

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

GRASIELLE ADRIANE TOSCAN LORENCETTI

**EFEITO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E PRODUTOS NATURAIS SOBRE
Thaumastocoris peregrinus CARPINTERO & DELLAPÉ (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE) E INDUÇÃO DE RESISTENCIA EM PLANTAS**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2013

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

GRASIELLE ADRIANE TOSCAN LORENCETTI

**EFEITO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E PRODUTOS NATURAIS SOBRE
Thaumastocoris peregrinus CARPINTERO & DELLAPÉ (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE) E INDUÇÃO DE RESISTENCIA EM PLANTAS**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2013

GRASIELLE ADRIANE TOSCAN LORENCETTI

**EFEITO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E PRODUTOS NATURAIS SOBRE
Thaumastocoris peregrinus CARPINTERO & DELLAPÉ (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE) E INDUÇÃO DE RESISTENCIA EM PLANTAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro
Co-orientadores: Prof.^a Dra. Michele Potrich e
Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva

PATO BRANCO

2013



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n.º 077

**Efeito de fungos entomopatogênicos e produtos naturais sobre
Thaumastocoris peregrinus Carpinteiro & Dellapé (Hemiptera:
Thaumastocoridae) e na indução de resistência em plantas
por**

Grasielle Adriane Toscan Lorencetti

Dissertação apresentada às nove horas do dia seis de março de dois mil e treze, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Leonardo Rodrigues
Barbosa**
Embrapa Floresta

**Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da
Silva**
UTFPR/DV

Profª. Drª. Michele Potrich
UTFPR/DV

Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro
UTFPR/DV
Orientador

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. André Brugnara Soares
Coordenador do PPGAG

*O Termo de aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGAG.

L868e

Lorencetti, Grasielle Adriane Toscan.

Efeito de fungos entomopatogênicos e produtos naturais sobre *Thaumastocoris peregrinus* carpintero & dellapé (Hemiptera: thaumastocoridae) e indução de resistência em plantas / Grasielle Adriane Toscan Lorencetti. -- 2013.
64 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro

Coorientador: Profa. Dra. Michele Potrich

Coorientador: Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2013.

Bibliografia: f. 45 – 64.

1. Percevejo bronzeado. 2. Controle alternativo. 3. Indução de resistência. I. Mazaro, Sérgio Miguel, orient. II. Potrich, Michele, coorient. III. Silva, Everton Ricardi Lozano da, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. V. Título.

CDD (22. ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco

Aos meus pais, Augusto e Losmary, que me ensinaram que sonhar e concretizar os sonhos só depende de nossa vontade!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas bênçãos e proteção diária.

Aos meus pais Losmary e Augusto por todo o apoio e dedicação, sempre me dando forças para não desistir.

Aos meus irmãos e família pelo apoio e incentivo durante todo o mestrado.

Aos meus amigos pelo carinho e companheirismo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro pela orientação, apoio e confiança.

Aos meus co- orientadores Prof. Dr.^a Michele Potrich e Prof. Dr. Everton Lozano da Silva por toda a dedicação e entusiasmo repassados ao longo do curso e na realização deste trabalho.

Aos estagiários do Laboratório de Controle Biológico da UTFPR de Dois Vizinhos, pela colaboração e valiosa ajuda na realização dos experimentos.

À Embrapa Florestas, e em especial ao pesquisador Leonardo Barbosa, pela parceria e auxílio.

À UTFPR, campus Pato Branco, sede do curso, e à UTFPR campus Dois Vizinhos, por ter cedido a estrutura para a realização dos experimentos.

À todos, o meu sincero agradecimento!

“Nunca o homem inventará nada mais simples nem mais belo do que uma manifestação da natureza. Dada a causa, a natureza produz o efeito no modo mais breve em que pode ser produzido.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

LORENCETTI, Grasielle A. T. EFEITO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E PRODUTOS NATURAIS SOBRE *Thaumastocoris peregrinus* CARPINTERO & DELLAPÉ (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) E INDUÇÃO DE RESISTENCIA EM PLANTAS. 2013. 70 f. Dissertação, (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (área de Concentração: Produção vegetal). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2013.

O percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), é um inseto-praga de origem australiana, que ataca espécies do gênero *Eucalyptus* em vários países. No Brasil, sua ocorrência foi relatada em 2008 do Rio Grande do Sul e em junho de 2012 foi registrada ocorrência na região sudoeste do Paraná. Também foram encontrados insetos possivelmente sendo atacados pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em campo. Após procedimentos de isolamento e identificação, o fungo foi armazenado e denominado UTFPR 01. Com a verificação do potencial de controle de *B. bassiana* sobre *T. peregrinus*, realizou-se estudo sobre a patogenicidade de isolados não comerciais, oriundos do Instituto Biológico de Campinas (IBCB 75, IBCB 210, IBCB 254) e a possibilidade de uso do fungo *Isaria* sp. (IBCB 367), comparando-os com o UTFPR 01. Soluções com $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ foram aplicada sobre folhas de *Eucalyptus camaldulensis* e mantidas em frascos de vidro vedados com filme plástico recebendo 13 insetos adultos. As avaliações ocorreram até o quinto dia retirando os insetos mortos que foram colocados em câmara úmida para extrusão do patógeno. Também foram testados os produtos: Orobor®, Topneem, Rotenat, Rotenat CE, Baicao, Compostonat, Pironat, Assist, Extrato de Alho e Calda Bordalesa sobre a mortalidade de *T. peregrinus*. Folhas de *E. camaldulensis* foram mergulhadas em solução diluída dos produtos, nas doses recomendadas pelos fabricantes. Após secagem o substrato foi transferido para tubos de vidro contendo 10 insetos adultos de *T. peregrinus* e mantidos durante cinco dias à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. A avaliação foi feita diariamente retirando-se os insetos mortos. Os melhores resultados foram obtidos com os produtos Topneem, Rotenat, Rotenat CE e Compostonat. Estes produtos foram avaliados quanto a sua provável ação na indução de resistência nas plantas de *Eucalyptus*. Utilizou-se cotilédones de soja como planta indicadora e o indutor padrão quitosana a 1% como testemunha “branca”. Avaliou-se o teor de fitoalexina gliceolina, proteínas e a atividade da FAL (fenilalanina amônia-liase). Como resultados induziram a produção de fitoalexinas e atividade da FAL os produtos Topneem e o Rotenat CE. Em relação ao teor de proteínas não correu diferença estatística entre os tratamentos. Apresentaram efeito sobre a mortalidade de *T. peregrinus* os fungos *B. bassiana* e *Isaria* sp. bem como os produtos Topneem e Rotenat CE, os quais também apresentaram potencial na indução de resistência em plantas.

Palavras- chave: Percevejo bronzeado; Controle alternativo, indução de resistência

ABSTRACT

LORENCETTI, Grasielle A. T. EFFECT ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND NATURAL PRODUCTS ON *Thaumastocoris peregrinus* CARPENTER & DELLAPÉ (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) AND INDUCTION OF RESISTANCE IN PLANTS. 2013. 70 f. Dissertation (MSc in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Area of Concentration: Crop). Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2013.

The bronzed bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), is an insect pest of Australian origin, attacking *Eucalyptus* species in several countries. In Brazil, its occurrence was reported in 2008 in Rio Grande do Sul and in June 2012 was recorded occurrence in the southwest region of Paraná. Also found were possibly being attacked by insects entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the field. After isolation and identification procedures, the fungus was stored and called UTFPR 01. With verification of the potential control *B. bassiana* against *T. peregrinus*, a study was conducted on the pathogenicity of isolates non-commercial, from the Biological Institute of Campinas (IBCB 75, IBCB 210 and IBCB 254) and the possibility of using the fungus *Isaria* sp. (IBCB 367), comparing them with UTFPR 01. Solutions with 1.0×10^8 conidia mL⁻¹ were applied to leaves of *Eucalyptus camaldulensis* and maintained in glass bottles closed with plastic film 13 receiving adult insects. Assessments occurred until the fifth day removing dead insects were placed in a moist chamber for extrusion of the pathogen. We also tested products: Orobor®, Topneem, Rotenat, Rotenat CE Baicao, Compostonat, Pironat, Assist Extract, Garlic and Lime Bordeaux on mortality of *T. peregrinus*. Sheets *E. camaldulensis* leaves were dipped in dilute solution products, in doses recommended by the manufacturers. After drying, the substrate was transferred to glass tubes containing 10 adult insects of *T. peregrinus* and maintained for 5 days at 26 ± 2 ° C, RH $70 \pm 10\%$ and photoperiod of 14 hours. The evaluation was done daily by removing the dead insects. The best results were obtained with the products Topneem, Rotenat, Rotenat CE and Compostonat. The best results were obtained with the products Topneem, Rotenat, Rotenat CE and Compostonat. These products have been assessed for their likely action in the induction of resistance in *Eucalyptus*. It was used as an indicator of soybean cotyledons of induced resistance and the inductor pattern 1% chitosan as witness "white". We evaluated the phytoalexin glyceollin content, protein and activity of PAL (phenylalanine ammonia lyase). As results induced phytoalexin and activity of PAL the products Topneem and Rotenat CE. Regarding protein content did not run statistical difference between treatments. Had an effect on mortality of *T. peregrinus* fungi *B. bassiana* and *Isaria* sp. and products Topneem and Rotenat CE, which also showed potential to induce resistance in plants.

Keywords: bronzed bug; alternative control, induction of resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1** Prateamento inicial das folhas em *Eucalyptus* spp (a e b). Folha de *E. camaldulensis* com sintomas de bronzeamento (c). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, jun. 2012.. 14
- Figura 2.2** Ovos de *T. peregrinus* (a). Ninfas de *T. peregrinus* (b). Adulto de *T. peregrinus* observado em microscópio estereoscópico (c). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, jun. 2012. 14
- Figura 4.1** – Infecção promovida pelo fungo *Beauveria bassiana* (a e b) e *Isaria* sp. (c) sobre insetos adultos de *Thaumastocoris peregrinus*, cinco dias após inoculação. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012. 28
- Figura 4.2** - Percentual de mortalidade diária acumulada de *Thaumastocoris peregrinus* nos tratamentos com isolados de *Beauveria bassiana* e *Isaria* sp., mantidos em câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012. 30
- Figura 5.1** Soluções de produtos naturais preparado em recipiente tipo Becker (a). Folha de *Eucalyptus camaldulensis*, secando após serem mergulhadas nos produtos (b). Frascos com folhas e insetos na B.O.D (c). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012..... 38
- Figura 5.2.** A) Aplicação do produto sobre cotilédones de soja em placa de Petri[®]. B) Agitação magnética - extração de gliceolina; C) Leitura sendo realizada em espectrofotômetro UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Isaria</i> sp. utilizados no bioensaio e respectiva origem. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.	25
Tabela 4.2 – Porcentagem média (\pm EP) de mortalidade confirmada de adultos de <i>Thaumastocoris peregrinus</i> por <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Isaria</i> sp. ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.	28
Tabela 5.1 – Produtos naturais avaliados no controle da <i>T. peregrinus</i> em laboratório. UTFPR, Dois Vizinhos – P R, 2012.....	37
Tabela 5.2 - Porcentagem média (%) (\pm Erro Padrão) de mortalidade de adultos de <i>T. peregrinus</i> por produtos naturais, 2 dias após aplicação ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.....	40
Tabela 5.3 - Absorbância de fitoalexina gliceolina (Absorb./por grama de peso fresco), proteínas (mg.g tecido ⁻¹) e atividade da enzima FAL (mg.g tecido ⁻¹) em cotilédones de soja pelos diferentes produtos avaliados. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.....	42

LISTA DE SIGLAS

ABRAF	Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas
AMSOP	Associação dos Municípios do Sudoeste do Paraná
ANVISA	Agencia Nacional de vigilância sanitária
BDA	Batata-dextrose-ágar
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAL	Fenilalanina Amônia Liase
IBCB	Instituto Biológico de Campinas, (SP) Brasil
IPEF	Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais
MG	Minas Gerais - Unidade da Federação
RS	Rio Grande do Sul - Unidade da Federação
ONG	Organização não Governamental
ONU	Organização das Nações Unidas
PR	Paraná - Unidade da Federação
UTM	Universal Transverse Mercator

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	4
2. CAPÍTULO I - PRIMEIRO REGISTRO DE <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (HEMIPTERA, THAUMASTOCORIDAE) NA REGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ .	11
2.1 RESUMO:.....	11
2.2 ABSTRACT:.....	11
3. CAPÍTULO II - OCORRÊNCIA NATURAL DE <i>Beauveria bassiana</i> (BALS. CRIV.) VUILL. 1912 (ASCOMYCETES: CLAVICIPITACEAE) SOBRE <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)	16
3.1 RESUMO.....	16
3.2 ABSTRACT.....	16
3.3 INTRODUÇÃO	17
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.6 CONCLUSÃO	21
4. CAPÍTULO III – POTENCIAL DE USO DE <i>Beauveria bassiana</i> VUILL. E <i>Isaria</i> sp. PARA O CONTROLE DE <i>Thaumastocoris peregrinus</i> CARPINTERO & DELLAPÉ (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE).....	22
4.1 RESUMO.....	22
4.2 ABSTRACT.....	22
4.3 INTRODUÇÃO	23
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.4.1 Obtenção, Produção e Preparação dos Isolados.....	25
4.4.2 Obtenção e Manutenção do Percevejo Bronzeado	26
4.4.3 Avaliação da Patogenicidade de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Isaria</i> sp sobre <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	26
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.6 CONCLUSÃO	32
5. CAPÍTULO IV – AVALIAÇÃO de PRODUTOS naturais sobre <i>Thaumastocoris peregrinus</i> CARPINTERO & DELLAPÉ (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) E SOBRE A INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS.....	33
5.1 RESUMO.....	33
5.2 ABSTRACT:.....	33
5.3 INTRODUÇÃO	34
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.4.1 Obtenção e Manutenção do Percevejo Bronzeado	36
5.4.2 Aplicação dos Produtos Naturais.....	36

5.4.3	Indução de Fitoalexinas em Cotilédones de Soja	38
5.4.4	Quantificação de Proteínas.....	39
5.4.5	Atividade da Fenilalanina Amônialiase (FAL).....	39
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.5.1	Mortalidade de <i>T. peregrinus</i> com Uso dos Produtos Naturais.....	40
5.5.2	Indução de Fitoalexinas, Quantificação de Proteínas e Atividade da Fenilalanina Amônialiase (FAL) em Cotilédones de Soja	41
5.6	CONCLUSÕES	43
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
7.	REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO GERAL

Thaumastocoris peregrinus Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), popularmente conhecido como percevejo bronzeado, introduzido no Brasil em 2008, é um inseto-praga do gênero *Eucalyptus*. O nome popular vem do sintoma associado à injúria que ele causa, sugando a seiva das folhas, que ficam com aspecto bronzeado (BARBOSA et al., 2009).

Este inseto vem causando preocupação ao setor florestal brasileiro, devido à facilidade de adaptação às condições climáticas e rápida dispersão (SOLIMAN, 2010). Além disso, esta praga provocou danos consideráveis nos países onde foi introduzida. A hipótese apresentada por Wilcken et al. (2010) é que a disseminação do inseto está seguindo o traçado das rodovias, sendo o transporte de madeira de eucalipto o principal veículo de dispersão.

O gênero *Eucalyptus* é nativo da Austrália. Sua produção em escala comercial teve início com o estabelecimento de pequenas plantações no sul da Europa e norte da África, na qual sua adaptabilidade estimulou a introdução em vários países (LIMA, 1993). No Brasil, foi introduzido no país a cerca de 100 anos, e representa atualmente uma das principais fontes de produção madeireira, atendendo a diversos segmentos da indústria, como papel e celulose, carvão vegetal, lenha, serrados, compensados e painéis reconstituídos (ABRAF, 2012).

De acordo com a ABRAF (2012), a área ocupada por plantios florestais no Brasil em 2011, totalizou 6.516.000 ha, sendo 74,8% correspondente à área de plantios de *Eucalyptus*. A maior concentração de plantios encontram-se nas regiões Sul e Sudeste do país (73,8%), o que se justifica em função da localização das principais unidades industriais dos segmentos de papel e celulose, painéis de madeira industrializada, siderurgia a carvão vegetal e madeira mecanicamente processada (ABRAF, 2012).

A cada ano, o setor florestal vem ganhando destaque na economia brasileira. Novos e importantes investimentos estão se desenvolvendo em várias regiões, visando suprir a demanda interna e também com vistas à exportação. Somente em 2009, a área plantada no país registrou um crescimento 4,4% comparada com o ano anterior (ABRAF, 2010). O ano de 2011 foi eleito pela Organização das Nações Unidas (ONU) como o “Ano Internacional das Florestas”, destacando a importância dada ao segmento florestal. Neste mesmo ano o setor de florestas plantadas representou 3,1% do total das exportações do Brasil, empregando 5,0% da população economicamente ativa no país (SBS, 2012).

O gênero *Eucalyptus* permaneceu praticamente imune ao ataque de insetos por um longo período desde sua introdução no país. No entanto, nos últimos anos, a produtividade

dos plantios vem sendo prejudicada pela ação de diversos insetos-praga. A introdução de insetos - praga exóticos causa significativos prejuízos a economia pelos danos causados as florestas, bem como ao ambiente, pois são insetos estranhos aos predadores aqui estabelecidos (GARLET, 2012). De acordo com Wilcken et al. (2010), entre as pragas exóticas recentes de maior importância, destacam-se o Psilídeo-de-concha, *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psyllidae), as vespas *Epichrysocharis burwelli* Schauff e *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) e o percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae).

O percevejo bronzeado teve sua presença registrada no Brasil pela primeira vez em 2008, no município de São Francisco de Assis, no Rio grande do Sul, sendo posteriormente registrado em São Paulo e no Paraná (BARBOSA et al. 2009). Para a região sudoeste do Paraná sua ocorrência foi registrada em 2012. Acredita-se que a praga tenha entrado no país através de correntes de ar ou pelo transporte de materiais, como lenha e madeira, originários da Argentina e Uruguai, onde o inseto foi detectado em 2005 (IPEF, 2010).

De acordo com Barbosa et al. (2009), o inseto adulto apresenta 3 mm de comprimento, corpo achatado e cor marrom clara. As ninfas são claras e vão escurecendo com o tempo, os ovos são pretos, achatados e com a região central côncava, depositados geralmente nas imperfeições ou próximo à nervura central das folhas, ramos e pecíolos. Podem ocorrer de forma isolada ou em grupos.

O aparelho bucal sugador labial confere a *T. peregrinus* o hábito alimentar de perfurar as folhas e ramos para sugar a seiva, provocando a seca das partes atacadas. Os danos ocasionados por *T. peregrinus* são o prateamento de folhas, seguido do secamento e queda (WILCKEN, 2008). De acordo com Noack et al. (2009), quando intensamente infestadas, as árvores exibem um avermelhamento das folhas, e conforme a infestação progride, a copa inteira fica amarelo- avermelhada e a árvore perde as folhas. As espécies mais suscetíveis ao ataque do inseto na África do Sul são *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus tereticornis*, sendo *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus paniculata*, *Eucalyptus robusta* e *Eucalyptus saligna*, pouco suscetíveis (JACOBS; NESER, 2005).

Na Austrália, em áreas urbanas, o controle de *T. peregrinus* é realizado através de um inseticida sistêmico (Imidacloprid), injetado no tronco das árvores (NOACK et al., 2009). No entanto, o uso em plantios comerciais não é recomendado, devido aos possíveis impactos ambientais e entraves aos processos de certificação florestal.

Os inseticidas sistêmicos quando aplicados nas folhas, ramos e raízes das plantas, são rapidamente absorvidos e translocados com a seiva para as várias regiões das plantas, em quantidades letais para insetos que se alimentam destas. Os sistêmicos também são aplicados em sementes, tubérculos e bulbos que, ao germinarem já apresentam o inseticida circulando com a seiva (MARICONI, 1977).

A adoção de medidas de controle menos agressivos pode estar inserida em um programa de manejo integrado de pragas, no qual diversos métodos são empregados de maneira conjunta, buscando no mínimo a redução na quantidade de produtos químicos utilizados. As empresas certificadas buscam adotar práticas que aumentem a produtividade, conservando o meio ambiente, como o manejo integrado de pragas, doenças e plantas espontâneas, dando preferência ao controle biológico, ao controle cultural e à utilização de produtos menos tóxicos e seletivos a inimigos naturais (FARIA, 2009).

Há um consenso entre os pesquisadores de diversos países, onde *T. peregrinus* já foi detectado, de que o controle biológico é uma das principais estratégias a ser utilizada (BARBOSA et al., 2010). No controle biológico, procura-se manter os insetos-praga em baixa população, exigindo monitoramento e ações antecipadas, possibilitando um controle efetivo, mas sem efeitos nocivos (LAZZARINI, 2005).

Países como a África do Sul, Chile e Brasil realizaram estudos com vistas à importação do parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), único inimigo natural da praga na Austrália, na tentativa de efetuar o seu controle (IPEF, 2010). Após dois anos de pesquisa, em agosto de 2012, foi realizada a primeira liberação no Brasil, em Paraopeba (MG). Mesmo com condições climáticas consideradas críticas, durante o período da liberação (baixa umidade relativa e alta temperatura), o parasitoide conseguiu completar seu ciclo biológico, com novos indivíduos emergindo em campo. A liberação no estado de Minas Gerais foi escolhida devido à grande ocorrência do percevejo, e pela maior facilidade para o transporte dos parasitoides, já que seu tempo de vida é em torno de apenas 1 a 2 dias (IPEF, 2012).

Outros estudos estão sendo desenvolvidos na busca de estratégias de controle para o inseto. Entre as opções destaca-se o emprego do controle microbiano, com o uso de fungos entomopatogênicos e a possibilidade de utilização de produtos naturais.

De acordo com Alves (1998), os fungos entomopatogênicos representam uma alternativa viável no controle de vários insetos pragas das culturas, sendo os primeiros patógenos a serem utilizados no controle microbiano. Os primeiros testes com fungos que infectam insetos foram realizados no final do século XIX, mas somente um século depois os

primeiros resultados práticos começaram a surgir, havendo atualmente vários inseticidas biológicos à base de fungos (micoinseticidas) comercializados em diferentes países (FARIA, 2001).

Sua utilização para o controle biológico de pragas tem sido estudada há mais de 100 anos e, devido às crescentes preocupações com sistemas mais sustentáveis de produção, está ocorrendo um aumento no interesse do desenvolvimento comercial desses patógenos. No Brasil, alguns programas de controle já foram implantados, como o uso de fungos para o controle da cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (ALVES, 1998; ALMEIDA, 2001) e das cigarrinhas-das-pastagens *Deois* spp. e *Zulia entrenaria* (Hemiptera: Cercopidae) (ALVES, 1992), ambos com amplo sucesso no controle destes insetos. Trabalhos para o controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) (MARTINS et al., 2004), do cascudinho de aviário *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) (ALVES et al., 2004, ROHDE et al., 2006), recomendações para o uso com gafanhotos (MAGALHÃES et al., 2007), e a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) (POTRICH et al., 2011).

Segundo Alves (1998), os fungos podem atacar as mais diversas fases de desenvolvimento do inseto, são altamente virulentos e com penetração via tegumento, o que pode ser uma vantagem quando comparados a outros tipos de entomopatógenos que penetram via oral, principalmente no controle de insetos sugadores. Além disso, os conídios dos fungos têm alta capacidade de dispersão horizontal, sendo transportados à grandes distâncias por vários agentes tais como: vento (dispersão anemófila), insetos (dispersão entomófila), pássaros (dispersão ornitófila) e água (dispersão hidrófila).

O ciclo de infecção do fungo inicia-se a partir do contato do propágulo com o inseto. Em uma reação compatível, o reconhecimento e adesão antecedem a germinação do fungo na cutícula do hospedeiro, seguida de penetração e colonização da hemocele (ALVES, 1998). O avanço no processo de infecção resulta na ruptura da cutícula do inseto, permitindo o crescimento externo do fungo. A morte do inseto ocorre durante a colonização da hemocele com o rompimento dos processos fisiológicos, pois o fungo ramifica-se colonizando o hospedeiro, desde os corpos gordurosos, até o sistema nervoso, o que provoca a morte devido a produção de micotoxinas e ao esgotamento de nutrientes, podendo o hospedeiro também morrer por inanição e obstrução interna. Ainda de acordo com este mesmo autor, tem influência direta sobre o processo de infecção as condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, além das condições nutricionais e da suscetibilidade do hospedeiro.

Entre os fungos entomopatogênicos capazes de causar mortalidade em populações de insetos, tem destaque o fungo *Beauveria bassiana* Vuill. (Ascomycetes: Clavicipitaceae) e *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae).

Os fungos do gênero *Isaria* sp. podem infectar uma ampla gama de hospedeiros incluindo Lepidoptera, Diptera, Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera e Arachnida (ZIMMERMANN, 2008). Sobre hemípteros tem ação comprovada sobre pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) (LOPES, 2008), mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Potrich et al., 2011), e *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae) (MUSTU, 2011).

Já o fungo *B. bassiana*, de acordo com Faria (2001), é empregado em escala comercial em países como Estados Unidos e México, sendo que volumes consideráveis foram comercializados no Brasil para o controle de ácaros do mamão e da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Além disso, já foi utilizado para o controle de cochonilhas e se mostrou eficiente para controle de cupins e insetos-praga como o moleque-da-bananeira *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) (BATISTA-FILHO, 1991), mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (FARIA; WRAIGHT, 2001; POTRICH, 2011), percevejo-castanho-da-raiz, *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae) (XAVIER; ÀVILA, 2005). Também é comercializado como inseticida microbiológico de uso agrícola, para o controle de pragas através da aplicação foliar nas culturas de crisântemo, eucalipto, pepino e soja, para diversas pragas e aplicação na parte aérea do caule na cultura de erva-mate (ANVISA, 2012), para o controle da broca da erva-mate *Hedypathes betulinus* (BORGES et al., 2010)

No Brasil o uso comercial de *B. bassiana* ocorre através do inseticida biológico Boveril[®] WP da Itaforte BioProdutos, Registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento sob o nº 4902, para o controle do ácaro rajado *Tetranychus urticae* em cultivos protegidos e para o gorgulho do eucalipto *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). Para *Isaria* sp. não existe produto registrado.

A ocorrência natural de ambos os fungos foi registrado sobre vários insetos. Sobre *T. peregrinus*, *B. bassiana* foi relatado no Rio Grande do Sul, em plantios comerciais de *Eucalyptus dunnii* (SMANIOTTO et al., 2012).

Em laboratório, Soliman et al. (2010) testou o fungo nas concentrações de $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹, como uso de um produto comercial. Para isto, foi utilizado como substrato folhas de *E. camaldulensis* em placas de Petri[®] e ninfas de 3^o e 4^o ínstar de *T. peregrinus*. Foi verificada elevada mortalidade (97,5%)

para a maior concentração, demonstrando resultado positivo no controle biológico do percevejo bronzeado. Isolados não comerciais foram testados por Lorencetti et al. (2011), na concentração $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹, obtendo mortalidade confirmada de 78,6% para o melhor isolado. No entanto, estudos quanto à utilização de fungos entomopatogênicos não comerciais e o teste de virulência de diferentes isolados ainda apresentam-se como um vasto campo de estudos no Brasil.

Neste sentido, foram testados isolados de *B. bassiana* e *Isaria* sp. para o controle do *T. peregrinus*, objetivando verificar o efeitos dos mesmos sobre a patogenicidade deste inseto-praga.

A atuação e permanência dos fungos entomopatogênico na natureza, não tem influencia sobre seres vivos considerados benéficos, promovendo a proteção das plantas e o equilíbrio do ambiente. Espera-se que este fato indique que este fungos, além de promover o controle de *T. peregrinus* deva melhorar as condições e promover o crescimento vegetativo e a resistência das plantas de Eucalipto.

Além do controle biológico, o controle alternativo com a utilização de produtos de origem natural apresentam potencial para a utilização no controle de pragas florestais, e pode representar uma alternativa promissora para *T. peregrinus*. Dentre os possíveis produtos tem destaque: Orobor®, Topneem, Rotenat, Rotenat CE, Baicao, Compostonat, Pironat, Assist, Extrato de Alho e Calda Bordalesa, por serem utilizados na agricultura orgânica. O extrato da planta timbó *Derris* sp. , por exemplo, apresenta atividade inseticida para operárias de *Atta sexdens* rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae) (BUENO, 2008). O óleo de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss), apresenta eficácia comprovada para hemípteros como os pulgões *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) (CARVALHO, 2008) além de cerca de 400 espécies de insetos (EMBRAPA, 2006).

O uso de produtos naturais vem ganhando espaço juntamente com o aumento da produção e valorização dos alimentos orgânicos, representando uma boa opção para o manejo de pragas e a manutenção dos organismos benéficos ao ambiente.

Soma-se a isso o fato de muitos produtos naturais apresentarem capacidade de induzir resistência em plantas, atuando no surgimento de mecanismos de defesa. Estes mecanismos de defesa induzidos podem ser estruturais, como papila, lignificação e tilose, ou bioquímicos, como o acúmulo de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Esta capacidade pode ser comprovada através de testes de produção de fitoalexinas (metabólito secundário), proteínas e FAL (fenilalanina amônia-

liase). Os experimentos podem ser realizados em cotilédones de soja e utilizados indutores de referência, como a quitosana, para comparação.

Segundo SCHWAN-ESTRADA et al. (2000) a utilização de cotilédones de soja mostra-se como excelente ferramenta para estudos envolvendo ação elicitora de moléculas de origem biótica e abiótica, sendo a fitoalexina gliceolina importante meio para demonstrar a interação da planta com fitopatógenos. O uso da quitosana na agricultura está tomando importância pela sua atividade elicitora sobre uma enorme gama de plantas (MAZARO, 2007) e possui ação comprovada, sendo utilizada como um indutor de referência em estudos de indução a fitoalexinas (MAZARO, 2008).

No Brasil, a indução de resistência, segundo Bonaldo (2005), teve início na década de 70 com o Instituto Biológico de São Paulo, com destaque para estudos de indução de resistência em cafeeiros contra *Hemileia vastatrix*, com o uso de diferentes agentes, como *Sacchaomyces cerevisiae*, *Bacillus thuringiensis* uredósporos inativados de *H. vastatrix*.

De acordo com Martins (1991), várias substâncias químicas e extratos com suposta atividade indutora, são citados na literatura, além de esporos de fungos não patogênicos, esporos fúngicos inativados e extratos vegetais. Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtido a partir de plantas medicinais da flora nativa, tem indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos e indução de fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características de elicitor (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). Segundo Sticher et al. (1997), elicitores são moléculas capazes de ativar respostas de defesas nas plantas atuando como indutores de resistência.

O uso de agentes bióticos como fungos entomopatogênicos e produtos naturais, inoculados nas plantas hospedeiras, podem representar alternativas viáveis para o controle de *T. peregrinus*, bem como promover a proteção das plantas contra o ataque de patógenos, melhorar a nutrição e evitar a incidência de doenças e pragas, através da ativação de mecanismos de defesa. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de fungos entomopatogênicos e produtos naturais, para o controle de *T. peregrinus* verificando se os mesmos possuem ação na indução de resistência de plantas.

2. CAPÍTULO I - PRIMEIRO REGISTRO DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA, THAUMASTOCORIDAE) NA REGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ

Comunicação científica submetida em 20 de julho de 2012 – Revista Arquivos do Instituto Biológico (formatado de acordo com esta revista) – Qualis capes B3 em Ciências Agrárias I

2.1 RESUMO:

Em junho de 2012 foi registrada a primeira ocorrência de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), conhecido como percevejo bronzeado, na região sudoeste do Paraná. *T. peregrinus* foi registrado no município de Realeza (Coordenadas UTM SAD 69: 245000 E 7153682 S), atacando, principalmente, árvores isoladas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn (Myrtaceae). Exemplares deste inseto foram coletados e encaminhados para identificação no Laboratório de Controle Biológico da UTFPR, campus Dois Vizinhos. O primeiro registro de *T. peregrinus* no Brasil ocorreu em 2008, no Rio Grande do Sul e desde então este inseto-praga vem se disseminando por vários estados de forma extremamente rápida, representando uma séria ameaça aos plantios de *Eucalyptus* em todo país.

Palavras-chave: Percevejo bronzeado, inseto-praga, *Eucalyptus*

2.2 ABSTRACT:

In June 2012 was the first occurrence of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera, Thaumastocoridae), known as bronze bug, in the southwestern region of Paraná. *T. peregrinus* was recorded in the city of Realeza (SAD 69 Coordinates UTM: 245000 E 7153682 S), attacking mainly isolated trees of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn (Myrtaceae). Specimens of this insect were collected and sent for identification. The first record of *T. peregrinus* in Brazil occurred in 2008 and since then this insect pest has spread through several states very rapidly, posing a serious threat to *Eucalyptus* plantations throughout the country.

Keywords: Bronze bug, insect pest, *Eucalyptus*.

O gênero *Eucalyptus* é nativo da Austrália e atualmente representa uma das principais fontes de produção madeireira no Brasil. Durante muitos anos as espécies cultivadas desse gênero permaneceram praticamente imunes ao ataque de pragas. No entanto, este quadro vem sofrendo alterações, em especial, devido à ocorrência de um inseto conhecido como percevejo bronzeado.

Este inseto, pertencente ao gênero *Thaumastocoris*, possui cinco espécies conhecidas, sendo que *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dallapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) é a única espécie detectada fora da Austrália (CARPINTERO; DELLAPE, 2006). O inseto adulto apresenta cerca de 3 mm de comprimento, corpo achatado e cor marrom clara. Na cabeça há a presença de placas mandibulares desenvolvidas, ausência de pulvilo nos tarsos e a genitália do macho é assimétrica. Os ovos são pretos, achatados, com a região central côncava. As ninfas são claras e vão escurecendo com o tempo. Cada fêmea coloca em média 60 ovos (JACOBS; NESER, 2005; CARPINTERO; DELLAPE, 2006; WILCKEN et al., 2010). A duração do período embrionário dos ovos é de cerca de seis dias. A fase ninfal, que tem cinco ínstaras, tem duração de até 16 dias. A longevidade dos adultos varia de 14 à 42 dias. (SOLIMAN, 2010).

T. peregrinus é um inseto que se alimenta da seiva das folhas de algumas espécies de *Eucalyptus*. As folhas inicialmente sofrem um prateamento, passando para tons de marrom e vermelho, o que confere à árvore um aspecto bronzeado. Este processo diminui a taxa de fotossíntese da planta, culminando com o secamento e a queda das folhas, com conseqüente prejuízo ao seu desenvolvimento (JACOBS; NESER, 2005). Além disso, este processo fragiliza a planta, propiciando a entrada de agentes fitopatogênicos.

De origem australiana, o inseto está disseminado em vários locais no mundo. Na África do Sul, sua ocorrência foi relatada em 2005, atacando as espécies *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis* e o híbrido *E. camaldulensis* x *Eucalyptus grandis* (JACOBS; NESER, 2005). Nas Américas, o primeiro registro foi feito na Argentina, atacando *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *Eucalyptus viminalis*, no ano de 2005 (CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006) e, posteriormente, no Uruguai, em janeiro de 2008 (MARTÍNEZ; BIANCHI, 2010). No Brasil, a ocorrência deste inseto foi relatada pela primeira vez em maio de 2008, no estado do Rio Grande do Sul, município de São Francisco de Assis, atacando clones híbridos de *E. grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Em menos de um ano foi encontrado em mais nove municípios deste estado (WILCKEN et al., 2010). Em dezembro de 2008, foi confirmado em Belo Horizonte, Minas Gerais, e em julho de 2009, em Linhares, Espírito Santo. Já em outubro de 2009, *T. peregrinus* foi registrado no estado do Rio de Janeiro, e em

Mato Grosso do Sul. Neste mesmo ano a praga já estava disseminada em 74 municípios do estado de São Paulo e foi registrado o primeiro foco no Paraná, próximo à cidade de Curitiba (BARBOSA, 2010). No Brasil, acredita-se que a praga tenha entrado através de correntes de ar ou pelo transporte de materiais como mudas de eucalipto, lenha e madeira, originários da Argentina e Uruguai (WILCKEN et al. 2010). Em setembro de 2011, ocorreu o primeiro registro para a Europa, com danos severos sobre plantios de *Eucalyptus* na Itália (LAUDONIA; SASSO 2012).

Infestações deste inseto podem reduzir a produção de madeira, embora ainda não existam dados quantificados. Além disso, não se encontrou um método de controle efetivo para a praga. O controle químico é realizado em pequena escala na Austrália, porém torna-se inviável face à dimensão e os processos de certificação florestal que norteiam plantios comerciais. Alguns estudos contemplam o uso do controle biológico, com predadores, parasitóides e fungos entomopatogênicos.

Até o ano de 2012, a região sudoeste do Paraná, que engloba 42 municípios e tem uma extensão de 17.102.750 km² (AMSOP, 2012), não havia constatado a ocorrência de *T. peregrinus*. Em junho de 2012, no entanto, foi detectado infestação de *T. peregrinus* no município de Realeza, em uma propriedade rural às margens da PR – 182, (Coordenadas UTM SAD 69: 245000 E 7153682 S, altitude: 396 metros). O foco de infestação são árvores isoladas de *E. camaldulensis*, plantadas à, aproximadamente, cinco anos. Algumas árvores apresentavam sintomas de ataque avançado, com secamento e queda de folhas. De acordo com NOACK; COVIELLA (2006), quando fortemente infestadas, as folhas exibem um prateamento e avermelhamento (Fig. 2.1), e conforme a infestação progride, a copa inteira fica amarelo-avermelhada e a árvore perde as folhas. Este fato acarreta direta e indiretamente na produção de *Eucalyptus*, visto que o plantio deste representa grande potencial para a região sudoeste do estado do Paraná, impulsionado em grande parte pela demanda por madeira para energia pelos setores avícola e industrial.

No mesmo local ainda foram encontrados insetos atacando *Eucalyptus dunnii* e *E. grandis*, em menor intensidade. Os insetos encontravam-se distribuído por todo o hospedeiro, com presença de sintomas, insetos e ovos em toda a árvore embora, como sugerem JACOBS; NESER (2005), a maior ênfase de infestação seja a copa das árvores. Exemplos do inseto, ovos e ramos das árvores atacadas foram coletadas do terço inferior das árvores, armazenados em sacos plásticos e levados para o Laboratório de Controle Biológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, para identificação

dos insetos *in natura*. Exemplos foram fixados em álcool 70% para observação detalhada com auxílio de microscópio estereoscópico Tecnival® (Fig. 2.2).

Observou-se que após as chuvas e frentes frias que ocorreram em junho de 2012 na região sudoeste, em média 172 mm, contra 71 mm mês anterior (SEAB, 2013) houve redução na infestação de *Eucalyptus* por *T. peregrinus*. Embora outros pontos de ataque não tenham sido encontrados na região, ações devem priorizar o monitoramento, manejo e orientação ao plantio de espécies de *Eucalyptus* resistentes ao ataque.



Figura 2.1 Prateamento inicial das folhas em *Eucalyptus* spp (a e b). Folha de *E. camaldulensis* com sintomas de bronzeamento (c). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, jun. 2012.



Figura 2.2 Ovos de *T. peregrinus* (a). Nínta de *T. peregrinus* (b). Adulto de *T. peregrinus* observado em microscópio estereoscópico (c). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, jun. 2012.

A espécie *E. camaldulensis* é considerada de grande importância e alta resistência ao déficit hídrico. De acordo com ANGELI et al. (2005), *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. grandis*, compõem o grupo das 12 principais espécies utilizadas para plantio comercial no Brasil. No entanto, WILCKEN (2008) classificou *E. camaldulensis* como uma espécie condenada, devido a alta incidência de pragas, como o psíldeo-de-concha (*Glycaspis*

brimblecombei Moore (Hemiptera: Psyllidae) e gorgulho-do-eucalipto (*Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), além do percevejo bronzeado, o que pode comprometer a atividade florestal no Brasil. JACOBS; NESER (2005), descreveram as espécies *E. camaldulensis* e *E. tereticornis*, entre os mais suscetíveis ao ataque de *T. peregrinus* na África do Sul, sendo que a espécie *Eucalyptus citriodora* (atual *Corymbia citriodora*) foi considerada imune ao ataque. No Brasil, *E. camaldulensis*, *E. viminalis*, *E. grandis*, *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus smithii*, *E. grandis* X *E. camaldulensis* e *E. grandis* X *Eucalyptus urophylla* foram indicadas como as espécies mais susceptíveis à danos pelo inseto (WILCKEN et al., 2009). MENEZES et al. (2011) testando a preferência alimentar de *T. peregrinus* sobre 15 espécies de *Eucalyptus*, em laboratório, confirmou a preferência deste inseto pela espécie *E. camaldulensis*, porém não descartando a possibilidade de ataque a *C. citriodora*.

O registro de novas regiões com ocorrência de *T. peregrinus* sobre diversas espécies de *Eucalyptus* evidenciam a capacidade de dispersão e adaptação deste inseto. A divulgação das informações sobre novos registros servem de alerta para a necessidade de melhores estratégias de proteção e manejo desta praga, como a implementação de medidas fitossanitárias, campanhas informativas, e uso de espécies menos suscetíveis ao ataque de insetos- pragas.

**3. CAPÍTULO II - OCORRÊNCIA NATURAL DE *Beauveria bassiana* (BALS. CRIV.)
VUILL. 1912 (ASCOMYCETES: CLAVICIPITACEAE) SOBRE *Thaumastocoris*
peregrinus (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)**

Comunicação científica submetida em 02 de maio de 2013 – Revista Ciência Florestal (formatado de acordo com esta revista) – Qualis capes B1 em Ciências Agrárias I

3.1 RESUMO

Exemplares de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), inseto-praga do gênero *Eucalyptus*, foram encontrados mortos em um plantio *Eucalyptus grandis* no município de Realeza, região sudoeste do estado do Paraná, Brasil, com a presença de micélio branco sobre o corpo, supostamente provocado por um fungo entomopatogênico. Foram realizados procedimentos para isolamento (em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar) e identificação do patógeno, sendo que a relação entre o micro-organismo e o inseto foi estabelecida através do postulado de Koch. A partir de procedimento padrão, foi identificado o fungo *Beauveria bassiana*. Em laboratório foi realizado teste de patogenicidade, e o mesmo causou mortalidade confirmada em 72,2 % dos insetos, na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹, após seis dias de inoculação. Assim verificou-se que *B. bassiana* infecta naturalmente *T. peregrinus*, com ocorrência espontânea no estado do Paraná.

Palavras - chave: Percevejo bronzeado; fungos entomopatogênicos; *Eucalyptus*.

3.2 ABSTRACT

Exemplars of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), insect pest of the genus *Eucalyptus*, were found dead in the *Eucalyptus grandis* plantation in the city of Realeza, the southwest region of the state of Paraná, Brazil, with white mycelial growth on the surface of the body. Isolation procedures were performed (in Potato-Dextrose-Agar culture) and identification of the pathogen, whereas the ratio between the microorganism and the insect has been established by Koch's postulate. The fungus through standard procedures, was identified as *Beauveria bassiana*. In the laboratory testing pathogenicity were performed and caused mortality confirmed in 72.2% of the insects at the concentration of 1.0×10^8 conidia.mL⁻¹ after six days inoculation. Studies on the selection of isolates should be

performed and justified by the growing demand of the forest sector in search of control strategies for this insect pest. Thus, was verified that *B. bassiana* naturally infects *T. peregrinus*, occurring spontaneously in the Paraná state.

Keywords: Bronze bug; entomopathogenic fungi; *Eucalyptus*.

3.3 INTRODUÇÃO

Entre os insetos-praga que atacam o gênero *Eucalyptus*, tem se destacado o percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), pela elevada capacidade de adaptação, ausência de inimigos naturais e rápida dispersão em diversas regiões do globo. No Brasil, acredita-se que o inseto esteja sendo disseminado por caminhões que transportam toras de eucalipto, onde normalmente observa-se a presença de *T. peregrinus* em ramos e folhas (WILCKEN et al., 2010).

O gênero *Thaumastocoris* é de origem australiana, e foi relatado na África do Sul e Argentina em 2005, no Uruguai em 2008 e na Europa em 2012 (JACOBS e NESER, 2005; CARPINTERO e DELLAPÉ, 2006; MARTÍNEZ e BIANCHI, 2010; LAUDONIA e SASSO 2012). O primeiro registro no Brasil ocorreu em 2008, com a espécie *T. peregrinus* no estado do Rio Grande do Sul (WILCKEN et al., 2010), atingindo o Paraná em 2009 (BARBOSA et al., 2010), além de vários outros estados. Os danos são provocados pelo hábito alimentar do inseto que suga a seiva das folhas. Este processo diminui a taxa de fotossíntese da planta, culminando em secamento e queda das folhas, com conseqüente prejuízo ao seu desenvolvimento (JACOBS e NESER, 2005). Tem-se buscado métodos de controle eficientes para este inseto-praga, com ênfase no uso do controle biológico, com o parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber (Hymenoptera: Mymaridae), inimigo natural originário da Austrália (LIN et al., 2007) e fungos entomopatogênicos (SOLIMAN et al., 2010; LORENCETTI et al., 2011).

Fungos entomopatogênicos são amplamente utilizados no controle de populações de insetos-praga agrícolas, por serem naturais do ambiente, tendo destaque *Beauveria bassiana* Vuill. (Ascomycetes: Clavicipitaceae). Em campo, *B. bassiana* pode promover infecção em insetos da ordem Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera, Diptera, Hymenoptera e Orthoptera (ALVES, 1998), tem ocorrência mundial e é comercializado como inseticida para o controle de pragas em eucalipto, crisântemo, pepino, soja e erva-mate (ANVISA, 2012), entre outras culturas agrícolas. Sobre hemípteros *B. bassiana* tem destaque para o controle do percevejo-do-grão, *Oebalus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) (Santos et al., 2002), o pulgão

Lipaphis erysimi (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) (ARAUJO JR. et al., 2009), o percevejo *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae) (BARBOZA, 2011), a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (FARIA e WRAIGHT, 2001; POTRICH et al., 2011) e o percevejo de renda da mandioca *Vatiga manihotae* (Drake) (Hemiptera: Tingidae) (ALVES et al., 2012).

Para *T. peregrinus*, a patogenicidade de *B. bassiana* foi confirmada em laboratório através do produto Boveril® (SOLIMAN et al., 2010) e de alguns isolados não comerciais (LORENCETTI et al., 2011), na concentração $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹. A ocorrência natural deste fungo sobre *T. peregrinus* foi registrada no Rio Grande do Sul, em plantios comerciais de *Eucalyptus dunnii* (SMANIOTTO et al., 2012). No Paraná, suspeitou-se da ocorrência do fungo em um plantio de *Eucalyptus grandis*, no município de Realeza (Coordenadas UTM SAD 69: 245000 E 7153682 S), no qual foram encontrados cadáveres deste inseto cobertos por micélio branco. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar, registrar e testar a patogenicidade deste isolado em laboratório.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os cadáveres de *T. peregrinus* foram coletados juntamente com as folhas de *E. grandis* nas quais estavam aderidos, e encaminhados ao Laboratório de Controle Biológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, para identificação. A coleta ocorreu no mês de agosto de 2011, após baixa na infestação da praga relacionada possivelmente às chuvas intensas de junho, com média 172 mm para a região sudoeste do Paraná (SEAB, 2013). De acordo com Lima (2011), a umidade relativa e a precipitação pluviométrica afetam populações de *T. peregrinus*, em correlação inversamente proporcional.

Inicialmente realizou-se a identificação do micro-organismo, com base nas características culturais (ALVES, 1998) e chave de identificação para os principais gêneros de fungos entomopatogênicos (ALVES, 1998; ALVES et al., 1998a). Posteriormente a relação causal entre o patógeno e o inseto foi estabelecida através do postulado de Koch (ALVES et al., 1998b), conforme realizado em trabalhos de ocorrência natural de *B. bassiana* sobre insetos (ALVES et al., 2005; 2012). O isolamento do fungo em culturas puras é necessário para confirmação, em face da inúmera população microbiana que, possivelmente, coloniza o inseto. Os métodos para isolamento foram baseados e adaptados de Alves (1998).

Em laboratório, utilizando material devidamente esterilizado, os insetos foram desinfectados em álcool 70% e um fragmento do inseto foi transferido para lâmina de vidro

com coloração lactofenol azul-de-algodão para identificação em microscópio estereoscópico Tecnival®. O restante foi acondicionado em superfície de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), em placas de Petri® de vidro, vedadas com filme plástico e mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$), durante oito dias.

Observou-se o crescimento micelial do fungo, bem como de outros agentes patogênicos. Iniciou-se o processo de purificação com a transferência do fungo de interesse para 10 novas placas de Petri® contendo meio de cultura BDA. Com uma alça de platina, um toque foi realizado na superfície do fungo, e dois toques/ pontos foram realizados em cada nova placa, as quais foram acondicionadas em câmara climatizada ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$) durante sete dias. Após a esporulação do fungo, as melhores colônias foram selecionadas e repicadas em novas placas, conforme procedimento anterior, obtendo o isolamento completo do fungo.

A comprovação da relação causal entre o patógeno e o inseto foi estabelecida através do postulado de Koch (ALVES et al., 1998). Este determina que os insetos devam ser novamente expostos ao patógeno, a fim de reproduzirem os sintomas. Em conjunto, foi realizado teste de patogenicidade, obtendo a porcentagem de mortalidade confirmada do fungo sobre *T. peregrinus*.

Insetos adultos sadios foram submetidos à ambiente contendo folhas de *Eucalyptus camaldulensis*, cortadas a 5 cm do pecíolo, mergulhadas em suspensão do fungo purificado, na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹. O excesso de umidade foi retirado com a exposição das folhas à ventilação em câmara de fluxo laminar vertical. As folhas tiveram os pecíolos envoltos por pedaços de algodão umedecido para preservar a turgidez e foram oferecidas como único substrato para alimentação dos insetos. Tubos de vidro de fundo chato esterilizados receberam cada um, uma folha e seis insetos adultos de *T. peregrinus*, sendo vedados com plástico filme. Os recipientes permaneceram em câmara climatizada tipo B.O.D., nas condições citadas anteriormente, durante seis dias. Foram realizadas 10 repetições. As avaliações ocorreram a cada 24 horas, durante cinco dias, retirando-se os insetos mortos.

Os cadáveres foram desinfetados externamente, mergulhando por dois segundos em álcool 70% e, em seguida, em água destilada esterilizada e acondicionados em câmara úmida para promover a extrusão do patógeno. As câmaras úmidas foram preparadas em placa de 16 poços contendo papel filtro esterilizado e úmido, alocadas em bandeja com algodão umedecido com água destilada e esterilizada. A esporulação do fungo foi verificada após três a cinco dias. O fungo foi então reisolado do hospedeiro e inoculado artificialmente em placas de Petri® e meio de cultura BDA, ficando em câmara climatizada por sete dias, para

comparação das características com a amostra coletada. Os esporos reproduzidos foram raspados e armazenados em frascos tipo “ependorfs” em freezer à -10°C, recebendo a denominação de isolado UTFPR 01.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a classificação feita com base na morfologia dos conídios, fiálides e hifas utilizando chave dicotômica (Alves, 1998) e chave de identificação para os principais gêneros de fungos entomopatogênicos (Alves et al., 1998a), ficou constatado tratar-se do fungo entomopatogênico da espécie *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill., 1912, cuja classificação taxonômica define: Super-reino: Eukaryota; Reino: Fungi; Divisão: Ascomycota; Sub Divisão: Pezizomycotina; Classe: Sordariomycetes; Ordem: Hypocreales; Família: Cordycipitaceae; Gênero: *Beauveria* (ANVISA, 2012; INDEX FUNGORUM, 2013).

No teste de patogenicidade, a mortalidade confirmada em câmara úmida foi de 72,2 % dos insetos após seis dias de inoculação do fungo sobre as folhas de *E. camaldulensis*. A média do registro de mortalidade esteve abaixo do relatado por Soliman et al. (2010) (97,3%), para a mesma concentração. No entanto, estes autores utilizaram um produto comercial à base *B. bassiana*, o qual se espera maior virulência, visto que o mesmo já passou por diversos parâmetros de qualidade para então ser comercializado. Soma-se a este fator a metodologia utilizada, com aplicação direta sobre os insetos e não apenas sobre o substrato, conforme realizado neste estudo. A aplicação sobre o substrato possibilita a inferência de que o fungo possa contaminar partes do inseto que entram em contato no ato do caminhar ou da sucção da seiva, aproximando do que ocorre em condições de campo.

Ainda no campo, dificilmente a pulverização irá ocorrer sobre os insetos e, se ocorrer sobre estes, não será uniforme. Isolados não comerciais de *B. bassiana*, na mesma concentração utilizada neste teste, provocaram 78,6% de mortalidade confirmada em *T. peregrinus* (LORENCETTI et al., 2011), valor este muito próximo ao obtido no presente trabalho.

Neste sentido, a utilização de fungos entomopatogênicos e a seleção de isolados de *B. bassiana* mais virulentos à *T. peregrinus* pode representar uma estratégia promissora para o controle deste inseto-praga.

3.6 CONCLUSÃO

B. bassiana infecta naturalmente *T. peregrinus*, com ocorrência espontânea no estado do Paraná, sendo o isolado patogênico também em condições de laboratório.

4. CAPÍTULO III – POTENCIAL DE USO DE *Beauveria bassiana* VUILL. E *Isaria* sp. PARA O CONTROLE DE *Thaumastocoris peregrinus* CARPINTERO & DELLAPÉ (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)

Comunicação científica submetida em 26 de maio de 2013 – Revista Florestal (formatado de acordo com esta revista) – Qualis capes B1 em Ciências Agrárias I

4.1 RESUMO

A busca por informações para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em *Eucalyptus*, concentram-se no uso de técnicas de controle biológico, entre elas, o uso de fungos entomopatogênicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* e *Isaria* sp. sobre *Thaumastocoris peregrinus* em condições de laboratório. Para isto, foram testados quatro isolados de *Beauveria bassiana* e um isolado de *Isaria* sp. na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹. A solução foi aplicada sobre folhas de *Eucalyptus camaldulensis*, fornecidas como substrato de alimentação aos insetos, e mantidas em frascos de vidro vedados com filme plástico em câmara climatizada ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$). Foram realizadas quatro repetições (frascos) por isolado com 13 insetos adultos por frasco. As avaliações foram realizadas até o quinto dia após a aplicação. Os insetos mortos foram colocados em câmara úmida para a confirmação da morte pelo patógeno. Todos os isolados foram patogênicos à *Thaumastocoris peregrinus*. A mortalidade confirmada variou entre 37% e 80,1% para *Beauveria bassiana*, e foi de 87% para *Isaria* sp após 10 dias da aplicação. O maior percentual médio de mortalidade diária (39,9%) ocorreu no quarto dia após o contato do inseto com o substrato pulverizado. Os isolados de *Beauveria bassiana* e de *Isaria* sp. avaliados apresentam potencial para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* em laboratório.

Palavras - chave: Percevejo bronzeado; fungos entomopatogênicos; controle biológico.

4.2 ABSTRACT

The search for informations to control *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) in *Eucalyptus*, focus on the use of biological control techniques, including the use of entomopathogenic fungi. The objective of this study was evaluated the

pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Isaria* sp. on *Thaumastocoris peregrinus*, under laboratory conditions. For this, we tested four isolates of *Beauveria bassiana* and one isolate of *Isaria* sp. concentration of 1.0×10^8 conidia mL⁻¹. The solution was applied on leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, provided as food for the insects substrate, and maintained in glass bottles sealed with plastic film in a climatic chamber (26 ± 2 ° C, 14 h photoperiod and U.R. $70 \pm 10\%$). Were performed four replicates (bottles) for isolated with 13 adult insects per bottle. Each bottle received 13 adult insects. Evaluations were performed until the fifth day after application. The dead insects were placed in humid chamber for confirmation of death by pathogen. All isolates were pathogenic to *Thaumastocoris peregrinus*. The confirmed mortality ranged between 37% and 80.1% for *Beauveria bassiana*, and was 87% for *Isaria* sp. after 10 days of application. The highest mean percentage of daily mortality (39,9%) occurred on the fourth day after contact with the substrate insect spray. The isolates of *Beauveria bassiana* and *Isaria* sp. evaluated presented potential to control *Thaumastocoris peregrinus* under laboratory conditions.

Keywords: bronze bug; entomopathogenic fungi; biological control.

4.3 INTRODUÇÃO

O percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), é um insetos-praga do gênero *Eucalyptus*, de origem australiana, com notável dispersão por vários locais do globo na ultima década. Sua ocorrência foi relatada na África do Sul e Argentina em 2005 (JACOBS e NESER, 2005; CARPINTERO e DELLAPÉ, 2006), no Uruguai e Brasil em 2008 (MARTÍNEZ e BIANCHI, 2010; WILCKEN et al., 2010), e na Europa em 2012 (LAUDONIA e SASSO, 2012).

O controle químico é realizado em pequena escala em áreas urbanas na Austrália, através de um inseticida sistêmico (Imidacloprid) injetado no tronco das árvores (NOACK, 2009). No entanto, não existe um método efetivo recomendado de controle deste inseto-praga (WILCKEN et al., 2010), sobretudo considerando a dimensão dos plantios, impactos ambientais e processos de certificação florestal. De acordo com Faria (2009), as empresas certificadas buscam adotar práticas produtivas que conservem o meio ambiente, como o manejo integrado de pragas, dando preferência ao controle biológico, cultural e à utilização de produtos menos tóxicos e seletivos a inimigos naturais.

Neste contexto, o emprego do controle biológico tem se destacado como estratégia de controle. O parasitóide de ovos *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), representa o único inimigo natural da praga na Austrália (LIN et al., 2007) e assim como ocorre com outras pragas exóticas, a introdução deste inimigo natural tem mostrado potencial no Brasil (WILCKEN et al., 2010). No entanto, nos ecossistemas brasileiros, os quais possuem elevada biodiversidade, espera-se encontrar inimigos naturais nativos, que sejam capazes de adaptarem-se e promover o controle de *Thaumastocoris peregrinus* (SOLIMAN et al., 2010).

Em 2012, foi relatada a ocorrência do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* atacando de forma natural exemplares de *Thaumastocoris peregrinus* no estado do Rio Grande do Sul (SMANIOTTO et al., 2012). A atuação deste fungo em laboratório já havia sido testada por Soliman et al. (2010) com o produto Boveril[®] e Lorencetti et al. (2011) com isolados não comerciais, causando a mortalidade confirmada de 97,5% e 78,6% dos insetos respectivamente.

Neste sentido, o controle microbiano, com a utilização de fungos entomopatogênicos, pode representar uma estratégia promissora. O fungo *Beauveria bassiana* Vuill. (Ascomycetes: Clavicipitacea) pode ocorrer, na natureza, em mais de 200 espécies de insetos e ácaros (ALVES, 1998). Da mesma forma, os fungos do gênero *Isaria* podem infectar uma ampla gama de hospedeiros, incluindo Lepidoptera, Diptera, Hemiptera, Coleoptera, Hymenoptera e Arachnida (ZIMMERMANN, 2008), em diferentes culturas agrícolas.

Com relação aos hemípteros, *Beauveria bassiana* promove infecção sobre o percevejo- do- grão, *Oebalus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) (SANTOS et al., 2002), o percevejo-castanho-da-raiz, *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae) (XAVIER e ÀVILA, 2005), a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (FARIA e WRAIGHT, 2001; POTRICH et al., 2011), o percevejo *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae) (BARBOZA et al., 2011), o percevejo de renda da mandioca *Vatiga manihotae* (Drake) (Hemiptera: Tingidae) (ALVES et al., 2012). Entre os insetos-praga do gênero *Eucalyptus*, *Beauveria bassiana* é recomendado para o gorgulho *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) (ITAFORTE, 2011).

No que se refere à ação de *Isaria* sp. sobre hemípteros tem-se ação comprovada sobre a pérola-da-terra *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) (LOPES et al., 2008), mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) (POTRICH et al., 2011), e *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae) (MUSTU, 2011).

Diante do exposto verifica-se o potencial de uso de fungos entomopatogênicos para o controle de hemípteros. Entretanto, no que se refere ao percevejo do bronzeado, tais

informações são escassas. Tal fato associado ao fato do referido inseto-praga se configurar como uma importante praga do eucalipto no Brasil, o controle biológico com fungos entomopatogênicos pode representar uma eficaz alternativa de manejo, sem comprometer o processo de certificação florestal. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* e *Isaria* sp. patogênicos a *Thaumastocoris peregrinus* em condições de laboratório. .

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Obtenção, Produção e Preparação dos Isolados

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Biológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos (UTFPR-DV). Foram utilizados quatro isolados de *Beauveria bassiana*: IBCB 75, IBCB 210, IBCB 254 e um isolado de *Isaria* sp. IBCB 367, fornecidos pelo Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de São Paulo, com sede em Campinas - IBCB e o isolado UTFPR 01, isolado de *Thaumastocoris peregrinus*, em campo, na região sudoeste do Paraná (Tabela 1).

Tabela 4.1 – Isolados de *Beauveria bassiana* e *Isaria* sp. utilizados no bioensaio e respectiva origem. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.

Isolados	Espécie do fungo	Hospedeiro original ou substrato	Local de origem
IBCB 75	<i>Beauveria bassiana</i>	Solo	Cascavel – PR
IBCB 210	<i>Beauveria bassiana</i>	Solo - soja	Ribeirão Preto – SP
IBCB 254	<i>Beauveria bassiana</i>	Solo	Fazenda São José – SP
UTFPR 01	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Thaumastocoris peregrinus</i>	Realeza – PR
IBCB 367	<i>Isaria</i> sp.	Solo - pastagem	Cuiabá – MT

A reativação da virulência dos isolados foi feita em lagartas de *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), oriundas da criação do Laboratório de Controle Biológico da UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos. Insetos de 1º ínstar foram imersos em uma suspensão de fungo na concentração $1,0 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ e, em seguida transferidos para placas de Petri® contendo papel filtro e dieta artificial para alimentação dos insetos. As placas foram mantidas em câmara climatizada tipo BOD ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$)

até a morte das lagartas. Com auxílio de uma pinça, os insetos foram transferidos para câmaras úmidas, preparadas em placas de Petri[®] com papel filtro umedecido, as quais permaneceram na câmara climatizada nas condições supracitadas por oito dias para a extrusão do patógeno.

Após a conidiogênese, em câmara de fluxo laminar, os esporos do fungo foram coletados e efetuou-se procedimentos de isolamento em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA), conforme metodologia descrita (adaptada) de Leite et al., (2003).

Os isolados foram multiplicados através da inoculação pelo método de placa cheia, com auxílio de uma alça de Drygalski. As placas, devidamente identificadas, foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$), durante oito dias para o desenvolvimento do fungo. Os conídios foram coletados, raspando-se a superfície do meio de cultura com auxílio de uma espátula e armazenados em frascos de vidro esterilizados, em freezer, à aproximadamente -4°C , conforme descrito por Alves et al. (1998).

Para a preparação das suspensões, os conídios foram colocados em frascos de vidro com água destilada esterilizada contendo o tenso ativo Tween[®] 80 (0,01%), vedados e agitados manualmente durante 5 minutos. Em seguida, os patógenos foram quantificados em câmara de Neubauer, padronizando as suspensões na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹.

4.4.2 Obtenção e Manutenção do Percevejo Bronzeado

Os insetos matrizes de *Thaumastocoris peregrinus* foram fornecidos pela Embrapa Florestas- Colombo, Paraná e mantidos no Laboratório de Controle Biológico da UTFPR-DV, em gaiola de vidro revestida por tecido tipo *voil*.

Para a alimentação e oviposição dos percevejos foram fornecidos ramos de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus benthammi*, mantidos em vasos com areia umedecida para conservar a turgidez das folhas pelo maior tempo possível. Os ramos foram trocados semanalmente, ou antes, quando necessário. Foram utilizados nos experimentos somente insetos adultos, separados manualmente dos demais insetos na gaiola de criação.

4.4.3 Avaliação da Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Isaria* sp sobre *Thaumastocoris peregrinus*

Foram coletadas folhas de *E. camaldulensis*, proveniente da área de Teste de Uso Múltiplo de Eucaliptos (TUME), instalado na UTFPR-DV em dezembro de 2009. Foram

selecionadas somente folhas sadias e com tamanho e tonalidade aproximadas. Estas foram recortadas com comprimento de 5 cm a partir do ponto entre o pecíolo-base da folha, todas com largura média superior entre 3,5 a 4,0 cm.

As folhas foram mergulhadas nas suspensões de conídios preparadas na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹. Para a evaporação do excesso de água, as folhas foram mantidas em câmara de fluxo laminar por cinco minutos. Em seguida, a base de cada folha foi envolta por algodão umedecido com água destilada para manter a turgidez das folhas, sendo as mesmas acondicionadas em frascos de vidro de 2 cm diâmetro x 10 cm de altura, vedadas com plástico filme. Cada frasco constituiu uma repetição, recebendo duas folhas e 13 insetos adultos de *Thaumastocoris peregrinus* e mantidos em câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$). Para cada isolado foram preparadas quatro repetições. Na testemunha foi aplicada água destilada esterilizada contendo o tenso ativo Tween[®] 80 (0,01%), em volume equivalente aos lotes tratados.

A mortalidade de *Thaumastocoris peregrinus* foi avaliada diariamente, durante 10 dias. Os insetos mortos foram imersos por cinco segundos em álcool 70%, para desinfecção superficial, e em água destilada esterilizada. Na seqüência foram acondicionados em câmara úmida e mantidos em câmara climatizada nas mesmas condições citadas anteriormente, por sete dias, para confirmação da mortalidade pelo patógeno. As câmaras úmidas foram preparadas em placas de 16 poços contendo papel filtro umedecido e esterilizado, acondicionadas sobre bandejas com algodão e água, fornecendo assim condições adequadas ao desenvolvimento do fungo.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Os dados foram avaliados e seguiram a normalidade Lilliefors ($p > 0,15$) e Shapiro-Wilk ($p > 0,1091$). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade com auxílio do programa BioEstat 5.0[®] (AYRES et al., 2007).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que tanto os isolados de *Beauveria bassiana* quanto o isolado de *Isaria* sp. são patogênicos à *Thaumastocoris peregrinus*. A porcentagem de mortalidade confirmada em câmara úmida, de *Thaumastocoris peregrinus* variou entre 37%, para o isolado IBCB 75, e 87% para o isolado IBCB 367 (Tabela 2; Figura 1)

Tabela 4.2 – Porcentagem média (\pm EP) de mortalidade confirmada de adultos de *Thaumastocoris peregrinus* por *Beauveria bassiana* e *Isaria* sp. ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.

ISOLADOS	MORTALIDADE CONFIRMADA (%)*
IBCB 75	$37,0 \pm 11,12$ b
IBCB 210	$75,3 \pm 8,37$ a
IBCB 254	$80,1 \pm 8,84$ a
UTFPR 01	$72,5 \pm 6,39$ ab
IBCB 367	$87,0 \pm 6,47$ a
p	0,0058

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

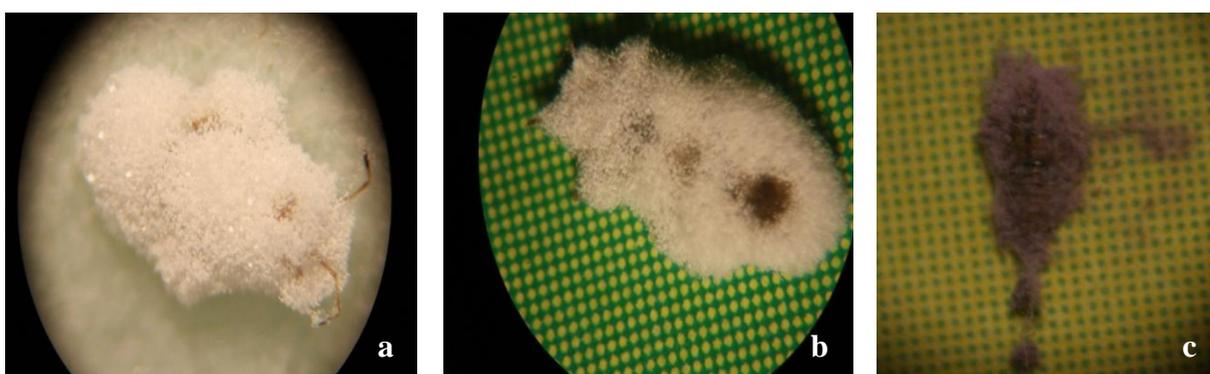


Figura 4.1 – Infecção promovida pelo fungo *Beauveria bassiana* (a e b) e *Isaria* sp. (c) sobre insetos adultos de *Thaumastocoris peregrinus*, cinco dias após inoculação. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.

Os resultados diferem dos relatados por Soliman et al. (2010) que avaliaram *Beauveria bassiana* do produto Boveril[®] em suspensão concentrada emulsionável (SC). De acordo com estes autores, na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ a mortalidade confirmada foi de 97,5% sobre ninfas de 3^o e 4^o ínstar. Isso deve-se possivelmente ao fato de as ninfas serem mais suscetíveis à infecção pelo fungo, especialmente por não possuírem asas recobrando seu abdome, assim como os adultos. França et al. (2006) testando *Beauveria bassiana*, sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) obtiveram maior percentual de mortalidade média para ninfas ($49,8 \pm 5,91\%$) do que para adultos ($12,3 \pm 3,32\%$), demonstrando a maior vulnerabilidade dos insetos nos estágios iniciais de desenvolvimento.

Além disso, a forma de aplicação da suspensão de fungos sobre o inseto, também é um fator determinante para a mortalidade. Neste trabalho a aplicação ocorreu de forma indireta, mergulhando as folhas de eucalipto que serviram de substrato aos insetos. Soliman et al. (2010) realizou pulverização direta sobre *Thaumastocoris peregrinus*, enquanto França et al. (2006) testando os métodos de pulverização direta e tratamento residual nas folhas, substrato do *Podisus nigrispinus*, obteve 59% e 8% de mortalidade confirmada, respectivamente. Acredita-se que a pulverização do substrato indique de forma mais efetiva o potencial de ação do fungo, uma vez que em campo dificilmente ele será aplicado diretamente sobre o hospedeiro.

Em experimento semelhante, Lorencetti et al. (2011) observaram 78,6% de mortalidade confirmada para isolados não comerciais de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Thaumastocoris peregrinus*, na mesma concentração e aplicação sobre as folhas. Os resultados corroboram com este estudo.

Quanto à *Isaria* sp., a mortalidade confirmada em câmara úmida de *Thaumastocoris peregrinus* (87%) diferiu significativamente em relação ao isolado de *Beauveria bassiana* IBCB 75 (37%), porém não diferindo dos demais isolados (Tabela 2).

Não existem relatos científicos da utilização de *Isaria* sp. sobre *Thaumastocoris peregrinus*. Sobre outros hemípteros sua atuação está confirmada, porém não com tanto destaque como *Beauveria bassiana*. Para *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae), a ação de *Beauveria bassiana* foi mais efetiva que *Isaria* sp, pulverizando 2 ml de suspensão dos fungos na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ diretamente sobre os insetos, com 100% e 70% de mortalidade após 12 dias de inoculação (MUSTU, 2011).

Segundo Alves et al. (1998), os fungos apresentam grande vantagem no controle de insetos sugadores, pois provocam infecção via tegumento, e não apenas via oral, como ocorre com outros entomopatógenos. Desta forma, a aplicação do fungo sobre o substrato, é suficiente para promover a infecção do inseto, uma vez que este, apesar de se alimentar da seiva interna da folha, necessita se locomover e ovipositar sobre a mesma. Ainda de acordo com estes autores, os fungos podem promover infecção nas diversas fases de desenvolvimento dos insetos alvo, o que representa vantagem adicional para a utilização deste método de controle.

Além disso, não necessariamente o fungo deverá atuar sozinho no controle de *Thaumastocoris peregrinus*. A adoção de medidas de controle poderá estar inserida em um programa de manejo integrado, onde outras estratégias de controle podem ser empregadas de maneira conjunta. Para o produto Boveril[®], a empresa fabricante mantém uma lista com mais

de 200 formulações testadas e que são compatíveis com o produto (ITAFORTE, 2011), os quais podem ser testados a fim de potencializar os resultados.

Quanto ao tempo de mortalidade dos insetos nos tratamentos, independente da confirmação de esporulação do fungo em câmara úmida, observou-se 100% dos insetos mortos até o quarto dia de avaliação para os isolados de *Isaria* sp (IBCB 367) e *Beauveria bassiana* (IBCB 210, IBCB 254 e UTFPR 1). O isolado IBCB 75 promoveu 28,8% de mortalidade acumulada até o quarto dia de avaliação, e 65,3% no quinto dia, considerado portanto menos eficiente que os demais. A testemunha registrou 19,2% de mortalidade acumulada até o quarto dia de avaliação e 36,5% ao final do experimento. No quarto dia pós a inoculação do fungo foi observada a maior taxa de mortalidade diária, com 39,9% do total de insetos mortos nos tratamentos. No terceiro dia também foi registrada elevada mortalidade, 25,1% de insetos (Figura 2).

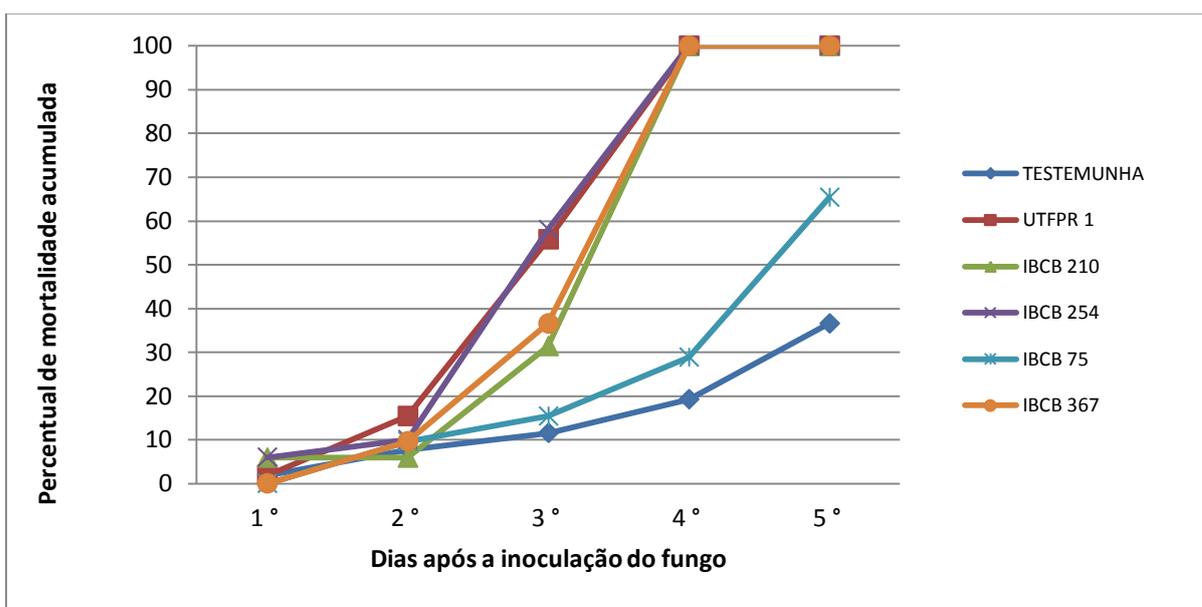


Figura 4.2 - Percentual de mortalidade diária acumulada de *Thaumastocoris peregrinus* nos tratamentos com isolados de *Beauveria bassiana* e *Isaria* sp., mantidos em câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.

De acordo com Alves et al. (1998), a germinação dos conídios de *Beauveria bassiana*, ocorre geralmente após 12 horas da inoculação e a colonização após três dias, quando o inseto já apresenta uma grande quantidade de conídios. No entanto, observou-se que em alguns casos a mortalidade iniciou a partir do primeiro dia de inoculação dos fungos, embora muitos

estudos tenham revelado mortalidade somente a partir do quinto ou sexto dia para outros insetos-praga como *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae) (MUSTU, 2011).

Este fato pode ser justificado por *Thaumastocoris peregrinus* tratar-se de um inseto muito pequeno, o qual permite que sejam mais rápidos todos os processos, inclusive a infecção pelo fungo. Resultados semelhantes foram obtidos por Loureiro (2001) aplicando *Beauveria bassiana* na concentração $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹, sobre o hemíptero *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphidae), que apresenta um tamanho inferior a *Thaumastocoris peregrinus*, cerca de 1,3 mm. Segundo o autor, o tempo letal foi de 2,39 dias, também com um considerável índice de mortalidade no primeiro dia da inoculação, expressando a rápida ação de infecção do fungo sobre insetos com tamanho reduzido (inferior a 5 mm).

Para *Beauveria bassiana* sobre *Thaumastocoris peregrinus* o tempo letal médio (TL₅₀), descrito por Soliman et al. (2010) para a concentração $1,0 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹, foi de 2,64 dias, confirmando também elevada mortalidade de insetos logo nos primeiros dias do contato com o fungo. É importante salientar que entre os objetivos a serem alcançados na seleção de isolados estão a maior mortalidade em curto período de tempo e maior mortalidade em períodos mais prolongados (SANTORO et al., 2007), representando vantagem a ação rápida destes patógenos para o controle de *Thaumastocoris peregrinus*. A variação no tempo letal envolve ainda outros fatores, como a metodologia utilizada em cada experimento, idade e tamanho dos insetos, genética dos isolados (ALVES, 1998) e variação de umidade dentro de cada recipiente.

Em laboratório as condições de temperatura e umidade controladas são favoráveis ao estabelecimento da infecção. Testes adicionais são necessários para avaliar isolados quanto à virulência e Concentração Letal Média (CL₅₀), incluindo o potencial produtivo (produção massal) para futuros testes em semi-campo e campo. Esse aspecto é de fundamental importância no delineamento de uma estratégia eficiente para o controle com utilização de entomopatógenos, pois os fungos são bastante sensíveis à umidade relativa, temperatura e incidência de luz, sendo a metodologia de aplicação importante para garantir a eficácia do controle (ALVES, 1998).

A detecção de *Thaumastocoris peregrinus* no Brasil mostra a vulnerabilidade da América do Sul a pragas exóticas e a necessidade de investir em medidas fitossanitárias eficientes e com baixo impacto ambiental. As tentativas de minimização dos prejuízos causados por *Thaumastocoris peregrinus* tem levado a busca de alternativas para o controle deste inseto e a utilização de fungos entomopatogênicos do gênero *Isaria* sp. e *Beauveria bassiana*, representam uma alternativa promissora.

4.6 CONCLUSÃO

Os isolados de *Beauveria bassiana* e *Isaria* sp. testados promoveram infecção sobre adultos de *Thaumastocoris peregrinus*, sendo considerados patogênicos a este inseto-praga. Apresentaram maior eficiência os isolados de *Isaria* sp (IBCB 367) e *Beauveria bassiana* (IBCB 210, IBCB 254 e UTFPR 1).

**5. CAPÍTULO IV – AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS SOBRE
Thaumastocoris peregrinus CARPINTERO & DELLAPÉ (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE) E SOBRE A INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS**

5.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi testar o efeito de dez produtos naturais sobre a mortalidade de *Thaumastocoris peregrinus*, bem como a capacidade destes produtos em ativar mecanismos de defesa em plantas. Para os testes de mortalidade dos insetos, folhas de *Eucalyptus camaldulensis* foram mergulhadas em solução diluída dos produtos, nas doses recomendadas pelos fabricantes. Após secar o substrato foi transferido para tubos de vidro contendo 10 insetos adultos de *T. peregrinus* e mantidos durante 5 dias à $26 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. A avaliação foi feita diariamente retirando-se os insetos mortos. Os melhores resultados foram obtidos com os produtos Topneem, Rotenat, Rotenat CE e Compostonat. Estes foram avaliados quanto ao seu potencial de indução de mecanismos de defesa em plantas, quantificando o teor de fitoalexinas gliceolínicas, proteínas e a atividade da FAL (fenilalanina -amônia- liase) em cotilédones de soja. Utilizou-se o indutor padrão quitosana a 1% como testemunha “branca”. Os resultados indicam que além da quitosana, induziram a produção de fitoalexinas e aumento da atividade da FAL os produtos Topneem e o Rotenat CE. Em relação ao teor de proteínas não correu diferença estatística entre os tratamentos. Os produtos Rotenat, Compostonat, Rotenat CE e Topneem apresentam efeito sobre *T. peregrinus* e Topneem e Rotenat CE são capazes de induzir mecanismos de defesa em cotilédones de soja.

Palavras - chave: Percevejo bronzeado; controle alternativo; indução de resistência;

5.2 ABSTRACT:

The objective of this study was to test the potential of natural products: Orobor[®], Topneem, Rotenat, Rotenat CE, Baicao, Compostonat, Pironat, Assist, Garlic Extract and Lime Bordeaux, in control of insect pest of *Eucalyptus*, *Thaumastocoris peregrinus* and their capacity to activate defense mechanisms in plants. For tests of insect mortality leaves of *Eucalyptus camaldulensis* were dipped in dilute solution products, in doses recommended by the manufacturers. After drying, the substrate was transferred to glass tubes containing 10

adult insects of *T. peregrinus* and maintained for 5 days at 26 ± 2 ° C, U.R. $70 \pm 10\%$ and photoperiod of 14 hours. The evaluation was done daily by removing the dead insects. The best results were obtained with the products Topneem, Rotenat, Rotenat CE and Compostonat. These were analyzed in terms of potential to induce resistance in soybean cotyledons to both quantify the concentration of phytoalexins, protein and activity of PAL (phenylalanine ammonia lyase). We also used the standard inductor 1% chitosan as witness "white". The results indicate that addition of chitosan, induced the production of phytoalexins glyceolin and increased activity of PAL products and Topneem Rotenat CE. In relation to protein content did not run statistical difference between treatments. The products Rotenat, Compostonat, Rotenat CE and Topneem have an effect on *T. peregrinus* and Topneem and Rotenat CE are able to induce defense mechanisms in soybean cotyledons.

Keywords: bronzed bug; alternative control; induced resistance;

5.3 INTRODUÇÃO

O percevejo bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae), é um inseto que se alimenta da seiva das folhas de várias espécies de *Eucalyptus*. Este processo diminui a taxa de fotossíntese da planta, culminando com o secamento e a queda das folhas, com conseqüente prejuízo ao seu desenvolvimento (JACOBS e NESER, 2005). Além disso, este processo pode fragilizar a planta, propiciando a entrada de outros agentes fitopatogênicos.

Até o momento não se encontrou um método de controle efetivo para este inseto-praga. Na Austrália, em pequena escala, o controle químico é realizado através do inseticida sistêmico, chamado de imidacloprid. O uso racional em curto prazo tem efeito positivo com redução significativa nas populações de *T. peregrinus* (NOACK et al., 2009). No entanto, em uma perspectiva de tempo maior, além de propiciar o surgimento de insetos resistentes, os resultados para a sociedade e para o meio ambiente podem se tornar extremamente negativos, devido a sua toxicidade e efeito químico residual.

De acordo com Vendramim e Castiglioni (2000), devido à preocupação com o surgimento de resistência de pragas aos inseticidas, ocorrência de danos ambientais, eliminação de organismos benéficos e problemas de intoxicação, causados pelas pulverizações freqüentes de agrotóxicos, iniciou-se uma busca por novos grupos de produtos químicos e inseticidas a base de plantas como alternativas para o controle de pragas.

Além disso, as empresas vêm buscando adotar práticas que aumentam a produtividade conservando o meio ambiente, utilizando o manejo integrado, e dando preferência ao controle biológico, cultural e à utilização de agrotóxicos seletivos e menos tóxicos (FARIA, 2009).

Para *T. peregrinus* tem destaque estudos envolvendo a utilização de fungos entomopatogênicos (Soliman et al., 2010; Lorencetti et al., 2011) e o parasitóide de ovos *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), único inimigo natural da praga na Austrália, importado e em estudo no Brasil (IPEF, 2012). O uso de espécies de *Eucalyptus* mais resistentes ao ataque também pode ser um fator determinante para o manejo da praga, pois esse inseto prefere algumas espécies de eucalipto e seus híbridos. Entre as espécies mais suscetíveis estão *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e o híbrido de *E. camaldulensis* x *E. grandis* (JACOBS e NESER, 2005). Foram consideradas por Soliman (2010), entre as espécies estudadas, as que favorecem o desenvolvimento e reprodução de *T. peregrinus*, *E. urophylla* e *E. grandis*.

Além do controle biológico, pode representar uma alternativa promissora à utilização de produtos a base de extratos de plantas. Segundo Almeida (2010) a diminuição da carga de agrotóxicos é perceptível devido ao aumento da comercialização de inseticidas de origem vegetal nos últimos anos, pois são de rápida degradação e não se acumulam ao longo das cadeias tróficas. Muitos produtos a base de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) (EMBRAPA, 2006), timbó *Derris* sp. (BUENO, 2008; ALMEIDA, 2010), e outros de origem botânica são amplamente utilizados na agricultura orgânica, com eficiência comprovada para o controle de várias pragas e doenças. Além disso, testes de compatibilidade de produtos naturais com fungos entomopatogênicos *in vitro* mostram que esses produtos promovem grande variação de resposta e, dependendo do produto, podem ser observados efeitos deletérios, nulos ou mesmo sinérgicos sobre esses agentes de controle microbiano (Alves et al., 1998).

O uso de produtos naturais pode permitir a proteção da planta contra o ataque de patógenos, através da ativação de mecanismos de defesa. Trabalhos desenvolvidos com extrato obtido a partir de plantas medicinais da flora nativa têm demonstrado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos e indução fitoalexinas, indicando a presença de compostos com características de elicitor (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000). De acordo com Sticher et al. (1997) elicitores são moléculas capazes de ativar mecanismos de defesas nas plantas, e são ativados pelo tratamento com agentes bióticos ou abióticos, de natureza inorgânica, orgânica ou sintética, atuando como indutores de resistência. Estes mecanismos de defesa podem ser estruturais, como papilas, lignificações e tiloses, ou bioquímicos, como o

acumulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (PASCHOLATI; LEITE, 1994).

Em soja, a fitoalexina gliceolina (pterocarpanóide) mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos, sendo que a utilização de cotilédones de soja mostrou-se como excelentes ferramentas para estudos envolvendo ação elicitadora de moléculas de origem biótica e abiótica (SCHWAN-ESTRADA et al., 2000).

Produtos naturais são usados para o controle de várias pragas das culturas, ou ainda como fertilizantes, para melhorar a nutrição e evitar a incidência de doenças e pragas e, portanto, podem atuar na ativação de rotas de defesa, como ativação de metabólitos, fitoalexinas, proteínas e enzimas como a FAL (fenilalanina amônia - liase). Até o momento não existem relatos sobre o emprego de produtos naturais para o controle de *T. peregrinus* e sua provável atuação sobre plantas de *Eucalyptus*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi testar os produtos: Orobor®, Topneem, Rotenat, Rotenat CE, Baicao, Compostonat, Pironat, Assist, Extrato de Alho e Calda Bordalesa sobre a mortalidade de *T. peregrinus* e a capacidade de atuação destes sobre a indução de mecanismos de defesa em plantas, utilizando como indicador, cotilédones de soja.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Obtenção e Manutenção do Percevejo Bronzeado

O experimento foi realizado no Laboratório de Controle Biológico da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Câmpus Dois Vizinhos) (UTFPR-DV). Os insetos matrizes de *T. peregrinus* foram fornecidos pela Embrapa Florestas de Colombo – Paraná, mantidos em gaiola de vidro revestida por tecido tipo *voil* e alimentados com ramos de *Eucalyptus benthammi* e *E. camaldulensis*. Foram utilizados nos experimentos somente insetos adultos. As médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis à 5% de probabilidade pelo programa BioEstat 5.0® (AYRES et al., 2007).

5.4.2 Aplicação dos Produtos Naturais

Foram utilizados os produtos: Assist, Baicao, Orobor®, Calda Bordalesa, Compostonat, Extrato de Alho, Pironat, Rotenat, Rotenat CE e Topneem, nas doses

recomendadas pelos fabricantes ou descritas na literatura. Na testemunha foi aplicada água destilada esterilizada (tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Produtos naturais avaliados no controle da *T. peregrinus* em laboratório. UTFPR, Dois Vizinhos – P R, 2012.

Nome comercial	Produto	Uso	Conc. em 100mL de H ₂ O	Empresa fabricante
Assist	Óleo mineral	INS	0,1 ml	Basf
Baicao	Fertilizante foliar mineral misto	INS	0,15 ml	Natural Rural
Calda Bordalesa	Composto de sulfato de cobre (II), cal hidratada ou cal virgem e água.	INS/ FUN/ BAC/ NEM	Não diluir	Fabricação caseira
Compostonat	Óleo de <i>Nim</i> , pimenta-longa, alho, timbó, gerânio e outros extratos	INS	0,1 ml	Natural Rural
Extrato de Alho	Extrato de Alho (<i>Allium sativum</i>)	INS	0,3 ml	Natural Rural
Orobor®	Óleo da casca da laranja (<i>Citrus sinensis</i>).	INS	0,5 ml	Agro Domus
Pironat	Extrato Pirolenhoso bruto + 100 substâncias químicas	INS	0,1 ml	Natural Rural
Rotenat	Extrato de timbó (<i>Derris sp.</i>)	INS	0,6 ml	Natural Rural
Rotenat CE	Extrato de timbó (<i>Derris sp.</i>)	INS	0,6 ml	Natural Rural
Topneem	Óleo de nim (<i>Azadirachta indica</i>) e outros compostos	INS/ FUN/ BAC/ NEM	1 ml	MF Rural
---	Testemunha (água)	---	---	---

Conc.= Concentração Recomendada

INS= Inseticida; FUN=Fungicida; BAC=Bactericida; NEM= Nematicida

Foram realizadas seis repetições por tratamento (produto). As diluições foram preparadas em recipientes de vidro tipo Becker, utilizando água destilada esterilizada. Foram selecionadas folhas de *E. camaldulensis* sadias e com tamanho e tonalidade aproximadas, recortadas com comprimento de cinco cm a partir do pecíolo e a base da folha, todas com largura média superior entre 3,5 a 4,0 cm. As folhas foram mergulhadas nas soluções com os

produtos e após secarem em câmara de fluxo laminar, foram transferidas para tubos de vidro contendo 10 insetos adultos cada um. Os frascos foram mantidos durante 5 dias à $26 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R. de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas (Figura 5.1). A avaliação foi feita diariamente retirando-se os insetos mortos.



Figura 5.1 Soluções de produtos naturais preparado em recipiente tipo Becker (a). Folha de *Eucalyptus camaldulensis*, secando após serem mergulhadas nos produtos (b). Frascos com folhas e insetos na B.O.D (c). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.

5.4.3 Indução de Fitoalexinas em Cotilédones de Soja

Para os testes de indução de resistência, foram utilizadas sementes de soja convencional “COODETEC 205”, semeadas em bandejas plásticas contendo areia autoclavada e mantidas em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por 9 dias para emergência das plântulas. Os cotilédones foram então removidos e lavados com água destilada. Na face abaxial dos cotilédones foi feito um corte superficial e sobre esse corte, depositou-se $40 \mu\text{L}$ dos produtos naturais, nas doses recomendadas pelo fabricante, e água destilada na testemunha.

Os cotilédones foram pesados, e colocados em placas de Petri[®], (4 por placa), previamente forradas com disco de papel filtro umedecidas com água destilada. As placas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada tipo BOD ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, e $70 \pm 10\%$), sem presença de claridade. Após o período de 20 horas, os cotilédones foram pesados e colocados em copos de plásticos contendo 15 mL de água destilada, e submetidos a agitação magnética por 1 hora para a extração de gliceolina. A indução de fitoalexinas foi avaliada transferido-se a solução para cubeta de vidro e determinando a absorbância em espectrofotômetro, modelo UV – SP 2000 Spectrum, marca Novatécnica, a 286 nanômetros (Figura 5.2).



Figura 5.2. A) Aplicação do produto sobre cotilédones de soja em placa de Petri®. B) Agitação magnética - extração de glicelina; C) Leitura sendo realizada em espectrofotômetro UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.

5.4.4 Quantificação de Proteínas

O teor de proteína solúvel foi determinado calorimetricamente pelo método descrito por Bradford (1976). Para cada tratamento, o material congelado enrolado em papel alumínio e previamente pesado na quantidade de 0,5 g, foi macerado em um almofariz com 5 ml da solução tampão Fosfato 0,2 Molar pH 7,5, obtendo assim o extrato enzimático. O extrato foi colocado em tubos “ependorfs” devidamente identificados e centrifugados durante 10 minutos a 12000 rpm e a 4 °C.

Foram retirados 40 µL do extrato sobrenadante e colocados em tubos de ensaio, adicionando a cada um 460 µL de água destilada e 2mL do reagente Bio-Rad diluído 1:4. Os tubos foram agitados em vórtex e colocados na cubeta para leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 630 nanômetros (nm) para obter o valor da absorbância. Os resultados foram expressos em variação de unidades de absorbância/min/mg de peso fresco.

5.4.5 Atividade da Fenilalanina Amônialiase (FAL)

Para o preparo do extrato, pesou-se 0,5 g de cotilédones de soja tratados com os diferentes produtos naturais que foram transferidos para almofariz de porcelana previamente gelado. Acrescentou-se 3,0 mL do tampão de extração, a 4 °C, e macerou-se a mistura completamente. O extrato obtido foi colocado em tubos “ependorfs” devidamente identificados. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por um período de 10 minutos a 4 °C. Foram pipetados 200 µL do sobrenadante, colocados em tubos de ensaio, e acrescentando 5 mL do tampão de extração. O tampão de extração foi preparado com uma mistura de 22,2 g

de Tris, 0,37 g de EDTA (ácido etileno- diamono- tetracético), 85,5 g de sacarose, 10 g de PVP (polivinilpirrolidona) e completado o volume para 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 8,0 com ácido clorídrico 2,0 N.

A determinação da atividade enzimática da FAL foi avaliada com base na diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (HYODO et al., 1978). Para isto pipetou-se para tubos de ensaio, 1,5 mL de cada extrato enzimático da amostra anterior, acrescentou-se 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina (49,6 mg/mL) e água destilada na prova em “branco”. Os tubos de ensaio foram incubados a 40 °C durante uma hora, interrompendo-se a reação com banho de gelo. As amostras foram transferidas para cubeta de vidro e realizadas as leituras em espectrofotômetro a 290 nm.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Mortalidade de *T. peregrinus* com Uso dos Produtos Naturais

O produto que provocou maior mortalidade foi o Rotenat, com 94,4% no segundo dia de avaliação. Este, no entanto, não diferiu dos produtos Compostonat, com 86,7%, Rotenat CE, com 61,1%, e Topneem, com 52,8% de mortalidade. Os demais produtos não diferiram da testemunha, para o controle de *T. peregrinus* (tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Porcentagem média (%) (\pm Erro Padrão) de mortalidade de adultos de *T. peregrinus* por produtos naturais, 2 dias após aplicação ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, 14 h de fotofase e U.R. de $70 \pm 10\%$). UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.

PRODUTOS	Mortalidade 2º (%)
Rotenat	94,4 \pm 5,66 a*
Compostonat	72,2 \pm 15,92 ab
Rotenat CE	61,1 \pm 11,13 abcd
Topneem	52,8 \pm 6,61 abcd
Baicao	38,9 \pm 10,23 bcde
Assist	30,6 \pm 6,82 bcde
Calda bordalesa	22,2 \pm 3,58 cde
Pironat	19,4 \pm 5,09 de
Extrato de alho	16,7 \pm 11,27 e
Testemunha	13,9 \pm 6,61 e
Orobor®	8,3 \pm 5,61 e

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

O Rotenat é um inseticida natural composto pelo extrato da planta timbó *Derris* sp. rica em rotenona. A rotenona é derivada de raízes, sementes e folhas algumas espécies de plantas e é comercializado como inseticida. Apresenta atividade inseticida para operárias de *Atta sexdens* rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae) (BUENO, 2008). Porém teve eficiência baixa para o controle de hemípteros como o psilídeo do citrus e eucalipto, *Euphalerus clitoriae* (Hemiptera: Psyllidae) (11,6%) na dose recomendada pelo fabricante (ALMEIDA, 2010), diferente do contatado para *T. peregrinus*.

O óleo de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss), presente nos produtos Topneem e Compostonat, apresenta eficácia comprovada para hemípteros como os pulgões *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) (CARVALHO, 2008). Estima-se que até 1995, cerca de 400 espécies de insetos foram relatadas como sensíveis a algum tipo de ação do Nim (EMBRAPA, 2006). De acordo com a descrição do produto, o Topneem sua ação está comprovada em trabalhos científicos sobre mais de 418 espécies de insetos, incluindo Lepdópteros, Coleópteros, Homópteros, Dípteros e Orthópteros. Este produto atua sobre os insetos de diversas maneiras: Ovicida, larvicida e repelente, provoca o atraso no crescimento, redução da fecundidade e fertilidade, indução de deformidades além de possuir ação nematicida, bactericida e fungicida (EMBRAPA, 2006). Apesar deste largo campo de atuação e dos resultados apresentados nesse estudo, testes adicionais devem ser realizados com produtos a base de Nim, para avaliar sua eficácia, uma vez que o Topneem apresenta outros componentes em sua fórmula, que poderão ter sido essenciais para a mortalidade de *T. peregrinus*.

Em todos os casos, por se tratarem de produtos orgânicos e biodegradáveis, devemos considerar a ação lenta, podendo haver a necessidade de maior número de aplicações e avaliação por períodos de tempo maior, para obter melhores resultados.

Os produtos que diferiram estatisticamente, Topneem, Rotenat, Rotenat CE e Compostonat, foram utilizados, nas mesmas doses, para os testes de indução de resistência em cotilédones de soja.

5.5.2 Indução de Fitoalexinas, Quantificação de Proteínas e Atividade da Fenilalanina Amônialiase (FAL) em Cotilédones de Soja

Todos os produtos avaliados apresentaram ação na indução das fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja e atividade da FAL. No entanto, apenas Topneem e Rotenat CE diferindo da testemunha. Os produtos Rotenat e Compostonat tiveram ação na indução de

fitoalexinas, no entanto, não diferiram da testemunha pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (tabela 5.3).

Dentre os tratamentos, a quitosana, utilizada como indutor referência, mostrou grande capacidade de induzir a produção de fitoalexinas, sendo superior a todos os preparados. Tal resultado veio reafirmar sua capacidade de alteração no metabolismo das fitoalexinas (TERRY e JOYCE, 2004), e pode ser utilizado como um indutor de referência em estudos de indução a fitoalexinas (MAZARO et al., 2008).

Tabela 5.3 - Absorbância de fitoalexina gliceolina (Absorb./por grama de peso fresco), proteínas (mg.g tecido⁻¹) e atividade da enzima FAL (mg.g tecido⁻¹) em cotilédones de soja pelos diferentes produtos avaliados. UTFPR, Dois Vizinhos - PR, 2012.

Tratamento	Fitoalexinas	Proteínas	Atividade enzima FAL
Quitosana	0,35875*a	6,536** ns	6,536 *** a*****
Topneem	0,08375b	6,246	6,2463 ab
Rotenat CE	0,071b	6,233	6,2333 ab
Rotenat	0,0615bc	5,921	5,9216 bc
Compostonat	0,05125bc	5,303	5,3036 bc
Testemunha	0,023c	5,154	5,1546 c
CV (%)	22,83	13,14	33,90

* Valores representam a absorbância (286 nm)/grama de peso fresco

** Absorbância (630 nm)/grama de peso fresco

*** Absorbância (290 nm)/grama de peso fresco

*****Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan (p<0,05).

ns: Sem diferença significativa da testemunha (Duncan 5%)

Na testemunha, na qual se aplicou água, ocorreu uma pequena produção de fitoalexinas, possivelmente induzidas pela lesão mecânica realizada nos cotilédones, sendo que as fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, produzidos pela planta em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos (CAVALCANTI et al., 2005).

Em relação ao teor de proteínas não correu diferença estatística entre os tratamentos. As alterações nas variáveis bioquímicas de macromoléculas, como nas proteínas totais, pode estar relacionado ao aumento da atividade metabólica das plântulas induzidas, pois os ciclos metabólicos estão integrados e um processo de indução de compostos do metabolismo

secundário pode afetar o metabolismo primário como a síntese de proteínas, fato não observado neste experimento.

O resultado observado para a atividade da FAL foi bastante similar a observada na ativação das fitoalexinas, ou seja, a quitosana apresentou ação destacável, bem como o Topneem e o Rotenat CE diferiram da testemunha. Os produtos Rotenat, Compostonat e apresentaram potencial de ativação da FAL, no entanto, não diferiram estatisticamente da testemunha.

As vantagens do Nim (Topneem) em relação a outras plantas inseticidas são a atividade sistêmica, a eficiência em baixas concentrações, a baixa toxicidade a mamíferos e a menor probabilidade de desenvolvimento de resistência pela ocorrência de um complexo de princípios ativos (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000). Já o Rotenat CE tem ação comprovada na bioproteção natural nos vegetais e animais, o que justifica o efeito observado pelo produto na indução de fitoalexinas.

A atividade da FAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, é a enzima chave no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, com participação de fenilalanina e sua conversão em ácido transcinâmico, catalisada pela FAL, resultando em compostos como fitoalexinas (MAZARO et al., 2009).

5.6 CONCLUSÕES

As pesquisas *in vitro* indicam que os produtos Topneem, Rotenat, Rotenat CE e Compostonat apresentam efeito sobre a mortalidade *T. peregrinus* e podem constituir estratégia eficaz para o manejo deste inseto-praga.

Topneem e Rotenat CE atuam na indução de alguns mecanismos de defesa das plantas, com ativação de fitoalexinas e aumento da atividade da FAL em cotilédones de soja. Em campo, espera-se resultado similar na indução de resistência em plantas de *Eucalyptus*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O inseto *T. peregrinus* continua se dispersando sobre plantios de *Eucalyptus* no Brasil, e isso fica bem claro com o registro de novas ocorrências do inseto.

O controle de *T. peregrinus* com agentes biológicos locais representa uma alternativa promissora, especialmente com o fungo entomopatogênico *B. bassiana*, o qual se confirma em campo.

Os isolados de *B. bassiana* e *Isaria* sp. testados foram patogênicos à *T. peregrinus*, demonstrando a necessidade de futuros testes de virulência em isolados de fungos destes gêneros.

Os produtos Rotenat, Compostonat, Rotenat CE e Topneem apresentam potencial para o controle de *T. peregrinus* ;

Os produtos Topneem e Rotenat CE apresentaram potencial na indução de resistência, com ativação das fitoalexinas gliceolinas e aumento da atividade da FAL em cotilédones de soja, demonstrando seu potencial efeito sobre plantas de *Eucalyptus*.

7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**. Lanham, v. 18, p. 265-267, 1925.

ABRAF -. Anuário Estatístico da Associação Brasileira dos Produtores de Florestas: ano base 2011. Brasília, 145 p. 2012. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF12/ABRAF12-BR.pdf>. Acesso em 16 mar. 2013.

ABRAF -. Anuário Estatístico da Associação Brasileira dos Produtores de Florestas: ano base 2009. Brasília, 140 p. 2010. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF10/ABRAF10-BR.pdf>. Acesso em 11 ago. 2012.

ALMEIDA, J. E. M. Resultados do controle biológico da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar com *Metarhizium anisopliae*. Instituto Biológico, Campinas, São Paulo, 2001. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IX_RIFIB/almeida2.PDF. Acesso em 29 out. 2011.

ALMEIDA, M. N. Eficiência de um Inseticida Botânico no Controle de Ninfas de *Euphalerus Clitoriae* (Hemiptera: Psyllidae). **Revista Controle Biológico (BE-300)** On-Line. V.2, Jan. 2010.

ALVES, S. B. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.77-86. 1992

ALVES, S. B. 1998. Fungos entomopatogênicos, p. 289–381. In: S. B. Alves (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed.,v.4. Piracicaba, FEALQ, 1998, 1163 p.

ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JR, A.; ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório, p.637-711. In: S. B. Alves (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed., v. 4. Piracicaba: FEALQ, 1998, 1163 p.

ALVES, L. F. A.; GASSEN, M. H.; PINTO, F. G. S.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviário comercial de Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**. v.34, n.3, Londrina, 2005

ALVES, L. F. A.; Bellon, P. P.; Rheinheimer, A. R.; Pietrowski V. First record of *Beauveria bassiana* (hyphomycetes: moniliales) on adults of cassava lace bug *Vatiga manihotae* (drake) (hemiptera: tingidae) in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológicos**, São Paulo, v.79, n.2, p. 309-311, 2012.

AMSOP - Associação dos Municípios do Sudoeste do Paraná. Disponível em: <<http://www.amsop.com.br/home.php>>. Acesso em: 16 jun. 2012

ANGELI, A.; BARRICHELO. L. E. G.; MÜLLER, P. H. Indicações para escolha de espécies de *Eucalyptus*: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF, 2005. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/Eucalyptus/indicacoes.asp>>. Acesso em: 16 jun. 2012.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3aad8100474592b79b0fdf3fbc4c6735/B40++Beauveria+Bassiana.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 dez. 2012

ARAUJO JR, J. M.; MARQUES, E. J.; OLVEIRA, J. V. Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do óleo de Nim no controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**. v.38, n.4, Jul./Ago. 2009

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. BioEstat: aplicação estatística nas áreas das ciências bio-médicas. Belém, 2007

BARBOSA, L. R.; LINZMEIER A. M.; SANTOS, F. Folder informativo – Embrapa Florestas. Colombo, Paraná. Jul. 2009.

BARBOSA, L. R.; SANTOS, F.; WILKEN, C. F.; SOLIMAN, E. P. Registro de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera, Thaumastocoridae) no estado do Paraná. Nota Científica. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v.30, n.61, p. 75-77, 2010.

BARBOZA, M. R.; SILVA, D. N.; HIROSE, E.; LUSTOSA, S. B. C. Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria Bassiana* sobre o percevejo *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae). **Ambiência**. Guarapuava (PR), V.7, n. 3, p. 473-480. Set./Dez 2011

BATISTA - FILHO, A.; SATO, M. E.; LEITE, L. G.; RAGA, A.; PRADA, W. A. Utilização de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no controle de moleque da bananeira *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.13, n.4, p. 35-40. 1991.

BONALDO, S. M. Indução de resistência: Noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTE, L. S. Di Piero, R. M., Cia, P., Pascholati, S.F., Resende, M.L.V. e Romeiro, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e pragas**. Piracicaba (SP), FEALQ. p.11-25. 2005.

BORGES, L. R.; LAZZARI, S. M. N., BORGES-ARRIAGADA, L. R.; IEDE, E. T. Eficácia de *Beauveria bassiana* para o controle de *Hedypathes betulinus* em erva-mate, *Ilex paraguariensis*. **Floresta**, Curitiba, PR, v.41, n.2, p.313-320, abr./jun. 2011

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.72, p.248-254, 1976.

BUENO, F. C.; CECCATO, M.; REISS, I. C. MATHIAS, M. I. C. BUENO, O. C. Toxicidade da Rotenona para Operárias de *Atta Sexdens Rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Anais...** XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Uberlândia (MG) Ago. 2008.

CAPA - Centro de Apoio ao Pequeno Produtor Rural. Agrotóxico proibido na Alemanha é vendido no Brasil com 17 nomes comerciais. Ulisses A. Nenê, 12 jun. 2008. Disponível em: http://www.capa.org.br/site/content/noticias/detalhe.php?noticia_id=56. Acesso em: 08 jun. 2012.

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

CARVALHO, G. A.; SANTOS, N. M.; PEDROSO, E. C.; TORRES, A. F. Eficiência do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no controle de *Brevicoryne brassicae* (linnaeus, 1758) e *Myzus persicae* (sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em couve-manteiga *Brassica oleracea* linnaeus Var. *Acephala*. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.75, n.2, p.181-186, abr./jun. 2008

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.81-124.

EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical. Usos e aplicações do NIM (*Azadirachta indica*). Cartilha informativa. Disponível em: http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/cartilha/cartilha_nim_2006.pdf. Acesso em: 10 jan 2013

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 22, n. 1, p. 18-21, 2001.

FARIA, M.; WRAIGHT, S.P. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. **Crop Protection**, Guildford, v.20, p.767-778, 2001.

FARIA, A. B. C. Revisando o processo de certificação florestal. **Ambiência** - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais. Guarapuava (PR), v.5, n.1 p.145 –153. Jan./Abr 2009.

FRANÇA, I.W.B. et al. Efeitos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo predador *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 349-356, 2006.

GARLET, J.; COSTA, E. C.; BOSCARDIN, J. NASCIMENTO, M.; PEDRON, L. Flutuação populacional de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em plantio clonal de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em Alegrete, RS, Brasil. **Anais...** VII Congresso de Medio Ambiente. La Prata, Argentina, 2012.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S. F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**. v.62, p.31-35, 1978.

IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. PROTEF realiza importação de inimigo natural de praga do eucalipto. Informativo on-line. Ed. 15, jul. 2010. Disponível em: <http://www.ipef.br/ipefexpress/nr015.htm>. Acesso em: 25 jul. 2012.

IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. PROTEF realiza primeira liberação do inimigo natural do percevejo bronzeado no Brasil. Informativo on-line. Ed. 50, ago. 2012. Disponível em: <http://www.ciflorestas.com.br/conteudo.php?id=7744>. Acesso em: 01 out. 2012

IPEF - Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. Primeiras avaliações sinalizam sucesso no estabelecimento do parasitóide do Percevejo Bronzeado. Informativo on-line. Ed. 55. Out. 2012. Disponível em: <http://www.ipef.br/ipefexpress/nr055.htm>. Acesso em: 25 nov. 2012

ITAFORTE Bioprodutos. Disponível em: http://www.itafortebioprodutos.com.br/produto.asp?id_produto=1. Acesso em: 05 nov. 2011

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

LAUDONIA, S.; SASSO, R. The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*: a new insect recorded in Italy, damaging to *Eucalyptus* trees. **Bulletin of Insectology**. v.65, n.1. p.89-93, 2012.

LAZZARINI, G. M. J. Efeito da umidade sobre a germinação in vitro de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e atividade contra *Triatoma infestans*. Goiânia, 2005. 46 f. **Dissertação** (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, 2005.

LEITE, L. G., BATISTA FILHO, A., ALMEIDA, J. E. M. de, ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2003. 92 p.

LIMA, A. C. V. Amostragem e dinâmica populacional do percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em floresta clonal de eucalipto. **Dissertação** (mestrado). Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP, 73f., 2011

LIMA, W. P. O Impacto Ambiental do Eucalipto. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1993.

LOPES, R. B.; SILVA, S. D.; ASSUNÇÃO, R. M.; BOTTON, M. Virulência de *Isaria fumosorosea* a *Eurhizococcus brasiliensis* (Hemiptera: Margarodidae) e descrição dos sintomas da doença em cistos. **Anais...** XXII Congresso Brasileiro de Entomologia, Uberlândia (MG), 2008.

LORENCETTI, G. A. T.; MENEZES, M. J. S.; JUNG, P. H.; GONÇALVES, T. E.; BARBOSA, L. R., POTRICH, M.; MAZARO, S. M.; SILVA, E.R.L. Análise do potencial de *Beauveria bassiana* vuill (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Anais...** I Congresso de Ciência e Tecnologia da UTFPR, Dois Vizinhos, 2011

LOUREIRO, E. S. Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com outros produtos fitossanitários e sua interação com *Myzus persicae* (Sulzer, 1776), *Aphis gossypii* (Glover, 1877) (Hemiptera: Aphididae) e *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae). Lavras, 2001, 121 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia - Entomologia) - Universidade Federal de Lavras.

MARICONI, F.A.M. Inseticidas e seu emprego no combate as pragas: com uma introdução sobre o estudo dos insetos. Editora Nobel, ed 3, v.1, São Paulo, 1977

MAGALHÃES, B.; FARIA, M.; FRAZÃO, H. Estudos de laboratório com *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* para controle de gafanhotos. In: MAGALHÃES, B.; LECOQ, M. (Ed.). Bioinseticida e gafanhotos-praga: relatório final do projeto "Desenvolvimento de bioinseticidas para controle de gafanhotos-para no Brasil". Brasília (DF): Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 41-55, 2007.

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

MARTINS, J. F. et al. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. **Ciência Rural**, v.34, p.1681-1688, 2004.

MARTINS, E. M. F. Controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) através da indução de resistência. In: Bettiol, W. (Ed.) Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna SP. Embrapa- CNPDA. p. 345-363, 1991.

MAZARO, S. M. Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores. **Tese** (Doutorado em Agronomia). 105 f. Universidade Federal do Paraná. Curitiba (PR), 2007.

MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**. v.38 ,n.7 , p.1824-1829, 2008.

MAZARO, S. M.; WAGNER A.; SANTOS, I.; CITADIN, I.; POSSENTI, J. C.; GOUVÊA, A. Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento de sementes com quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.11, p.1424-1430, 2009.

MENEZES, M. J. S.; LORENCETTI, G. A. T.; DALLACORTE, S.; OLIVEIRA, T.M.; POTRICH, M.; SILVA, E. R. L. Preferência alimentar de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) a diferentes espécies do gênero *Eucalyptus*. **Anais...** I Congresso de Ciência e Tecnologia da UTFPR. Dois Vizinhos (PR), 2011.

MUSTU, M.; DEMIRCI, F.; KOÇAK, E. Mortality effects of *Isaria farinosa* (Holm.) and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Sordariomycetes: Hypocreales) on *Aelia rostrata* Boh. (Hemiptera: Pentatomidae). **Turkish Journal of Entomology**, v.35, p. 559-568, 2011

NOACK, A. E.; KAAPRO, J.; BARTIMOTE-AUFFLICK, K.; MANSFIELD, S.; ROSE, H.A.. Efficacy of Imidacloprid in the Control of *Thaumastocoris peregrinus* on *Eucalyptus scoparia* in Sydney, Australia. **Arboriculture & Urban Forestry**. p. 192–196, 2009.

NOACK, A. E., COVIELLA, C. E. *Thaumastocoris australicus* Kirkaldy (Hemiptera: Thaumastocoridae): first record this invasive pest of *Eucalyptus* in the Americas. **General and Applied Entomology**. v.35, p.13–15, 2006.

PASCHOLATI, S. F. LEITE, B.. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.2, p.1-51, 1994.

POTRICH, M.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, L. F. A.; PIZZATTO, M.; SILVA, E. R. L.; LUCKMANN, D.; GOUVEA, A.; ROMAN, J. C. Virulência de fungos entomopatogênicos a ninfas de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1783-1792, 2011

ROHDE, C.; ALVESI, L.F.; NEVES, P. M.; ALVES, S. B.; SILVA, E.R. da; ALMEIDA, J.E de. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.35, n.2, p.231- 40, 2006.

SANTORO,P.H.; NEVES, P.M.O.J.; ALEXANDRE, T.M.; ALVES, L.F.A. Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42,n.4,p.483-489, 2007

SANTOS, R. S. S.; PRANDO, H. F.; REDAELLI, L. R.; DIEFENBACH, L. M. G.; ROMANOWSKI, H. P. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em adultos hibernantes de *Oebalus poecilus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**; v.31, n.1, p. 53-155, 2002

SBS - Sociedade Brasileira de Silvicultura. Informativo on-line, jul. 2010. Disponível em: http://www.sbs.org.br/detalhes_dia.php?id=2366. Acesso em: 07 out. 2011

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v.30, n. 1-2, p. 129-137, 2000.

SEAB - Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Governo do estado do Paraná. Disponível em: <http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/pesquisar.asp>. Acesso em: 30 out. 2012

SEAB - Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Governo do estado do Paraná. Disponível em: www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/pluvio.xls. Acesso em: 25 mar. 2013

SMANIOTTO, M. A. GARCIA, M. S.; FARIAS, C. R. J.; FINKENAUER, E. Primeiro registro da ocorrência de *Beauveria bassiana* (Balsamo) em adultos de *Thaumastocoris peregrinus* Carpinteiro & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae) no Rio Grande do Sul. **Anais...** XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia, Curitiba (PR), set. 2012.

SOLIMAN, E. P. Bioecologia do percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) em eucalipto e prospecção de inimigos naturais. 2010. 90f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia – Área de Proteção de Plantas) Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, Botucatu, 2010.

SOLIMAN, E. P.; DAL POGETTO, M. H. F.; ZACHÉ, B.; DIAS, T. K. R.; PEREIRA J, M.; LAZO, M. L.; BARBOSA, L. R.; WILCKEN, C. F. Cálculo da CL50 e TL50 de *Beauveria bassiana* para controle do Percevejo-bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Anais...** XXXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Natal (RN). Set. 2010.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technoly**. Amsterdam, v.32, p.1-13. 2004.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas In: **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: Pallotti, p. 113-128, 2000.

WILCKEN, C. F. Percevejo bronzeado do eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileiras. IPEF Programa de proteção florestal - PROTEF/IPEF. Botucatu, SP, Set. 2008. Disponível em: <<http://www.ipef.br/protecao/alerta-percevejo.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2011.

WILCKEN, C. F.; SOLIMAN, E. P.; NOGUEIRA DE SÁ, L. A.; BARBOSA, L. R. DIAS, T. K. R.; FERRERA-FILHO, P. J. OLIVEIRA. R. J. R. 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, 2010.

WILCKEN, C. F. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais – IPEF. Percevejo Bronzeado do Eucalipto no Brasil. Projeto cooperativo de monitoramento e manejo de pragas exóticas do Eucalipto. Programa de proteção florestal. **Folheto informativo**. Set. 2009. Disponível em: <http://www.ipef.br/protef/percevejo.pdf>. Acesso em: 31 out. 2011

WILCKEN, C.F.; SOLIMAN, E.P.; LIMA, A.C.V.; DAL POGETTO, M.H.F.A.; DIAS, T.K.R. Perspectivas para o manejo do percevejo bronzeado do eucalipto. Botucatu, SP: Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, In.: 14 Reunião técnica do PROTEF/IPEF, nov. 2009. Disponível em: http://www.ipef.br/eventos/2009/rtprotef14/PercevejoBronzeado_Wilcken.pdf. Acesso em: 14 jun. 2012.

WRAIGHT, S. P.; CARRUTHERS, C. A.; BRADLEY, S. T.; JARONSKI, L. A.; LACEY L.A.; WOOD P.; GALAINI-WRAIGHT S. Pathogenicity of the Entomopathogenic Fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p.217–226, 1998.

XAVIER, L. M. S. ÁVILA, C. J. Patogenicidade, DL 50 e TL 50 de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok para o percevejo castanho das raízes *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae). **Ciência Rural**, n.35, p. 763–768, 2005.

ZIMMERMANN, G. Fungos entomopatogênicos *Isaria farinosa* (anteriormente *Paecilomyces farinosus*) e o complexo de espécies fumosorozea *Isaria* (anteriormente *Paecilomyces fumosorozeus*): biologia, ecologia e utilização no controle biológico. **Biocontrol Ciência e Tecnologia**, Ed.18, p. 865-901, 2008.