

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO E PATOGENICIDADE DE FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DO PERCEVEJO-BRONZEADO DO
EUCALIPTO, *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)**

MARÍA LORENA SAN ROMÁN LAZO

Dissertação apresentada Faculdade de Ciências
Agronômicas da Universidade Estadual Paulista
– Campus de Botucatu, como parte dos
requerimentos para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Agosto – 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO E PATOGENICIDADE DE FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DO PERCEVEJO-BRONZEADO DO
EUCALIPTO, *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)**

MARÍA LORENA SAN ROMÁN LAZO
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Professor Dr. Carlos Frederico Wilcken

Dissertação apresentada Faculdade de Ciências
Agronômicas da Universidade Estadual Paulista
– Campus de Botucatu, como parte dos
requerimentos para obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Agosto – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R758c San Román Lazo, María Lorena , 1973-
Caracterização e patogenicidade de fungos entomopatogênicos isolados do percevejo-bronzeado do Eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) /
María Lorena San Román Lazo. - Botucatu : [s.n.], 2012
iii , 78 f. : il., color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012
Orientador: Carlos Frederico Wilcken
Inclui bibliografia

1. Eucalipto. 2. *Fusarium* sp. 3. Pragas - Controle biológico. 4. *Faecilomyces* sp. I. Wilcken, Carlos Frederico. II . Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO E PATOGENICIDADE DE FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS ISOLADOS DO PERCEVEJO BRONZEADO
DO EUCALIPTO *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE)"

ALUNA: MARÍA LORENA SAN ROMÁN LAZO

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS FREDERICO WILCKEN

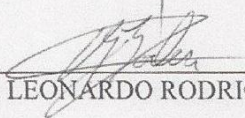
APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA



PROF. DR. CARLOS FREDERICO WILCKEN



PROF. DR. ANTONIO BATISTA FILHO



PROF. DR. LEONARDO RODRIGUES BARBOSA

Data da Realização: 23 de agosto de 2012.

Agradeço a meu, Pai (*in memoriam*), quem me guiou, ame e amo e deu sempre a possibilidade de escolher meu caminho.

A minha família toda especialmente minha mãe e seu apoio incondicional a minha erma Maria Nella, meu cunhado Gustavo, Fernando com quem afortunadamente comparti por um longo tempo minha vida, e minha sobrinha Ivana a quem adoro.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Carlos Wilken quem sempre com alma e paciência me aceitou como orientada, mostrou que acreditava em mim como profissional e como pessoa.

- Ao Prof. Dr. Edson Furtado pelo apoio pessoal, conceitos, lições e apoio, abrindo as portas de seu laboratório. A Paula e Gabriela pela ajuda pessoal e técnica nos trabalhos de Laboratório de Fitopatologia da FCA/UNESP;

- À Dra. Ana Carolina Firmino pela ajuda e apoio incondicional pessoal, a quem considero amiga;

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq -pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro;

- Ao IPEF (Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais) pelo apoio financeiro no início do curso e pelo apoio às viagens de campo;

- A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas pelos ensinamentos;

- Aos profs. Elliot Kitajima e Francisco André Ossamu Tanaka por permitirem que eu utilizasse a estrutura do Centro de Microscopia Eletrônica da ESALQ e ao técnico Renato pelo apoio;

- A minhas amigas e colegas do Uruguai: Rossana, Virginia, Ana, Adriana, Nanda e Ana Lía, por seu apoio sempre;

- Agradeço a todos e cada um de meus colegas do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais da FCA/UNESP em os quais me apoiei e recebi ajuda pessoal.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1. O eucalipto como recurso florestal.....	8
4.2. Pragas do eucalipto.....	9
4.3. Percevejo-bronzeado <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	11
4.3.1 Taxonomia, morfologia e biologia.....	11
4.3.5. Estratégias de controle para <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	15
4.4 Fungos entomopatogênicos.....	19
CAPÍTULO II Identificação, caracterização e patogenicidade de <i>Paecilomyces cateniannulatus</i> , isolado do percevejo bronzeado do eucalipto, <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (Hemiptera: Thaumastocoridae) e efeito de inseticidas neonicotinoides sobre seu crescimento.....	25
Resumo.....	27
Summary.....	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÕES.....	45
LITERATURA CITADA.....	46
CAPÍTULO II Identificação, caracterização e patogenicidade de <i>Fusarium proliferatum</i> isolado do percevejo-bronzeado do eucalipto <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (Hemiptera: Thaumastocoridae) e efeito de inseticidas neonicotinoides sobre seu crescimento e análise de fitopatogenicidade em culturas agrícolas.....	49
Resumo.....	50
Summary.....	51
INTRODUÇÃO.....	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÕES.....	71
LITERATURA CITADA.....	71
5. REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS.....	74

1. RESUMO

A área de plantio de *Eucalyptus* no mundo tem aumentado nas últimas décadas. Em 2011 a área total de plantio de eucalipto no Brasil foi de 4.873.952 ha. Os insetos nativos são o principal problema nas plantações de eucalipto no Brasil. Entretanto, nos últimos anos novas pragas têm sido introduzidas e disseminadas causando perdas na cultura. O percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* foi detectado pela primeira vez no Brasil em maio de 2008 em São Francisco de Assis, RS. Esse inseto afeta a produtividade dos plantios de eucalipto. As ninfas e os adultos se alimentam sugando as folhas, provocando pontos cloróticos nas folhas, que evoluem para um aspecto bronzeado. É necessário o estabelecimento e quantificação dos danos nas florestas de eucalipto bem como o desenvolvimento e implantação de um sistema integrado de controle para *T. peregrinus*. O desenvolvimento do controle microbiano como o uso de fungos entomopatogênicos, é uma opção de manejo da praga. As possibilidades são a utilização bioinseticidas comerciais existentes no mercado ou a obtenção de isolados nativos a partir da ocorrência de epizootias naturais no campo, para posterior desenvolvimento de novos inseticidas biológicos. Diante do problema que essa praga vem causando em plantios de eucalipto e das limitadas alternativas para seu controle o presente trabalho teve os seguintes objetivos: Obter isolados de fungos entomopatogênicos a partir de indivíduos de *T. peregrinus* mortos coletados em campo; selecionar isolados e realizar sua caracterização biológica (velocidade de crescimento e aspecto geral da colônia em meio de cultivo), morfológica (tamanho e formato de esporos e presença/ausência de estruturas especializadas) e molecular; verificar a

sensibilidade dos fungos isolados a inseticidas empregados para controle do percevejo bronzeado do eucalipto; acompanhar a colonização dos fungos isolados quando inoculados diretamente no corpo dos insetos, com estudo detalhado por microscopia eletrônica de varredura. Foram isoladas algumas espécies de fungos, mas apenas isolados de duas espécies foram utilizadas para o desenvolvimento do trabalho. As duas espécies de fungos testadas foram capazes de causar mortalidade nos insetos inoculados. Os fungos mostraram sensibilidade aos inseticidas testados, imidacloprid e thiamethoxam. Para a caracterização molecular, foram utilizadas sequências de genes de duas regiões do DNA (ITS-5.8S rDNA e α -elongase). Os fungos entomopatogênicos associados à *T. peregrinus* foram *Fusarium proliferatum* e *Paecilomyces cateniannulatus* (= *Isaria cateniannulata*). A partir da identificação dos fungos foi feito um teste de fitopatogenicidade para *Fusarium proliferatum* já que o gênero desse fungo tem sido relatado como fitopatogênico, causando doenças em milho, cana-de-açúcar, tomate, etc.. A partir dos isolados de *F. proliferatum* foi conduzido um bioensaio, aplicando suspensões do fungo em concentrações de 10^6 esporos/ml, por pulverização na parte aérea como aplicação nas raízes em plantas de cana-de-açúcar, tomateiro, milho e eucalipto. O experimento foi mantido em casa de vegetação e avaliado diariamente durante 45 dias, não sendo observado nenhum sintoma de doença nas diferentes espécies de plantas testadas.

Palavras-chave: praga florestal; eucalipto; controle microbiano; *Paecilomyces* sp.; *Fusarium* sp.

CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ISOLATED FROM EUCALYPTUS BRONZE BUG, *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE). Botucatu, 2012. 76 p. Dissertation (Master Degree in Agronomy /Plant Protection) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP)..

Author: MARIA LORENA SAN ROMAN LAZO

Adviser: CARLOS FREDERICO WILCKEN

2. SUMMARY

The area of *Eucalyptus* plantations in the world has increased in recent decades. In 2011 the total area of eucalyptus plantations in Brazil was 4.873.952 ha. The native insects are a major problem in eucalyptus plantations in Brazil, but in recent years, new pests have been introduced and causing widespread crop losses. In May, 2008, *Thaumastocoris peregrinus* was detected first time in Brazil, in São Francisco de Assis, State of Rio Grande do Sul. This pest reduces and affects the productivity of eucalyptus plantations. Nymphs and adults feed by sucking the leaves, causing chlorotic spots, which develop in bronzed look. The development of microbial control using microorganisms, as entomopathogenic fungi, as an option. Test evaluating commercial bioinsecticides and isolating native fungi species from the natural epizootics in the field, are an important tool for its control. Nowadays there is a few control alternatives for the problem caused by this pest in eucalyptus plantations. The present work aimed to obtain isolates of entomopathogenic fungi from dead individuals of *T. peregrinus* collected in field; selecting isolates and evaluated them considering characteristics of biology (growth rate and general appearance of the colony) morphology (size and shape of spores and the presence / absence of specialized structures) and molecular; verify the sensitivity of fungi isolate against potential insecticides used to eucalyptus bronze bug control; evaluate colonization of fungi isolated when inoculated directly into the bronze bug using scanning electron microscopy. Many fungi were isolated, but for practical purposes only two were chosen for the development work. All fungi tested were able to cause insect mortality. All fungi have shown

significant sensitivity to the insecticides imidacloprid and thiamethoxam. The identity of each fungus as determined using two DNA regions (ITS-5.8S rDNA, and α -elongase) and they were identified as *Fusarium proliferatum* and *Paecilomyces cateniannulatus* (= *Isaria cateniannulata*). After the fungi identification, a test to evaluate a possible phytopathogenicity was carried out since many species of genus *Fusarium* are phytopathogenic in different agricultural crops. From the isolates of *F. proliferatum*, the bioassay was carried out, applying suspensions of the fungus at concentrations of 10^6 spores/mL, by sprayed in the leaves and soak the roots of plants of sugarcane, maize, tomato and *Eucalyptus*. The experiment was carried out in a greenhouse and evaluated daily by 45 days. During this time, it not observed any disease symptoms in all plants tested.

Keywords: forest pest, *Eucalyptus*, microbial control, *Paecilomyces* sp., *Fusarium* sp.

3. INTRODUÇÃO

A área de plantio de *Eucalyptus* no mundo tem atingindo 20 milhões de ha em 2010, apresentando a seguinte distribuição, em milhões de hectares: 8,4 na Ásia; 6,9 na América; 2,9 na África; 1,3 na Europa e 0,9 na Oceania. O Brasil possui a maior área plantada no mundo, e junto com a Índia e a China concentram mais de 50 % das plantações mundiais de eucalipto (IGLESIAS et al., 2010).

Segundo ABRAF (2012) em 2011 a área total de plantio de eucalipto foi de 4.873.952 ha, que se distribuem da seguinte maneira: Minas Gerais (29 %), São Paulo (21%), Bahia (12 %), Mato Grosso do Sul (10 %), Rio Grande do Sul (6%), Espírito Santo (4%), Paraná (4 %) e demais estados (18%).

As plantações de eucalipto têm como principais problemas as pragas nativas, como as formigas cortadeiras, cupins, lagartas e besouros desfolhadores. Nos últimos anos novas pragas têm sido introduzidas e disseminadas causando perdas na cultura, como a gorgulho-do-eucalipto (*Gonipterus scutellatus*), o psilídeo-da-concha (*Glycaspis brimblecombei*), a vespa-da-galha (*Leptocybe invasa*) e o percevejo bronzeado (*Thamaustocoris peregrinus*) (WILCKEN et al., 2008).

Na África do Sul foi detectada a ocorrência de *T. australicus* desde 2003 quando um único exemplar fêmea foi coletado em *Croton gratissimus* Burch. (Euphorbiaceae) em

Pretória (JACOBS ; NESER, 2005). Na Argentina, a espécie foi *T. australicus* foi detectada em Moreno, província de Buenos Aires, em novembro de 2005 (NOACK ; COVIELLA, 2006). Logo após, a identificação da praga foi refeita, passando a ser considerada como *T. peregrinus* (CARPINTERO ; DELLAPÉ, 2007). No Brasil este inseto foi detectado em maio de 2008 em São Francisco de Assis, RG posteriormente, em junho do mesmo ano em Jaguariúna, SP (WILCKEN et al., 2008).

No Uruguai, os primeiros indivíduos de *T. peregrinus* foram coletados em janeiro de 2008 no Departamento de Tacuarembó. Os insetos foram encontrados em fevereiro de do mesmo ano em exemplares de *E. globulus*, *E. grandis*, *E. camaldulensis* e *E. viminalis* Atualmente a sua presença tem sido confirmada em todo o país. (MARTÍNEZ ; BIANCHI, 2010)

O percevejobronzeado *T. peregrinus* é uma praga exótica que afeta a produtividade dos plantios de eucalipto. Tanto as ninfas quanto os adultos se alimentam pela sucção das folhas, provocando pontos cloróticos que evoluem para um aspecto bronzeado. Em casos severos pode ocorrer à seca e queda prematura de folhas maduras. Tanto a quantificação dos danos nas florestas de eucalipto como o desenvolvimento e implantação de um programa de manejo integrado para *T. peregrinus* constitui em objetivos importantes, devido às perdas que este inseto vem ocasionando no setor florestal e às restrições ao uso de produtos químicos, considerando as exigências dos sistemas de certificação florestal (WILCKEN 2011, informação pessoal)

Dentre os métodos de combate deste inseto o controle integrado vem sendo a melhor estratégia, sendo que o uso de fungos entomopatogênicos tem recebido atenção pela grande variedade de espécies. A ocorrência de epizootias que causam alta mortalidade natural de *T. peregrinus* é importante fonte para desenvolvimento de pesquisa de procura de isolados desses fungos entomopatogênicos A caracterização, identificação e constatação da patogenicidade destes fungos são essenciais para o controle integrado de *T. peregrinus*. Com base nessas características o presente trabalho teve como objetivos : Isolar fungos entomopatogênicos diretamente de *T. peregrinus* coletados mortos durante epizootias no campo; realizar a caracterização biológica, morfológica e molecular a partir do sequenciamento de duas regiões do genoma dos fungos encontrados e verificar a sensibilidade dos fungos isolados a diferentes inseticidas utilizados no controle da praga. Esse trabalho foi dividido em dois capítulos intitulados : Capítulo I “Identificação e caracterização de *Fusarium proliferatum*, um novo fungo entomopatogênico, isolado do percevejobronzeado do eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)” e

Capítulo II “Identificação e caracterização de *Fusarium proliferatum*, um novo fungo entomopatogênico isolado do percevejobronzeado do eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)”

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. O eucalipto como recurso florestal

A área de plantio de *Eucalyptus* no mundo tem aumentado nas últimas décadas atingindo área de 20.071.201 ha em 2009, apresentando a seguinte distribuição, em milhões de hectares: 8,4 na Ásia, 6,9 na América, 2,9 na África, 1,3 na Europa e 0,9 na Oceania. O Brasil possui a maior área plantada no mundo, e junto com a Índia e a China, concentram mais de 50 % das plantações mundiais. Na América do Sul, o Brasil possui 4.515.700 ha, Chile com 683.143 ha, Uruguai com 676.096 ha e Argentina com 330.000 ha, representando quase 90 % da área plantada com *Eucalyptus* no continente americano (IGLESIAS et al., 2010).

O eucalipto é originário da Austrália e de outras ilhas da Oceania, e foi introduzido no Brasil na segunda metade do século XIX para colaborar na produção de dormentes e pontes para linhas férreas que se instalavam no país (MCT2008). As mais antigas espécies de eucalipto conhecidas no Brasil são os exemplares de *E. robusta* e *E. tereticornis* no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Na década 1905-1915 Edmundo Navarro de Andrade estabeleceu uma ampla gama de experimentos com 144 espécies de eucalipto, pela Companhia Paulista de Estrada de Ferro e mais tarde implantou o famoso horto florestal em Rio Claro, SP (FAO, 1980).

No Brasil a área plantada com eucalipto tem aumentado a cada ano com a finalidade de suprir a crescente demanda de produção de papel e celulose, madeira para chapas e construção civil, carvão vegetal, além da extração de óleos essenciais (MCT, 2008). A área de florestas com eucalipto está em franca expansão na maioria dos estados brasileiros com tradição na silvicultura deste grupo de espécies, ou em estados considerados como novas fronteiras da silvicultura, com crescimento médio de 7,1% ao ano entre 2004e2009 (ABRAF, 2010).

Segundo ABRAF (2012) em 2011 a área total de plantio de eucalipto foi de 4.873.952 ha, que se distribuem da seguinte maneira: em Minas Gerais (29 %), São Paulo (21%), Bahia (12 %), Mato Grosso do Sul (10 %), Rio Grande do Sul (6%), Espírito Santo (4%), Paraná (4 %) e demais estados (18%).

No Brasil, a produção de madeira em tora de eucalipto, em 2009, foi de 45,1 milhões de m³ e o consumo foi de 111.156.000 m³. O segmento de celulose e papel é o principal consumidor, absorvendo cerca do 47,3% das toras produzidas; a lenha industrial 29,1%, a indústria madeireira 2,8 %; o setor siderúrgico, por sua vez, consumiu 17,4% (carvão vegetal) e o de painéis reconstituídos com 2,6%. (ABRAF, 2010).

Com balança de exportação favorável os principais produtos exportados são celulose e papel, representando 59,2% e 30,1% respectivamente, do total exportado proveniente dos produtos de florestas plantadas (ABRAF, 2010).

A expansão na área plantada com eucalipto é resultado de um conjunto de fatores que vêm favorecendo o plantio em larga escala deste gênero. Entre os aspectos mais relevantes estão o rápido crescimento em ciclo de curta rotação, a alta produtividade florestal e a expansão e direcionamento de novos investimentos por parte de empresas de segmentos que utilizam sua madeira como matéria prima em processos industriais. Em particular, as expansões previstas no segmento de celulose e papel têm sido a alavanca do crescimento nas áreas plantadas deste grupo de espécies. (ABRAF, 2010).

4.2. Pragas do eucalipto

As plantações de eucalipto têm como principais problemas as pragas nativas como as formigas cortadeiras, cupins, lagartas desfolhadoras e besouros. Estas pragas apesar de terem sido registradas há muito tempo, como a broca do eucalipto (*Phoracanta semipunctata*) (Coleoptera: Cerambycidae) e os psilídeos de ponteiro (*Cteranytaina eucalypti*, *C. spatulata* e *Blastopsylla*

occidentallis) (Hemiptera: Psyllidae), não têm causado perdas econômicas, devido a presença de seus inimigos naturais e também devido ao fato das espécies e clones cultivadas não serem suscetíveis as mesmas. Mas nos últimos anos novas pragas tem sido introduzidas e disseminadas causando perdas nos plantios como o gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae), o psílideo-da-concha *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psyllidae), as vespas-de-galha *Leptocybe invasa* e *Epichrysocharis burwelli*, (Hymenoptera: Eulophidae) e o percevejo bronzeado *Thamaustocoris peregrinus*, (Hemiptera: Thaumastocoridae) (WILCKEN et al., 2008).

Gallo et al. (2002) relatam que a cultura do eucalipto pode ser atacada por cupins (*Coptotermes* spp., *Heterotermes* spp., *Anoplotermes* spp., etc.), formigas (saúvas - *Atta* spp. e/ou quenquéns – *Acromyrmex* spp.), lagartas desfolhadoras (*Sarsina violacens*, *Thyrintea arnobia*, *Eupseudosoma aberrans*, *Glena unipennaria*, dentre outras), besouros-de-folha (*Costalimaita ferruginea* e *Sternocolaspis quatuordecimcostata*, dentre outros), brocas (*Timocratica palpalis*), coleobrocas (*Achryson surinamum* e *Stenodontes spinibarbis*) e besouro-da-raiz (*Migdolus fryanus*).

Entre as pragas exóticas, *G. scutellatus* é conhecido no Brasil desde 1979, ocorrendo, nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (PEDROSA-MACEDO, 1990). *G. scutellatus* expandiu-se posteriormente, sendo detectada sua entrada nos estados de São Paulo em 1992 e Espírito Santo, em 2005 (Wilcken et al. 2008). O gorgulho-do-eucalipto causa danos importantes nas folhas tanto no estágio adulto quanto no estado larval, atacando diretamente os brotos foliares. Esta praga é controlada por seu inimigo natural, o parasitoide de ovos, *Anaphesnitens* (Hymenoptera: Mymaridae) presente no Brasil (PEDROSA-MACEDO , 1990) .

A broca do eucalipto *P. semipunctata* corresponde à principal espécie de coleobroca que ocorre em plantios de eucalipto, sendo relatada pela primeira vez no Brasil em 1950 (PEDROSA-MACEDO, 1990.) A partir de 1994, a *P. semipunctata* expandiu-se rapidamente nas regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil. Além de *P. semipunctata*, foi detectada também a ocorrência de *P. recurva* no estado de São Paulo (WILCKEN et al., 2002)

As larvas de *P. semipunctata* alimentam-se de floema, fazendo galerias em toras e árvores sob estresse ou doentes. O controle é efetuado mediante práticas culturais usando toras com casca utilizadas como “árvores-armadilha” que posteriormente são eliminados mediante a queima(PEDROSA-MACEDO, 1990).

Outrapraga exótica, o psílideo-de-concha *G. brimblecombei*, foi detectado no Brasil em junho de 2003 atacando *E. camaldulensis* e *E. tereticornis*, causando desfolha e propiciando a

fumagina. Um mês depois no mesmo ano foram detectados danos em árvores de clones de *E. grandis* x *E. urophylla* (“urograndis”), que inicialmente apresentavam algumas conchas brancas, e encontravam-se com secamento de ponteiros e desfolha entre 20 a 30 % e árvores com desfolha de até 100 %, sem possibilidade de recuperação. (WILCKEN, 2003).

O gênero *Glycaspis* se caracteriza por causar danos desse tipo comodescoloração das folhas, redução da área fotossintética das plantas, redução no crescimento das árvores e secamento dos ponteiros (CARNE, TAYLOR, 1984) podendo levar as árvores à morte, como nos surtos causados por *G. bailey* em *E. saligna* (ELLIOTT et al., 1998).

A vespa-da-galha *Leptocybe invasa*, de origem australiana, foi detectada pela primeira vez em abril de 2007 no nordeste da Bahia em clones de *E. camaldulensis* e híbridos desta espécie. A praga ataca as folhas, formando galhas nas nervuras centrais, pecíolos e ramos finos causando desfolha e secamento de ponteiros, quando presentes nos ramos mais finos.(WILCKEN, 2008).

Atualmente mais uma praga exótica foi encontrada atacando a cultura do eucalipto, trata-se do percevejobronzeado, detectado em junho de 2008 em Jaguariúna, SP. *Thaumastocoris peregrinus* é originário da Austrália, sendo encontrado na África do Sul, Zimbábue, Argentina, Uruguai, Chile e Paraguai. (WILCKEN et al., 2010).

4.3. Percevejobronzeado *Thaumastocoris peregrinus*

4.3.1 Taxonomia, morfologia e biologia

Dentro da Ordem Hemiptera encontra-se a família Thaumastocoridae, que corresponde a pequenos percevejos fitófagos, variando de 2,0 a 4,6 mm de comprimento. Atualmente duas subfamílias são conhecidas, Xylastodorinae, com dois gêneros: *Discocoris* Kormilev, relatado em América do Sul, e *Xylastodoris* Barber, relatado em Cuba e Flórida, (JACOBS, NESER 2005; CARPINTERO, DELLAPÉ, 2006); e Thaumastocorinae, com quatro gêneros: *Baclozygum* Bergroth encontrado na Tasmânia e continente australiano, *Onymocoris* Drake

e Slater relatado em Austrália e *Thaumastocoris* Kirkaldy encontrado em Austrália e África do Sul, e *Wechina* Drake e Slater, no sul da Índia (CARPINTERO ; DELLAPÉ, 2006).

O gênero *Thaumastocoris* foi proposto por Kirkaldy (1908) para a espécie *T. australicus*. O gênero *Thaumastocoris* (Hemiptera: Thaumastocoridae) é de origem australiana, com quatro espécies conhecidas. Entretanto, *T. peregrinus* é a quinta espécie desse gênero, sendo descrita fora da Austrália (CARPINTERO, DELLAPÉ, 2006).

A descrição taxonômica de *T. peregrinus* feita por Carpintero e Dellapé (2006) demonstrou que relatos anteriores sobre a ocorrência de *T. australicus* Kirkaldy 1908, em Pretória, África do Sul em 2003 (JACOBS ; NESER, 2005) e em Moreno, Argentina, em 2005 (NOACK ; COVIELLA, 2006), tratava-se na verdade da espécie *T. peregrinus*.

T. peregrinus é um percevejo pequeno de corpo achatado e com aproximadamente 3 mm de comprimento; em sua cabeça há presença de placas mandibulares desenvolvidas, antenas com quatro segmentos, sendo os apicais mais escuros, e olhos avermelhados nas ninfas. O comprimento do rostro dos machos e das fêmeas atinge, em média, 0,32 e 0,30 mm, respectivamente. Os adultos apresentam coloração marrom clara com áreas mais escuras, sendo a genitália do macho assimétrica, abrindo-se para o lado direito e se trata de uma espécie fitófaga tanto no estágio ninfal quanto no adulto (CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006).

Segundo Jacobs e Naser, (2005) a ágil locomoção observada se deve à presença de apêndices apicais nas tíbias, o que lhe confere a capacidade de aderir-se fortemente até mesmo em superfícies lisas.

Noack e Rose (2007) afirmam que o inseto apresenta 5 ínstaros ninfais, durando em média 20 dias, sob temperatura variável de 17 a 20°C, sendo que cada fêmea de ovipositar 60 ovos em média.

Sua fase ninfal dura aproximadamente 35 dias, podendo ter várias gerações ao longo do ano, quando o clima é favorável ao inseto (JACOBS ; NESER, 2005).

Segundo Crosa (2008) os ovos são colocados tanto no limbo foliar como nos ramos, estes são pretos apresentando uma leve concavidade na região central do exocóron. Cada fêmea coloca em média 2 ovos por dia, apresentando uma longevidade de 30 dias. Os ovos são colocados agregados ou individualmente, principalmente em locais protegidos, tanto como em regiões irregulares da folha.

4.3.2. Dispersão de *T. peregrinus*

Em 2003, indivíduos de *T. peregrinus* foram registrados pela primeira vez fora de sua área de distribuição natural, causando os danos em plantações comerciais de diversas espécies dos eucaliptos em África do Sul (JACOBS, NESER, 2005). Em 2004 o surto estendeu-se para Zimbábue, afetando plantações comerciais de eucaliptos (CHILIMA, 2007).

Em 2005 os primeiros indivíduos foram encontrados em Buenos Aires, Argentina. Posteriormente a sua identificação, relacionaram essa espécie com os surtos observados na África do Sul no 2003 (MARTÍNEZ, BIANCHI, 2010)

No Uruguai, os primeiros indivíduos de *T. peregrinus* foram coletados no janeiro de 2008 no departamento de Tacuarembó. Atualmente sua presença tem sido confirmada em todo o país (MARTÍNEZ, BIANCHI, 2010).

No Brasil o percevejo bronzeado foi detectado em junho 2008, na fazenda de Monte Carmelo, em Jaguariúna, SP em árvores isoladas do *E. camaldulensis*. Ovos, ninfas e adultos foram coletados nas folhas e nos ramos. As árvores atacadas mostraram as folhas bronzeadas e desfolhamento em ramos severamente infestados (WILCKEN et al., 2010).

Este inseto foi relatado também em São Francisco de Assis, RS, em maio de 2008, em um clone híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*. Entretanto, após de um período frio em o final de maio e junho, o inseto não foi observado. Posteriormente, em janeiro de 2009, a praga foi encontrada em vários municípios do Rio Grande do Sul. A dispersão do inseto ocorreu provavelmente de forma natural, movendo-se pelas fronteiras de países vizinhos (Argentina e Uruguai). Em dezembro de 2008, o percevejo foi confirmado em Belo Oriente e Curvelo, MG e em julho, 2009 foi detectado em Linhares, ES. Em outubro de 2009 *T. peregrinus* foi confirmado em Resende, RJ, Curitiba, PR e em Nova Andradina e Três Lagoas, MS (WILCKEN et al., 2010).

No estado de São Paulo, pode ter chegado por aviões, já que o inseto foi encontrado em árvores do *Eucalyptus* próximo aos aeroportos internacionais de Viracopos, em Campinas, e em Guarulhos, na região metropolitana da cidade de São Paulo. (WILCKEN et al., 2010).

Sua dispersão é rápida e pode estar sendo influenciada pelo homem, pois as detecções iniciais têm sido feitas em árvores isoladas ou plantios de quebra-ventos nas margens das principais rodovias de São Paulo. É possível que o inseto esteja sendo disseminado por caminhões que

transportam toras de eucalipto, onde normalmente observa-se presença de ramos e folhas de eucalipto (WILCKEN et al, 2010).

4.3.3. Preferência alimentar

A seleção da planta hospedeira por parte de um inseto envolve a escolha da planta hospedeira dentro de um grupo de espécies, apropriadas para se alimentar, sobreviver e desenvolver-se. Os insetos fazem uso de uma grande quantidade de modalidades sensoriais, onde a integração de sinais visuais, olfatórias e gustativas, permite-lhes orientar-se para encontrar hospedeiros adequados. Dentro dos fatores visuais encontram-se a cor, a forma e o tamanho, e dentro dos fatores olfativos encontram-se os compostos voláteis emitidas por as plantas. (MARÍN-LOAIZA, CÉSPEDES, 2007).

As plantas produzem e emitem inúmeros compostos voláteis orgânicos, tanto nas flores e frutos, como os tecidos vegetativos. Há mais de duas décadas se determinou a influência de voláteis em relação com funções fisiológicas e ecológicas. Geralmente estas misturas são formadas por terpenos, derivados de ácidos graxos e compostos aromáticos. A importância dos voláteis das plantas consiste em que podem atuar como sinais para outros organismos (MARÍN-LOAIZA, CÉSPEDES, 2007).

As relações entre um fitopatógeno e planta hospedeira podem ser complexas, mas a descoberta de estes compostos voláteis pode ser aproveitado em o manejo comportamental dos fitopatógenos. Além dos voláteis atrativos existem também os compostos repelentes aos insetos como mecanismo de defesa das plantas (CAVALCANTI, 2010).

O fato da determinação da preferência alimentar do percevejo bronzeado aos diferentes genótipos de *Eucalyptus* constitui uma ferramenta chave no momento de conhecer quais são os materiais suscetíveis e quais apresentam mais resistência. A resistência de plantas apresenta-se como uma das alternativas para manejo de *T. peregrinus*. Em estudo com a intensidade de infestação de algumas espécies de eucalipto ao ataque de *T. peregrinus* na África do Sul, demonstrou que as espécies com maior suscetibilidade são: *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e o híbrido *E. camaldulensis* x *E. grandis* (JACOBS, NESER, 2005).

4.3.4. Danos de *T. peregrinus* em eucalipto

Os danos ocasionados são o prateamento, seguindo de secamento e quedas dessas folhas. As árvores ficam com aspecto bronzeado e a copa seca (Figura 1). Esse dano é devido ao hábito alimentar do percevejo, que perfura as folhas e ramos finos para sugar seiva, deixando as folhas secas e levando à desfolha das árvores.

Tanto as ninfas como os adultos atacam preferencialmente as folhas mais velhas, porém já foi verificada a ocorrência de ataque em ponteiros de plantas adultas e também em plantas jovens.



Figura 1. Danos causados em plantios de *E. dunnii* causados por *T. peregrinus*. Alegrete, RS, 2011.

4.3.5. Estratégias de controle para *Thaumastocoris peregrinus*

Assim como para qualquer outra espécie de inseto que atinge surtos populacionais, *T. peregrinus* é considerado praga do eucalipto, pois apresenta alta capacidade de causar danos, ciclo de desenvolvimento curto e alto potencial reprodutivo, o que facilita a colonização de novas áreas. Deste modo, trabalhos referentes ao controle são indispensáveis para estabelecimento de um programa para manejo integrado de *T. peregrinus* no eucalipto.

O manejo integrado de pragas (MIP) é uma filosofia que envolve integração dos métodos de controle de infestações de uma praga, que se fundamenta em princípios ecológicos e nos fatores de mortalidade naturais. O MIP procura desenvolver táticas de controle que interfiram minimamente com esses fatores com o objetivo de diminuir as chances dos insetos ou doenças de se adaptarem a alguma prática defensiva em especial. Quando bem empregada, a técnica do Manejo Integrado de Pragas (MIP) limita os efeitos potenciais prejudiciais dos pesticidas químicos à saúde pública e ao ambiente. (COULSON; WITTER, 1990)

Resistência de Plantas

A resistência de plantas a pragas apresenta-se como uma das alternativas para manejo de *T. peregrinus*, pois relatos de ocorrência são feitos nas diversas espécies e híbridos sendo possível, com o tempo, observar preferência. Porém, não existem estudos efetivos que comprovem a causa da resistência.

Santadino (2009), em estudo de preferência de *T. peregrinus* a *E. tereticornis*, *E. viminalis*, *E. dunnii* e *E. grandis*, verificou que, para preferência a alimentação e oviposição, *E. dunnii* foi o mais preferido que as demais espécies.

Controle químico

O controle químico geralmente é recomendado como “tratamento de choque” em surtos populacionais que resultam no controle momentâneo, mas avaliação de ingredientes ativos, doses letais e formas de aplicação são necessários para controle efetivo de *T. peregrinus*.

Howard e Stopek (1998), aplicando o inseticida sistêmico Imidacloprid por imersão de raízes, verificaram alta eficiência no controle de populações do percevejo *Xylastodoris luteolus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em palmeira *Archontophoenix alexandrae* na Flórida, com pelo menos três meses de controle efetivo.

Devido às preocupações ambientais e ocorrência de *T. peregrinus* em áreas urbanas torna-se viável a aplicação localizada em substituição a foliar (LAWSON, DAHLSTEN 2003), além da dificuldade de acesso a copa das árvores grandes. Assim, Noack et al. (2009) utilizaram inseticida injetado no tronco.

Tendo em vista a necessidade de investigar doses de inseticidas necessárias para manter o nível populacional desejado, Noack et al. (2009) concluíram que árvores tratadas com imidacloprid mostraram redução significativa nas populações de *T. peregrinus* quando comparado com árvores não tratadas. Os mesmos autores do estudo sugerem microinjeção deste produto químico, com dose de 3 a 5 mL/10 cm do DAP (diâmetro a altura do peito) foi efetiva no controle de *T. peregrinus* de dois a três meses.

Controle biológico

Inimigos naturais podem servir como agentes de controle biológico de *T. peregrinus*, como predadores (joaninhas, crisopídeos, sirfídeos e reduvídeos), parasitóides e entomopatógenos, porém são escassos os trabalhos sobre agentes de controle biológico para essa praga. *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) foi encontrado predando ninfas de *T. peregrinus* no Brasil (WILCKEN et al., 2010).

Quanto à parasitoides, até o momento foi relatada somente a ocorrência do parasitóide de ovos em *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae) em Sydney (Austrália) (LIN et al., 2007). Atualmente, *C. noacke* está sendo introduzido no Brasil, sendo a primeira tentativa em novembro do 2011, com os insetos mantidos no Laboratório de Quarentena “Costa Lima”, EMBRAPA Meio Ambiente, e atualmente encontra-se em fase de multiplicação (WILCKEN, informação pessoal).

Controle microbiano

O controle microbiano de insetos encontra-se como uma alternativa possível para o controle biológico de insetos, e especificamente no controle de pragas florestais como o percevejo bronzeado

A patologia de insetos é a ciência que estuda as doenças dos insetos, abrangendo a etiologia, a sintomatologia e a epizootiologia, visando utilizá-las para o controle de pragas. O controle microbiano é a principal meta da patologia de insetos e representa um ramo do controle biológico de insetos. Este por sua vez, trata da utilização racional dos patógenos, visando a manutenção da população das pragas a níveis aceitáveis de danos econômicos (ALVES, 1998).

Dentro dos microrganismos patogênicos causadores de doença em insetos encontram-se os fungos, vírus, protozoários, nematoides, riquétsias e micoplasmas, que atuam isoladamente ou associados.

A epizootiologia estuda os fatores que determinam ou controlam o desenvolvimento das doenças em populações de insetos. Esse estudo envolve as causas da variação dos níveis de doença em diferentes. Os principais objetivos da epizootiologia aplicada às doenças dos insetos são

estudar e descobrir o ciclo de vida dos patógenos procurando explicar a ausência ou elevada ocorrência em populações de insetos assim como o poder quantificar a ocorrência (ALVES, 1998).

4.4 Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados. A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens no controle microbiano de insetos. Com técnicas apropriadas é possível selecionar isolados de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos, visando o controle de grande número de pragas das culturas econômicas. Aproximadamente 80 % das doenças tem como agentes etiológicos os fungos, pertencentes a 90 gêneros e mais de 700 espécies. A maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos relatados já ocorre no Brasil. A ocorrência desses fungos, em condições naturais, tanto enzoótica como epizooticamente tem sido fator importante na redução das populações de pragas (ALVES, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são os que têm recebido atenção pela quantidade de espécies e hospedeiros. Certos fungos possuem características muito especiais o que os permite sobreviver em forma parasítica sobre os insetos e em forma saprofítica sobre o material vegetal em decomposição. O crescimento saprófito pode dar como resultado a produção de conidióforos, conídios e desenvolvimento do micélio. Esta característica permite que o fungo possa ser cultivado no laboratório utilizando as técnicas de produção massiva de baixo custo. Os fungos têm grande potencial para serem empregados como biocontroladores. Entre os principais fungos entomopatogênicos encontram-se aqueles pertencentes à subdivisão Deuteromycotina: Hyphomycetes, tais como os gêneros: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*, *Nomurae*, *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Sorospora*, *Tolypocladium* e *Sporothrix*. (ALVES, 1998).

Em Boa Esperança do Sul, SP, foi feito o primeiro relato de um fungo entomopatogênico infectando *T. peregrinus* em condições naturais. Trata-se de *Zoophthora radicans*, um fungo da ordem Entomophorales, coletado durante uma epizootia a partir de ninfas e adultos mortos, ocorrida em plantações de eucalipto em 2009. (MASCARIN et al., 2012).

Relação fungo - hospedeiro

Os fungos podem afetar insetos que vivem no solo e partes aéreas, podendo causar doença e afetar ao hospedeiro em todas as partes desenvolvimento do inseto (ovo, larva, pupa e adulto). Dependendo do fungo e seu hospedeiro o modo de penetração ao inseto é via tegumento, por intermédio de propágulos, esporos, zoósporos, zigosporos, esclerócios, clamidiósporos e esporodóquios. Os conídios e esporos disseminam-se horizontalmente por vento, chuva e insetos. O ciclo de relações fungo-hospedeiro depende em grande medida das condições ambientais como umidade e temperatura. (ALVES, 1998).

Resulta importante para o desenvolvimento deste trabalho ter conhecimento dos mecanismos de ação dos fungos entomopatogênicos. Esses fungos iniciam o processo infeccioso em insetos hospedeiros quando os esporos viáveis ficam retidos pelo contato com a superfície do tegumento, até encontrar um espaço adequado para estabelecer-se e conseguem desenvolver tubos germinativos e, por vezes, apressórios, o que facilita a invasão do fungo. (HAJEK, 1997; DESHPANDE, 1999; MILNER, 2000; ASAFF et al, 2002; BARRANCO et al, 2002; DIAZ 2006).

Tem sido sugerido que os íons divalentes, como Ca^{+2} e Mg^{+2} , reduzem as forças de repulsão eletrostática da superfície do inseto, e pode assim influenciar a sua hidrofobicidade e promover a adesão da célula fúngica à parede da cutícula, criando condições favoráveis para o estabelecimento do esporo e da subsequente invasão do hospedeiro (HAJEK, 1997; DESHPANDE, 1999; MILNER, 2000; ASAFF et al., 2002; BARRANCO et al., 2002).

A germinação de esporos é iniciada por expansão do mesmo, que é favorecida por uma umidade elevada (70% por 14h), a germinação é desencadeada por mensageiros que são geralmente hidratos de carbono presentes nas proteínas da cutícula de insetos (HEGEDUS KHACHATOURIANS, 1995; KHACHATOURIANS, 1996). A hidratação do esporo é favorecida pela ação antidessecante da tampa mucilaginosa, também funciona como um escudo na presença de polifenóis tóxicos e enzimas segregadas pelo sistema imunológico do inseto. *Metarhizium anisopliae* tem elevado teor de aminopeptidases e hidrofobina, que favorecem a ação de enzimas extracelulares na cutícula de insetos. No entanto, esterases e proteases têm sido encontradas em conídios não-germinados, sugerindo modificação da superfície cuticular antes da germinação, uma vez que durante a hidratação de esporos não apenas absorve água, mas também nutrientes (JONES, 1994; KERSHAW, TALBOT, 1998; DIAZ, 2006;).

Após o inchaço dos esporos tem lugar a formação do tubo germinativo pelo processo de polarização do crescimento apical de fungos, que estimula a síntese da parede celular. H^+ e Ca^{2+} entram na extremidade da hifa por um mecanismo de transporte passivo e são acionados por mecanismos dependentes de energia. Este fluxo transcelular permanece constante e mantém o desenvolvimento do tubo de germinativo e formação de apressórios. O tubo germinativo reconhece a superfície do corpo do inseto, localizando sítios de receptor, permitindo que as hifas penetrem na cutícula (WESSELS, 1999).

O apressório serve para ancorar o esporo e exerce uma pressão para dentro do inseto. Em paralelo, o fungo excreta grande quantidade de enzimas entre os quais incluem proteases, quitinases, quitobiasas, lipases, lipoxigenases e outras enzimas hidrolíticas, que iram degradar a cutícula e, por sua vez, fornecem nutrientes para o fungo (ALVES, 1998). Uma vez dentro do inseto, o fungo prolifera formando corpos de hifas secundárias com ramificação para a procutícula, composto principalmente de fibrilas de quitina lameladas incorporados em uma proteína de matriz que atua como uma cobertura de proteção nas secreções extracelulares do patógeno. Em seguida, os corpos de hifas encontram com a camada epidérmica e com a respectiva membrana basal, propagando-se pela hemocele. Assim, várias estruturas invadem o tecido muscular, corpos gordurosos, túbulos de Malpighi, mitocôndrias, hemócitos, retículo endoplasmático e a membrana nuclear (DIAZ, 2006).

Com o esgotamento dos nutrientes, o fungo começa a invadir, com crescimento micelial, todos os órgãos do hospedeiro. Finalmente, as hifas atravessam a cutícula do inseto de dentro para fora e emergem na superfície, iniciando a formação de esporos quando a umidade relativa é adequada (GILLESPIE, CLAYDON, 1989; DIAZ, 2006).

Produção de toxinas

A capacidade dos fungos de sintetizar toxinas entomopatogênicas são estudadas com o objetivo de elucidar o modo de ação dos fungos sobre os insetos, procurar novos produtos para o controle da praga e selecionar isolados altamente toxicogênicos para serem utilizados no controle. (ROBERTS, 1981;ALVES, 1998).

Várias espécies de fungos entomopatogênicos são capazes de produzir ácidos orgânicos e alguns deles têm sido implicados no processo de infecção. Por exemplo, tem sido relatado a produção de ácido oxálico por *Beauveria* spp, *Lecanicillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Metarhizium anisopliae* (HEGEDUS, KHACHATOURIANS, 1995., ASAFF et al, 2006). Este composto tem sido descrito como um fator de virulência em fungos fitopatogênicos e tem sido sugerido que, no caso de fungos entomopatogênicos, pode ser um elemento que contribui para a solubilização da proteína cuticular (BIDOCHKA, KHACHATOURIANS, 1991; DIAZ, 2006). Outro importante composto produzido por alguns fungos entomopatogênicos, entre os quais *Paecilomyces* spp. e *M. anisopliae* é o ácido 2,6-piridinodicarboxílico (ácido dipicolínico). (ASAFF et al., 2006), que tem propriedades inseticidas contra larvas de *Calliphora erythrocephala*(Diptera: Calliphoridae) (CLAYDON, GROVE, 1982).

Também foram relatadas toxinas peptídicas cíclicas e lineares. Na primeira parte de uma família de peptídeos conhecidos como depsipeptídeos. O primeiro composto desta natureza para ser caracterizado foi a beauvericina, extraída a partir do micélio de *Beauveria bassiana*, e foi subsequentemente isolada a partir de diferentes espécies de *Fusarium* e *Paecilomyces* (LOGRIECO et al., 1998). Outros depsipeptídeos são isolados a partir de eniatinas de *Fusarium* (GROVE, POPLE, 1980), que são tóxicas contra larvas de lagartados ponteiros do abeto (*Choristoneura fumiferama*) (Lepidoptera: Tortricidae). A ação inseticida destes depsipeptídeos é específica para certos grupos de insetos e sua toxicidade é devido à ação sinérgica de um complexo de compostos, entre os quais incluem beauvericina. Alguns isolados de *M. anisopliae* produziram as chamadas destruxinas, como a dimetildestruxina e protodestruxina, e estão relacionados com a virulência (CLAYDON, 1989; KERSHAW, TALBOT, 1998; GILLESPIE; MONZÓN, 2001; DIAZ, 2006).

Caracterização molecular de fungos entomopatogênicos

Em epidemiologia, ecologia e manejo integrado de pragas é importante identificar com precisão as espécies de entomopatógenos. A identificação de fungos entomopatogênicos é realizada geralmente por características morfológicas e culturais, porém, tem sido necessário o uso de outros métodos rápidos, confiáveis e sensíveis para a diferenciação de entomopatógenos, como marcadores moleculares. Esses métodos diferem em poder discriminatório, reprodutibilidade, facilidade de interpretação e padronização. Os marcadores genéticos são classificados tendo em conta a localização cromossômica (anônima ou definida), na localização celular (nuclear ou citoplasmática) e quanto à especificidade de detecção (*multilocus* ou *monolocus*). Neles, os mais usados são os marcadores protéicos (isoenzimas), os polimorfismos de comprimento de fragmentos (polimorfismo de restrição (RFLP) de polimorfismos de DNA mitocondrial, de nucleótido simples (SNP) e unidades de repetição em tandem, ou minissatélites (VNTR) ou microssatélites (STR). (MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M.; ARBEIT, R., 1993).

Uma das técnicas atualmente empregadas na identificação molecular de fungos entomopatogênicos é a de reação em cadeia (PCR). Desde a sua primeira descrição por Saiki, em 1985, a reação em cadeia (PCR) tem tido impacto significativo em muitos campos da biologia. Seu princípio é muito simples e é baseado na amplificação de DNA *in vitro*, na qual resulta na replicação exponencial da mesma sequência alvo em um milhão de vezes, mesmo na presença de grandes quantidades de moléculas de DNA, dando como produto um DNA altamente homogêneo, o que torna-se excelente fonte para várias manipulações moleculares (LINZ, 1991).

Fegan et al (1993) e Hegedus, et al. (1996) exploraram a técnica de PCR, a fim de identificar e diferenciar os isolados de *B. bassiana*, e revelam o elevado grau de diversidade genética em *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

A escolha do programa de temperatura é um critério importante para o controle PCR, porém, os fatores mais importantes para a repetibilidade são a pureza relativa e a regulação correta da concentração da amostra de DNA e a concentração dos iniciadores amplificadores (RIVERA, BUSTILLO, BRIDGE, 1997).

CAPÍTULO I

Identificação, caracterização e patogenicidade de *Paecilomyces cateniannulatus*, isolado do percevejo bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) e efeito de inseticidas neonicotinoides sobre seu crescimento

(baseado nas normas do periódico Neotropical Entomology)

Resumo-Nos últimos anos as plantações de eucalipto vem aumentando e com isso novas pragas têm sido introduzidas e disseminadas, entre elas está o percevejo bronzeado (*Thaumastocoris peregrinus*). O percevejo bronzeado é uma praga exótica que reduz a produtividade dos plantios de eucalipto. Ao se alimentarem, por meio de sucção, este inseto provoca clorose nas folhas, que evoluem para um aspecto bronzeado, podendo causar queda prematura das folhas. Até o momento não há inseticidas registrados no Brasil para controle deste inseto no campo. Portanto, o estudo de técnicas alternativas de controle se faz necessária para a regulação da população deste inseto em plantações de eucalipto. Desta forma, o presente trabalho teve o objetivo de estudar e caracterizar o fungo *Paecilomyces* sp., isolados de insetos mortos em epizootia nas plantações de eucalipto. A caracterização do fungo foi realizada através de estudos morfológicos, culturais e moleculares. Além disso foram realizados testes de patogenicidade e o acompanhamento da colonização do inseto pelo fungo por técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Também foi verificada a sensibilidade deste fungo a inseticidas usualmente aplicados em eucalipto, no controle de outras pragas. Segundo sequenciamento de seu DNA o fungo foi identificado como *Paecilomyces cateniannulatus*, corroborando com as caracterizações culturais e morfológicas. Nos testes de patogenicidade foi observado que esta espécie tem a capacidade de causar a morte do inseto 24 horas depois da aplicação, sendo que, pelo acompanhamento da colonização do inseto via MEV, foi observada a penetração do fungo no corpo do inseto quatro horas após a inoculação. O fungo não apresentou sensibilidade expressante aos inseticidas testados (Tiametoxam e Imidacloprid). De forma geral, *P. cateniannulatus* mostra-se com alto potencial entomopatogênico e que pode ser melhor estudado para futuramente ser usado para controle de *T. peregrinus* em plantações de eucalipto.

Palavras-chave: percevejo bronzeado, praga, *Eucalyptus*, controle microbiano.

IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF *Paecilomyces cateniannulatus*, A NEW ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS OF EUCALYPTUS BRONZE BUG *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) AND EFFECT OF NEONICOTINOID INSECTICIDES ON ITS GROWTH

Summary-Eucalyptus plantations have increased steadily and reached 20 million hectares in 2009. New pests have been introduced and disseminated and have caused widespread crop losses, one example is the bronze bug (*Thaumastocoris peregrinus*). The bronze bug is an exotic pest that reduces and affects the productivity of eucalyptus plantations. When they feed, by suction, it causes leaf chlorosis, which develops into a bronze color and eventually can triggers premature leaf loss. Integrated Pest Management (IPM) technique limits the potentially harmful effect of chemical pesticides in public health and the environment, and thus insect microbial control is an alternative for biological control. Hence the present work objectives are to study and characterize *Paecilomyces* sp. fungi, isolated form dead insects collected in epizooties in eucalyptus plantation. Fungus characterization was performed by morphological, cultural and molecular studies (sequencing of the ITS regions and α -elongase). Furthermore, pathogenicity tests and monitoring of insect colonization were carried out, through observation under Scanning Electron Microscopy (SEM), in addition sensitivity to insecticides were also tested. According to its DNA sequencing the fungus was identified as *Paecilomyces cateniannulatus*, which corroborates the findings with those of cultural and morphological characterization, where the fungus developed into a white color colony, with oval to ellipsoidal conidia with size of 2 to 3.5 x 0.8 to 2.5 μ m. The fungus has the capacity to cause the insect's death in 24 hours after treatment as observed in the pathogenicity tests. Moreover, the fungus has the facility to penetrate the insect's body through natural openings and by cuticle degradation 4 hours after inoculation, as observed via SEM. No significant sensitivity to insecticides (thiamethoxam and imidacloprid) was observed, even though daily growth was slower when compared to non-treated, with no significant statistical difference among doses (0, 1, 10, 100 and 1000 ppm). Consequently, *P. cateniannulatus* is a potential entomopathogenic fungus which can be further used to control *T. peregrinus* in *Eucalyptus* plantations.

Key words: bronze bug, pest, *Eucalyptus*, microbial control.

INTRODUÇÃO

A área de plantio de eucalipto no mundo tem aumentado nas últimas décadas atingindo área de 20 milhões de hectares em 2010. Segundo ABRAF (2012) em 2010 a área total de plantio de eucalipto no Brasil foi de 4.755.730 ha. Com isso, novas pragas vem sendo detectadas nesta cultura, causando danos relevantes. Dentre estas novas pragas encontra-se o percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae).

O percevejo bronzeado foi detectado pela primeira vez no Brasil em 2008 e rapidamente se transformou em um problema. Este inseto, ao atacar plantas de eucalipto, reduz e afeta a produtividade, por reduzirem a área foliar destas. As ninfas e os adultos alimentam-se por sucção de seiva, provocando prateamento das folhas, que evoluem para clorose ou bronzeamento, e levando ao desfolhamento das árvores. Essa praga de eucalipto é considerada espécie invasora em vários países, ocorrendo na África (África do Sul e Zimbábue), América do Sul (Argentina, Uruguai, Brasil, Chile e Paraguai) e Europa (Itália) (JACOBS, NESER, 2005; CARPINTERO, DELLAPÉ, 2006; WILCKEN et al., 2010; MARTINEZ, BIANCHI, 2010; LAUDONIA, SASSO, 2012).

O controle químico geralmente é utilizado em surtos populacionais, porém, este não é recomendado devido ao risco de impacto ambiental, além da falta de ingredientes ativos registrados pelos órgãos federais. Inimigos naturais como joaninhas, crisopídeos, sirfídeos e reduviídeos são citados como inimigos naturais de *T. peregrinus*, mas são escassos os trabalhos comprovando a efetividade no controle biológico. Até o momento foi relatada somente a ocorrência de *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae), parasitando ovos deste inseto, em Sydney (Austrália) (LIN et al., 2007).

C. noackae foi introduzido no Brasil pela primeira vez em novembro de 2011 e atualmente encontra-se em fase de estudos de adaptação para possível multiplicação (WILCKEN, informação pessoal). Outra alternativa que vem sendo estudada para controle dessa praga é o emprego de organismos entomopatogênicos. No Brasil foi relatada a ocorrência de *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) sobre ninfas e adultos de *T. peregrinus* em plantações clonais de eucalipto no estado de SP em 2009 (MASCARIN et al., 2012). Entretanto, esse grupo de fungos

entomopatogênicos são de difícil multiplicação em escala comercial para uso em campo (ALVES, 1998).

Entre os principais fungos entomopatogênicos usados para controle de insetos encontram-se os do gênero *Paecilomyces* (ALVES, 1998). Este gênero pertencente a Classe Deuteromycotina e subdivisão Hiphomycetes, reúne diversas espécies entomopatogênicas sendo as mais frequentes: *P. farinosus*, *P. amoeneroseus*, *P. cicadidae* e *P. fumoroseus*, *P. teunipes*, dentre outros.

A forma perfeita ou teleomorfa pode ocorrer como ascomiceto (*Cordyceps*, *Torrubiella*). Esse fungo penetra normalmente via tegumento usando a pressão física e química proporcionada pelo apressório e grampo de penetração. Este fungo já foi observado sobre lepidópteros, coleópteros, hemípteros e ortópteros. Há relatos de isolamento deste fungo em *Stenoma decora* (Lepidoptera: Stenomidae) na BA, *Eupseudosoma* spp. (Lepidoptera: Arctiidae) em SP e MT e em adultos de *Lagria villosa* (Coleoptera: Lagriidae), oriundos de várias regiões (ALVES, 1998).

Em estudos realizados em áreas de eucalipto atacadas por *T. peregrinus* foi observada a ocorrência de uma epizootia em plantações de eucalipto, localizada em Alegrete, RS. A partir de insetos mortos nessa epizootia foram isolados alguns fungos entomopatogênicos, sendo um deles identificado como *Paecilomyces* sp., ainda não registrado como patogênico a *T. peregrinus*. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização morfológica, biológica, patogênica e molecular de *Paecilomyces* sp. isolada de *T. peregrinus*. Além disso, foi realizado o estudo da infecção do fungo no inseto, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e verificada a sensibilidade deste isolado a diferentes inseticidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de desenvolvimento do trabalho

O estudo foi realizado no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais e no Laboratório de Fitopatologia da FCA/UNESP – Campus de Botucatu.

Coleta de insetos e isolamento do fungo

Foram coletados indivíduos de *T. peregrinus* mortos em epizootia nas plantações de eucalipto da empresa Stora Enso, na região de Alegrete, RS. A coleta de insetos foi realizada em novembro de 2011 diretamente na copa das árvores. As coletas dos indivíduos com presença de micélio sobre seu corpo foram utilizadas como característica primordial para a escolha das amostras (Figura 1 e Figura 2).

Os insetos coletados foram acondicionados em câmara úmida para propiciar esporulação dos fungos observados nos corpos de ninfas e adultos. Após 24 horas estes insetos foram submetidos à esterilização com solução de hipoclorito de sódio, álcool 70% e água esterilizada e, posteriormente, foram colocados em placas de petri contendo meio água-ágar, para isolamento do fungo. Após a observação do crescimento da colônia, esta foi repicada para meio BDA (batata-dextrose-agar) para posterior identificação.



Figura 1. A. *T. peregrinus* sobre folha de eucalipto no campo. B. *T. peregrinus* doentes (1) e sadios (2), coletados nas epizootias no campo.



Figura 2. *T. peregrinus* com extrusão de micélio de *Paecilomyces* pelas articulações e orifício anal

Obtenção de isolados monospóricos

Para a obtenção de culturas monospóricas, as colônias obtidas dos isolamentos foram lavadas com água destilada esterilizada e as concentrações das suspensões de esporos foram padronizadas para aproximadamente 10^2 esporos/mL. Foram colocados 100 μ l da suspensão de esporos em placas contendo meio água/ágar, acrescido de 0,005% de oxitetraciclina. Pela visualização em microscópio óptico, os esporos foram individualizados e transferidos com alfinete entomológico para meio BDA para formação das colônias.

Teste de patogenicidade em *T. peregrinus*

O objetivo do teste foi avaliar o potencial entomopatogênico do isolado. Para realização dos bioensaios dos testes de patogenicidade utilizaram-se insetos adultos sadios de *T. peregrinus* obtidos de criação em laboratório. A partir da obtenção do isolado puro do fungo a partir dos insetos foram escolhidas algumas placas para fazer os testes de patogenicidade. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado com dois tratamentos (patógeno e testemunha) e

4 repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri. Cada placa continha gel estéril e um disco de folha de *Eucalyptus camaldulensis*.

O isolado do fungo obtido foi pulverizado em torre de Potter com volume de 3 mL de suspensão de cada isolado, com concentração 10^6 esporos/mL (diluído com água destilada autoclavada e Tween 20 a 0,02%), à pressão de 15 lb/pol². Para a testemunha, foi realizada a aspersão utilizando unicamente água destilada autoclavada, com Tween 20 a 0,02 %. Após inoculação, os tratamentos foram colocados em câmara BOD a 25 °C e fotofase de 12 horas. Foram realizadas avaliações diárias do experimento, contando e retirando os insetos mortos até 6 dias ou mortalidade total de um dos tratamentos. Os insetos mortos foram colocados em câmara úmida para re-isolamento dos fungos e confirmação da mortalidade pelo isolado inicialmente aplicado.

Processo de colonização do fungo no inseto

Para complementação dos estudos de patogenicidade, foi realizado o acompanhamento da colonização do isolado do fungo selecionado sobre o corpo do inseto. Para isso uma suspensão contendo 10^6 esporos/mL foi pulverizada diretamente sobre os insetos vivos. Como testemunha, foi feita a pulverização com água destilada autoclavada.

Após a inoculação, conforme metodologia descrita para o teste de patogenicidade, os insetos tratados foram coletados em intervalos de tempo pré-determinados (2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas) e fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, pH 7,2), por período mínimo de 24 h. Após isso as amostras de insetos foram preparadas e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) LEO435-VP, sendo avaliados cinco insetos para cada intervalo de tempo pré-determinado.

As amostras de insetos inoculados foram retiradas do fixador Karnovsky e submetidas ao vapor de OsO₄ por 24 h. Decorrido este tempo as amostras foram colocadas em sílica gel, para completar a secagem. Após completa a desidratação as amostras foram cuidadosamente montadas em “stubs” com fita de carbono dupla face para aderência das amostras e cobertas com 20 nm de ouro em aparelho Baltec SCD 050 (Figura 3). A preparação e observação das amostras foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica, localizado na ESALQ/USP (Figura 3).



Figura 3. Amostras de *T. peregrinus* montadas em “stubs” (esquerda) e Microscópio eletrônico de Varredura (MEV) - ESALQ/USP (direita).

Caracterização biológica do crescimento

A caracterização cultural dos isolados foi baseada na velocidade de crescimento micelial, cor da colônia e estruturas produzidas, quando cultivados em meio de cultura BDA. Para o isolado, discos de micélio com 6 mm de diâmetro foram obtidos das bordas de uma colônia cultivada por 10 dias em meio de cultura BDA e transferidos para o centro de novas placas de Petri contendo o mesmo meio. Após a repicagem, os isolados foram incubados à temperatura de 25 ± 1 °C e fotofase de 12 h. A avaliação do crescimento da colônia foi realizada diariamente, pela mensuração do diâmetro da colônia na placa com régua milimetrada. A velocidade média de crescimento micelial foi utilizada para as análises estatísticas.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta por uma placa.

Caracterização morfológica

Neste experimento foi determinado o tamanho de todos os tipos de esporos produzidos pelos isolados encontrados. Para avaliação dos esporos foram preparadas lâminas semi-permanentes com lactofenol. A mensuração desses esporos foi realizada utilizando-se sistema de

vídeo-câmara Opton, modelo TA-0124XS, instalada em microscópio óptico. A imagem foi transmitida para computador e analisada por meio do programa EDN-2. Para a calibração do equipamento, utilizou-se uma lâmina micrografada (Carl Zeiss®). Foram avaliados 30 esporos de cada isolado.

Caracterização molecular do isolado selecionado

A extração de DNA do isolado selecionado no experimento de patogenicidade foi realizada conforme o método desenvolvido por Murray e Thompson (1980), modificado. Em cada tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foram macerados 3 discos de micélio com 1000 µL de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2 % CTAB; 0,2 % β-mercaptoetanol). Em seguida, os tubos foram incubados a 65°C, por 30 minutos. Subsequentemente, foram adicionados 500 µL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) aos tubos e estes foram misturados manualmente, por agitação, durante 10 minutos e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi removida para novos tubos com isopropanol. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm e o “pellet” obtido foi lavado com 500 µL de etanol 70% e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água com DEPC (Dietilpirocarbonato).

A amplificação da região ITS do DNA do fungo selecionado foi feita utilizando os pares de primers ITS 1 (5´ TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3´) e ITS 4 (5´ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3´), que geram um fragmento de aproximadamente 750 pares de bases. Para a PCR, empregaram-se 3 µL de DNA total extraído (30ng), tampão 1X da enzima GoTaq DNA polimerase (Promega®), 2mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM de cada primer e 1,25 U de GoTaq DNA polimerase (Promega®), ajustando o volume da reação para 50 µL com água tratada com DEPC. O regime de programa utilizado no termociclador foi : 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 35 segundos, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min, finalizando-se o processo com 72°C por 15 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio e observados sob luz UV. Para sequenciamento dos fragmentos amplificados, 100 µL do produto de PCR foi purificado com o Kit SV Gel and PCR Clean UP system (Promega®).. As seqüências obtidas foram alinhadas e processadas com o programa Mega 5.05 para que fosse

construída a árvore filogenética dos isolados de *Paecilomyces*, utilizando o método “p-distance” (TAMURA, 1992) para a construção da matriz de distâncias, pelo método de Neighbour-Joining. Foi realizado um “bootstrap” com 10.000 replicações. Os resultados de PCR foram comparados com as regiões de DNA e comparadas com as sequências depositadas no Genbank, códigos de acesso BankIt1525016 *Paecilomyces* JQ957848 (região ITS); BankIt1525018 *Paecilomyces* JQ957849 (α -elongase). Para o PCR relacionado com a α -elongase foi usado os pares de primers EF1 (5' ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC 3') e EF2 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3), que geram um fragmento de aproximadamente 1300 pares de bases. Para a PCR, empregaram-se 3 μ l de DNA total extraído (30 ng), tampão 1X da enzima GoTaq DNA polimerase (Promega®), 2mM MgCl², 0,2 mM dNTP, 1 μ M de cada primer e 1,25 U de GoTaq DNA polimerase (Promega®), ajustando o volume da reação para 50 μ l com água tratada com DEPC. O regime de programa foi semelhante ao descrito acima para a análise da região ITS.

Sensibilidade in vitro a diferentes inseticidas

Apesar de não haver inseticidas oficialmente registrados para o controle do percevejo bronzeado, resultados de pesquisa tem demonstrado que os produtos à base de imidacloprid e thiamethoxam, do grupo dos neonicotinóides, são altamente eficientes no controle de ninfas e adultos de *T. peregrinus*.

Para determinação da sensibilidade do fungo entomopatogênico selecionado, foi utilizada a metodologia de incorporação dos diferentes inseticidas ao meio de cultura, adaptada de Caldari Júnior (1998). Para isso, as diferentes concentrações dos inseticidas foram adicionadas a frascos tipo Erlenmeyer, contendo meio de cultura MEA (Malte, Extrato, Agar) previamente autoclavado e resfriado à temperatura entre 40 e 50°C. Para homogeneização, agitou-se o Erlenmeyer contendo o meio BDA (batata-dextrose-agar) adicionado com inseticidas, vertendo esse meio em placas de Petri. As concentrações dos inseticidas testadas foram: 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm. Os inseticidas testados foram: imidacloprid (EVIDENCE WG 700) e thiamethoxam (ACTARA 250 WG).

Discos de micélio, com 5 mm de diâmetro, foram obtidos das bordas de colônias cultivadas em meio BDA por uma semana e transferidos para o centro das placas contendo meio

com os inseticidas. Estas colônias foram então incubadas a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sob fotoperíodo alternado. Foram realizadas avaliações diárias até o primeiro contato de uma das colônias com a borda da placa, através da mensuração de diâmetros perpendiculares de cada colônia.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta de uma placa de petri. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi determinada segundo Menten et al. (1976). Os dados de sensibilidade aos inseticidas imidacloprid e thiamethoxam foram submetidos análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) com auxílio do software SISVAR 4.6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos insetos coletados foi obtida uma colônia típica *Paecilomyces* sp. que, quando reinoculados em insetos sadios, se mostrou altamente patogênica ao percevejo bronzeado.

Nos bioensaios realizados nos testes de patogenicidade com esse fungo foi verificado que tem a capacidade de causar a mortalidade acima de 50% dos insetos em dois dias após a inoculação, sendo que a partir de três dias foi observada mortalidade de 100 % dos insetos inoculados (Tabela 1 e Figura 4). Apesar de ser observada a mortalidade dos insetos 24 horas após a inoculação, conforme observação em MEV, essa espécie de fungo inicia sua germinação e penetração sobre o corpo do inseto cerca de 4 horas após sua inoculação. Foi verificado o aumento da quantidade de micélio no corpo do inseto 24 horas de inoculação (Figura 5), sendo possível observar a colonização do corpo do inseto quase em sua totalidade, corroborando com os dados de patogenicidade (figura 4), foram os períodos em que foram observados o início da mortalidade dos insetos.

Segundo a literatura a patogenicidade de algumas espécies de *Paecilomyces* pode variar conforme a forma e propágulo usado na inoculação deste fungo (FRAGUES et al., 1994). Fragues et al. (1994), estudando a infectividade de propágulos de *P. fumosoroseus* em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) observaram que, quando a suspensão de esporos usada para inoculação é baseada em fragmentos de hifa, conídios já germinados e conídios não germinados, há diferença no número de insetos mortos, pois a inoculação com esporos já germinados e de hifas do fungo foram mais agressivos do que conídios não germinados. Estes pesquisadores observaram

que as taxas de mortalidade em larvas de primeiro instar foram de 29% para as larvas contaminadas com conídios sem germinação, 43 a 49% para as larvas tratadas com conídios germinados e 61% para as larvas tratadas com hifas. Outro exemplo é do estudo realizado por Jackson et al. (1997). Estes autores, comparando a bioatividade de blastósporos de *P. fumosoroseus* e conídios de *Beauveria bassiana*, mostraram que blastósporos foram quatro vezes mais eficazes em infectar e matar ninfas da mosca-branca *Bemisia argentifolli* (Hemiptera: Aleyrodidae). Com base nisso, pode-se inferir que a quantidade de insetos mortos 24 h após a inoculação poderia ser maior se estes fossem inoculados com esporos germinados e hifas do fungo, uma vez que no presente trabalho utilizou esporos não germinados.

Tabela 1. Número de indivíduos mortos de *T. peregrinus* após inoculação com esporos de *Paecilomyces* sp. (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h).

Tratamentos	Mortalidade média diária (\pm ep)					
	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias
Testemunha	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0,5 \pm 0,50	1,0 \pm 0,50	1,5 \pm 0,50	2,0 \pm 0,50
<i>Paecilomyces</i> sp.	1,0 \pm 0,58	6,5 \pm 0,50	10,0 \pm 0,96	10,0 \pm 0,00	10,0 \pm 0,00	10,0 \pm 0,00

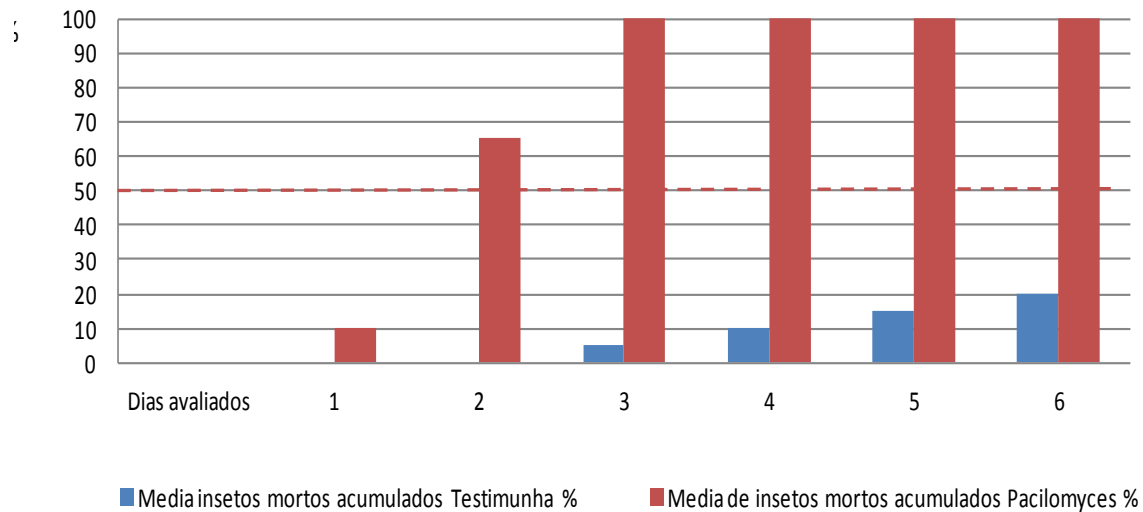


Figura 4. Mortalidade de ninfas e adultos de *T. peregrinus* ao longo do tempo após inoculação com esporos de *Paecilomyces* sp. em laboratório (Temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12 h).

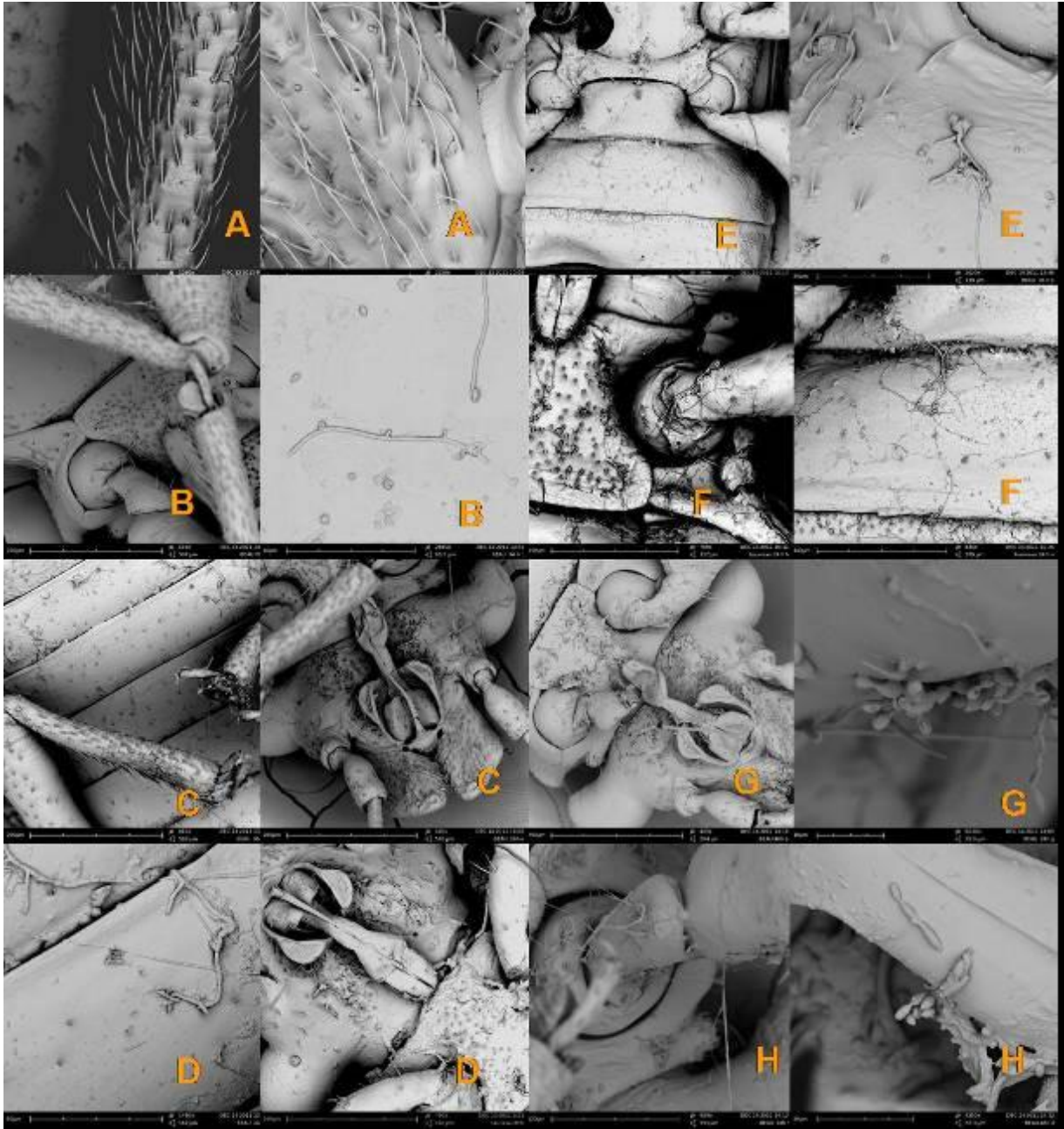


Figura 5.: Evolução da colonização do fungo *Paecilomyces cateniannulatus* no corpo de *T. peregrinus* (A= 2 hs, B= 4 hs, C= 8 hs, D= 12 Hs, E = 24 hs, F= 48 hs, G= 72 hs, H = 96 hs)

Com base nas características biológicas das culturas, morfológicas e nas sequências de DNA extraídas do fungo este foi identificado como *Paecilomyces cateniannulatus* LiangO isolado estudado demonstrou velocidade de crescimento micelial de 10,7 mm/dia. A colônia tinha cor

branca na frente e levemente rosada no reverso da placa (Figura 6) quando cultivados em meio de cultura BDA. O fungo apresentou fialides agrupadas e globosas na posição basal, compridas e alargadas no final, onde se pode observar os conídios (Figura 6). Os conídios são pequenos e ovais com dimensões de 2,6 (2,0 -3,5 μm) x 1,6 (0,8-2,5 μm) comprimento e largura respectivamente.

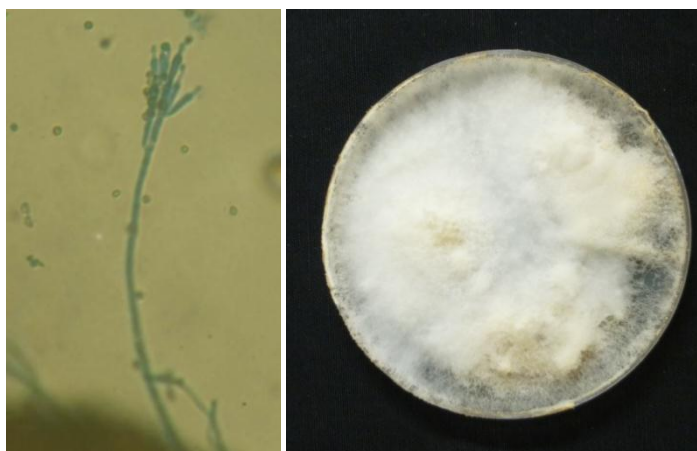


Figura 6: Fialides e conídios de *P. cateniannulatus* (esquerda) e colônia de *P. cateniannulatus* (direita).

Liang et al (2005), em trabalho realizado na China onde caracterizaram morfologicamente e molecularmente espécies de *Paecilomyces*, descrevem que *P. cateniannulatus* tem características semelhantes com as obtidas deste trabalho, onde as colônias apresentam coloração branca, com hifas aéreas. As fialides possuem uma parte basal globosa ou elipsoidal e uma projeção fina e longa, também apresentando conídios pequenos, ovais a elipsoidais, 2-3,5 \times 1-2,5 μm . Nesse estudo, os autores ainda relatam *P. cateniannulatus* como entomopatogênico para alguns lepidópteros. Este é o primeiro relato de *P. cateniannulatus* para o Brasil como entomopatógeno de *T. peregrinus*.

Paecilomyces cateniannulatus pode ser facilmente distinguido de espécies estreitamente relacionadas, tais como *P. fumosoroseus* e *P. farinosus* pela cor branca de sua colônia, o anel específico e cadeias de conídios imbricadas. Esse fungo foi isolado a partir de muitos insetos nas províncias da China em alguns insetos mortos. A variação genética de 12 espécies de *Paecilomyces* por RAPD tem sido relatada (Huang et al., 2002). Os resultados experimentais mostraram que as similaridades entre *P. cateniannulatus* e *P. farinosus* são apenas de 26 a 38 %, com bases em análises de RAPD. Testes de laboratório apontam a existência de algumas raças desse

fungo que têm alta patogenicidade quando inoculados em pulgões, nemátoides e espécies de lepidópteros (LIANG et al., 2005).

Com base nas sequências de DNA (Figura 7) o isolado de *P. cateniannulatus* (ISO 39) obtido de *T. peregrinus* apresentou 99% de homologia da região ITS de seu DNA com o isolado de *Isaria cateniannulata* (= *P. cateniannulatus*) GZUIFR-xs.6 (GI170774135) relatada na China. Já o sequenciamento da região da α -elongase deste mesmo isolado estudado apresentou 99% de homologia com isolados de *Isaria cateniannulata* (= *P. cateniannulatus*) raça IP 218 (GI323145657) do Brasil.

Segundo Inglis et al. (2006) a região ITS pode ser útil para a resolução algumas dificuldades na taxonomia clássica de *Paecilomyces* e está redefinindo a classificação de alguns isolados, que antes apresentavam nível elevado de variabilidade quando analisados com base em outros marcadores de DNA como RAPD. Porém, atualmente na micologia as sequências de ITS-rDNA têm valor limitado na filogenia de fungos, pois é uma região pouco conservada, colaborando na identificação inicial de um patógeno.

Luangsa et al. (2004), estudando a variabilidade genética de diferentes espécies de *Paecilomyces* baseada na região ITS deste fungos, não encontraram valores de bootstraps consistentes dentro do clado *P. cinnamomeus*. Estes autores citam que, embora as espécies *P. marquandii* e *P. carneus* pertencerem ao táxon Clavicipitaceae, não é possível determinar seus relacionamentos com bases nas sequências de DNA desta região de seu genoma.

As análises filogenéticas apontam valores de bootstrap significativos (acima de 50%), que confirmam a identidade deste fungo, separando de maneira clara *P. cateniannulatus* de outras espécies de *Paecilomyces* (Figura 7). Como pode ser observada pela árvore filogenética, montada com base nas sequências da α -elongase, os isolados brasileiros formaram um grupo bem definido e diferente dos isolados de *P. cateniannulatus* da China, apontando que os isolados brasileiros podem ter ser geneticamente distintos dos isolados de outros países. Segundo Fargues et al. (2002), analisando sequências de DNA da região ITS de *P. fumosoroseus*, apontaram elevado nível de polimorfismo dentro desta espécie sendo que esta variação genética pode ser em função da origem biológica do isolado.

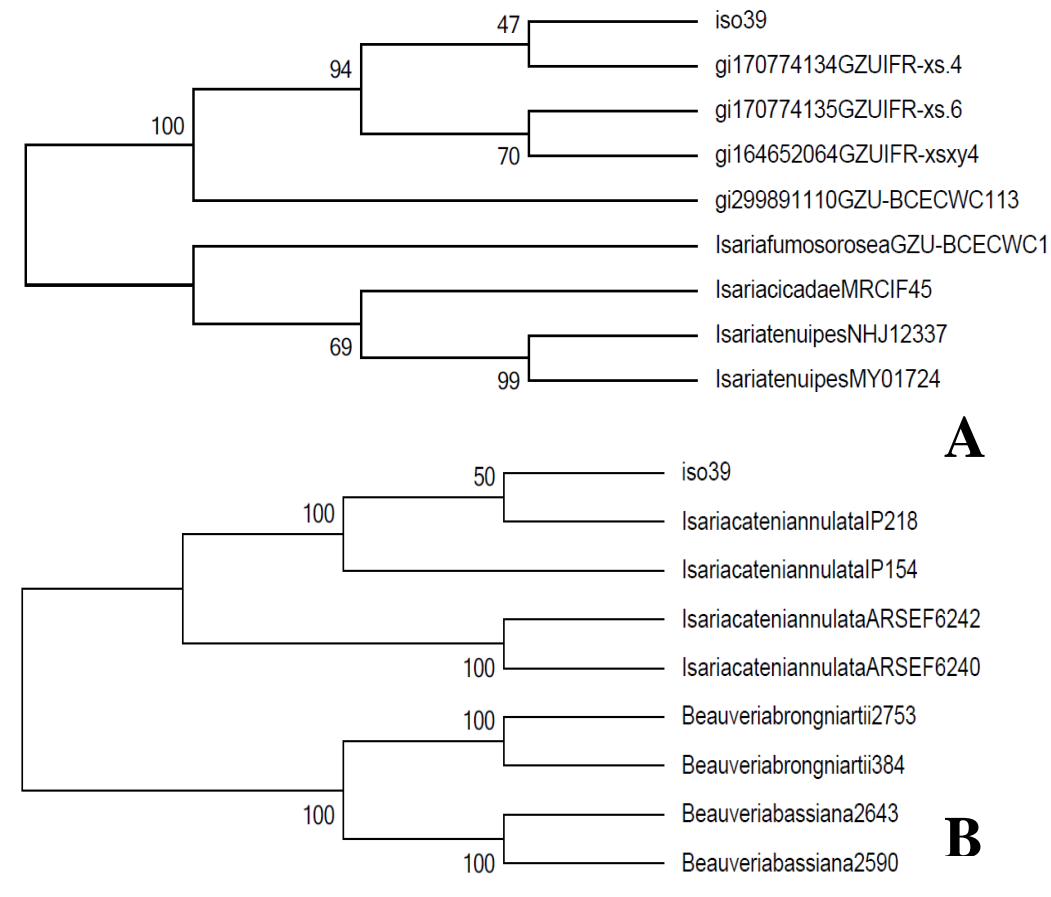


Figura 7. A) Árvore filogenética de *P.cateniannulatus* baseada na região ITS-5.8S rDNA. **B)** Árvore filogenética de *P.cateniannulatus* baseada na região α - elongase

Os resultados obtidos com os inseticidas tiamethoxam (Figura 8a) e imidacloprid e (Figura 8b) (ambos pertencentes ao grupo de neonicotíneoides) demonstraram que houve diferenças significativas entre as concentrações testadas e a testemunha, quanto a crescimento (Figura 10). O inseticida tiamethoxam afetou o crescimento de *P. cateniannulatus* igualmente, independente da concentração testada. Para imidacloprid foi verificado que as concentrações de 1 a 100 ppm afetaram igualmente o crescimento micelial de *P. cateniannulatus*, mas a concentração de 1000 ppm foi a que mais reduziu o crescimento do fungo no meio BDA (Figura 9). Batista Filho, Almeida e Lamas (2001), estudando o efeito de thiamethoxam em microrganismos entomopatogênicos como *Aschersonia aleyrodi*, *Bacillus thuringiensis*, *Baculovirus anticarsia*, *Beauveria bassiana*, *Hirsutella thompsonii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomurea rileyi*, *Sporothrix insectorum*,

Lecanicillum lecanii e *Paecilomyces farinosus*, observaram que este inseticida não afetou o crescimento vegetativo das colônias e nem o desenvolvimento reprodutivo, demonstrando que o princípio ativo é compatível com todos os microrganismos avaliados por eles, resultado distinto do obtido no presente estudo

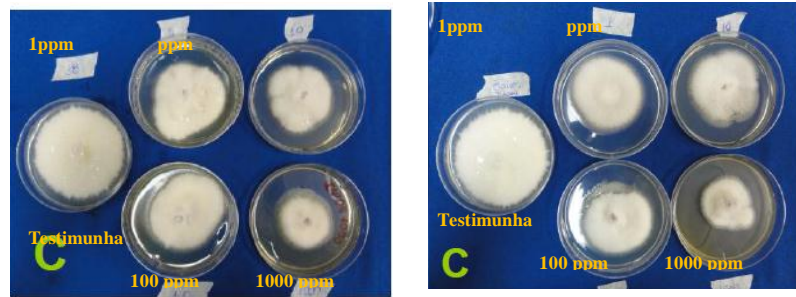


Figura 8. Efeito de inseticidas neonicotinoides sobre o desenvolvimento de *P. cateiannulatus* *in vitro*. A) Efeito de diferentes concentrações de imidacloprid; B) efeito de diferentes concentrações de thiamethoxam.

De forma geral, a ação do inseticida thiamethoxam foi mais intensa, pois afetou o fungo entomopatogênico em todas as concentrações testadas. O imidacloprid teve efeito fungistático ou fungitóxico menor, sendo mais intenso apenas na concentração de 1000 ppm.

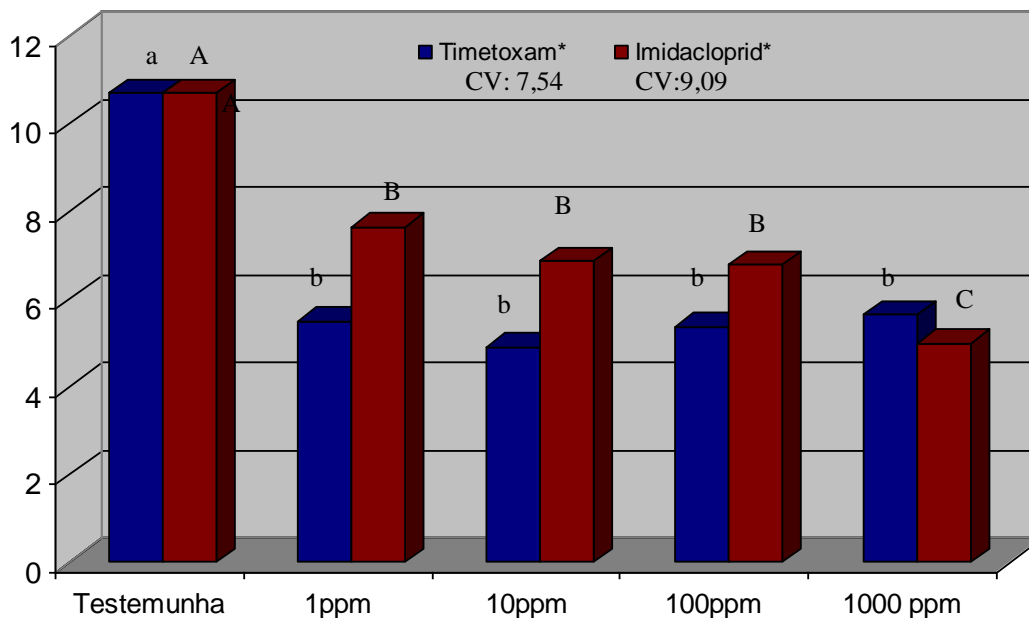


Figura 9: Crescimento micelial (cm) de *P. catenianullatus* na presença dos inseticidas imidacloprid e thiamethoxam no meio de cultura. (Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h).

*Letras minúsculas não diferem significativamente pelo teste de Tukey $< 0,05$ para Thiamethoxam; Letras maiúsculas não diferem significativamente pelo teste de Tukey $< 0,05$ para imidacloprid.

CONCLUSÕES

- Foi identificada a espécie *Paecilomyces cateniannulatus* infectando *T. peregrinus*, sendo essa a primeira ocorrência desse fungo entomopatogênico sobre essa praga florestal exótica no Brasil.
- *P. cateniannulatus* é capaz de penetrar no corpo do inseto a partir de 4 horas após a inoculação, principalmente pelas aberturas naturais do inseto.
- *P. cateniannulatus* demonstra sensibilidade aos inseticidas imidacloprid e thiamethoxam, sendo mais sensível ao thiamethoxam.

LITERATURA CITADA

ABRAF. **Anuário estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas:** ano base **2009**. Brasília Df, 2010. P. 80.

ALVES, S.B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba. FEALQ. 1998,1163 p.

BATISTA, A. F.; ALMEIDA, J. E. M.; LAMAS, C. Effect of Thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, 2001

CALDARAI JUNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores de plantas ornamentais** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998

CARPINTERO, D.L.; DELLAPÉ, P.M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae) **Zootaxa**, Castelar n. 1228, p. 61-68, 2006.

DAL POGETTO, M. H. F. **Avaliação de produtos comerciais de fungos entomopatogênicos no controle do Psilídeo-de-concha *Glycaspis brimblecombei***. Dissertação (Mestrado em Agronomia Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual de São Paulo Universidade- Campus de Botucatu. 73 f. 2009.

FRAGUES J.; MANIANINA, N.K.; DELAMAS, J.C.. Infectivity of propagules of *Paecilomyces fumoroseus* during in vitro *Spodoptera frugiperda* **Journal of Invertebrate Pathology**, Great Britain v. 64, p. 1973- 1978. 1994.

JACOBS, D.H.; NESER, S. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus* trees : research in action. **South African Journal of Science**, Pretoria v. 101, n. 5, p. 233-236, 2005.

- HOWARD FW, STOPEK A. Control of royal palm bug with imidacloprid. **Principes** 42: 80-84, 1988.
- HUANG, B.; YU, C.X.; CHEN, X.L.; FAN, MZAND LI, Z.Z. Classification and Identification of species and strains in *Paecilomyces* using RAPD. **Mycosystema**, Chinav. 21, p. 33-38. 2002.
- INGLIS, Peter W.; TIGANO, Myrian S.. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 29, n. 1, 2006.
- LAUDONIA, S.; SASSO, R. The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*: a new insect recorded in Italy, damaging to Eucalyptus trees. **Bulletin of Insectology**, Roma v. 65, n. 1, p. 89-93. 2012.
- LIN, N-Q, J.T. HUBER, J. LA SALLE. The Australian genera of Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea). **Zootaxa**, China n.1596, p.1–111.2007.
- LIANG, Z.Q.; HAN, Y.F.; CHU, H.L.; LIU, A.Y. Studies on genus *Paecilomyces* in China I. **Fungal Diversity**, Chinav. 20, p. 83-101. 2005.
- LUANGSA, J.; HYWEL, J., ; SAMSON R. The polyphyletic nature of *Paecilomyces* sensa lato based on 18S- generated r DNA phylogeny . **Micología** Barcelonav 96, 773-780. 2004.
- MARTÍNEZ, G & BIANCHI, M Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Delappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). **Agrociencia** Montevideov. 14, n. 1, p. 15–18. 2010.
- MASCARIN , G.M, DUARTE, V.S.; BRANDÃO, M.M.; DELALIBERA Jr, I.. Natural occurrence of *Zoophthora radicans* (Entomophthorales : Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastodoridae) na invasive pest recently found in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, n.3, p 401-404. 2012.

MENTEN J. O. et al Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (tass) Goid “in vitro” . **Fitopatologia Brasileira**. Brasilia. v.1. n.2, p 57-66. 1976.

WILCKEN C. F.; SOLIMAN, E.P; SÁ, L.A.N.; BARBOSA, L.B.; DIAS; T.K.R.; FERREIRA-FILHO, J.P.;RODRIGUES, R. J. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on Eucalyptus in Brazil and its distribution.**Journal of Plant Protection Research**v.50, n.2., p.201-205. 2010.

CAPÍTULO II

Identificação, caracterização e patogenicidade de *Fusariumproliferatum* isolado do percevejo-bronzeado do eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) e efeito de inseticidas neonicotinoides sobre seu crescimento e análise de fitopatogenicidade em culturas agrícolas

(baseado nas normas do periódico Neotropical Entomology)

Resumo: Um dos principais problemas que afeta a produtividade do eucalipto são novas pragas que têm sido introduzidas, causando perdas consideráveis. Entre as pragas exóticas mais importantes está o percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). O percevejo bronzeado ao se alimentar, por sucção de fluídos vegetais, provoca clorose nas folhas, que evoluem para um aspecto bronzeado e podendo levar ao desfolhamento total das árvores. A filosofia do Manejo Integrado de Pragas (MIP) é o caminho ideal para controlar os surtos populacionais, uma vez que integra os métodos de controle. Entre eles, o controle microbiano de insetos encontra-se como uma alternativa possível para o controle biológico, e especificamente no controle do percevejo bronzeado. O presente trabalho teve o objetivo de estudar e caracterizar uma espécie do gênero *Fusarium*, isolado de insetos mortos em epizootia nas plantações de eucalipto na região sul do Brasil. A caracterização do fungo foi realizada através de estudos morfológicos, culturais e moleculares (seqüenciamento das regiões relacionadas ao ITS e da α -elongase). Além disso foram realizados testes de patogenicidade e o acompanhamento da colonização do inseto pelo fungo por técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e ainda foi verificada a sensibilidade desse fungo a inseticidas usualmente aplicados na cultura do eucalipto. Também foi verificada a ocorrência de fitopatogenicidade dessa espécie de *Fusarium*, com teste em plantas de tomate, cana-de-açúcar, milho e eucalipto. Pelo seqüenciamento de seu DNA e pela caracterização cultural e morfológica, o fungo foi identificado como *Fusarium proliferatum*, cujas colônias foram de cor violeta, com presença de macroesporos septados e microesporos. Nos testes de patogenicidade foi observado que *F. proliferatum* tem a capacidade de causar a morte do inseto a partir de 24 horas. Pelo acompanhamento da colonização do inseto via MEV foi observado que este fungo tem crescimento preferencial em direção aos orifícios naturais do inseto, tendo capacidade de penetrar no corpo do inseto a partir das 4 horas após a inoculação. Este fungo apresentou sensibilidade aos inseticidas thiamethoxan e imidacloprid. No teste de fitopatogenicidade foi verificado que *F. proliferatum* não foi patogênico a nenhuma das espécies de plantas testadas. Desse modo, *F. proliferatum* tem potencial como agente de controle microbiano e que pode ser futuramente usado para controle de *T. peregrinus* em plantações de eucalipto.

Palavras-chave: percevejo bronzeado, praga florestal, *Eucalyptus*, fungo entomopatogênico

***FUSARIUM PROLIFERATUM* ISOLATED OF EUCALYPTUS BRONZE BUG *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE): IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION, PATHOGENICITY, EFFECT OF NEONICOTINOID INSECTICIDES ON ITS GROWTH AND EVALUATION OF PHYTOPATHOGENICITY RISK**

Summary: Eucalyptus plantations has increased year by year reaching about 20 million ha in 2009. One of the most important problems in eucalyptus plantations is occurrence of new pests have been introduced and causing expressive crop losses. Among these the most important is the bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) that reduces and affects the eucalyptus productivity. The strategy of Integrated Pest Management (IPM) is the logical pathway to reduce the populational outbreaks, due integrated different control methods. Microbial control is as a possible alternative for biological control, and specifically control of bronze bug. The present work had to aim to study and characterize one species of genus *Fusarium* isolated from dead adults of *T. peregrinus* in an epizooty in eucalyptus plantations in Southern region of Brazil. Further experiments were carried out to evaluate the potential risk of the best isolate can be phytopathogenic and to evaluate the sensibility of this isolate to insecticides used in bronze bug control. The characterization of the fungus was performed by morphological, cultural and molecular (sequencing of the ITS regions and the related α -elongase). By DNA sequencing and by cultural and morphological characterization, the fungus was identified as *Fusarium proliferatum*, with violet colonies and presence of septate macro and microspores. The fungus colonization on the insects was observed by SEM (scanning electronic microscopy) verifying it has preferential penetration sites are the natural orifices of the insect, after 4 hours after inoculation. *F. proliferatum* was not phytopathogenic to the different plant species (sugarcane, maize, tomato and eucalyptus) tested. This species was shown significant sensitivity to the insecticides imidacloprid and thiamethoxam in any dose worked. Therefore, *F. proliferatum* is potentially entomopathogenic fungus and it can be used to control *T. peregrinus* in eucalyptus plantations in the future.

Keywords: bronze bug, pest, Eucalyptus, microbial control, entomopathogenic fungus

INTRODUÇÃO

A área de plantio de eucalipto no mundo tem aumentado nas últimas décadas atingindo área de 20.071.201 ha em 2009. Um dos problemas que afetam as plantações de eucalipto é a ocorrência de pragas, com aumento de novas espécies a cada ano. Uma dessas novas pragas é o percevejo bronzeado *T. peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), que ataca plantas de eucalipto. Ninfas e adultos do percevejo bronzeado alimentam-se pela sucção de seiva, causando pontos cloróticos nas folhas, que evoluem para um aspecto bronzeado, ocasionando a desfolha das plantas (Wilcken et al., 2010). Uma alternativa para o controle dessa praga é o emprego de microrganismos entomopatogênicos. Entre as possibilidades, os fungos entomopatogênicos do gênero *Fusarium* tem sido estudados. Este gênero foi descrito desde meados dos anos 1980 como promissor no controle de insetos. Em revisão sobre espécies de *Fusarium* entomopatogênicos, é citado que algumas espécies são altamente patogênicas a cigarrinhas e dípteros (Teeter-Barsch & Roberts, 1983). Além disso, esses autores citam como vantagem o fato da alta especificidade ao hospedeiro, nenhum dano às plantas da cultura e fácil multiplicação em laboratório. Dentre as espécies de *Fusarium* que vem sendo amplamente estudadas encontra-se *F. proliferatum* sendo sua forma sexual conhecida como *Gibberella fujikuroi*. Apesar desse gênero de fungo estar associado com frequência com doenças radiculares em plantas como arroz, milho, sorgo e mangueira, este também vem sendo usado no controle de insetos, devido sua capacidade de produzir toxinas, muitas vezes em elevados níveis, incluindo beauvericina, fusaproliferina, ácido fusárico, fusarinas e moniliformina. As fumonisinas são produzidas por *F. proliferatum* em níveis elevados e do grupo de genes que codifica os genes necessários para a biossíntese de fumonisina (Leslie & Summerell, 2006). A produção de fusaproliferina por esse gênero de fungo foi descrita recentemente em isolados sul-africanos, que incluía *F. proliferatum*. Segundo Logrieco et al. (1998) a beauvericina é uma micotoxina ciclo-hexadepsipeptídeo que tem propriedades inseticidas e que pode induzir apoptose em células de mamíferos. Beauvericina é produzida por outras espécies entomopatogênicas e fitopatogênicas de *Fusarium*, como *F. semitectum* e *F. subglutinans*. Gupta et al. (1991) detectaram beauvericina em culturas de cepas entomopatogênicas de *F. moniliforme*. Segundo Alves (1998) algumas espécies de *Fusarium* que ocorrem sobre insetos parecem se comportar como patógenos fracos, exceto as espécies que ocorrem em coccídeos, sendo que a espécie encontrada nesse grupo de insetos é capaz

de produzir toxinas semelhantes à beauvericina. No Brasil em pomares de pêsego e citros, ocorre infestações frequentes com cochonilhas, associadas a diversas espécies de *Fusarium*. Assim *F. coccophilum* é de ocorrência comum sobre *Parlatoria cinerea* (Hemiptera: Diaspididae) nos pomares de citros de São Paulo (Correia, 1996; citado por Alves, 1998). Em estudos realizados em plantações de eucalipto atacadas por *T. peregrinus* foi observada a ocorrência de uma epizootia em plantação de eucalipto em Alegrete, RS. A partir de insetos mortos nessa epizootia foi isolado um fungo entomopatogênico identificado como *Fusarium* sp. Este fato indicou que o controle deste inseto no Brasil poderia ser feito por espécies de *Fusarium* que ocorrem no país. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização cultural, morfológica, patogênica e molecular de *Fusarium* sp. isolado de *T. peregrinus*. Além disso, foi realizado o acompanhamento da colonização do inseto pelo fungo via MEV (microscopia eletrônica de varredura) e foi verificado o potencial de fitopatogenicidade do melhor isolado em diferentes espécies vegetais e a sensibilidade deste isolado a diferentes inseticidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de desenvolvimento do trabalho

O estudo foi realizado no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais e no Laboratório de Fitopatologia da FCA/UNESP – Campus de Botucatu.

Coleta de insetos e isolamento do fungo

Foram coletados *T. peregrinus* mortos em epizootia nas plantações de eucalipto da empresa Stora Enso, na região de Alegrete, RS. A coleta de insetos foi realizada em novembro de 2011 diretamente em folhas das árvores. A preferência para as coletas foram de insetos com presença de micélio sobre seu corpo. Os insetos coletados foram submetidos à câmara úmida para melhor esporulação do fungo em seu corpo. Após 24 horas esses insetos foram submetidos à esterilização com solução de hipoclorito de sódio, álcool 70% e água esterilizada e, posteriormente, estes foram colocados em placas de petri contendo meio água-agar, para isolamento do(s) fungo(s). Após a observação do crescimento da colônia esta foi repicada para meio BDA (batata-dextrose-agar) para posterior identificação.

Obtenção de isolados monospóricos

Para a obtenção de culturas monospóricas, as colônias obtidas do isolamento foram lavadas com água destilada esterilizada e as concentrações das suspensões de esporos foram padronizadas para aproximadamente 10^2 esporos/mL. Foi depositado 100µl dessa suspensão de esporos em placas contendo meio água/agar, acrescido de 0,005% de oxitetraciclina. Através de visualização em microscópio ótico, os esporos foram individualizados e transferidos com agulha entomológica para meio MEA (malte- extrato -agar) para formação das colônias.

Teste de patogenicidade em *T. peregrinus*

Para realizar os bioensaios utilizaram-se adultos sadios de *T. peregrinus*, obtidos de criação em laboratório. O fungo isolado foi pulverizado em microaspersão utilizando torre de Potter a uma pressão de 15 lb/pol². Cada tratamento correspondeu a aplicação de 3mL de suspensão de cada isolado com uma concentração 10⁶ esporos/mL (diluído com água destilada autoclavada mais espalhante Tween 20 a 0,02%). No caso da testemunha, foi realizada a aspersão utilizando unicamente a água destilada autoclavada com Tween 20 a 0,02 %. Em cada placa de petri (tratamento e testemunha) foram colocadas uma folha de *Eucalyptus camaldulensis* previamente desinfestadas (submergindo as folhas em hipoclorito de sódio ao 2% durante 5 minutos e enxaguadas seguidas com água destilada autoclavada) para que os insetos se alimentassem durante os dias de avaliação.

Após inoculação, as placas de petri foram colocadas em câmara BOD à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Foram realizadas avaliações diárias do experimento, contando e retirando os insetos mortos. Os insetos mortos foram colocados em câmaras úmidas para reisolamento do fungo, visando a confirmação de que tratava do mesmo isolado inicial aplicado.

O delineamento experimental foi montado em blocos ao acaso com dois tratamentos (fungo entomopatogênico e testemunha) e 4 repetições, sendo 10 insetos por placa de petri contendo um pedaço de folha de eucalipto sobre gel estéril. As técnicas a seguir para fazer os bioensaios e testes de patogenicidade basearam-se nos postulados de Koch. (Alves, 1998)

Processo de colonização do fungo no inseto

Para complementação dos estudos de patogenicidade foi realizado o acompanhamento da colonização nos insetos por alguns isolados dos fungos testados. Para isso, uma suspensão contendo 10⁶ esporos /mL foi pulverizada sobre os adultos. Na testemunha os insetos foram tratados somente com água destilada autoclavada.

Após a inoculação, os insetos inoculados foram coletados em intervalos de tempo pré-determinados (2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 h) e fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, pH 7,2), por período mínimo de 24 horas, para serem preparadas e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO435-VP. Foram coletados 5 insetos para cada intervalo de tempo pré-determinados.

As amostras de insetos inoculadas foram retiradas do fixador Karnovsky, submetidas ao vapor de OsO₄ por 24 horas. Decorrido este tempo as amostras foram colocadas em sílica gel, para completar a secagem. Após completa a desidratação as amostras foram cuidadosamente montadas em “stubs” com fita de carbono dupla face para aderência das amostras e cobertas com uma cama de 20nm de ouro em aparelho Baltec SCD 050 . A preparação e observação das amostras foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica localizado na ESALQ/USP.

Caracterização biológica do crescimento

A caracterização cultural dos isolados foi baseada na velocidade de crescimento micelial, cor da colônia e estruturas produzidas, quando cultivados em meio de cultura BDA. Para cada isolado, discos de micélio com 6 mm de diâmetro foram obtidos das bordas de uma colônia cultivada 10 dias em meio de cultura BDA e transferidos para o centro de novas placas de Petri contendo o mesmo meio. Após a repicagem, os isolados foram incubados à temperatura de 25±1 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. A avaliação do experimento foi realizada diariamente, pela mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia com auxílio de régua milimetrada. A velocidade média de crescimento micelial foi utilizada para as análises estatísticas.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta por uma placa.

Caracterização morfológica

Neste experimento foi determinado o tamanho de todos os tipos de esporos produzidos pelos fungos testados. Para avaliação dos esporos foram preparadas lâminas semi-permanentes com lactofenol. A mensuração desses esporos foi realizada utilizando-se sistema de vídeo-câmara Opton, modelo TA-0124XS, instalada em microscópio óptico. A imagem foi transmitida para computador e

analisada com o programa EDN-2. Para a calibração do equipamento, utilizou-se uma lâmina micrografada (Carl Zeiss®). Foram medidos 30 esporos de cada isolado.

Caracterização molecular

A extração de DNA dos isolados coletados foi realizada conforme o método desenvolvido por Murray e Thompson (1980) modificado. Em cada tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foram macerados 3 discos de micélio retirados das placas de petri e com 1000 µL de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2 % CTAB; 0,2 % β-mercaptoetanol). Em seguida, os tubos foram incubados a 65°C, por 30 minutos. Subsequentemente, foram adicionados 500 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) aos tubos e esses foram misturados manualmente, por agitação, durante 10 minutos e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi removida para novos tubos com isopropanol. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm e o “pellet” obtido foi lavado com 500 µL de etanol 70% e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, seco à temperatura ambiente e ressuspensionado em 100 µL de água com DEPC (Dietilpirocarbonato).

A amplificação da região ITS do DNA do fungo foi feita utilizando os pares de primers ITS 1 (5´ TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3´) e ITS 4 (5´ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3´), que geram um fragmento de aproximadamente 750 pb. Para a PCR, empregaram-se 3 µl de DNA total extraído (30ng), tampão 1X da enzima GoTaq DNA polimerase (Promega®), 2mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM de cada primer e 1,25 U de GoTaq DNA polimerase (Promega®), ajustando o volume da reação para 50 µl com água tratada com DEPC. O regime de programa utilizado no termociclador foi: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 35 segundos, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min, finalizando-se o processo com 72°C por 15 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio e observados sob luz UV. Para sequenciamento dos fragmentos amplificados, 100 µl do produto de PCR foi purificado com o Kit SV Gel and PCR Clean UP system (Promega®). O DNA dos isolados obtidos foi sequenciado no centro de genoma Humano da USP. As sequências obtidas foram editadas através do software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2005). Após edição, estas sequências foram utilizadas para procurar sequências similares usando o software Blastn do NCBI. As sequências obtidas foram

alinhas e processadas com o programa Mega 5.05 para que fosse construída a árvore filogenética dos isolados de *Fusarium*, utilizando o método “p-distance” (Tamura 1992) para a construção da matriz de distâncias, pelo método de Neighbor- Joining. Foi realizado um “bootstrap” com 10.000 replicações.

Para o PCR relacionado com a α -elongase foi usado os pares de primers EF1 (5' ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC 3') e EF2 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3), que geram um fragmento de aproximadamente 1300 pb. Para a PCR, empregaram-se 3 μ l de DNA total extraído (30ng), tampão 1X da enzima GoTaq DNA polimerase (Promega®), 2mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 1 μ M de cada primer e 1,25 U de GoTaq DNA polimerase (Promega®), ajustando o volume da reação para 50 μ l com água tratada com DEPC. O regime de programa utilizado no termociclador foi semelhante ao descrito anteriormente para a análise do gene ITS.

Sensibilidade in vitro a diferentes inseticidas

A metodologia utilizada foi a do inseticida incorporado ao meio de cultura adaptada de Caldari Júnior (1998). Para isso, as diferentes concentrações dos inseticidas foram adicionadas a frascos tipo Erlenmeyer, contendo meio de cultura BDA previamente autoclavado e resfriado à temperatura entre 40 e 50°C. Para homogeneização, agitou-se o Erlenmeyer contendo o meio BDA adicionado com os inseticidas, efetuando-se, posteriormente, a distribuição do mesmo em placas de Petri. As concentrações dos inseticidas testados foram: 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm. Os inseticidas testados foram: Imidacloprid (Evidence WG 700) e Thiametoxam (Actara 250 WG).

Discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram obtidos das bordas de colônias cultivadas em meio BDA por uma semana e transferidos para o centro das placas contendo meio com os inseticidas. Estas colônias foram então incubadas a 25±1°C sob fotoperíodo alternado. Foram realizadas avaliações diárias até o primeiro contato de uma das colônias com a borda da placa, através da mensuração de diâmetros perpendiculares de cada colônia.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta de uma placa. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi determinada segundo Menten et al. (1976). Os

dados de sensibilidade aos inseticidas Imidacloprid e Thiamethoxam foram submetidos análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com auxílio do Software SISVAR 4.6

Avaliação da fitopatogenicidade do isolado entomopatogênico de *Fusarium*

Como há predominância de espécies de *Fusarium* fitopatogênicas em relação às entomopatogênicas, foi instalado um experimento para avaliar possíveis reações fitopatogênicas do isolado ISO-36 de *Fusarium*, obtido de *T. peregrinus* para garantir que essa espécie de fungo possa ser utilizada no controle biológico aplicado da praga sem que ocorram danos às plantas. O experimento consistiu de quatro tratamentos: plantas de cana-de-açúcar *Saccharum officinarum*, IAC 955000, tomateiro *Lycopersicon esculentum* cultivar Santa Cruz Kada Gigante, milho *Zea mays* cultivar Santa Helena UNESP e mudas clonais de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (clone H-13). As inoculações foram realizadas via raiz e via foliar. No primeiro caso as plantas tiveram suas raízes feridas mecanicamente e logo após foram imersas em suspensão de esporos do isolado de *Fusarium*, onde permaneceram por 15 minutos. Logo após estas foram plantadas em vasos com substrato autoclavado. A inoculação via foliar foi realizada por aspersão da suspensão de esporos nas folhas. Nesse caso, as plantas permaneceram em câmara úmida à 25°C por 24 horas após a aspersão dos esporos. Em ambos experimentos foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições (plantas) por tratamento. Como inóculo foram preparadas suspensões de 10⁸ esporos /mL. Nas plantas testemunha foi utilizada somente água esterilizada. No caso do tomateiro foi instalado um segundo ensaio, com a inoculação do isolado ISO-36 e de um isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersicon*, sabidamente patogênico às plantas de tomateiro. Nesse caso, o objetivo foi verificar se as técnicas propostas de inoculação do isolado de *F. proliferatum* (via raiz e foliar) eram adequadas para causar a doença e demonstrar os sintomas. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e as avaliações foram realizadas semanalmente, por período de 120 dias (17/02 a 17/5/2012). As avaliações consistiram da observação dos sintomas, principalmente de murcha de folhas ou da parte aérea como um todo e da contagem de possíveis plantas mortas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos insetos coletados foram obtidas colônias típicas de *Fusarium*, que apesar de já ser um gênero de fungo relatado na literatura como entomopatogênico, foi melhor estudado neste trabalho, devido sua alta patogenicidade em testes prévios em *T. peregrinus*.

Nos bioensaios dos experimentos de patogenicidade realizados com este fungo foi verificado que este tem a capacidade causar a mortalidade média de 40 % dos insetos em 24 horas após a inoculação (tabela 1 e figura 1). Este fungo inicia sua germinação sobre o corpo do inseto 2 horas após sua inoculação e 4 horas após esta já é observado a penetração deste pelos orifícios naturais do inseto. O inseto se encontra morto e completamente colonizado 72 horas após a inoculação (figura 2).

Tabela 1. Número médio acumulado de indivíduos mortos de *T. peregrinus* após inoculação com *Fusarium proliferatum* (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h).

Tratamentos	Mortalidade média diária (\pm ep)					
	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias
Testemunha	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0	0,5 \pm 0,5	1,5 \pm 0,6	1,5 \pm 0,0	2,5 \pm 1,0
<i>F. proliferatum</i>	4,0 \pm 1,8	5,5 \pm 1,50	8,5 \pm 0,6	9,5 \pm 1,0	10,0 \pm 0,5	10,0 \pm 0,00

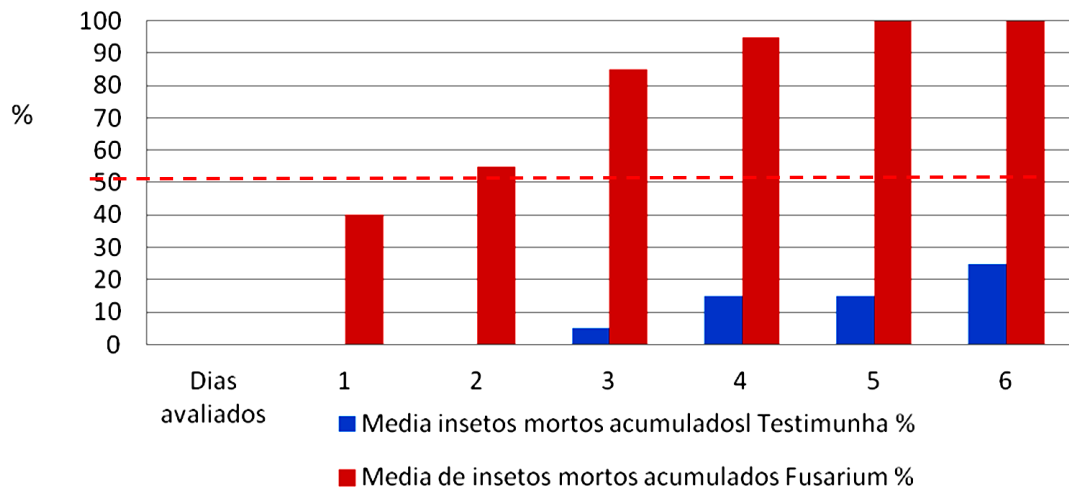


Figura 1. Frequência de adultos de *T. peregrinus* mortos (%) após inoculação de *F. proliferatum* (Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h).

Com base nas sequências de DNA extraídas do fungo este foi identificado como *F. proliferatum*, e feito o depósito no Genbank (códigos: BankIt1525008-*Fusarium* JQ957846, para a região ITS e BankIt1525013- *Fusarium* JQ957847 para a α -elongase).

Os resultados das análises moleculares corroboraramos resultados obtidos pelas caracterizações cultural e morfológica, onde foi observada colônia de cor roxa que demonstrava crescimento micelial médio de 8,30 mm/dia. As colônias apresentaram a presença de macro esporos septados (média de 4 septos e comprimento e largura média de 22,5 μ m x 2,9 μ m), e microesporos (6,90 x 2,58 μ m), também foram observados esporodóquios em cadeia (Figura 3). Estas características são similares às descritas para esta mesma espécie de fungo causando doenças em plantas. Por exemplo, Gohari et al. (2007), ao estudarem fungos produtores de toxinas em grãos de trigo, identificaram a presença dessa espécie de *Fusarium* descrevendo que este apresentava colônias de rápido crescimento, atingindo 7,5 a 8 cm de 8 dias a 25 °C em meio BDA, conidióforos primários inicialmente não ramificados e depois livremente ramificado, resultante lateralmente em hifas no micélio aéreo. Os microconídios observados por estes autores tinham em média 4,8-12,4 x 2,8-3,3 μ m e os macroconídios, com 3 septos, tinham 25,0-41,0 x 1,9-2,8 μ m (comprimento x largura). Os resultados aqui obtidos confirmam o estudo realizado por Leslie e Summerell (2006).

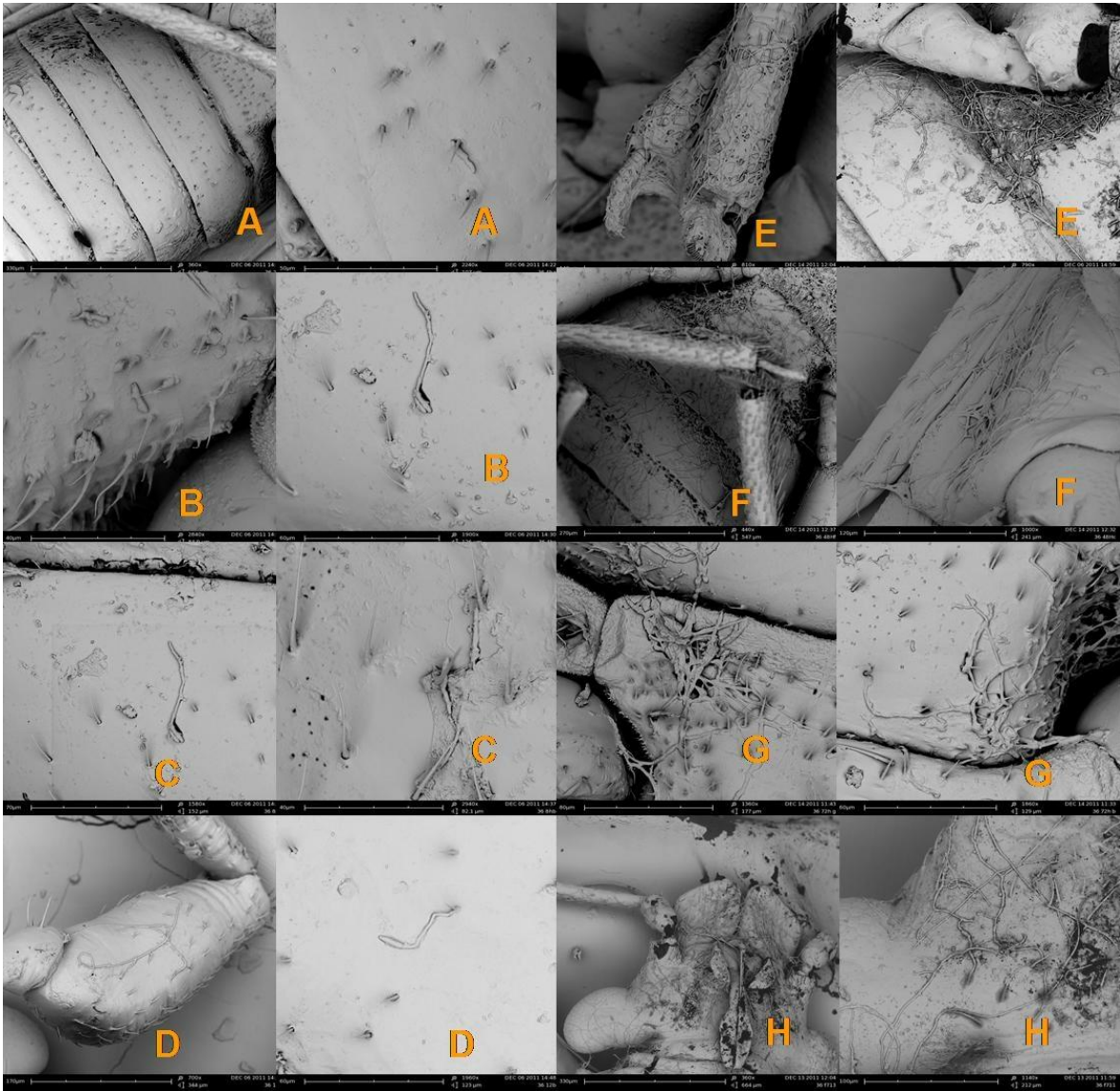


Figura 2: Colonização de *F. proliferatum* em adultos de *T. peregrinus* . (A= 2h, B=4h, C=8h, D=12h, E=24h, F=48h, G=72h e H=96h após inoculação)

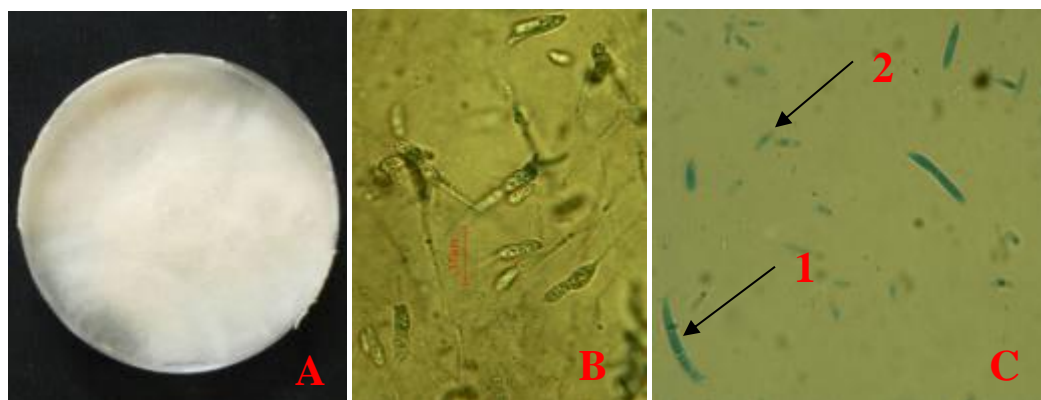


Figura 3: A. Colônia de *F. proliferatum*. B. Esporodóquios. C. 1. Macrosporo. 2. Microsporo.

Este é primeiro relato desse fungo como entomopatogênico em *T. peregrinus* no Brasil. Na literatura este fungo é citado como capaz de produzir beauvericina e fusarina, substâncias as quais já se sabem estarem ligadas a capacidade de fungos entomopatogênicos causar morte em insetos.

Fusarium proliferatum normalmente é apontado como patógeno de raiz em algumas gramíneas, como milho (Leslie et al. 1990). Esta espécie de *Fusarium* pode ser encontrada em plantas ou resíduos em praticamente todos os campos de milho. Plantas atacadas por esse fungo apresentam podridão na coroa, podridão no colmo e a podridão em grãos de milho. Não foi observado nenhum desses sintomas em nenhuma das espécies de plantas testadas, incluindo de milho, inoculadas pelo isolado de *F. proliferatum* estudado em casa-de-vegetação (Figura 5). Pelas análises moleculares (Figura 4) pode-se observar que o *Fusarium* (ISO 36) isolado de *T. peregrinus*, apesar de apresentar 98% de homologia (tanto da região ITS quanto a α -elongase) com as sequências de DNA, depositadas no GenBank, de isolados de *F. proliferatum* coletados de plantas, apresentou-se como um grupo distinto. Isso pode ser um indício da especificidade desse fungo para insetos. A capacidade da região ITS para diferenciar espécies tem sido relatada como uma forma viável e rápida para identificar os isolados, tanto gênero como espécie (Oechler et al. 2009).

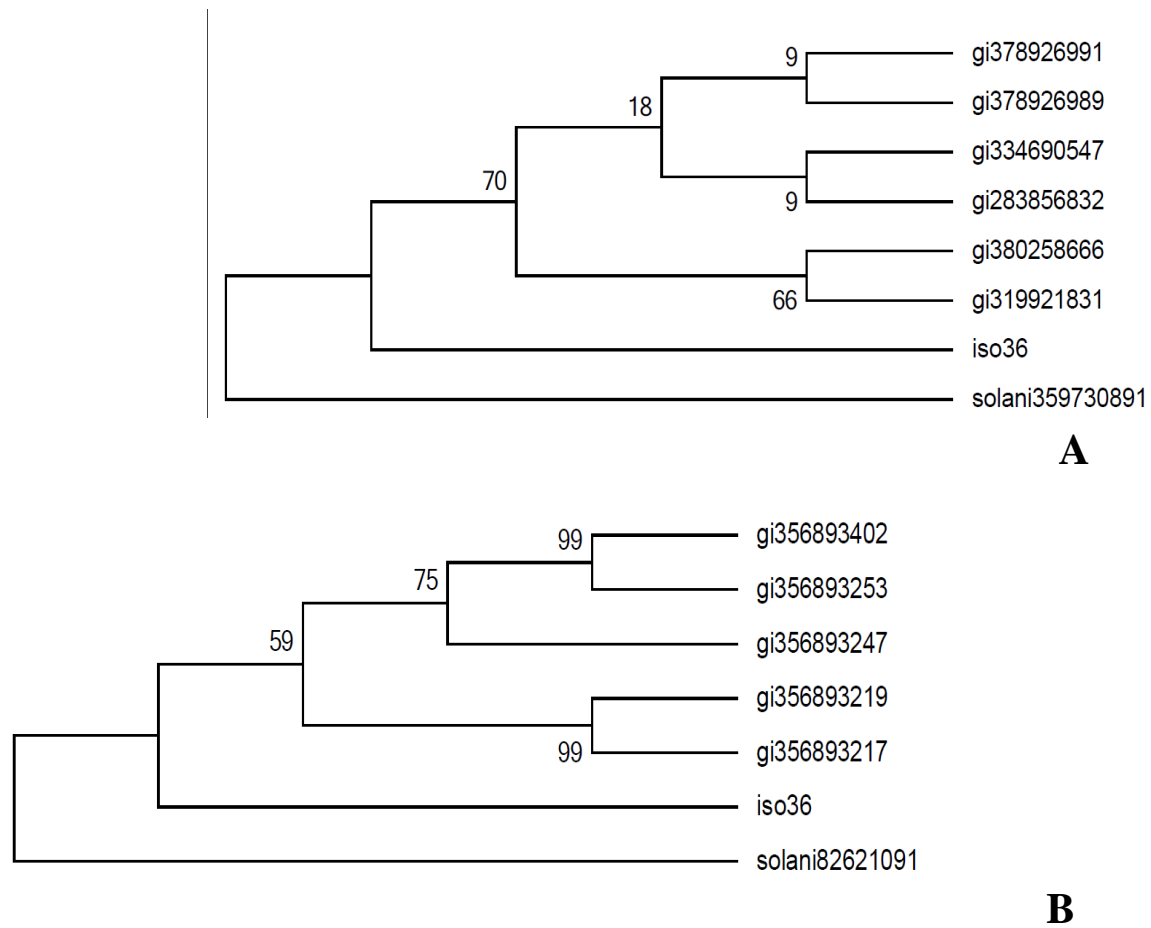


Figura 4: Árvore filogenética de isolados de *Fusarium* obtidos de adultos de *T. peregrinus* infectados no campo, comparado com isolado de *F. solani*, baseada na região ITS (A) e α -elongase (B).

Jurado et al. (2010), ao estudarem a variabilidade genética de *F. proliferatum* de diferentes origens geográficas e hospedeiros, baseadas em vários métodos moleculares e pelo sequenciamento da região da α -elongase, constataram alta variabilidade intraespecífica dessa espécie deste fungo. Além disso, estes autores discutem que o fato dessa espécie colonizar uma vasta gama de espécies, tais como pinheiros, palmeiras, trigo, cevada, milho, aspargos e até mesmo os seres humanos, apoiaria seu caráter oportunista e sua grande capacidade de adaptação, também apontado por outros autores (Leslie et al., 2004). A informação sobre o nível de variabilidade de *F. proliferatum* e da estrutura da população pode contribuir grandemente nos estudos de avaliação de controle de pragas em laboratório e campo, melhorando a eficiência nas estratégias de manejo integrado de pragas.

Apesar de causar doenças em plantas, essa espécie de *Fusarium* é conhecida por causar leucoencefalomalácia em cavalos e edema pulmonar em suínos, bem como danos ao fígado e câncer em animais de laboratório. Todos os problemas causados por este fungo são relacionados com a capacidade deste produzir toxinas, incluindo as fumonisinas, uma classe recentemente descrita de micotoxinas que são produzidos principalmente por *F. moniliforme* e *F. proliferatum* (NELSON et al., 1993). As fumonisinas são as toxinas mais comuns encontradas em grãos de milho doentes e assintomáticos no meio-oeste dos Estados Unidos. São relatados também a produção de elevados níveis de beauvericina, fusaproliferin, ácido fusárico, fusarinas e moniliformina. Deste modo, pode-se inferir que a morte dos insetos 24 horas após a inoculação, mesmo não tendo todo o corpo colonizado pelo fungo, como foi observado nas análises em MEV, pode estar também relacionada com as toxinas produzidas por *F. proliferatum*.

Alguns estudos apontam que algumas espécies de *Fusarium* produzem a micotoxina, do tipo tricotecenos e outros metabólitos secundários, que contribuiriam para a mortalidade de cupins, larvas de farinha, brocas de milho e moscas de sorgo (Teetor—Barsch & Roberts 1983). Ganassi et al. (2001), ao estudarem espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* sobre o pulgão *Schizaphis graminum* comprovaram que os gêneros *Fusarium* e *Trichoderma* controlavam significativamente essa espécie de inseto. Estes autores também comprovaram que a espécie *F. proliferatum* produziu nível elevado de fumonisina B1 mostrando uma atividade inseticida elevada (> 60%) a 10 minutos após a aplicação.

Segundo Teetor-Barsch e Roberts (1983), a questão da invasão do fungo no inseto foi abordada por poucos pesquisadores. Sabe-se que a entrada do fungo ocorre pelas vias oral, ovipositor, feridas ou devido à atividade de ectoparasitos, mas não há muitos trabalhos sobre penetração direta pela cutícula dos insetos. Deste modo, esse isolado de *Fusarium* deve ser melhor estudado e testado quanto à sua possível utilização no controle biológico.

Como há várias espécies de *Fusarium* que são fitopatogênicas, sendo a murcha de *Fusarium* como uma das doenças mais importantes para várias culturas agrícolas, foi avaliado o potencial fitopatogênico do isolado ISO 36 de *F. proliferatum*. Das quatro espécies vegetais testadas (cana-de-açúcar 'IAC-955000', milho 'Santa Helena UNESP', tomateiro 'Santa Cruz Kada Gigante' e eucalipto (clone H-13), não foram observados nem sintomas da doença (murcha ou alteração de coloração das folhas) e nem mortalidade de plantas, para todas as espécies testadas, independente da forma de inoculação (via raiz ou foliar) (figura 5). Para o bioensaio com tomateiro, foi verificado

murcha, seguida de morte de plantas (100 %), para o tratamento com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, enquanto para as plantas do tratamento com *F. proliferatum* houve ausência completa de sintomas e nenhuma planta morreu durante todo o período de avaliação.



Figura 5: Plantas de cana-de-açúcar, milho, tomateiro e eucalipto inoculadas com *F. proliferatum* via raiz (A e B) e de tomate inoculado com *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pelo mesmo método (C). D, E, F e G: Plantas testemunhas das mesmas espécies, com aplicação de água esterilizada nas raízes. H, I, J e K: Plantas de eucalipto, tomateiro, milho e cana-de-açúcar inoculadas com *F. proliferatum* via foliar.

Pelos experimentos de fitopatogenicidade, foi comprovada a segurança do isolado ISO-36 de *F. proliferatum*, demonstrando que esse isolado pode ser utilizado para experimentação em condições de campo, sem oferecer riscos de causar doença na cultura do eucalipto. Esses resultados também reforçam os resultados obtidos na caracterização molecular desse isolado, demonstrando ser de um grupo distinto de outras espécies de *Fusarium*.

Nos experimentos realizados para verificar a sensibilidade do isolado de *F. proliferatum*, aos inseticidas imidacloprid e thiamethoxam foi verificado que os dois inseticidas diminuíram o crescimento do fungo, porém, não inibiram totalmente seu crescimento (Figuras 6 e 7). O imidacloprid afetou mais intensamente, pois, nas placas de petri com esse produto, as colônias apresentaram diâmetro de aproximadamente 3 cm menor que as colônias da testemunha, sendo mais drástico na concentração de 1000 ppm. Para o thiamethoxam, o efeito foi menor, pois a redução foi de 1 a 2 cm em comparação com as das colônias testemunha de *F. proliferatum*. Não foi observado efeito entre das concentrações testadas (figura 7).

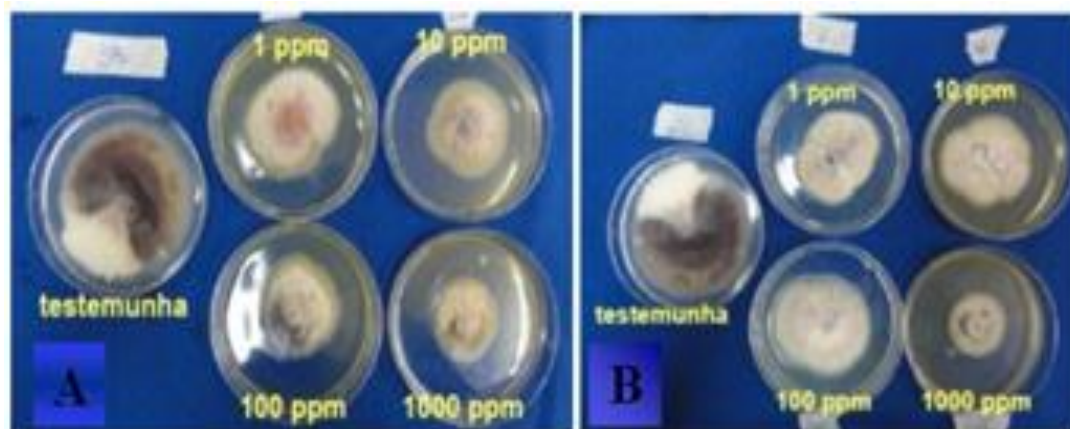


Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de imidacloprid (A) e thiamethoxam (B) adicionados ao meio de cultura sobre o crescimento de *F. proliferatum*. (Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h).

Moino e Alves (1998), avaliando o efeito fungitóxico dos inseticidas imidacloprid e fipronil sobre os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, também verificaram que o imidacloprid foi menos tóxico a estes fungos.

Almeida et al (2003), avaliando a compatibilidade de vários inseticidas sobre os fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *V. lecanii*, verificaram que thiamethoxam, em laboratório, foi compatível para todos os microrganismos, em todas as concentrações testadas, não afetando de forma significativa o crescimento e a esporulação desses fungos *in vitro*, diferente do observado no presente trabalho. Batista Filho et al. (2001) também obtiveram resultados positivos quanto à compatibilidade do thiamethoxam sobre *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, *V. lecanii* e *B. thuringiensis* em condições de laboratório. A diferença entre os resultados obtidos nesse

estudo em comparação ao autores citados foi devido ao período de avaliação. No presente estudo as avaliações foram diárias e foram encerradas tão logo o fungo de um dos tratamentos atingisse a borda da placa de petri. Nos demais trabalhos a avaliação de crescimento foi feita uma única vez após 15 dias da inoculação dos fungos, o que poderia dar tempo para que as colônias onde foi aplicado os produtos crescessem até cobrir quase toda a superfície da placa. Além disso, há a possibilidade do efeito diferencial entre as espécies de fungos testadas, uma vez que os demais autores não estudaram o efeitos de inseticidas sobre *F. proliferatum*.

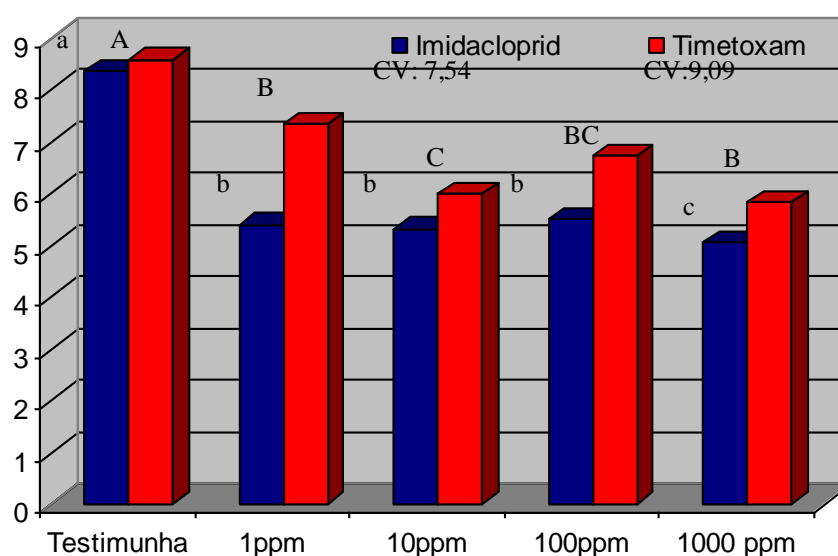


Figura 7. Crescimento micelial (cm) de *F. proliferatum* na presença dos inseticidas imidacloprid e thiamethoxam no meio de cultura. (Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h).

*Letras minúsculas não diferem significativamente pelo teste de Tukey $< 0,05$ para Thiamethoxam; Letras maiúsculas não diferem significativamente pelo teste de Tukey $< 0,05$ para imidacloprid.

De forma geral, a ação do inseticida imidacloprid foi mais intensa, pois afetou o fungo entomopatogênico em todas as concentrações testadas e mais intensamente na concentração de 1000 ppm. O thiamethoxam teve efeito fungistático e/ou fungitóxico menor que o imidacloprid, sendo variável independentemente da concentração testada.

CONCLUSÕES

- Foi confirmada a identificação de *F. proliferatum* como entomopatogênica à *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), sendo a primeira ocorrência desse fungo sobre essa espécie de praga no Brasil.
- *F. proliferatum* é capaz de penetrar no corpo do inseto a partir de 4 horas após a inoculação, principalmente pelas aberturas naturais do inseto.
- *F. proliferatum* (isolado ISO-36) não é fitopatogênico para cana-de-açúcar, milho, tomateiro e eucalipto.
- *F. proliferatum* demonstra sensibilidade aos inseticidas imidacloprid e thiamethoxam, sendo mais intensa para o imidacloprid.

LITERATURA CITADA

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; LAMAS, C.; LEITE, L.G.; TRAMA, M.; SANO, A.H. (2003) Avaliação da compatibilidade de defensivos agrícolas na conservação de microrganismos entomopatogênicos no manejo de pragas do cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, 70: .79-84.

ALVES, S.B. (Coord.).(1998). **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba. FEALQ, 1163p.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. (2001) Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotrop. Entomol.**, 30:437-447.

CALDARI JUNIOR, P. **Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais**. 1998. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

GOHARI, A. M., SEDAGHAT, N. ; JAVAN-NIKKHAH, M.; SABERI-RISEH, R. (2007). Mycoflora of wheat grains in the main production area in Kerman province, Iran. **International Journal of Agriculture and Biology**, 9: 635-636.

- MARIN, P.; CALLEJAS, C.; MORETTI, A.; VAZQUEZ, C.; GONZALEZ, M. T. (2010). Genetic variability and Fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. **Food Microbiology**, 27: 50–57.
- LESLIE, J. F.; PEARSON, C. A. S.; NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A. (1990). *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. **Phytopathology**, 80: 343-350.
- LESLIE, J.F.; BRETT, A.; SUMMERELL, B.A. (2006). **The *Fusarium* Laboratory**. Blackwell Publishing Professional. Iowa, USA. p. 224 -228.
- LINZ, U. (1991). Protocol optimization and the need for standarization of the polymerasa chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology** 2:98-102.
- LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; CASTELLA, G.; KOSTECKI, M.; GOLINSKI, P.; RITIENI, A.; CHELKOWSKI, J. (1998). Beauvericin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 3084–3088.
- MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M.; ARBEIT, R. (2003). Molecular epidemiology application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clinical Infect Disease**, 17: 153-164.
- MOINO Jr. A.; ALVES, S.B. (1998). Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 27: 611-619.
- MURRAY M.G; THOMPSON, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, 8:4321-4326.
- NELSON, P. E., DESJARDINS, A. E., PLATTNER, R. D. (1993). Fumonisin, Mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. **Annual Review Phytopathology**, 31: 233-252.

OECHSLER, R. A.; FEILMEIER, M. R.; LEDEE, D. R.; MILLER, D.; DIAZ, M. R.; FINI, M. E.; CAIU, J. W.; ALFONSO, C. E. (2009). Utility of Molecular Sequence Analysis of the ITS rRNA Region for Identification of *Fusarium* spp. from Ocular Sources..**Investigative Ophthalmology Visual Science**,50 (5): 2230-2236..

ROBERTS, D.W.(1991). Isolation of beauvericin of *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* toxin from an insect..**Mycopathologia**, 115: 185–189..

TAMURA, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases..**Molecular Biology and Evolution**, 9: 678-687.

TEETOR-BARSCH, G.H.; ROBERTS, D.W.
(1983) Entomogenous *Fusarium* species..**Mycopathologia**, 84: 3-16.

WILCKEN C. F.; SOLIMAN, E.P; SÁ, L.A.N.; BARBOSA, L.B.; DIAS; T.K.R.; FERREIRA-FILHO, J.P.; RODRIGUES, R. J. (2010) Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on eucalyptus in Brazil and its distribution..**Journal of Plant Protection Research**,. 50 (2): 201-206.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. **Anuário estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas: ano base 2009**. Brasília, 2010. P. 80.

ALVES, S.B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba. FEALQ, 1998.1163p

CAVALCANTI, N. **Efeito dos coespecíficos e voláteis das plantas *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Psidium guajava* L. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre o comportamento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**.Dissertação (Doutorado em Entomologia)- Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010. 67 p.

CARNE, P. B.; TAYLOR, K. L; HILLIS, W. E.; BROWN, A. G. **Insects pests:*Eucalyptus* for wood production**. 2 ed. Melbourne: CSIRO, Academic Press, 1984. P. 155-168.

CARPINTERO, D.L.; DELLAPÉ, P.M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae) **Zootaxa**,Auckland,n 1228: 61-68. 2006.

CLAYDON, N.; GROVE, J. Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous *Verticillium lecanii*.**Journal of Invertebrate Pathology**,Iowav. 40,;p.413-418. 1982

CROSA, G. M. *Thaumastocoris peregrinus* CARPINTERO & DELAPPE, 2005 (Heteroptera: Thaumastocoridae): new pest found in eucalyptus in Uruguay. IUFRO **Recent Advances in Forest Entomology**, Pretoria, South Africa. 2008.

CHILIMA, C. Z. New Eucalyptus pest recorded from Zimbabwe. In: **Forest Invasive Species Network** for Africa (FAO), 2007.<http://www.fao.org/forestry/fisna/26061/en/> Acesso em: Junho 2011

DÍAZ, M. P.; MACIAS A.F.; NAVARRO, S.R.; DE LA TORRE, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Interciencia**, Caracas, v.31,n.12,2006.

ELLIOTT, H.J.; OHMART, C.P.; WYLIE, F.R. **Insect pests of Australian forests**. Melbourne, Inkata Press. 1998. 214 p.

COULSON, R. N.; WITTER, J, A. **Entomología forestal ecología y control**. México , Noriega Editores. 115-145 p.1990.

FEGAN, M.; MANNERS; J. M.; MACLEAN, D. J.; IRWIN, J. A., SAMUELS, K. D.; HOLDOM, D. G.; LI, D. P. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, Tokyo, v 139 p 2075-81. 1993

FAO. El eucalipto en la repoblación forestal. Departamento de montes, 1980 Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/004/ac459s/AC459S00.HTM>, acesso em: 12 de agosto de 2011

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. V.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

HAJEK, A.E. **Ecology of terrestrial fungal entomopathogens**. Ithaca: Adv. Microb. Ecol, 1997. v. 15, p. 193-249.

HEGEDUS D, KHACHATOURIANS G The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. **Biotechnol. Adv.** v. 13, p. 455-490. 1995.

HEGEDUS D.; KHACHATOURIANS, G. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. **Journal of Invertebrate Pathology**, Iowa v .67 p 289-99.1996.

LAWSON, A.B.; D.L. DAHLSTEN.. Evaluation of systemic insecticides as a treatment option in integrated pest management of the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Müller) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology** v96,:1455–1462. 2003.

LESLIE, J.F.; BRETT, A.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* Laboratory**. Blackwell Publishing Professional. Iowa, USA. 2006. P. 224 -228.

JACOBS, D.H.; NESER, S. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Heteroptera: Thaumastocoridae): a new insect arrival in South Africa, damaging to *Eucalyptus* trees : research in action. **South African Journal of Science**, v. 101, n. 5, p. 233-236, 2005.

IGLESIAS, T.W. Global eucalyptus map 2009. GIT Forestry Consulting SL. Lugo, Spain 2010
Disponível em: <http://git-forestry.com/Global_Eucalyptus_Map.htm> Último acesso: 10 de agosto 2011.

LACEY, L. **Manual of Techniques in insect pathology**. San Diego, USA. Biological Techniques series. p 409, 1997.

LIANG, Z.Q. HAN, Y.F., CHU, H.L. AND LIU, A.Y.. Studies on the genus *Paecilomyces* in China. I. **Fungal Diversity**, v. 20, p. 83-101. 2005.

LOGRIECO, A. A MORETTI, CASTELLA, G, KOSTECKI,, GOLINSKI P, RITIENI J AND. CHELKOWSKI A .Beauvericin production by *Fusarium* species **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3084-3088. 1998

MARÍN-LOAIZA, J.C.; CÉSPEDES, C.L. Compuestos volátiles de plantas, origen, emisión efectos, análisis y aplicaciones en el agro. Chapingo , **Fitotecnia Mexicana**. v. 30, n.4, p. 327-351. 2007.

MARTÍNEZ, G & BIANCHI, M Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellappé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). Montevideo. **Agrociencia** v. 14, n. 1, p. 15–18. 2010.

MENTEN J.O. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (tass) God “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, v.1, n.2, p 57 -66, 1976.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Especial projeto Genolyptus**. Disponível em: <<http://www.ftp.mct.gov.br/especial/genolyptus.htm>>. Acesso em: 5 maio 2008.

MURRAY M.G; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, New York , v.8, p 4321-4326, 1980

NOACK, A.E. & COVIELLA, C.E. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Hemiptera: Thaumastocoridae): first record of this invasive pest of *Eucalyptus* in the Americas. **General and Applied Entomology**, v. 35, 2 p. 2006.

NOACK, A.; ROSE, H. Life-history of *Thaumastocoris peregrines* and *Thaumastocoris* sp. In the laboratory with some observations on behaviour. **General and Applied Entomology** v. 36. P. 27-33. 2007.

PEDROSA-MACEDO , J. H. (Coord.). **Manual de pragas em florestas. Pragas florestais do sul do Brasil**. IPEF/SIF, Piracicaba, V. 2, 111 p., 1993.

RIVERA, A.; BUSTILLO, A.; BRIDGE, P. Caracterización bioquímica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana* procedentes de la broca del café, *Hypothenemus hampei*. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogota, v23 p. 51-57.1997.

SANTADINO, M.; LILJESTROM, G.; COVIELLA, C. Preferencia alimentaria y de oviposición de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellape (Heteroptera: Thaumastocoridae), chinche del

eucalipto, sobre distintas especies de *Eucalyptus* spp. en Argentina. In: CONGRESO FORESTAL MUNDIAL, 2009, Buenos Aires. **Anais**. Buenos Aires: 2009, CD-ROM. Disponível em: <http://www.cfm2009.org/es/programapost/resumenes/index.asp>

SILVEIRA, R. L. V. A.; HIGASHI, E. N.; SGARBI, F.; MUNIZ, M. R. A. Seja o doutor do seu eucalipto. Arquivo do agrônomo. **Informações agrônômicas**, Piracicaba n.93, p.1-23, 2001.

WILCKEN C. F.; SOLIMAN, E.P; SÁ, L.A.N.; BARBOSA, L.B.; DIAS; T.K.R.; FERREIRA-FILHO, J.P.; RODRIGUES, R. J. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on eucalyptus in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research** v. 50, n. 2, p. 201-206, 2010.

WILCKEN, C.F. Percevejo bronzeado do eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*) (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileiras. **Alerta PROTEF**, IPEF, n.3, 2008. Disponível em: <http://www.ipef.br/protecao/alerta-percevejo.pdf>. Acesso em agosto de 2010.

WILCKEN, C. F.; OLIVEIRA, N. C. de; SARTÓRIO, R. C.; LOUREIRO, E. B.; BEZERRA-JUNIOR, N.; ROSADO-NETO, G. H. Ocorrência de *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) em plantações de eucalipto no estado do Espírito Santo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.1, p.113-115, 2008.

WILCKEN, C. F.; BERTI-FILHO, E.; OTTATI, A. L. T.; FIRMINO, D. C.; COUTO, E. B. do. Ocorrência de *Phoracantha recurva* Newman (Coleoptera: Cerambycidae) em eucalipto no Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia forestalis**, São Paulo, n. 62 , p. 149-153, 2002.

WILCKEN, C. F.; COUTO, E. B.; ORLATO, C.; FERREIRA-FILHO, P. J.; FIRMINO, D. C. Ocorrência do psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) em florestas de eucalipto no Brasil. Circular técnica IPEF, n. 201, p. 1-11, 2003. Disponível em: http://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica_23/01/2004, Acesso em: 28 de jan. de 2009.

WESSELS, J.G.H. Fungi in their own right. **Fungal Genet. Biol.** v. 27, p. 134-145.1999