6	1,05 $\pm$ 0,01 b	49,8	24,7 $\pm$ 1,61 b	49,8	84,8 $\pm$ 1,93 ab	7,3
1	0,77 $\pm$ 0,01 b	42,1	0,98 $\pm$ 0,01 b	53,1	16,6 $\pm$ 1,01 bc	66,3	84,3 $\pm$ 1,91 b	7,9
1,5	0,74 $\pm$ 0,01 b	44,4	0,94 $\pm$ 0,02 b	55	10,5 $\pm$ 0,65 c	78,7	80,2 $\pm$ 2,49 b	12,4

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Rodriguez-Lagunes *et al.* (1997) e Quintela & Pinheiro (não publicado) não observaram, em laboratório, efeitos fungitóxicos significativos causados por OEN em concentrações abaixo de 5%. A diferença entre esses resultados, e os observados no presente trabalho, possivelmente se deve à variabilidade no teor de triterpenóides e outros compostos presentes nas sementes de nim, utilizadas para a formulação dos produtos comerciais (Sidhu *et al.* 2004), ou talvez, aos emulsionantes e estabilizantes utilizados na industrialização. No entanto, efeitos negativos causados ao entomopatógeno pelo OEN também foram observados por Bajan *et al.* (1998) e Hirose *et al.* (2001).

O mecanismo de ação dos produtos derivados de nim sobre o crescimento vegetativo e a reprodução dos fungos ainda não é conhecido (Locke 1995). Entretanto, é possível que as fitoalexinas, compostos sulfurados e os triterpenóides presentes nesses produtos possuam ação fungitóxica (Singh *et al.* 1984, Bandopadhyay 2002).

As colônias do fungo desenvolvidas no meio de cultura contendo EAS tiveram crescimento vegetativo e conidiogênese significativamente reduzidos em comparação com o tratamento testemunha. A concentração de EAS a 1% foi suficiente para causar inibição significativa do crescimento micelial e da conidiogênese de *B. bassiana* com reduções maiores nas concentrações mais altas. Entretanto a incorporação do EAS no meio de cultura não afetou a viabilidade dos esporos produzidos em nenhuma das concentrações. (Tabela 2).

Tabela 2. Diâmetro das colônias (média  $\pm$  E.P.), número médio de esporos e porcentagem de esporos viáveis, produzidos por *B. bassiana* em meio BDA+E com diferentes concentrações de extrato aquoso de sementes de nim (EAS). Temp.:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotofase: 12h.

Extrato aquoso de sementes de nim (%)	Diâmetro da colônia (n = 35)				Número de esporos (n = 35)		Viabilidade dos esporos (n = 15)	
	3 dias		6 dias		(x 10 <sup>5</sup> /ml)	redução (%)	redução (%)	redução (%)
	cm	redução (%)	cm	redução (%)				
0	1,71 $\pm$ 0,01 a	0,00	3,25 $\pm$ 0,03 a	0,00	48,2 $\pm$ 2,65 a	0,00	90,5 $\pm$ 1,11 a	0,00
1	1,45 $\pm$ 0,02 b	15,2	2,93 $\pm$ 0,02 b	9,8	38,5 $\pm$ 2,20 b	20,1	90,4 $\pm$ 1,07 a	0,1
2	1,34 $\pm$ 0,03 c	21,6	2,85 $\pm$ 0,03 b	12,3	34,3 $\pm$ 2,16 bc	28,8	90,3 $\pm$ 1,13 a	0,2
4	1,24 $\pm$ 0,02 d	27,5	2,57 $\pm$ 0,03 c	20,9	28,2 $\pm$ 2,24 c	41,5	90,3 $\pm$ 1,61 a	0,2

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Rodriguez-Lagunes *et al.* (1997) não observaram inibição significativa no crescimento vegetativo e na produção de esporos de *B. bassiana* causado por EAS a 5% e 1,5%. A variação na concentração dos componentes com possível atividade fungitóxica nas sementes de nim (Sidhu *et al.* 2004) poderia explicar o menor efeito negativo do EAS utilizado por esses autores sobre o fungo, já que há estudos que demonstram a diferença na concentração de azadiractina em sementes de diferentes procedências (Ermel *et al.* 1984, Devaranavadagi *et al.* 2003).

Observou-se recuperação do crescimento vegetativo nas colônias em meio com EAS, entre o terceiro e sexto dia após a inoculação (Tabela 2) Essa recuperação pode resultar da metabolização dos componentes tóxicos do EAS pelo fungo, de forma semelhante ao que ocorre com alguns produtos químicos (Alves *et al.* 1998), e talvez de processos

oxidativos e de decomposição do extrato. Entretanto, esse processo não ocorreu nas colônias em meio com OEN (Tabela 1), possivelmente por causa da maior estabilidade e persistência do produto comercial, comparado ao extrato vegetal.

Pelos resultados apresentados na tabela de classificação de produtos fitossanitários quanto à toxicidade dos mesmos ao fungo *B. bassiana* (Tabela 4), verifica-se que o OEN, nas concentrações avaliadas, não foi compatível com o isolado, e possivelmente será tóxico para outros isolados de *B. bassiana* utilizados no controle de *H. hampei*. O mesmo efeito não foi observado nas colônias submetidas ao EAS, que foi compatível com o fungo em todas as concentrações avaliadas. O OEN foi mais tóxico a *B. bassiana* que o EAS, e na concentração 0,5%, causou maior inibição no crescimento vegetativo e produção e viabilidade de esporos que os extrato botânico, inclusive em sua concentração mais alta.

Tabela 4. Classificação do óleo emulsionável e dos extratos aquosos de sementes e de folhas, em diferentes concentrações, com relação à compatibilidade com *B. bassiana* (valor T, segundo Alves *et al* 1998).

Tratamentos	T	Classificação
Óleo emulsionável de nim		
0,5%	50,02	moderadamente tóxico
1%	36,34	tóxico
1,5%	26,04	muito tóxico
Extrato aquoso de sementes de nim		
1%	81,96	compatível
2%	74,51	compatível
4%	62,62	compatível

A fórmula de Alves *et al.* (1998) representa o efeito tóxico de produtos fitossanitários sobre os fungos entomopatogênicos *in vitro*. Os testes de compatibilidade em laboratório têm a vantagem de expor o patógeno à máxima atividade dos produtos químicos, o que não ocorre em condições de campo. Assim, quando o tratamento é compatível *in vitro*, existem fortes evidências de sua seletividade em condições de campo. Entretanto, a alta toxicidade *in vitro* não significa que o produto sempre será tóxico para o patógeno no campo (Alves *et al.* 1998), e nesta condição, a inibição do crescimento vegetativo pode ser um indicador menos representativo da fungitoxidade que a viabilidade dos esporos ou o efeito sobre a germinação (Loria *et al.* 1983). Portanto, como a fórmula não considera o efeito do tratamento na viabilidade dos esporos, os resultados indicam que deve-se tomar precauções com a utilização de OEN, em ambientes onde *B. bassiana* tem papel significativo na mortalidade de *H. hampei*.

Em condições de campo é importante haver a compatibilidade do produto fitossanitário com a germinação, já que os insetos são infectados através da germinação dos esporos por ingestão ou contato (Malo 1993). Hirose *et al.* (2001) observaram 45% de redução na germinação dos esporos de *B. bassiana* quando misturados ao óleo de nim a 2%. Portanto, deve-se evitar a mistura de emulsão aquosa de OEN com os esporos do entomopatógeno para o controle da praga. Em relação à utilização do óleo e de extratos de sementes de nim no manejo da broca-do-café, deve-se considerar que, em agroecossistemas onde *B. bassiana* exerce papel importante nas epizootias, é recomendável a utilização das formulações de nim compatíveis para não inviabilizar o efeito do fungo entomopatogênico no controle da praga. Em condições de campo, fatores ambientais amenizam a ação dos compostos tóxicos sobre o fungo, portanto, as formulações consideradas compatíveis nos testes *in vitro*, podem ser consideradas seguras sobre o fungo.

## Conclusões

O extrato aquoso de sementes de nim, nas concentrações avaliadas em laboratório, é compatível com *Beauveria bassiana*, podendo ser considerado um produto seguro ao entomopatógeno, em programas de manejo da broca e de outras pragas do café. O óleo emulsionável de nim não foi compatível com o fungo entomopatogênico em nenhuma das concentrações testadas. Sua utilização para o controle de pragas em agroecossistemas onde *B. bassiana* causa epizootias, deve-se restringir aos períodos e locais onde exista menor probabilidade do contato do produto com o microrganismo.

## Referências bibliográficas

- Alves, S.B.; Moino Jr. A.; Almeida J.E.M. (1998). Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: S.B. Alves (ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ. pp.217-238.
- Bajan, C.; Kmitowa, K.; Nowak, E.P. (1998). Reaction of various ecotypes of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the botanical preparation NEEM<sup>TM</sup> and pyrethroid Fastak. *Archives of Phytopathology*. PFL, 31:369-375.
- Bandopadhyay, A.K. (2002). A current approach to the management of root diseases in bast fibre plants with conservation of natural and microbial agents. *Journal of Mycopathological Research*, 40:57-62.
- Brun, L.A.; Marcillaud, C.; Gaudichon, V.; Scukling D. (1989). Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. *Journal of Economic Entomology*, 82:1311-1316.

- Brun, L.A.; Marcillaud C.; Gaudichon, V. (1994). Cross resistance between insecticides in coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from New Caledonia. *Bulletin of Entomological Research*, 84:175-178.
- Depieri, R.A.; Martinez, S.S.; Gonçalves, D.H.K.; Zapparoli, A.M.M. (2003). Efeito repelente do óleo, extrato de sementes e de folhas de nim, *Azadirachta indica* A. Juss., sobre a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Porto Seguro. Anais...pp.337-338.
- Devaranavadagi, S.B.; Sajjan, A.S.; Kulakarni, V.N.; Wali, S.Y.; Jambagi, M.B. (2003). Comparison of the oil and azadirachtin content of neem seed kernel from different ecotypes. *Karnataka Journal of Agricultural Science*, 16:624-625.
- Ermel, K.; Pahlich, E.; Schmutterer, H. (1984). Comparison of the azadirachtin content of neem seeds from ecotypes of Asian and African origin. In: Schmutterer, H.; Ascher, K.R.S. (eds). Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. *Proceedings of the Second International Neem Conference*. Rauschholzhausen, GTZ, Eschborn, 1984. pp.91-93.
- Hirose, E.; Neves, P.M.O.J.; Zequi, J.A.C.; Martins, L.H.; Peralta, C.H.; Moino Jr., A. (2001). Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. And *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44:409-423.
- Locke, J.C. (1995). Effects on viruses and organisms – Fungi. In: Schmutterer H. (ed), *The neem tree Azadirachta indica A. Juss. and other meliaceous plants*. Weinheim, VCH. pp.118-127.
- Loria, R.; Galaini S.; Roberts, D.W. (1983). Survival of inoculum of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as influenced by fungicides. *Environmental Entomology*, 12:1724-1726.
- Malo, A.R. (1993). Estudio sobre la compatibilidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. *Revista Colombiana de Entomología*, 19:151-158.
- Martinez, S.S. (ed) (2002). *O nim. Azadirachta indica – natureza, usos múltiplos, produção*. Londrina, IAPAR 142p.
- Mourão, S.A.; Vilela, E.F.; Zanúncio, J.C.; Zambolim, L.; Tuelher, E.S. (2003). Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. *Neotropical Entomology*, 32:103-106.
- Oliveira, C.N.; Neves, P.M.O.J.; Kawazoe, L.S. (2003). Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. *Scientia Agricola*, 60:663-667.
- Rodríguez-Lagunes, D.A.; Tejedo, A.L.; Diaz, D.R.; Maciel, C.R.; Mendoza, J.V.; Roman, E.B.; Colorado, S.R.; Velasco, E.P. (1997). Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y extractos acuosos de nim (*Azadirachta indica*) para el control de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*). *Manejo Integrado de Plagas*, 44:14-19.
- Rodríguez-Lagunes, D.A.; Tejedo, A.L.; Diaz, D.R.; Maciel C.R.; Mendoza, J.V.; Roman, E.B.; Velasco, E.P. (1998). Extractos acuosos de nim para el combate de la broca de café. *Manejo Integrado de Plagas*, 49:73-77.
- Schmutterer, H. (ed) (1995). *The neem tree Azadirachta indica A. Juss. and other meliaceous plants*. Weinheim, VCH, 696p.
- Sidhu, O.P.; Kumar, V.; Behl, H.M. (2004). Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of neem among different provenances of India. *Industrial Crops Production*, 19:65-75.
- Singh, U.P.; Singh, H.B.; Chauhan, V.B. (1984). Effect of some fungicides, plant extracts and oils on inoculum density of different nodal leaves of pea infected by *Erysiphe polygoni*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91:20-26.
- Sponagel, K.W. (1994). *La broca del café Hypothenemus hampei en plantaciones de café robusta en la Amazonia Ecuatoriana*. Giessen, Wissenschaftlicher Fachverlag, 191p.