

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

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
PATOGENICIDADE DE DIFERENTES ISOLADOS DE *Fusarium* spp.
PARA O CONTROLE DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE)**

SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP - Campus
de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Fevereiro - 2015

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

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
PATOGENICIDADE DE DIFERENTES ISOLADOS DE *Fusarium* spp.
PARA O CONTROLE DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE)**

SIMONE GRAZIELE MOIO VELOZO

Orientador: Carlos Frederico Wilcken

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP - Campus
de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP

Fevereiro – 2015

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

V443i Velozo, Simone Graziele Moio, 1991-
Identificação, caracterização e avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de *Fusarium* spp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) / Simone Graziele Moio Velozo. - Botucatu : [s.n.], 2015
viii, 59 f. : ils. color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2015
Orientador: Carlos Frederico Wilcken
Inclui bibliografia

1. Pragas - Controle biológico. 2. Fusário. 3. Percevejo (Inseto) - Controle biológico. 4. Eucalipto. 5. Fungos. I. Wilcken, Carlos Frederico. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu. III. Título

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
PATOGENICIDADE DE DIFERENTES ISOLADOS DE *Fusarium* spp.
PARA O CONTROLE DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA:
THAUMASTOCORIDAE)"

ALUNA: SIMONE GRAZIELE MOIO

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS FREDERICO WILCKEN

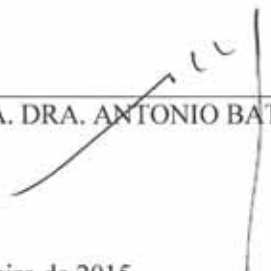
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. CARLOS FREDERICO WILCKEN



PROF. DR. EVERTON PIRES SOLIMAN



PROFA. DRA. ANTONIO BATISTA FILHO

Data da Realização: 12 de fevereiro de 2015.

“O que ninguém nunca viu, e o que jamais alguém pensou que poderia acontecer, foi
isso o que Deus preparou para aqueles que o amam.”
(1 Coríntios 2:9)

Ofereço,

A Deus, Pai Celestial, que esteve presente em todos os dias dessa caminhada, inclusive nos momentos mais difíceis, os quais muitas vezes acreditei que não teria capacidade para realizar esse trabalho. No Senhor encontrei sabedoria, paz, calma e tranquilidade para que essa dissertação se tornasse possível. O tempo todo Deus livrou-me de todo mal e colocou pessoas maravilhosas em meu caminho para eu chegar até aqui. Sei que tudo já havia sido planejado conforme a Sua vontade. Agradeço-Te pela minha vida e por todas as graças alcançadas.

Dedico,

Ao meu amado esposo Murilo Velozo e ao meu “bebê” Thor que em todos os momentos estiveram compreensivamente ao meu lado.

Aos meus “avôós” Maria Leonarda Oliveira, Manoel Oliveira (em memória), Ana Moio (em memória) e Luiz Moio (em memória), pelo amor incondicional.

Aos meus pais Vanderléia Moio e Paulo Moio e minha irmã Camila Moio que sempre acreditaram em mim e não mediram esforços para investir em minha educação.

Com Deus ao meu lado, orientação do Prof. Dr. Carlos F. Wilcken e apoio de vocês, consegui enfrentar os obstáculos dessa caminhada para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu pela oportunidade e por contribuir diretamente em minha formação no Mestrado.

Ao Professor, Orientador e Amigo Carlos F. Wilcken por confiar em mim orientando-me e compartilhando comigo seus conhecimentos de Entomologia e seus valores éticos durante todo meu período de graduação e agora de pós-graduação. Peço a Deus que abençoe sua vida e sua família, pois com intermédio do seu apoio pude realizar este sonho.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante o curso.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia por todos os ensinamentos e permissão para uso de suas estruturas laboratoriais, em especial ao Prof. Dr. Edson Furtado, Carlos Raetano e Silvia Renata.

Ao Prof. Dr. Antonio Batista Filho pela recepção, amizade e afeto no decorrer da disciplina de Microrganismos Entomopatogênicos no Instituto Biológico em Campinas/SP.

Ao Prof. Dr. José C. Zanuncio pela disponibilidade e empenho no Curso de Redação Científica, com isso, proporcionando uma melhor escrita dos nossos trabalhos.

Ao Instituto de Estudos e Pesquisas Florestais (IPEF) e às empresas florestais que integram o Programa de Proteção Florestal (PROTEF) que auxiliaram direta e indiretamente com a pesquisa.

À Agrícola Rio Claro, situada em Lençóis Paulista/SP, pela disponibilização de plantas de cana de açúcar para desenvolvimento dos experimentos de fitopatogenicidade. Em especial ao Sr. Luiz Carlos Dalben e André Dalben.

Aos meus amigos e “co-orientadores” Ana C. Firmino, que teve paciência e sabedoria em me ensinar a metodologia para a realização dos experimentos, e Mario H. F. A. Dal Pogetto, o qual tenho grande admiração pelo seu conhecimento em estatística e que me orientou nessa área.

À minha amiga María Lorena San Román Lazo, que me confiou os isolados para continuação da pesquisa.

Aos meus amigos do Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais, Bruno Tamellini, Everton P. Soliman, Carol Jordan, Lorena, Fernanda Paes, Natália Medeiros,

André Horta, Thaíse Dias, Murici Candelaria e Amanda Rodrigues, pela amizade e colaboração no decorrer dos experimentos. Em especial ao estagiário Bruno Tamelini, que participou e ajudou no desenvolvimento dos experimentos.

Às amigas que foram e são minha família em Botucatu Mírian Medeiros, Marília Pizetta, Evelynne Ursêdo Leão, Carla Brito e Nádia Boareto Moreno. Em especial a Mírian pela dedicação e cuidado em ajudar-me nos momentos mais difíceis da minha vida, pessoais e profissionais.

A toda a equipe da Biblioteca Prof. Paulo de Carvalho Mattos - FCA/ UNESP de Botucatu pelo apoio e a colaboração dos funcionários do Departamento de Proteção Vegetal – FCA.

Ao apoio de todos da minha família (tios, primos, cunhado, sogro e sogra) e dos meus amigos Ana Claudia Burato, Cristiano Maximiano, Mariana André, Mahyara Romani, Rodrigo Repke, Joezer, Carla, Gabi, Junior, Vanea e Helbert.

Aos membros da banca avaliadora Antonio Batista Filho e Everton P. Soliman, por aceitarem o convite e compartilharem seus conhecimentos na defesa.

A todos que me incluíram em suas orações, acreditaram em meu potencial e me ajudaram de alguma forma para a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos. Que Deus os recompense em dobro.

Minha gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
SUMMARY.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	07
2.1. Importância da cultura do eucalipto no Brasil.....	07
2.2. Pragas exóticas do eucalipto.....	08
2.2.1. Percevejo bronzeado <i>Thaumastocoris peregrinus</i> Carpintero e Dellapé 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae).....	10
2.2.1.1. Distribuição geográfica e hospedeiros.....	10
2.2.1.2. Características do inseto.....	11
2.2.1.3. Danos e controle.....	12
2.3. Fungos entomopatogênicos no controle de pragas do eucalipto.....	14
2.4. Compatibilidade de microrganismos a produtos químicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Informações gerais do estudo.....	18
3.1.1. Local de desenvolvimento do trabalho.....	18
3.1.2. Criação de <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	18
3.2. Isolamento e caracterização dos isolados.....	19
3.2.1. Obtenção dos isolados.....	19
3.2.2. Obtenção dos isolados monospóricos.....	21
3.2.3. Caracterização molecular dos isolados.....	21
3.2.4. Caracterização biológica das culturas dos isolados.....	22
3.2.5. Caracterização morfológica dos isolados.....	22
3.3. Controle microbiano de <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	23
3.3.1. Teste de patogenicidade em <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	23
3.3.2. Colonização de <i>Fusarium proliferatum</i> e <i>Fusarium equiseti</i> no corpo de <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	25
3.4. Aspectos de compatibilidade.....	26
3.4.1. Compatibilidade de <i>Fusarium proliferatum</i> e <i>Fusarium equiseti</i> a fungicidas.....	26
3.11. Análise da fitopatogenicidade de <i>Fusarium proliferatum</i> e <i>Fusarium equiseti</i>	

em diferentes culturas de importância econômica.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Isolamento e caracterização dos isolados.....	29
4.1.1. Caracterização molecular dos isolados.....	29
4.1.2. Caracterização biológica e morfológica dos isolados.....	31
4.1.2.1. <i>Fusarium proliferatum</i>	31
4.1.2.2. <i>Fusarium tricinctum</i>	31
4.1.2.3. <i>Fusarium equiseti</i>	31
4.2. Controle microbiano de <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	33
4.2.1. Teste de patogenicidade em <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	33
4.2.2. Colonização de <i>Fusarium proliferatum</i> e <i>Fusarium equiseti</i> no corpo de <i>Thaumastocoris peregrinus</i>	37
4.3. Aspectos de compatibilidade.....	39
4.3.1. Compatibilidade de <i>Fusarium proliferatum</i> e <i>Fusarium equiseti</i> fungicidas.....	39
4.6. Análise da fitopatogenicidade de <i>Fusarium proliferatum</i> e <i>Fusarium equiseti</i> em diferentes culturas de importância econômica.....	44
5. CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE DIFERENTES ISOLADOS DE *Fusarium* spp. PARA O CONTROLE DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)

Autor: Simone Grazielle Moio

Orientador: Carlos Frederico Wilcken

RESUMO

O percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), praga exótica de *Eucalyptus* spp., foi relatado em 2008 no Brasil e está distribuído em vários estados brasileiros. Os danos causados, por esse inseto, são o prateamento, evoluindo para o bronzeamento das folhas e, em altas infestações, pode ocorrer desfolha. A alternativa de controle de *T. peregrinus* é o parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae) e fungos entomopatogênicos. Esses microrganismos apresentam vantagens como infecção por via oral, traqueal ou tegumento, variabilidade genética e permanência no ambiente. Os objetivos desta dissertação foram: identificar e caracterizar fungos entomopatogênicos coletados em epizootias em campo, realizar testes de patogenicidade; identificação molecular dos fungos isolados a partir do sequenciamento de três regiões do genoma (ITS-5.8S rDNA, β -Tubulina, α -elongase); realizar caracterizações culturais e morfológicas dos isolados obtidos; acompanhar a colonização (externamente) dos fungos isolados quando inoculados no percevejo bronzeado (tempos pré-determinados: 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação), através de técnica de microscopia de varredura e microscopia óptica de luz; verificar a sensibilidade *in vitro* aos fungicidas usados comumente utilizados em plantios de *Eucalyptus* e analisar a fitopatogenicidade dos isolados a diferentes culturas de tomateiro, cana de açúcar e mudas clonais de *Eucalyptus* spp. com importância econômica. As espécies obtidas na identificação molecular foram: *Fusarium proliferatum*, *Fusarium tricinctum* e *Fusarium equiseti*. O teste de patogenicidade comprovou que os isolados podem matar o percevejo bronzeado, sendo *F. proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF004) e *F. equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009) os mais virulentos e, portanto, escolhidos para os demais experimentos. Os fungicidas Azoxistrobina + Ciproconazol (Priori Xtra®), Trifloxistrobina + Tebuconazol (Nativo®) e Piraclostrobina (Comet®) foram testados no teste de

sensibilidade. Os isolados ISO-DPV-LCBPF004 e ISO-DPV-LCBPF009 de *Fusarium* spp. apresentaram maior sensibilidade aos fungicidas nas maiores concentrações (1000ppm e 100ppm), o fungicida Trifloxistrobina + Tebuconazol foi o mais prejudicial ao crescimento micelial dos dois isolados, seguido por Azoxistrobina + Ciproconazol, e Piraclostrobina. A análise de fitopatogenicidade foi feita com as plantas: tomateiro *Lycopersicum esculentum* cultivar Santa Cruz Kada Gigante, cana de açúcar *Saccharum officinarum* variedade RB 96 6928 e mudas clonais de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* clone H-13. As inoculações foram realizadas via raiz e via foliar. O teste de fitopatogenicidade comprovou a segurança dos isolados, os quais podem ser utilizados em campo sem riscos de causar doenças ou mortalidade das plantas das plantas testadas.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos, proteção florestal, micoinseticida, percevejo bronzeado.

IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE PATHOGENICITY OF DIFFERENT ISOLATES OF *Fusarium* SPP. FOR CONTROL OF *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE). Botucatu, 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Simone Grazielle Moio

Advisor: Carlos Frederico Wilcken

SUMMARY

The bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), invasive pest of *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) was reported in 2008 in Brazil. The symptoms caused by this pest are leaf silverying, leaf bronzing and defoliation in susceptible *Eucalyptus* species or clones. The main control strategies for *T. peregrinus* involve biological control with an egg parasitoid *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae), introduced from Australia and entomopathogenic fungi. These microorganisms show advantages such as via oral, traqueal or tegument infection, great genetic variability and remaining in the environment. The objective of this study were: identifying and characterizing entomopathogenic fungi collected from field epizooties; running pathogenicity tests; molecular identification of fungi from sequencing of three regions in the genome (ITS-5.8S rDNA, β -Tubuline, α -elongase); cultural and morphological characterization of the isolates obtained; following up the colonization (externally) of fungi isolates when inoculated on the bronze bug with scanning and optical microscopy; verifying *in vitro* sensibility to fungicides normally used in eucalyptus plantations; analysing the phytopathogenicity of isolates to different plant species (tomato, sugarcane and *Eucalyptus*). The species obtained by molecular identification were: *Fusarium proliferatum*, *F. tricinctum* and *F. equiseti*. Pathogenicity test has proved that the isolates are lethal to the bronze bug, being *F. proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF004) e *F. equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009) the most virulent ones and therefore selected for the other experiments. Fungicides Azoxystrobin + Cyproconazol (Priori Xtra®), Trifloxystrobin + Tebuconazole (Nativo®) and Pyraclostrobin (Comet®) were tested to verify sensibility. Isolates ISO-DPV-LCBPF004 e ISO-DPV-LCBPF009 of *Fusarium* spp. showed greater

sensibility to fungicides in higher concentrations (1000 ppm and 100 ppm), the product Trifloxystrobin + Tebuconazole thwarted the most the micelial growth of the two isolates, followed by Azoxystrobin + Cyproconazol, and Pyraclostrobin. The phytopathogenicity analysis showed inoculations were of root and leaves caused no wilt symptoms in tested plant species.

Keywords: entomopathogenic fungi, forest protection, mycoinsecticide, bronze bug.

1 INTRODUÇÃO

Espécies do *Eucalyptus*, nativo da Austrália, são importantes para a economia mundial por terem taxa rápida de crescimento, ciclos curtos de rotação e adequados para produção em grande escala (SOUZA; LORENZI, 2005; PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011). Isto fez com que plantios de *Eucalyptus* fossem estabelecidos em diferentes regiões do mundo e insetos pragas nativos da Austrália também colonizaram os novos ambientes, causando problemas (PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011).

A produtividade do setor florestal brasileiro tem sido afetada por fatores bióticos, como insetos pragas, nativos e exóticos. A implantação do cultivo do eucalipto no Brasil favoreceu o aumento populacional de insetos nativos, muitos se tornaram pragas como formigas, besouros e lagartas desfolhadoras (QUEIROZ, 2009; ZANUNCIO et al., 1990; ZANUNCIO, 1993). Além disso, o deslocamento de pessoas e do comércio mundial está favorecendo o aumento do número de organismos invasores em novos ambientes (MEYERSON; MOONEY, 2007).

Thaumastocoris peregrinus Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), conhecido como percevejo bronzeado, foi detectado em 2008 em árvores de eucalipto em Jaguariúna, São Paulo e em São Francisco de Assis, Rio Grande do Sul (WILCKEN et al., 2010a), Brasil. A rápida dispersão desse inseto levou à

sua presença nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Bahia, Maranhão, Goiás e Piauí (BARBOSA et al., 2010; WILCKEN et al., 2010a; SAVARIS et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; Comunicação pessoal Soliman, 2014).

Os danos por *T. peregrinus* em plantas de eucalipto se devem ao hábito alimentar sugador deste inseto, que perfura as folhas para sugar a seiva, resultando em prateamento (clorose) seguido do bronzeamento e secagem das folhas (WILCKEN, 2008; WILCKEN et al., 2010a).

O controle de *T. peregrinus* com inseticidas em plantações florestais comerciais, requer um grande número de aplicações, no entanto não há ingredientes ativos registrados. Além disso, pesticidas apresentam riscos ambientais e o Conselho de Manejo Florestal (Forestry Stewardship Council – FSC) proíbe o uso de alguns deles (NADEL; NOACK, 2012). Deste modo, é promissor e pertinente o controle biológico, com o parasitoide de ovos *Cleruchoides noackae* Lin & Huber, 2007 (Hymenoptera: Mymaridae), importado da Austrália (NADEL; NOACK, 2012) e com fungos entomopatogênicos (LORENCETTI et al., 2011; MASCARIN et al., 2012; SAN ROMAN et al., 2012; SOLIMAN, 2014). Microrganismos apresentam vantagens como a forma de infecção, por via oral, traqueal ou pelo tegumento, além de alta variabilidade genética e permanência no ambiente (ALVES, 1998).

Devido *T. peregrinus* ser relevante para a cultura do eucalipto e o controle biológico ser uma perspectiva mais efetiva, esta dissertação teve como objetivos: identificar e caracterizar fungos entomopatogênicos coletados em epizootias, realizar o teste de patogenicidade com os fungos isolados do percevejo bronzeado coletado no campo em insetos sadios; realizar a identificação molecular dos fungos isolados a partir do sequenciamento de três regiões do genoma (ITS-5.8S rDNA, β -Tubulina, α -elongase); realizar caracterizações culturais e morfológicas dos isolados obtidos; acompanhar a colonização (externamente e internamente) dos fungos isolados inoculados no percevejo bronzeado (tempos pré-determinados: 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação) através de técnica de microscopia de varredura, verificar a sensibilidade *in vitro* aos fungicidas, comumente utilizados em plantios de eucalipto e analisar a fitopatogenicidade dos isolados a diferentes plantas de importância econômica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da cultura do eucalipto no Brasil

O setor florestal é importante para a economia brasileira para geração de emprego e renda e fornecimento de matéria prima e produtos para a exportação, que favorece a conservação e preservação dos recursos naturais (ABRAF, 2013).

Em 2012, o setor florestal empregou aproximadamente 4,4 milhões de pessoas, incluindo empregos diretos, indiretos e resultantes do efeito-renda com área plantada de 7,1 milhões de hectares, sendo 71% de eucalipto, 21,7% de plantios de Pinus e 7,2% de espécies não convencionais, como Acácia, Araucária, Pópulus, Teca, Seringueira e Paricá (ABRAF, 2013).

Também em 2012, 35,2% da madeira de florestas plantadas no país foi destinada para a produção de celulose, sendo que o Brasil é o 3º maior produtor mundial de celulose, e a produção de painéis, serrados e compensados consumiram, respectivamente, 7,1%, 16,4% e 2,7% do total de madeira produzida. Os 38,7% restantes foram destinados à produção de carvão vegetal, lenha e outros produtos florestais (ABRAF, 2013).

No setor econômico, as florestas plantadas são importantes para o desenvolvimento do país, com um saldo de 5,5 bilhões de dólares, sendo os Estados

Unidos, Argentina, Alemanha e China os principais importadores de produtos florestais brasileiros (ABRAF, 2013).

Espécies do gênero *Eucalyptus*, nativas da Austrália, Indonésia, Filipinas e Nova Guiné, são as mais plantadas no mundo e introduzidas no Brasil em 1904 (CHIPPENDALE, 1988; PENFOLD; WILLIS, 1961).

O eucalipto, por ser uma planta exótica, tem preocupado o setor brasileiro, devido à possibilidade de pragas exóticas entrarem no país (DIAS, 2000).

2.2 pragas exóticas do eucalipto

Espécies de *Eucalyptus*, amplamente utilizadas em todas as regiões do mundo, apresentavam poucos problemas com pragas, mas introduções de insetos australianos nas últimas três décadas têm causado danos nesses plantios (PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011).

A produtividade de plantios de eucalipto pode ser reduzida por introduções de pragas exóticas, como as brocas do eucalipto *Phoracantha semipunctata* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Cerambycidae) e *Phoracantha recurva* Newman, 1840 (Coleoptera: Cerambycidae), os gorgulhos-do-eucalipto *Gonipterus platensis* Marelli, 1926 (Coleoptera: Curculionidae) e *Gonipterus pulverulentus* Lea, 1897 (Coleoptera: Curculionidae), o psílideo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore, 1964 (Hemiptera: Psyllidae), a vespa da galha *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle, 2004 (Hymenoptera: Eulophidae) e o percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae), que se disseminaram com danos diretos as plantas e aumento de custos de produção nos principais estados produtores de eucalipto no Brasil (BERTI FILHO; CERIGNONI; SOUZA JÚNIOR, 1995; WILCKEN et al., 2002; ANDRADE, 1928; FENILLI, 1982; WILCKEN et al., 2003; WILCKEN et al., 2008; WILCKEN et al., 2010a).

Phoracantha recurva e *P. semipunctata* são pragas de eucalipto, principalmente fora do habitat natural dessa planta. Na Austrália, seu país de origem, esses insetos tem pouca importância, atacando, apenas, árvores estressadas (danificadas ou recém-abatidas), mas em áreas onde foram introduzidas tem danificado plantas saudáveis (FAO, 2007). *Phoracantha semipunctata* é a principal coleobroca em plantios de eucalipto no Brasil e detectada, pela primeira vez, no país no estado de Rio Grande do Sul em 1956

(BIEZANKO; BOSQ, 1956) e em 1994 em São Paulo em *Eucalyptus citriodora* (BERTI FILHO; CERIGNONI; SOUZA JÚNIOR, 1995). *Phoracantha recurva* foi relatada pela primeira vez em 2001 no estado de São Paulo, porém, através de levantamentos de espécies nas coleções entomológicas da ESALQ/USP e FCA/UNESP foi verificado que essa espécie já havia ocorrido no Estado em 1994 e 1999 (WILCKEN et al., 2002). Não existem recomendações para o controle de *P. semipunctata* e *P. recurva* no Brasil, mas plantas atacadas por esse inseto devem ser cortadas e as toras descascadas no campo (WILCKEN et al., 2002).

O gênero *Gonipterus*, nativo da Austrália e Tasmânia, tem distribuição geográfica extensa com espécies originadas na África, Ásia, América do Norte e do Sul e Europa (MALLY, 1924; EPPO, 2005). *Gonipterus platensis* (*G. scutellatus*) é o principal besouro desfolhador do eucalipto no mundial e esse inseto tem causado danos nas diferentes regiões em foi introduzido (WILCKEN et al., 2008). Esta espécie foi detectada no Brasil pela primeira vez em 1979 no Paraná, em 1982 no estado de Santa Catarina e, após dez anos, esse coleóptero foi registrado em São Paulo (FENILLI, 1982; ROSADO-NETO, 1993). O controle dessa praga com parasitoide de ovos, *Anaphes nitens* Girault, 1928 (Hymenoptera: Mymaridae) e a utilização de *Beauveria bassiana* têm sido as melhores alternativas (WILCKEN et al., 2005; WILCKEN et al., 2008).

Glycaspis brimblecombei, o psílideo de concha, é de origem australiana, e seu nome popular se deve à presença de uma concha de coloração branca que serve de proteção para suas ninfas (HALBERT et al., 2001). Essa espécie foi encontrada pela primeira vez no Brasil em 2003 no Estado de São Paulo e se disseminou nas principais regiões produtoras de eucalipto no país (WILCKEN et al. 2003; SANTANA; BURKHARDT, 2007). Os danos por esse hemíptero se devem a perda da coloração das folhas, indução do aparecimento de fumagina, diminuição da área fotossintética, seca dos ponteiros e atraso no desenvolvimento das plantas (WILCKEN et al., 2003; CARNE; TAYLOR, 1984). O controle químico dessa praga não é recomendado, pois inseticidas de contato são ineficazes contra suas ninfas, protegidas pela concha e os sistêmicos são inviáveis devido ao alto custo. Por isto, *G. brimblecombei* tem sido controlado com a introdução do parasitoide *Psyllaephagus bliteus* Riek (Hymenoptera: Encyrtidae) de origem australiana (FAO, 2012).

A vespa da galha, *L. invasa*, deve ter origem australiana, embora sua distribuição na Austrália tenha sido pouco estudada. Esse inseto encontra-se presente

na África, Ásia, Europa, América do Norte e América Latina, incluindo o Brasil, introduzida em 2007 (MENDEL et al., 2004; FAO, 2012; WYLIE; SPEIGHT, 2012). O manejo de *L. invasa* em áreas comerciais de plantios de eucalipto está direcionado principalmente para o estudo de materiais resistentes e estratégias ligadas ao controle biológico (DITTRICH-SCHRÖDER et al., 2012), uma vez que o controle químico é considerado ineficiente, além de afetar os inimigos naturais (GOWDA et al., 2010). Nesse contexto, as opções de controle mais viáveis para este inseto incluem a seleção de clones de *Eucalyptus* spp. resistentes e o controle biológico com os *Quadrastichus mendeli* Kim & La Salle, 2008 (Hymenoptera: Eulophidae), *Selitrichodes kryceri* Kim & La Salle, 2008 (Hymenoptera: Eulophidae), *Selitrichodes neseri* Kelly & La Salle, 2012 (Hymenoptera: Eulophidae) e espécies dos gêneros *Aprostocetus* e *Megastigmus* (DITTRICH-SCHRÖDER et al., 2012; NYEKO et al., 2010; KIM et al., 2008; DITTRICH-SCHRÖDER et al., 2014; FAO, 2012).

2.2.1 Percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae)

O percevejo bronzeado, *T. peregrinus*, tem causado danos em plantações de eucalipto no Brasil desde 2008 (FAO, 2007; WILCKEN et al., 2010a). A família Thaumastocoridae inclui insetos pequenos fitófagos, com 2 a 4,6 mm (CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006). O gênero *Thaumastocoris*, de origem australiana, tem 14 espécies descritas (NOACK; CASSIS; ROSE, 2011) e *T. peregrinus* é a única espécie desse gênero detectada no Brasil e considerada praga em plantios de eucalipto (WILCKEN, 2010a; WILCKEN, 2011).

2.2.1.1 Distribuição geográfica e hospedeiros

Thaumastocoris peregrinus teve rápida e ampla disseminação mundial, presente no Brasil e em países de diferentes continentes, como na África do Sul (JACOBS e NESER, 2005), Zimbábue, Malaui e Quênia (NADEL et al., 2010; HURLEY et al., 2011), Argentina (NOACK; COVIELLA, 2006; CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006), Uruguai (MARTINEZ; BIANCHINI, 2010), Chile (IDE et al., 2011), Itália (LAUDONIA; SASSO, 2012), Nova Zelândia (SOPOW et al., 2012) e Portugal (GARCIA et al., 2013).

No Brasil, *T. peregrinus* foi relatado em maio de 2008 em São Francisco de Assis, estado do Rio Grande do Sul e um mês após sua presença foi confirmada em Jaguariúna, estado de São Paulo (WILCKEN, 2010a).

O percevejo bronzeado, após sua primeira detecção, se disseminou rapidamente e encontra-se estabelecido em Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Bahia, Maranhão, Goiás e Piauí (BARBOSA et al., 2010; WILCKEN et al., 2010a; SAVARIS et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; Comunicação pessoal Soliman, 2014).

O modo de introdução de *T. peregrinus* no Brasil não foi comprovado, mas isto pode ter ocorrido através de sua disseminação naturalmente pelas fronteiras dos países vizinhos. No estado de São Paulo, o percevejo bronzeado pode ter chegado por avião, pois foi encontrado próximo aos aeroportos internacionais de Viracopos, em Campinas e Guarulhos, em São Paulo (WILCKEN et al., 2010a).

Thaumastocoris peregrinus tem como hospedeiros em nível mundial árvores de *Eucalyptus globulus*, *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. viminalis*, *E. nicholli*, *E. scoparia*, *E. benthamii*, *E. maidenii*, *E. botryoides*, *E. dorrigoensis*, *E. paniculata*, *E. saligna*, *E. smithii*, *E. syderoxylon*, *E. tereticornis*, *E. grandis* x *camaldulensis* e *E. grandis* x *urophylla* (CARPINTERO; DELLAPÉ 2006; BUTTON, 2007; FAO, 2007; MARTINEZ-CROSA, 2008; JACOBS; NESER 2005; NOACK; COVIELLA 2006).

2.2.1.2 Características do inseto

O percevejo bronzeado é um inseto sugador, de corpo achatado dorsoventralmente com comprimento de, aproximadamente, 3 mm. Seus adultos possuem coloração marrom com áreas mais escuras e genitália assimétrica para o macho (CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006). *T. peregrinus* pode ser distinguido pela morfologia do pronoto, com um turbéculo em ângulos anterolateral do lobo anterior, característica que corrigiu o fato de ter sido classificado como *T. australicus* na África do Sul (CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006).

As ninfas desse inseto apresentam cinco instares, com período de desenvolvimento em torno de 20 dias em temperaturas entre 17 a 20°C (NOACK; ROSE, 2007). A longevidade é de 35 dias, mas, dependem da espécie e dos clones de eucalipto

nos quais esse inseto se alimenta (SOLIMAN et al., 2012). O macho possui reprodução sexuada, com suas fêmeas ovipositando em média 60 ovos (MARTINEZ; BIANCHINI, 2010). Entretanto, no Brasil já houve relatos de até 75 ovos por fêmea em algumas espécies de *Eucalyptus* (SOLIMAN et al., 2012).

Ovos dessa espécie apresentam cor preta e, normalmente, podem ser encontrados agrupados nas folhas, caules ou frutos, em manchas escuras, o que pode auxiliar o reconhecimento das plantas infestadas (JACOBS; NESSER, 2005; CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006). No Brasil, *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* foram as espécies mais adequadas para a biologia de *T. peregrinus* (SOLIMAN et al., 2012).

2.2.1.3 Danos e controle

Os danos pelo percevejo bronzeado são relacionados ao seu hábito alimentar, que ocorre preferencialmente na face abaxial das folhas, perfurando e introduzindo os estiletes nas regiões próximas aos feixes de vasos condutores para sugar a seiva e o conteúdo celular, podendo danificar o parênquima lacunoso (BUTTON, 2007; WILCKEN et al, 2008; WILCKEN et al., 2010a; MOIO et al., 2014). Os sintomas apresentados pelas plantas são o prateamento, bronzeamento, queda das folhas e morte da planta em casos severos (Figura 1) (WILCKEN et al., 2010a; JACOBS; NESER, 2005; FAO, 2007).

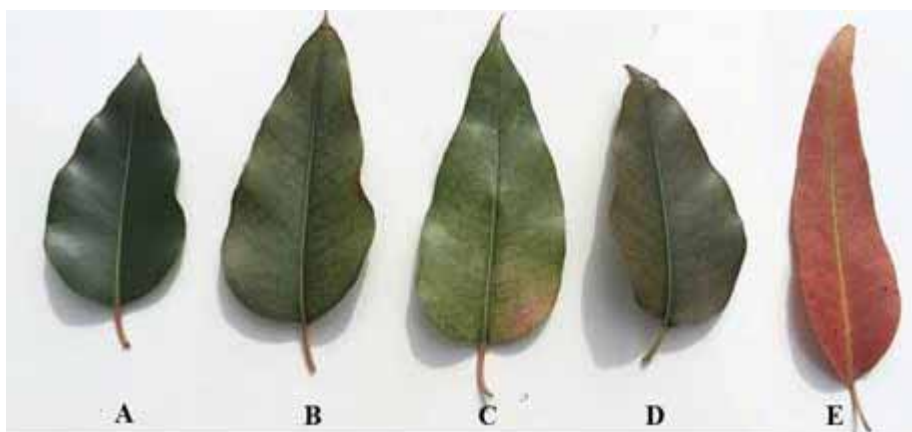


Figura 1. Escala de danos causados pela alimentação de *Thaumatoecoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em folhas de *Eucalyptus* sp. (A- folha sadia; B- início do prateamento; C- aumento do prateamento e sinais de bronzeamento; D- início do bronzeamento; E- folha bronzeada).

Métodos de controle de *T. peregrinus* estão, ainda em desenvolvimento (MUTITU et al., 2013), mas a prevenção e o controle de suas infestações em estágios iniciais é a solução mais eficaz (SUMA; NUCIFORA; BELLA, 2014).

O inseticida sistêmico imidacloprid, injetado no tronco das árvores, é eficaz para o controle do percevejo bronzeado na Austrália, porém, trata-se de um método é inviável em grandes plantios florestais (NOACK et al., 2009).

A falta defensivos químicos registrados e as exigências da certificação do Conselho de Manejo Florestal (Forestry Stewardship Council – FSC) aumentam as limitações do controle químico do percevejo bronzeado (NADEL; NOACK, 2012).

A resistência de plantas apresenta reduzidas chances de uso no manejo de *T. peregrinus*, pois esse inseto pode se alimentar de uma grande variedade de espécies de eucalipto e essa tecnologia demanda longo período de estudos (NOACK; CASSIS; ROSE, 2011).

Não existem métodos eficazes, mas as pesquisas tem avançado no controle biológico do percevejo bronzeado, com os parasitoides de ovos *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae) e *Stethynium* sp. (Hymenoptera: Mymaridae) da Austrália, sendo *C. noackae* o de maior interesse (LIN et al., 2007; MUTITU et al., 2013).

A eficiência de *C. noackae* em controlar *T. peregrinus* tem sido mostrada em diferentes países como a África do Sul, Brasil e Chile (TREE PROTECTION CO-OPERATIVE PROGRAMME, 2008; TREE PROTECTION CO-OPERATIVE PROGRAMME, 2010; VIVEIRO FLORESTAL, 2010; VIVEAGRO, 2010).

No Brasil, inimigos naturais generalistas, como *Chrysoperla externa* Hagen, 1861 (Neuroptera: Chrysopidae), *Atopozelus opsimus* Elkins, 1954 (Hemiptera: Reduviidae) e *Supputius cincticeps* Stal, 1860 (Heteroptera: Pentatomidae) predam o percevejo bronzeado e fungos entomopatogênicos infectam ninfas e adultos de *T. peregrinus* no campo (WILCKEN et al., 2010b; LORENCETTI et al., 2011; MASCARIN et al., 2012; SAN ROMAN et al., 2012; SOUZA et al., 2012; SOLIMAN, 2014).

2.3 Fungos entomopatogênicos no controle de pragas do eucalipto

Fungos são patógenos de largo espectro e capazes de atingir desde insetos aquáticos a fitófagos infectando diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros (ALVES, 1998).

O controle microbiano de pragas com fungos entomopatogênicos tem sido feito, principalmente, com aqueles da subdivisão Deuteromycotina: Hyphomycetes, tais como os gêneros: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Laecanicillium*, *Nomurae*, *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Sorospora*, *Tolypocladium* e *Sporothrix* (ALVES, 1998).

No setor florestal, o controle microbiano com fungos entomopatogênicos tem sido utilizado contra pragas exóticas, com estudos de espécies entomopatogênicas de epizootias e produtos comerciais à base de fungos, como para controle de *G. scutellatus*, *G. brimblecombei* e *T. peregrinus*, com resultados satisfatórios (DAL POGETTO et al., 2011; BERTI-FILHO et al., 1992; SAN ROMAN, 2012; SOLIMAN, 2014).

O fungo *B. bassiana* é o único produto registrado para o controle de *G. scutellatus* (AGROFIT, 2014), entretanto, os fungos *B. bassiana* e *Aspergillus* sp. foram encontrados em adultos de *G. scutellatus* no município de Itararé, São Paulo (BERTI-FILHO et al., 1992). O produto comercial Boveril®, à base de *B. bassiana* (cepa B103) teve 100% de eficiência em laboratório contra *G. scutellatus* quando pulverizado ou polvilhado (WILCKEN et al., 2005).

Ninfas de *G. brimblecombei* apresentaram alta suscetibilidade a produtos comerciais à base de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Lecanicillium longisporum* e, portanto, o controle microbiano com fungos entomopatogênicos formulados pode ser uma alternativa para o controle desse inseto (DAL POGETTO et al., 2011).

Zoophtora radicans foi relatada no Brasil, em 2009, infectando naturalmente, ninfas e adultos de *T. peregrinus* com até 100% de mortalidade, sendo que, a umidade relativa de, até 82%, favoreceu estes níveis de mortalidade (MASCARIN et al., 2012). A relação fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta e da nutrição e de suscetibilidade do hospedeiro (ALVES, 1998). Entretanto, focos problemáticos de insetos pragas muitas vezes ocorrem em climas quentes, tais como aqueles comumente encontrados na América do Sul, África,

Austrália, China, México e nos Estados Unidos (FARIA; WRAIGHT, 2007). Supõe-se que, geralmente, é improvável a infecção de insetos por fungos em temperaturas acima do limiar de crescimento do microrganismo e em baixas umidades; mas, desde que o fungo não é morto em tais condições, a infecção e desenvolvimento da doença podem ocorrer em períodos mais frescos do dia (RANGEL et al., 2010). Sendo assim, é possível determinar estirpes com predisposição para sobreviver potencialmente em campo sob altas temperaturas (KEYSER et al., 2014).

No Brasil, em 2012, fungos entomopatogênicos dos gêneros *Fusarium* e *Paecilomyces* foram relatados sobre indivíduos de *T. peregrinus* em uma epizootia em campo, quando *F. proliferatum* e *P. cateniannulatus* foram identificados. Isto mostra a possibilidade de se controlar o percevejo bronzeado com organismos que ocorrem naturalmente no país (SAN ROMAN et al., 2012).

O gênero *Fusarium* compreende um grande grupo de espécies de fungos filamentosos distribuídos no solo e associados com plantas, porém, esse gênero tem espécies patogênicas e não patogênicas para plantas (LESLIE; SUMMERELL, 2006; KURUVILLA; JACOB, 1979a; 1979b; 1980). Esse gênero é de grande importância para o controle de pragas, por ter ampla gama de insetos hospedeiros, incluindo espécies de Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera e Lepidoptera (TEETOR-BARSCH; ROBERTS, 1983; HUMBER, 1992).

Espécies de *Fusarium* spp. são promissores para o controle biológico de insetos, por serem de fácil cultivo e produção massal, bastante específicos e considerados patógenos facultativos com excelente sobrevivência no campo (ARANTES; CORREIA, 1999).

Em 2014, cadáveres de *T. peregrinus* foram encontrados aderidos a folhas de eucalipto em Araraquara/SP, caracterizando uma epizootia. O reisolamento dos fungos permitiu a identificação de *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp., *Nigospora* sp., *Davidiella tassiana*, *Cladosporium* sp. e *Aspergillus* sp., os últimos gêneros com relatos de patogenicidade a insetos (SOLIMAN, 2014).

Fungos apresentam mais vantagens que outros grupos de inimigos naturais, como a forma de infecção por via oral, traqueal ou pelo tegumento, grande variabilidade genética e a permanência no ambiente e, por isso, considerados promissores no controle de pragas (ALVES, 1998).

2.4. Compatibilidade de microrganismos a produtos químicos

O manejo integrado de pragas visa otimizar o controle dos indivíduos que causam danos nas culturas pelo uso de múltiplas táticas garantindo resultados favoráveis em termos econômicos, ecológicos e sociais (LUCKMANN; METCALF, 1994; PROKOPY; KOGAN, 2009). Entretanto, as táticas empregadas para a proteção de plantas devem ser selecionadas em função das características do sistema de cultivo e das exigências do mercado consumidor (ZALAF et al., 2008).

Dentro do contexto do manejo integrado de pragas, os microrganismos e outros agentes de controle biológico podem atingir o seu maior potencial de ação quando associados a produtos compatíveis, como agrotóxicos ou fertilizantes (ZALAF et al., 2008).

Os defensivos agrícolas exercem um importante papel na agricultura, pois previnem perdas de produtividade devido ao ataque de alguns organismos como insetos praga, fungos, dentre outros (FERMAM; ANTUNES, 2009). Porém, pressões de grupos ambientalistas, da comunidade científica e de partes da sociedade levaram a uma mudança de paradigma, para modelos menos agressivos, aos conceitos de manejo integrado de pragas e de agricultura sustentável (NARDO; MORAES; SÁ, 1998).

Dependendo do produto químico utilizado, podem ser observados efeitos deletérios sobre os fungos entomopatogênicos, como, inibição do crescimento vegetativo, reprodução, germinação, diminuição da virulência e mutações do patógeno (ALVES et al., 1998; ZALAF et al., 2008).

Entretanto, no setor florestal o uso de fungicidas para controlar doenças é necessário e legalizado pelo Ministério da Agricultura, pois, doenças como a ferrugem do eucalipto chegam a causar perdas de até 30% e representa uma das principais causas de danos e prejuízos em plantios de eucalipto no Brasil (FERREIRA, 1989; ALFENAS et al., 2009; FURTADO, et al., 2009; AGROFIT, 2014). *Puccinia psidii*, agente etiológico da ferrugem do eucalipto, é um fitopatógeno causador de uma doença foliar em espécies arbóreas da família Myrtaceae, e seu controle é recomendado com os fungicidas à base de Azoxistrobina + Ciproconazol e Trifloxistrobina + Tebuconazol (FERREIRA; MILANI, 2002; AGROFIT, 2014).

Além da ferrugem, a cultura do eucalipto também sofre com a ocorrência de *Cylindrocladium candelabrum* que frequentemente causa doenças em

viveiros no Brasil (ALFENAS et al., 2009). Entretanto, *E. benthamii*, espécie florestal plantada na região Sul do Brasil devido à sua resistência à geada, tem como principal doença de campo a mancha foliar causada por *C. candelabrum*, que pode restringir seu plantio nessa região (SCHULTZ, 2010). E para o controle dessa doença recomenda-se o uso de fungicida à base de Piraclostrobina (AGROFIT, 2014).

Testes de seletividade e compatibilidade são importantes e necessários, quando o assunto é controle biológico. Pois, os testes *in vitro* de produtos químicos com os microrganismos expõem os agentes de controle a todos os possíveis efeitos negativos ou positivos que possam sofrer quando aplicados em associação; auxiliando então na escolha de agroquímicos pouco prejudiciais à atuação dos patógenos (ZALAF et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Informações gerais do estudo

3.1.1 Local de desenvolvimento do trabalho

O estudo foi realizado no Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais e no Laboratório de Patologia Florestal da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu (FCA/UNESP).

3.1.2 Criação de *Thaumastocoris peregrinus*

Adultos de *T. peregrinus* foram coletados em áreas de plantio de eucalipto da FCA/UNESP, de árvores clonais de *Eucalyptus saligna* com 5 anos de idade e transferidos para o Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais para a criação (Figura 2), que consistiu em “buquês” com ramos de *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* coletados em árvores com 2 anos de idade em erlenmeyers com água e acondicionados em gaiolas plásticas de 32 cm de altura x 30 cm de largura x 48 cm de comprimento com a abertura superior vedada com “voil” para aeração.

Folhas de eucalipto com posturas de *T. peregrinus* foram recortadas, esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,2 % por 5 min., lavadas em água destilada e acondicionadas sobre discos foliares de eucalipto em placas de Petri (11 cm de diâmetro x 2 cm de altura) com papel de filtro umedecido. Após a eclosão das ninfas, os discos foliares eram mantidos por dois dias em novos ramos de eucaliptos para facilitar a transferência das ninfas para as folhas. A criação ocorreu em sala climatizada a $25,0 \pm 2$ °C, umidade relativa de $60,0 \pm 10$ % e fotofase de 12 h (BARDDAL, 2009).



Figura 2. Adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em folhas de *Eucalyptus* sp. em sistema de criação em laboratório.

3.2 Isolamento e caracterização dos isolados

3.2.1 Obtenção dos isolados

Para os bioensaios utilizaram-se nove isolados de fungos entomopatogênicos do gênero *Fusarium* obtidos da coleção da FCA/UNESP (Tabela 1). Os isolados estavam acondicionados há dois anos em frascos de vidros lacrados com um disco de cada fungo em meio BDA (colônias monospóricas) e água destilada e autoclavada, ou seja, conservação em método de Castellani.

Os isolados dos fungos foram obtidos em novembro de 2011, nos plantios de eucalipto, na região de Alegrete, Rio Grande do Sul. *T. peregrinus* oriundos epizootias e com presença de micélio no corpo foram coletados na copa das árvores, sendo esta característica utilizada na escolha das amostras. Os insetos mortos eram acondicionados em câmara úmida para esporulação dos fungos nos corpos de ninfas e adultos. Após 24 horas, realizou-se a desinfecção do material coletado com hipoclorito de sódio, álcool 70% e água esterilizada e após isso acondicionou-os em placas de Petri com

meio água-ágar para isolamento do fungo. As colônias obtidas sofreram no máximo 2 repicagens em meio BDA (batata-dextrose-ágar) e após isso, preservou-as em método de Castellani.

Tabela 1. Isolados oriundos de epizootia em campo nas populações de *Thaumastocoris peregrinus* (*T. peregrinus*)

Isolado	Hospedeiro	Coletor	Local	Data
ISO-DPV-LCBPF001	<i>T. peregrinus</i>	C. F. Wilcken	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF002	<i>T. peregrinus</i>	C. F. Wilcken	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF003	<i>T. peregrinus</i>	C. F. Wilcken	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF004	<i>T. peregrinus</i>	C. F. Wilcken	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF005	<i>T. peregrinus</i>	C. F. Wilcken	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF006	<i>T. peregrinus</i>	C. F. Wilcken	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF007	<i>T. peregrinus</i>	C. F. Wilcken	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF008	<i>T. peregrinus</i>	C. F. Wilcken	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF009	<i>T. peregrinus</i>	C. F. Wilcken	Alegrete, RS	Nov/2011

Para reativação da virulência e garantia da viabilidade do fungo os isolados eram colocados em meio BDA para crescimento e as colônias obtidas repicadas também em meio BDA. Após isso, ocorreram pulverizações desses isolados em insetos adultos de *T. peregrinus* em boas condições sanitárias da criação em laboratório. Utilizou-se torre de Potter para a pulverização dos isolados na concentração 1×10^8 esporos/mL (diluído com água destilada autoclavada) à pressão de 15 lb/pol². Uma folha de *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* desinfestada em cada placa de Petri compôs a alimentação dos insetos.

Após a pulverização dos isolados sobre *T. peregrinus*, as placas permaneceram em câmara tipo BOD com temperatura de 25°C e fotofase de 12 horas para a inoculação. Realizou-se avaliações diárias e os insetos os mortos eram retirados e colocados em câmara úmida (algodão estéril umedecido com água destilada e esterelizada) para reisolamento dos fungos e a estruturas fúngicas transferidas para meio BDA para crescimento da colônia e identificação do fungo.

3.2.2 Obtenção de isolados monospóricos

As colônias obtidas dos isolamentos passaram por lavagens com água destilada e esterilizada e as concentrações das suspensões de esporos padronizadas para aproximadamente 10^2 esporos/mL para a obtenção de culturas monospóricas. Um total de 100 µl da suspensão de esporos foram colocados por placa com meio água/ágar acrescido de 0,005% de oxitetraciclina. Os esporos eram individualizados e transferidos com alfinete entomológico para meio BDA para formação das colônias com auxílio de um microscópio óptico.

3.2.3 Caracterização molecular dos isolados

Extraíu-se o DNA dos isolados conforme o método desenvolvido por Murray e Thompson (1980), modificado. Macerados de três discos de micélio com 1000 µL de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2 % CTAB; 0,2 % β-mercaptoetanol) foram colocados por tubo de microcentrífuga de 1,5 mL., incubados a 65°C por 30 minutos. A seguir, adicionou-se 500 µL de solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v) em cada tubo misturado manualmente, por agitação, durante 10 minutos e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi removida para novos tubos com isopropanol. Centrifugou-se a mistura por 15 minutos a 12.000 rpm e o “pellet” obtido foi lavado com 500 µL de etanol 70% e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µL de água com DEPC (Dietilpirocarbonato).

Os fungos foram identificados e analisados baseado em uma região do DNA. Isto foi feito com oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região ITS-5.8S rDNA foram os seguintes: ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'). O DNA dos isolados obteve sequenciamento no Centro de Genoma da USP e estas sequências utilizadas para análise de variabilidade genética dos fungos.

3.2.4 Caracterização biológica das culturas dos isolados

A caracterização biológica dos nove isolados foi baseada na velocidade de crescimento micelial, cor da colônia e estruturas produzidas em meio de cultura BDA. Discos de micélio com 6 mm de diâmetro obtidos das bordas de uma colônia cultivada em meio de cultura BDA eram transferidos para o centro de novas placas de Petri com o mesmo meio. Após a repicagem, os isolados permaneceram incubados à temperatura de $25\pm1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 h em câmara tipo BOD. O diâmetro perpendicular das colônias foi obtido diariamente, com régua milimétrica (Figura 3), quando a velocidade de crescimento micelial era avaliada. O delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, tendo cada parcela uma placa.



Figura 3. Metodologia para caracterização biológica dos isolados. Mensuração dos diâmetros das colônias com régua milimétrica.

3.2.4 Caracterização morfológica dos isolados

Avaliou-se o tamanho e os tipos de esporos dos isolados em lâminas semi-permanentes com lactofenol utilizando-se sistema de vídeo-câmara Opton, modelo TA-0124XS em microscópio óptico. A imagem foi transmitida para computador e analisada com o programa EDN-2. Sendo utilizada uma lâmina micrografada (Carl Zeiss®) para calibração do equipamento. Para cada isolado mediu-se o comprimento e a

largura de cinquenta esporos, sendo a média das dimensões utilizadas para a comparação com as descrições científicas.

3.3 Controle microbiano de *Thaumastocoris peregrinus*

3.3.1 Teste de patogenicidade em *Thaumastocoris peregrinus*

Os bioensaios para os testes de patogenicidade foram feitos com insetos adultos de *T. peregrinus* em boas condições sanitárias da criação em laboratório. Cada parcela experimental correspondeu a uma placa de Petri (6 cm de diâmetro) com a tampa vazada (2 cm de diâmetro) e fechada com tecido *voil* para impedir a saída dos insetos e permitir trocas gasosas. Uma camada de gel agrícola, na proporção de 1g de gel para 400 ml de água, foi colocada sob cada folha de *E. urophylla* var. *platyphylla* para evitar o ressecamento, as folhas mediam cerca de 16,5 cm² e sobre elas eram colocados 10 adultos de *T. peregrinus* por placa em delineamento inteiramente casualizado com três repetições (Figura 4 – A e B). Os nove isolados dos fungos (Tabela 2) foram pulverizados em torre de Potter na concentração 1×10^8 esporos/mL (diluído com água destilada autoclavada) (LAZO, 2012) à pressão de 15 lb/pol² (Figura 4 – D). A testemunha, teve, somente, água destilada autoclavada pulverizada.

Após inoculação, as parcelas foram colocadas em câmara tipo BOD a temperatura de 25°C±1°C e fotofase de 12 horas (Figura 4 – C). Avaliações diárias foram realizadas, quando os insetos mortos foram retirados e contados. Os insetos mortos foram colocados em câmara úmida (placa de Petri contendo um algodão estéril umedecido com água destilada e esterelizada), após 24 horas eram transferidos para uma placa de Petri contendo meio ágar e após o crescimento do fungo os micélios eram transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA, esse reisolamento dos fungos visava a confirmação da mortalidade causada pelos isolados. Os fungos com elevada taxa de virulência foram selecionados para os testes seguintes.

Os dados de mortalidade foram submetidos análise de variância fatorial e as médias comparadas entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,01$) ou ($p \leq 0,05$) com auxílio do software SISVAR 4.6 e foram também corrigidas pela fórmula de Abbott (1925).

Para a análise estatística dos dados da mortalidade acumulada os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. Na mortalidade corrigida os dados foram transformados em $\text{ARCSEN} \sqrt{\frac{x}{100}}$.

Tabela 2. Isolados utilizados na pulverização em *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) por local (Local) e data (Data) de aplicação

Isolados	Espécies	Concentração	Local	Data
ISO-DPV-LCBPF001	<i>Fusarium proliferatum</i>	1×10^8 esporos/mL	UNESP/FCA	Ago/2013
ISO-DPV-LCBPF002	<i>Fusarium proliferatum</i>	1×10^8 esporos/mL	UNESP/FCA	Ago/2013
ISO-DPV-LCBPF003	<i>Fusarium proliferatum</i>	1×10^8 esporos/mL	UNESP/FCA	Ago/2013
ISO-DPV-LCBPF004	<i>Fusarium proliferatum</i>	1×10^8 esporos/mL	UNESP/FCA	Ago/2013
ISO-DPV-LCBPF005	<i>Fusarium proliferatum</i>	1×10^8 esporos/mL	UNESP/FCA	Ago/2013
ISO-DPV-LCBPF006	<i>Fusarium proliferatum</i>	1×10^8 esporos/mL	UNESP/FCA	Ago/2013
ISO-DPV-LCBPF007	<i>Fusarium proliferatum</i>	1×10^8 esporos/mL	UNESP/FCA	Ago/2013
ISO-DPV-LCBPF008	<i>Fusarium tricinctum</i>	1×10^8 esporos/mL	UNESP/FCA	Ago/2013
ISO-DPV-LCBPF009	<i>Fusarium equiseti</i>	1×10^8 esporos/mL	UNESP/FCA	Ago/2013

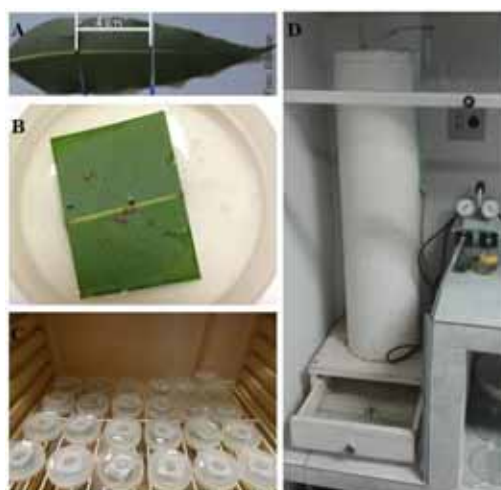


Figura 4. Metodologia para estudar a patogenicidade dos isolados aos adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). A- Detalhe da folha de *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* recortada. B- Placa de Petri com gel agrícola diluído sob a folha de *Eucalyptus urophylla* var. *platyphylla* e adultos do percevejo bronzeado. C- Parcelas experimentais em câmara tipo BOD, com temperatura de 25 °C e fotofase de 12 horas. D- Torre de Potter.

3.3.2 Colonização de *Fusarium proliferatum* e *Fusarium equiseti* no corpo de *Thaumastocoris peregrinus*

Complementou-se o estudo de patogenicidade por meio da avaliação da colonização do corpo do inseto pelos fungos selecionados (Tabela 3). Os dois isolados de espécies diferentes utilizados nesse experimento foram aqueles com maior capacidade de causar mortalidade dos insetos em um menor espaço de tempo. Uma suspensão com 1×10^7 esporos/mL dos isolados foi pulverizada diretamente sobre os insetos vivos e água destilada autoclavada na testemunha. Cada tratamento era composto por 10 insetos.

Os insetos tratados foram coletados em intervalos de tempo pré-determinados (24, 48, 72 e 96 horas) e fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, pH 7,2) (Figura 5), por período mínimo de 24 h. após a inoculação conforme metodologia do teste de patogenicidade.

As amostras com insetos inoculados foram retiradas do fixador Karnovsky, submetidas ao vapor de OsO_4 por 24 h. e colocadas em sílica gel para completar a secagem durante duas horas. À seguir, as amostras foram montadas em “stubs” com fita de carbono dupla face para aderência e cobertas com 20 nm de ouro em aparelho Baltec SCD 050.

As análises microscópicas foram preparadas e observadas no Centro de Microscopia Eletrônica, localizado na ESALQ/USP.

Tabela 3. Isolados pulverizados em *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) para estudo da colonização do fungo no hospedeiro

Isolados	Espécies	Concentração	Local da Aplicação	Data da Aplicação
ISO-DPV-LCBPF006	<i>Fusarium proliferatum</i>	1×10^7 esporos/mL	UNESP/FCA	Jul/2014
ISO-DPV-LCBPF009	<i>Fusarium equiseti</i>	1×10^7 esporos/mL	UNESP/FCA	Jul/2014



Figura 5. Ependorfs com amostras de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) após 24, 48, 72 e 96 horas da inoculação dos isolados e fixadas em solução de Karnovsky.

3.4 Aspectos de compatibilidade

3.4.1 Compatibilidade de *Fusarium proliferatum* e *Fusarium equiseti* a fungicidas

A compatibilidade dos fungos entomopatogênicos foi avaliada com a incorporação dos fungicidas ao meio de cultura (adaptada de CALDARI JÚNIOR, 1998) nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 ppm dos fungicidas foram adicionadas diretamente no meio de cultura. Os fungicidas testados foram: Azoxistrobina + Ciproconazol (Priori Xtra®), Trifloxistrobina + Tebuconazol (Nativo®) e Piraclostrobina (Comet®).

Discos de micélio, com 5 mm de diâmetro, obtidos das bordas de colônias de ISO-DPV-LCBPF006 (*F. proliferatum*) e ISO-DPV-LCBPF009 (*F. equiseti*) cultivadas em meio BDA por uma semana, foram transferidos para o centro das placas com meio de cultura e fungicida. Estas colônias permaneceram incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 12 horas. As avaliações diárias ocorreram até o primeiro contato de uma das colônias com a borda da placa, através da mensuração de diâmetros perpendiculares de cada uma. Além disso, a produção dos conídios foi avaliada através da contagem dos mesmos (Figura 6).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo cada parcela uma placa de petri. Os dados de crescimento da colônia em meio BDA com os fungicidas incorporados foram submetidos à análise de variância fatorial e as médias comparadas si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,01$) com o software SISVAR 4.6.

O fator de compatibilidade dos fungicidas foi definido com a fórmula de Alves, Moino e Almeida (1998): $T = [(20 \times (CV) + 80 \times (ESP))/100]$, onde: T - valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para a classificação do produto; CV - porcentagem de crescimento vegetativo em relação à testemunha; e ESP - porcentagem de esporulação em relação à testemunha. Os valores calculados de “T” foram comparados com os seguintes limites estabelecidos: 0-30 = muito tóxico, ou, altamente tóxico (AT); 31-45 = tóxico (T); 46-60 = moderadamente tóxico (MT); e > 60 = compatível (C).

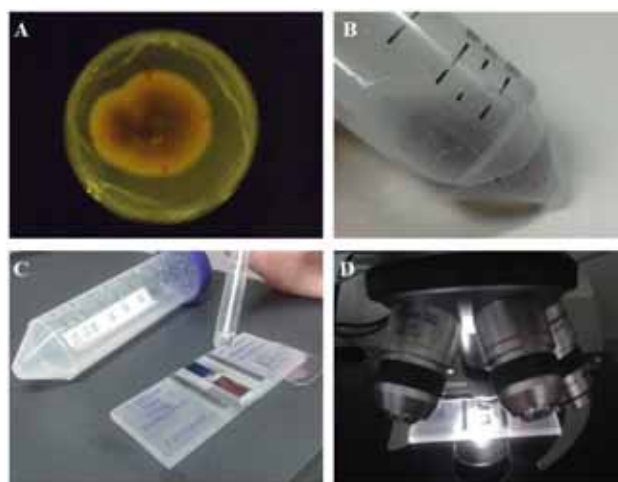


Figura 6. Metodologia para estudar a compatibilidade de *Fusarium proliferatum* e *Fusarium equiseti* com os fungicidas a base de Azoxistrobina + Ciproconazol (Priori Xtra), Trifloxistrobina + Tebuconazol (Nativo) e Piraclostrobin (Comet). A- Placa de Petri com crescimento micelial da colônia de ISO-DPV-LCBPF006 em meio BDA contendo Azoxistrobina + Ciproconazol a 1ppm; B- Tubo contendo esporos lavados de cada placa com 10 ml de água destilada; C- Preparação do hemacitômetro (Câmara de Neubauer) para contagem de esporos e D- Contagem dos esporos produzidos em Câmara de Neubauer.

3.4.2 Análise da fitopatogenicidade de *Fusarium proliferatum* e *Fusarium equiseti* em diferentes culturas de importância econômica

A fitopatogenicidade dos isolados ISO-DPV-LCBPF006 e ISO-DPV-LCBPF009 de *F. proliferatum* e *F. equiseti*, respectivamente, foi avaliada em casa de vegetação em temperatura média de 25°C para o tomateiro *Lycopersicon esculentum* cultivar Santa Cruz Kada Gigante, cana de açúcar *Saccharum officinarum* variedade RB 96 6928 e mudas clonais de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* clone H-13 plantadas em solo autoclavado. Esses isolados foram utilizados nas concentrações de 1×10^7

esporo/ml com 25 ml em cada repetição. As inoculações foram realizadas via raiz e foliar com cinco repetições (plantas) em delineamento experimental inteiramente casualizado. Uma ferida foi aberta com tesoura na raiz e uma suspensão de esporos dos isolados adicionada ao solo. A inoculação via foliar foi realizada por aspersão da suspensão de esporos nas folhas da planta que permaneceram em câmara úmida por 24 horas (Figura 7). A testemunha teve, apenas, água esterilizada. Sintomas que se assemelhassem com os causados por doenças de *Fusarium* spp. foram observados, diariamente, por 30 dias, nas plantas.



Figura 7. Metodologia para estudar a fitopatogenicidade de *Fusarium proliferatum* e *Fusarium equiseti* em diferentes culturas de importância econômica. A- Plantas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada Gigante com inoculação de suspensão de *F. equiseti* via raiz; B- Plantas de eucalipto clone H-13 com inoculação de suspensão de *F. proliferatum* via raiz; C- Planta de cana de açúcar var. RB 96 6928 com inoculação de suspensão de *F. equiseti* via raiz; D- Plantas de tomateiro cultivar Santa Cruz Kada Gigante com inoculação de suspensão de *F. equiseti* via foliar em câmara úmida; E- Plantas de eucalipto clone H-13 com inoculação de suspensão de *F. equiseti* via foliar em câmara úmida; F- Plantas de cana de açúcar var. RB 96 6928 com inoculação de suspensão de *F. proliferatum* via foliar em câmara úmida; G- Experimento sobre mesa suspensa em casa de vegetação e H- Vista externa da casa de vegetação UNESP/FCA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e caracterização dos isolados

4.1.1 Caracterização molecular dos isolados

O sequenciamento do ITS-5.8S rDNA permitiu a identificação dos fungos, sendo três espécies do gênero *Fusarium*, coletados em epizootia em campo (Tabela 4). Epizootias em populações de insetos representam um fenômeno natural com vários fatores interagindo, principalmente as características do inseto hospedeiro, patógeno e ambiente (TANADA, 1963; CARRUTHERS et al., 1991). Espécies de *Fusarium* já foram relatadas no Brasil de forma enzoótica em Hymenoptera e Coleoptera e epizoótica em Hemiptera (ROBERTS, 1962; ALVES, 1992). O gênero *Fusarium* é abundante na natureza e associado com plantas e animais, principalmente com insetos (TEETOR-BARSCH; ROBERTS, 1983). Espécies desse gênero constituem um importante grupo de fungos deuteromicetos, como *F. proliferatum*, *F. equiseti* e *F. tricinctum* cuja fases sexuadas são conhecidas por *Gibberella intermedia*, *Gibberella intricans* e *Gibberella tricincta*, respectivamente (GUPTA et al., 1991; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O maior número de isolados que causaram a morte de *T. peregrinus* foram identificados como *F. proliferatum*. Apesar, dessa espécie ser mais relacionada a

doenças de plantas, como ocorre na cultura do milho, onde causa a deterioração de sementes, morte e tombamento de plântula, podridão de radículas, de colmo, da espiga e dos grãos (SOUZA et al., 2007), neste caso está relacionado a mortalidade de *T. peregrinus* (SAN ROMAN et al., 2012). A variabilidade genética natural entre isolados de uma mesma espécie de fungo entomopatogênicos é bastante conhecida e relatada (TANZINI; ALVES; SETTEN, 2002), explicando o fato dessa espécie ser fitopatogênica para alguns isolados e entomopatogênica para outros. Espécies de *Fusarium* podem causar alta ou moderada mortalidade dos hemípteros *Orthezia praelonga* Douglas, 1891 (Hemiptera, Ortheziidae) e *Nilaparvata lugens* Stal, 1854 (Hemiptera: Delphacidae). (MORQUER; NYSTERAKIS, 1944; GONCALES, 1964; KURUVILLA; JACOB, 1979a; KURUVILLA; JACOB, 1980). Além disso, podem se comportarem como saprófitas, colonizando hospedeiros facultativos como Lepidoptera e Coleoptera (TREMBLAY, 1968; MOORE, 1970; MOORE, 1973; NAYAK; SRIVASTAVA, 1978; TEETOR-BARSCH; ROBERTS, 1983; DRAGANOVA et al., 2013).

Tabela 4. Levantamento de espécies de fungos entomopatogênicos isolados de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) (*T. peregrinus*) encontradas no Estado do Rio Grande do Sul.

Isolados	Espécies	Hospedeiros	Local	Data Coleta
ISO-DPV-LCBPF001	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>T. peregrinus</i>	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF002	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>T. peregrinus</i>	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF003	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>T. peregrinus</i>	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF004	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>T. peregrinus</i>	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF005	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>T. peregrinus</i>	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF006	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>T. peregrinus</i>	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF007	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>T. peregrinus</i>	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF008	<i>Fusarium tricinctum</i>	<i>T. peregrinus</i>	Alegrete, RS	Nov/2011
ISO-DPV-LCBPF009	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>T. peregrinus</i>	Alegrete, RS	Nov/2011

4.1.2 Caracterização biológica e morfológica dos isolados

4.1.2.1 *Fusarium proliferatum*

Sete isolados de *F. proliferatum* na temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ apresentaram crescimento micelial médio de 9,6 mm/dia tocando a borda da placa no sétimo dia. A velocidade de crescimento diário para colônias de *F. proliferatum* durante três dias a 25°C e 30°C foi de, de respectivamente, 10 mm/dia e 9,5 mm/dia (BURGESS et al. 1994, LAZO, 2012). Essa espécie apresentou grande variação de cores em suas colônias, como branca, amarela, roxa e violeta (Figura 9 - A1, A2; B1, B2; C1, C2; D1, D2; E1, E2; G1, G2; I1, I2). Essas colônias apresentaram macroesporos com comprimento de 7 μm e largura de 2,1 μm (Tabela 5) e três ou quatro septos. Isto confirma o descrito para 70 espécies do gênero *Fusarium* (LESLIE; SUMMEREL, 2006).

4.1.2.2 *Fusarium tricinctum*

O isolado de *F. tricinctum* na temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ teve crescimento micelial médio de 10,1 mm/dia tocando a borda da placa no sétimo dia. O crescimento micelial diário nas temperaturas de 25°C e 30°C de *F. tricinctum* foi maior na menor temperatura, 11,33 mm/dia, confirmando os dados de presente estudo, e para 30°C , 2,83 mm/dia, mostrando sensibilidade desse fungo a altas temperaturas (BURGESS et al., 1994). Suas colônias apresentaram coloração branca evoluindo para a roxa com o passar do tempo (Figura 9 - F1, F2). Essa espécie apresentou macroesporos com quatro septos e com comprimento médio de 8,4 μm e largura média de 2,1 μm (Tabela 5), semelhantes ao que já foi relatado para essa espécie de fungo (LESLIE; SUMMEREL, 2006).

4.1.2.3 *Fusarium equiseti*

Fusarium equiseti na temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ apresentou velocidade média de crescimento micelial de 9,8 mm/dia tocando a borda da placa no sétimo dia e coloração predominante marrom (Figura 9 - H1, H2). Essa espécie teve, apenas, macroesporos com cinco septos com comprimento de 6,6 μm e largura de 2 μm (Tabela 5),

assemelhando a descrição para esse fungo, especialmente pela ausência de microesporos e coloração marrom pálido ao marrom escuro em BDA (LESLIE E SUMMERELL, 2006). O crescimento micelial em meio BDA foi de 13,33 mm/dia a 25°C e de 12 mm/dia a 30°C (BURGESS et al. 1994). Portanto, *F. equiseti* não demonstra sensibilidade a temperatura de 30°C, característica positiva para uso no Brasil.

Tabela 5. Largura e comprimento (µm) dos macroesporos dos isolados de *Fusarium proliferatum* (*F. proliferatum*), *Fusarium tricinctum* (*F. tricinctum*) e de *Fusarium equiseti* (*F. equiseti*).

ISOLADOS		LARGURA		COMPRIMENTO	
		Média	Mínima-Máxima	Média	Mínima
ISO-DPV-LCBPF001	<i>F. proliferatum</i>	1,9	1-2,7	7,6	5,2-10,2
ISO-DPV-LCBPF002	<i>F. proliferatum</i>	2,2	1,1-3,6	6,6	4-9,6
ISO-DPV-LCBPF003	<i>F. tricinctum</i>	2,1	1,1-3,1	8,4	5,1-11,7
ISO-DPV-LCBPF004	<i>F. proliferatum</i>	1,9	1-3,2	5,9	3,7-8,3
ISO-DPV-LCBPF005	<i>F. proliferatum</i>	2,1	1,4-3,2	7,3	5-11,2
ISO-DPV-LCBPF006	<i>F. proliferatum</i>	2	1,3-3,1	6,9	4,7-9,3
ISO-DPV-LCBPF007	<i>F. proliferatum</i>	2,1	1,2-3,4	7,4	5-10,5
ISO-DPV-LCBPF008	<i>F. proliferatum</i>	2,2	1,3-3,4	7,3	4,8-10,5
ISO-DPV-LCBPF009	<i>F. equiseti</i>	2	1,2-3,2	6,6	4-8,6

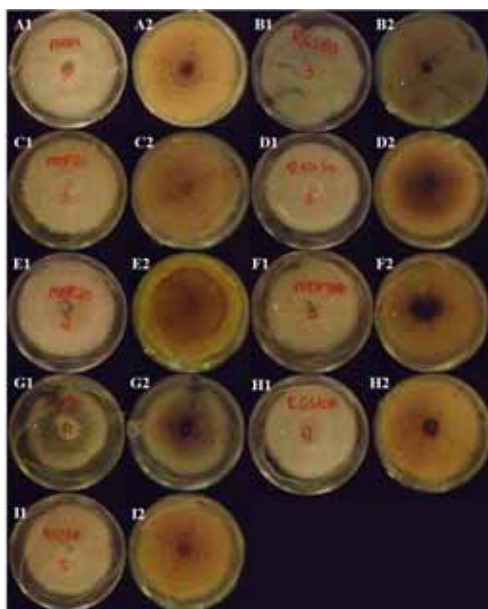


Figura 9. Crescimento micelial aos sete dias dos nove isolados de fungos em meio de cultura BDA, frente (1) e reverso (2) da placa de Petri. A1 e A2- ISO-DPV-LCBPF006: *Fusarium proliferatum*; B1 e B2- ISO-DPV-LCBPF002: *F. proliferatum*; C1 e C2- ISO-DPV-LCBPF003: *F. proliferatum*; D1 e D2- ISO-DPV-LCBPF005: *F. proliferatum*; E1 e E2- ISO-DPV-LCBPF007: *F. proliferatum*; F1 e F2- ISO-DPV-LCBPF008: *Fusarium*

tricinctum; G1 e G2- ISO-DPV-LCBPF001: *F. proliferatum*; H1 e H2- ISO-DPV-LCBPF009: *Fusarium equiseti* e I1 e I2- ISO-DPV-LCBPF004: *F. proliferatum*.

4.2 Controle microbiano de *Thaumastocoris peregrinus*

4.2.1 Teste de patogenicidade em *Thaumastocoris peregrinus*

Os fungos aplicados na concentração 1×10^8 esporos/ml apresentaram patogenicidade aos adultos de *T. peregrinus* comprovada pelo reisolamento dos isolados obtidos em meio BDA (Figura 11). *Fusarium proliferatum* correspondeu à espécie causadora de maior mortalidade, mas, foi possível notar que mesmo entre os isolados dessa mesma espécie houve diferenças na virulência dos isolados (Tabela 6 e Figura 10). Através de análises filogenéticas realizadas a uma escala global, incluindo isolados de *F. proliferatum* de diferentes origens geográficas e de diferentes hospedeiros foi encontrada uma alta variabilidade intraespecífica para essa espécie (JURADO et al., 2010).

Grande parte dos isolados causou a mortalidade acima de 50% dos insetos, porém, com velocidades diferentes. O isolado ISO-DPV-LCBPF006, de *F. proliferatum*, se destacou causando 50% de mortalidade em menos de 72 horas após a aplicação, por isso foi elegido para os demais testes (Tabela 6 e Figura 10 e 12-A). Esse fungo, proveniente de indivíduos mortos de *T. peregrinus*, causou mortalidade de 40% desse inseto a 10^6 esporos/mL em 24 horas após a inoculação (LAZO 2012), porém isto, não foi comprovado a 10^8 esporos/ml, o que foi atribuído a perda de sua patogenicidade devido às sucessivas repicagens em meio de cultura (SOLIMAN, 2014). Sucessivas repicagens de fungos em meios de cultura podem reduzir sua virulência de fungos. *Metarhizium anisopliae* teve decréscimo de virulência, além de modificações morfológicas, após oito repicagens em meio de arroz cozido (ALVES, 1998).

Em relação às espécies, foi possível concluir que além de *F. proliferatum*, a espécie *F. equiseti* também obteve um bom desempenho no decorrer do bioensaio, onde foi capaz de causar aproximadamente 34% de mortalidade dos insetos após 6 dias da inoculação (Figura 12-B), diferente de *F. tricinctum* que atingiu no máximo 12,5 % de mortalidade de *T. peregrinus* após 6 dias da inoculação (Tabela 6). Esse estudo foi o primeiro a testar a patogenicidade de *F. equiseti* e *F. tricinctum* a *T. peregrinus*. *Fusarium equiseti* e *F. tricinctum* retardaram o desenvolvimento de larvas de *Tenebrio*

molitor (DAVIS et al., 1975). E, além disso, *F. equiseti* pode causar a morte de *Matsucoccus matsumurae* (Hemiptera: Coccoidea: Matsucoccidae), espécie exótica na China que causa danos em *Pinus tabulaeformis* e *Pinus massoniana* (WEIMIN et al., 2014).

A capacidade dos fungos *F. proliferatum*, *F. tricinctum* e *F. equiseti* de causar a mortalidade em *T. peregrinus* pode ter relação com a produção de micotoxinas. Fungos, na natureza, podem produzir micotoxinas, como por exemplo, a beauvericina, por alguns fungos como *B. bassiana* e *Fusarium* spp. (HAMILL et al., 1969; LOGRIECO et al., 1998). A beauvericina é uma micotoxina com propriedades inseticidas e que pode induzir apoptose em células de mamíferos. Apesar da importância toxicológica dessa micotoxina para o homem e animais, a beauvericina possui uma abordagem voltada para a capacidade dos fungos entomopatogênicos em produzi-la (LOGRIECO et al., 1998).

Fusarium proliferatum e *F. tricinctum* quando pulverizados sobre *T. peregrinus* foram capazes de causar perturbações no comportamento desse inseto, pois, ocorreram inquietações. Muitas espécies de *Fusarium* produzem a beauvericina e outras micotoxinas, como fumosinas, fusaproliferina e moniliformina (KOMMEDAHL; WINDELS, 1981; BOTTALICO, 1998; LESLIE; SUMMERELL, 2006; GLENN, 2007). O primeiro relato da produção de beauvericina foi para fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* e, mais tarde, foi detectada em *Fusarium* spp. (HAMILL et al., 1969; GUPTA et al., 1991). Micotoxinas, relatadas na literatura e que causam efeito tóxico em animais e a saúde humana são exclusivamente associadas com o consumo de alimentos, como o milho, contaminado por *Fusarium* fitopatogênicas (BOLGER et al., 2001; MARASAS, 2001).

Tabela 6. Mortalidade confirmada acumulada para adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) com fungos entomopatogênicos na concentração 10^8 conídios/ml (Temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h).

Tratamentos	Número de insetos mortos			
	1 DAA	2 DAA	3 DAA	4 DAA
Testemunha	$0,33 \pm 0,19$ a	$0,67 \pm 0,38$ a	$0,67 \pm 0,38$ ab	$2,00 \pm 1,15$ ab
ISO-DPV-LCBPF001	$0,00 \pm 0$ a	$0,33 \pm 0,19$ a	$0,67 \pm 0,38$ ab	$2,67 \pm 1,54$ ab
ISO-DPV-LCBPF002	$0,00 \pm 0$ a	$0,33 \pm 0,19$ a	$2,00 \pm 1,15$ ab	$3,00 \pm 1,73$ ab
ISO-DPV-LCBPF003	$0,00 \pm 0$ a	$0,00 \pm 0$ a	$0,00 \pm 0$ a	$1,00 \pm 0,58$ a
ISO-DPV-LCBPF004	$3,66 \pm 2,11$ b	$2,67 \pm 1,54$ a	$6,00 \pm 3,46$ c	$6,00 \pm 3,46$ b
ISO-DPV-LCBPF005	$0,67 \pm 0,38$ a	$1,67 \pm 0,96$ a	$3,33 \pm 1,92$ ab	$4,33 \pm 2,50$ ab
ISO-DPV-LCBPF006	$0,00 \pm 0$ a	$0,67 \pm 0,38$ a	$1,33 \pm 0,77$ ab	$3,33 \pm 1,92$ ab
ISO-DPV-LCBPF007	$0,00 \pm 0$ a	$0,33 \pm 0,19$ a	$1,00 \pm 0,58$ ab	$2,33 \pm 1,35$ ab
ISO-DPV-LCBPF008	$0,00 \pm 0$ a	$0,00 \pm 0$ a	$0,67 \pm 0,38$ ab	$1,33 \pm 0,77$ ab
ISO-DPV-LCBPF009	$0,33 \pm 0,19$ a	$0,67 \pm 0,38$ a	$0,67 \pm 0,38$ ab	$3,00 \pm 1,73$ ab
F	4,32	0,68	6,64	1,98
P	0,004	0,7179	0,0003	0,1033
CV (%)	34,82	52,79	26,80	28,45

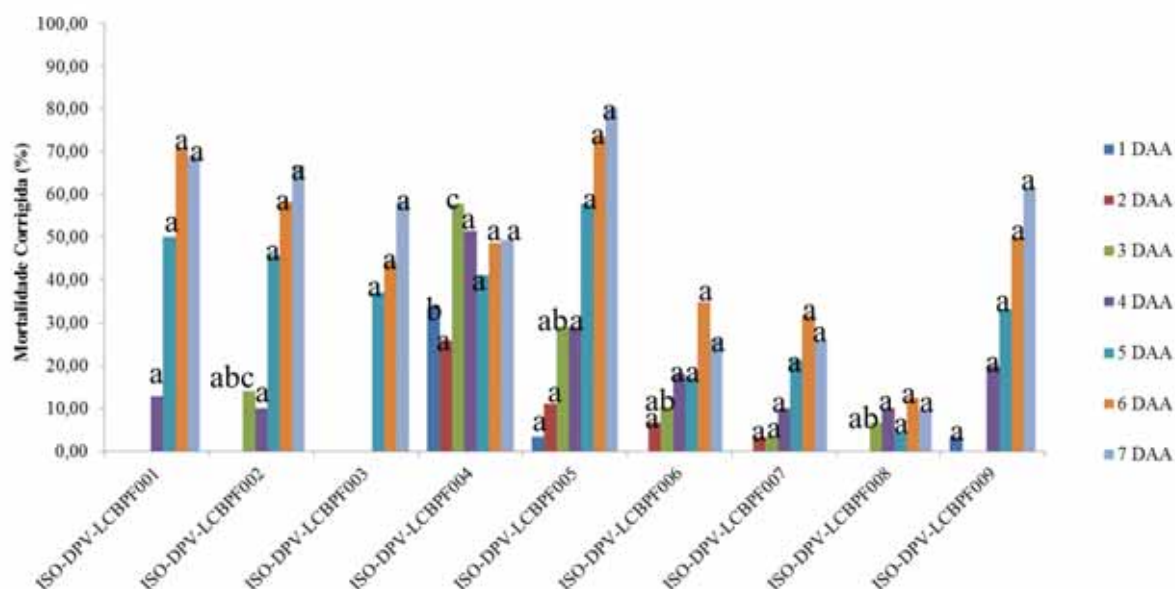
Obs. DAA = dias após a aplicação; Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente ($P < 0,05$).

Continuação...

Tratamentos	5 DAA	6 DAA	7 DAA
Testemunha	$3,67 \pm 2,12$ a	$4,00 \pm 2,31$ a	$4,67 \pm 2,69$ ab
ISO-DPV-LCBPF001	$7,33 \pm 4,23$ a	$8,33 \pm 4,81$ a	$8,33 \pm 4,81$ ab
ISO-DPV-LCBPF002	$6,33 \pm 3,66$ a	$7,33 \pm 4,23$ a	$8,00 \pm 4,62$ ab
ISO-DPV-LCBPF003	$5,33 \pm 3,08$ a	$6,00 \pm 3,46$ a	$7,33 \pm 4,23$ ab
ISO-DPV-LCBPF004	$6,67 \pm 3,85$ a	$7,00 \pm 4,04$ a	$7,33 \pm 4,23$ ab
ISO-DPV-LCBPF005	$7,67 \pm 4,43$ a	$8,67 \pm 5$ a	$9,00 \pm 5,20$ b
ISO-DPV-LCBPF006	$5,00 \pm 2,89$ a	$6,00 \pm 3,46$ a	$6,00 \pm 3,46$ ab
ISO-DPV-LCBPF007	$4,33 \pm 2,5$ a	$5,67 \pm 3,27$ a	$5,67 \pm 3,27$ ab
ISO-DPV-LCBPF008	$2,00 \pm 1,15$ a	$2,67 \pm 1,54$ a	$3,33 \pm 1,92$ a
ISO-DPV-LCBPF009	$5,67 \pm 3,27$ a	$7,67 \pm 4,43$ a	$8,33 \pm 4,81$ ab
F	1,33	1,94	2,23
P	0,28	0,111	0,0706
CV (%)	25,11	19,87	15,76

Obs. DAA = dias após a aplicação; Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente ($P < 0,05$).

Figura 10. Mortalidade corrigida para adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) com fungos entomopatogênicos na concentração 10^8 conídios/ml (Temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h).



Obs. DAA = dias após a aplicação. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente ($P < 0,01$).

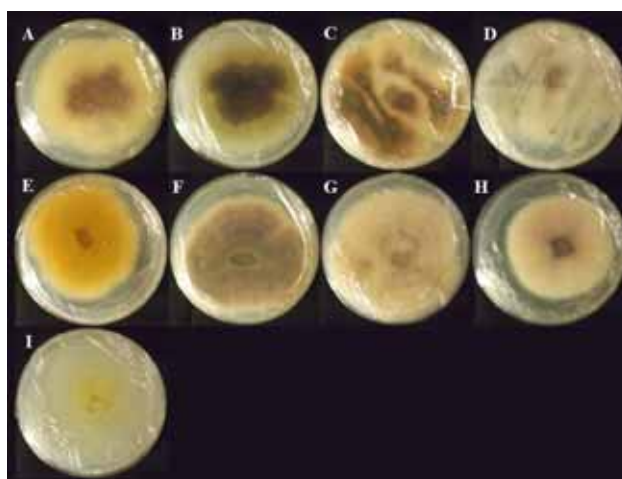


Figura 11. Colônias em meio BDA obtidas do reisolamento do fungo a partir de insetos mortos no teste de patogenicidade. A- ISO-DPV-LCBPF006 (*Fusarium proliferatum*); B- ISO-DPV-LCBPF003 (*Fusarium proliferatum*); C- ISO-DPV-LCBPF007 (*Fusarium proliferatum*); D- ISO-DPV-LCBPF002 (*Fusarium proliferatum*); E- ISO-DPV-LCBPF008 (*Fusarium tricinctum*); F- ISO-DPV-LCBPF001 (*Fusarium proliferatum*); G- ISO-DPV-LCBPF004 (*Fusarium proliferatum*); H- ISO-DPV-LCBPF005 (*Fusarium proliferatum*) e I- ISO-DPV-LCBPF009 (*Fusarium equiseti*).

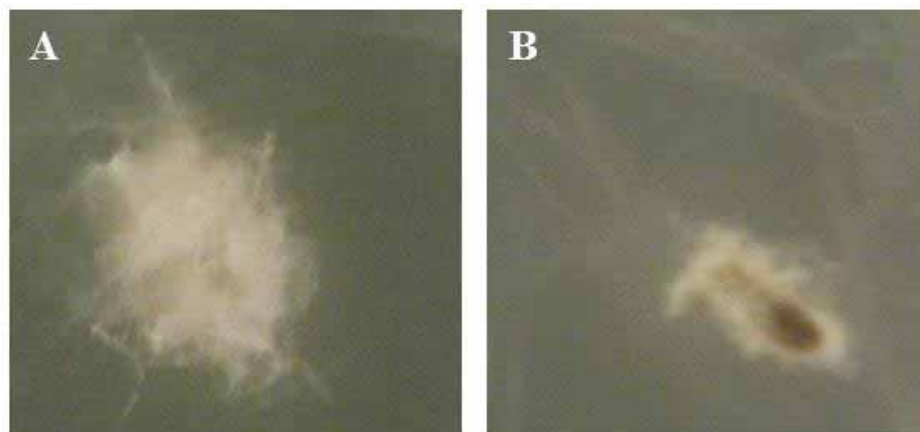


Figura 12. Adultos de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) provenientes da câmara úmida colonizados pelos fungos: A- *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006) e B- *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009).

4.2.2 Colonização de *Fusarium proliferatum* e *Fusarium equiseti* no corpo de *Thaumastocoris peregrinus*

A microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualização dos fungos *F. proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006) e *F. equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009) se desenvolvendo e colonizando, principalmente, o tórax, abdome e cabeça de *T. peregrinus*. O ISO-DPV-LCBPF006 mostrou crescimento micelial no aparelho bucal e nas regiões intersegmentares (Figura 13- A1, A2, A3 e A4) e o ISO-DPV-LCBPF009 nas regiões intersegmentares, coxa e trocanter desse inseto (Figura 12- B1, B2, B3 e B4). Os dois isolados mostraram germinação após 24 horas da inoculação, com presença de tubo germinativo (Figura 13- A1 e B1) e esporulação após 72 horas da inoculação (Figura 13- B3). Fungos entomopatogênicos iniciam o processo quando esporos viáveis entram em contato com o tegumento e encontram condição favorável para emissão do tubo germinativo para facilitar a entrada em insetos hospedeiros (JONES, 1994; HAJEK, 1997). A germinação dos esporos é iniciada por expansão do tubo germinativo favorecida por alta umidade, acima de 70%, durante 14 h; processo desencadeado por mensageiros, geralmente, carboidratos, na cutícula do inseto (HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1995; KHACHATOURIANS, 1996). Entomopatógenos do gênero *Fusarium* são promissores por poderem colonizar todas as fases do inseto, incluindo os ovos, embora poucos fungos tenham essa característica (MORQUER; NYSTERAKIS, 1944; AKBAR; HAQUE; ABBAS, 1958; FEDDE, 1971; KURUVILLA; JACOB, 1979).

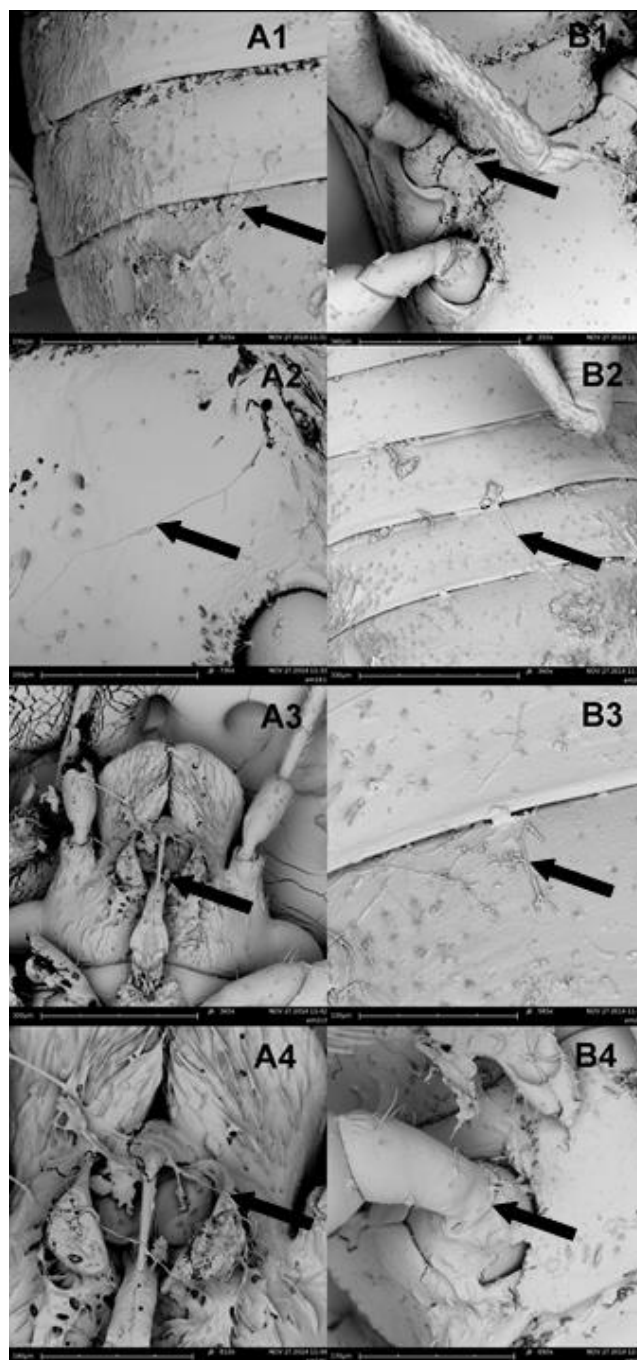


Figura 13. *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae): colonização do inseto pelo isolado *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006) após 24h (A1), 48h (A2), 72h (A3) e 96h (A4) da inoculação e colonização do inseto pelo isolado *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009) após 24h (B1), 48h (B2), 72h (B3) e 96h (B4) da inoculação. A1 e B2- Vista ventral do abdome do inseto com formação de hifas e tubo germinativo nas regiões intersegmentares; A2- Vista ventral do tórax com formação de hifas e tubo germinativo nessa região; A3 e A4- Vista ventral da cabeça com colonização do fungo no aparelho bucal; B1 e B4- Vista ventral do abdome e do tórax com formação de hifas e tubo germinativo no trocânter e na coxa do inseto e B3- Vista ventral do abdome com esporulações e formação de hifas e do tubo germinativo nas regiões intersegmentares.

4.3 Aspectos de compatibilidade

4.3.1 Compatibilidade de *Fusarium proliferatum* e *Fusarium equiseti* a fungicidas

O crescimento das colônias dos isolados ISO-DPV-LCBPF006 e ISO-DPV-LCBPF009, após seis dias da inoculação, mostrou que os fungicidas Trifloxistrobina + Tebuconazol e Azoxistrobina + Ciproconazol foram os que mais influenciaram no crescimento das colônias, quando estavam nas concentrações 100ppm e 1000ppm, reduzindo o crescimento dos dois fungos entomopatogênicos, entretanto, Trifloxistrobina + Tebuconazol também reduziu o crescimento da colônia do isolado ISO-DPV-LCBPF009 quando estava a 10ppm. O fungicida Piraclostrobina foi o que menos influenciou no crescimento micelial dos isolados nas concentrações testadas, exceto para a concentração 1000ppm (Tabela 7) (Figuras 14, 15 e 16). Fungicidas, são normalmente relacionados como não seletivos a fungos em testes realizados *in vitro* (ZALAF et al., 2008).

A produção de conídios, após doze dias da inoculação, mostra que todos os fungicidas reduziram a esporulação de *F. proliferatum* e *F. equiseti*, sendo classificados em todas as concentrações como altamente tóxico (AT) (Tabela 8). A redução do crescimento micelial dos isolados de *F. proliferatum* e *F. equiseti* pela Trifloxistrobina + Tebuconazol concorda com o antagonismo desse fungicida para uma linhagem de *M. anisopliae* nas concentrações de 1250ppm, 650ppm, 350ppm, 150ppm, 70ppm e 40ppm (DAMIN et al., 2011). Porém, o tebuconazol não foi eficiente para reduzir a incidência do fungo *Fusarium graminearum* (fitopatógeno) em sementes de trigo (GARCIA JÚNIOR et al., 2008). A compatibilidade de fungos com agroquímicos é importante, pois estes produtos podem melhorar o potencial do fungo no controle biológico, pois substâncias sintéticas nos produtos formulados podem atuar como estressantes, facilitando a infecção e a rápida proliferação da doença (DAMIN et al., 2011).

Tabela 7. Crescimento (cm) aos seis dias após a inoculação, das colônias de *Fusarium proliferatum* e *Fusarium equiseti* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Azoxistrobina + Ciproconazol (Priori Xtra), Trifloxistrobina + Tebuconazol (Nativo) e Piraclostrobina (Comet)(Temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h)

<i>Fusarium proliferatum</i> (ISO-DPV-LCBPF006)			
Concentração	Trifloxistrobina + Tebuconazol	Piraclostrobina	Azoxistrobina + Ciproconazol
0	8,5 d	8,5 d	8,5 d
1	4,15 c	5,33 b	5,24 c
10	2,48 b	5,9 c	3,77 b
100	0,22 a	5,31 b	2,4 a
1000	0 a	3,42 a	0,22 a
F	874,7	294,5	774,9
P	0	0	0
CV(%)	8,58	4,18	6,20
<i>Fusarium equiseti</i> (ISO-DPV-LCBPF009)			
Concentração	Trifloxistrobina + Tebuconazol	Piraclostrobina	Azoxistrobina + Ciproconazol
0	8,35 c	8,35 c	8,35 d
1	3,75 b	3,42 a	4,33 c
10	0,7 a	4,6 b	2,87 b
100	0 a	4,86 b	0,59 a
1000	0 a	2,5 a	0 a
F	271,6	67,28	248,54
P	0	0	0
CV(%)	19,02	12,79	14,73

Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente ($P < 0,10$).

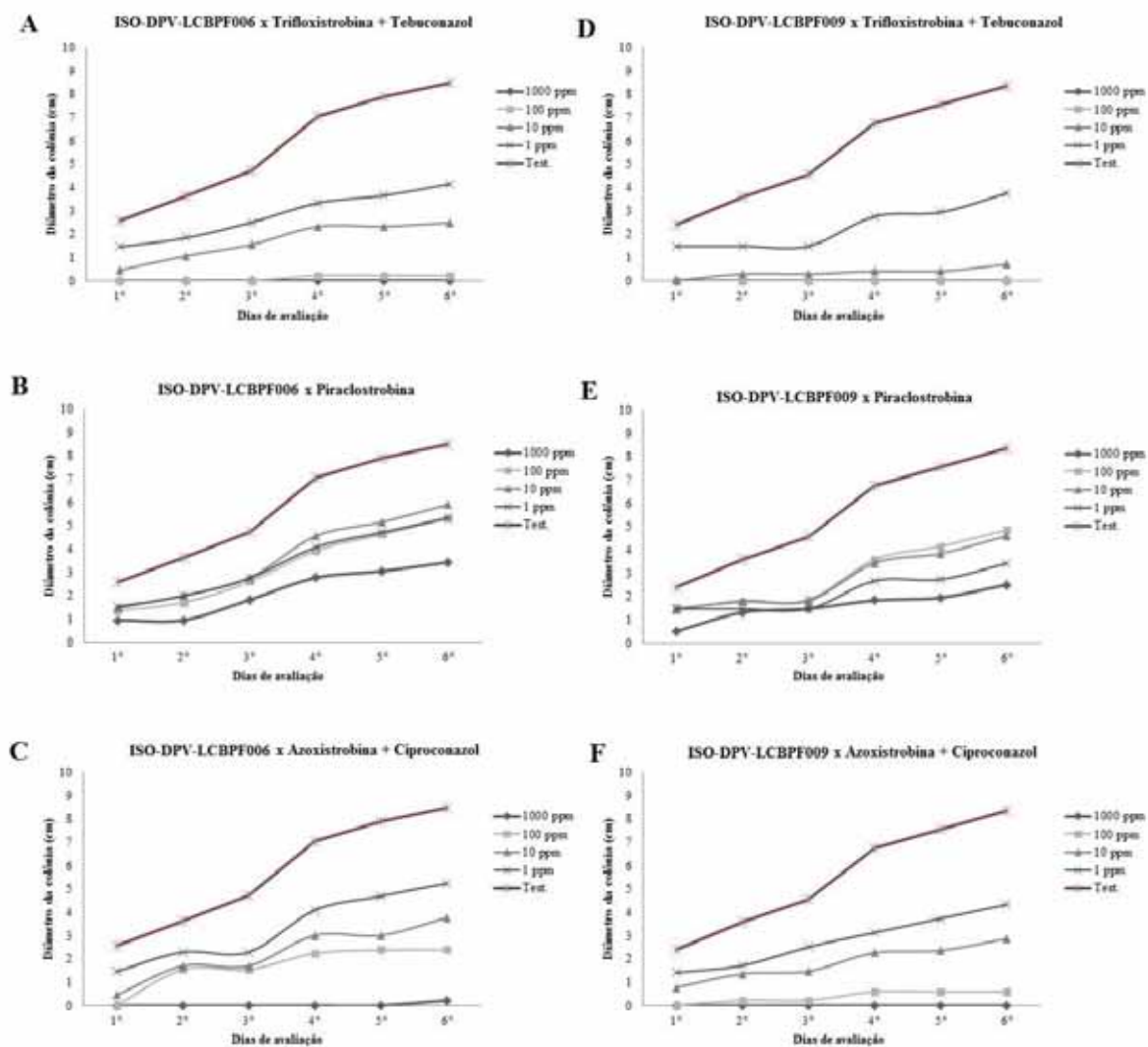


Figura 14. A, B e C- *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006): Crescimento diário nos diferentes fungicidas. D, E e F- *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009): Crescimento diário nos diferentes fungicidas.

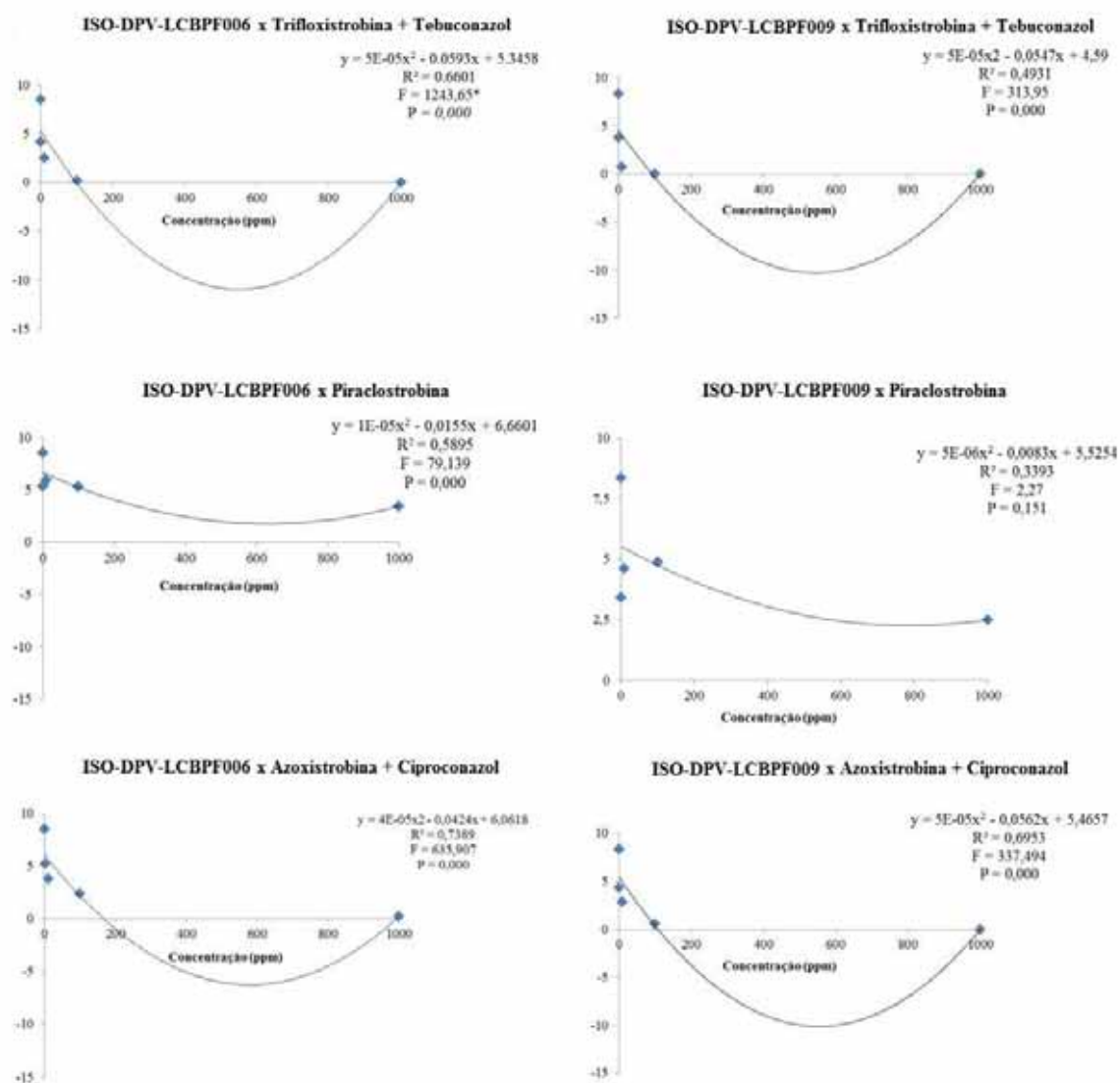


Figura 15. *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006): curva resposta do crescimento final nas cinco concentrações dos diferentes fungicidas (A, B e C). *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009): curva resposta do crescimento final nas cinco concentrações dos diferentes fungicidas (D, E e F).

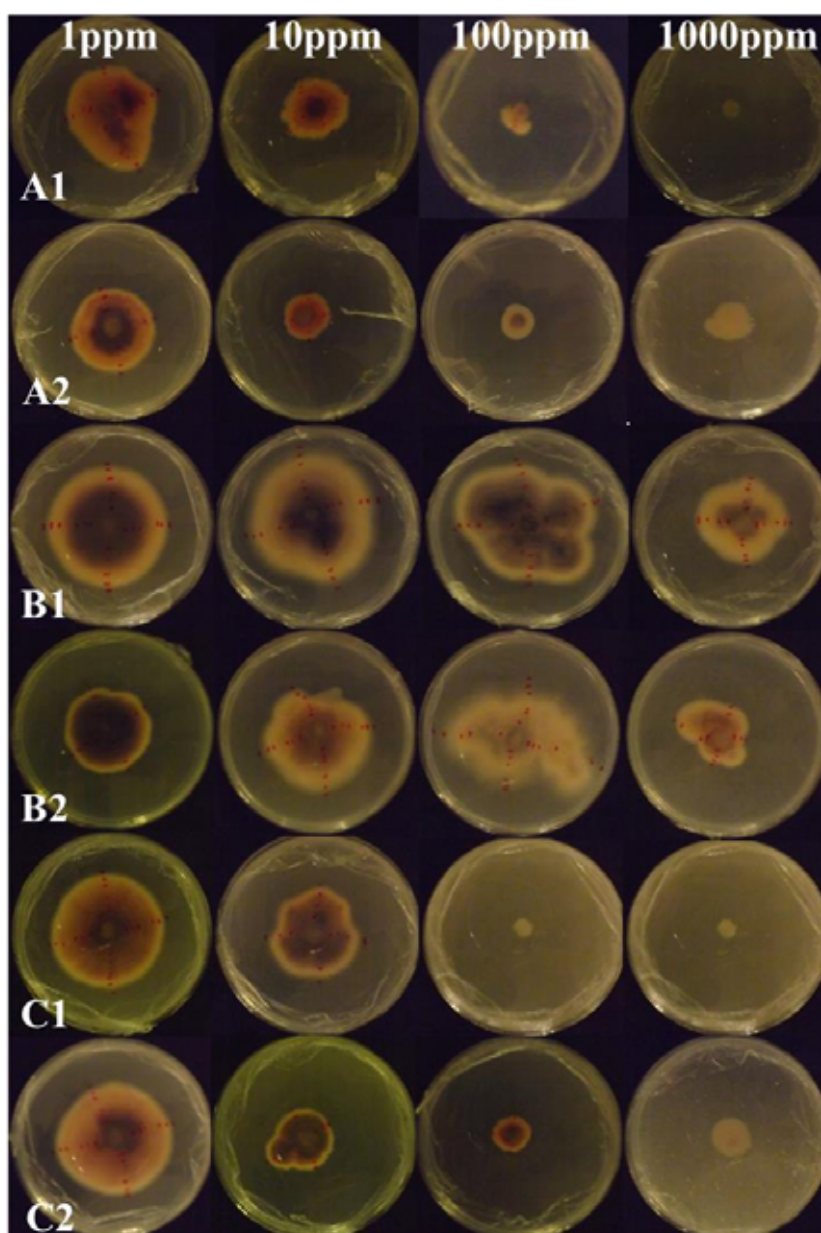


Figura 16. Crescimento micelial de *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006) (1) e *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009) (2) em meio de cultura contendo 1, 10, 100 e 1000ppm (colunas) dos fungicidas Trifloxistrobina + Tebuconazol (linha A), Piraclostrobina (linha B) e Azoxistrobina + Ciproconazol (linha C).

Tabela 8. Efeito das concentrações dos fungicidas na esporulação das colônias de *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006) e *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009) em meio de cultura (Temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h).

Tratamento	Trifloxistrobina + Tebuconazol			Piraclostrobina			Azoxistrobina + Ciproconazol		
	FP	FE	Cl.	FP	FE	Cl.	FP	FE	Cl.
1000	0	0	AT/AT	15,6	11,29	AT/AT	1,74	0	AT/AT
100	0,52	0	AT/AT	18,6	19,3	AT/AT	7,66	2,36	AT/AT
10	8,5	4,08	AT/AT	20,85	18,84	AT/AT	15,96	10,95	AT/AT
1	17,11	17,33	AT/AT	20,37	16,52	AT/AT	21,02	17,57	AT/AT

AT = Altamente tóxico; FP = *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006); FE = *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009); Cl = Classificação.

4.3.2 Análise da fitopatogenicidade de *Fusarium proliferatum* e *Fusarium equiseti* em diferentes culturas de importância econômica

Fusarium proliferatum (ISO-DPV-LCBPF006) e *F. equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009) não foram fitopagênicos para as plantas testadas (Figura 17 - A e B; Figura 18 - A e B e Figura 19 - A e B), pois mesmo com condições favoráveis não causou doença, demonstrando ser um grupo distinto de outras espécies de *Fusarium*. Isto indica que possa ser utilizado no campo sem riscos às culturas de tomate, cana de açúcar e eucalipto. Outro isolado de *F. proliferatum*, proveniente de *T. peregrinus*, também não causou doenças nessas plantas e no milho (LAZO, 2012).

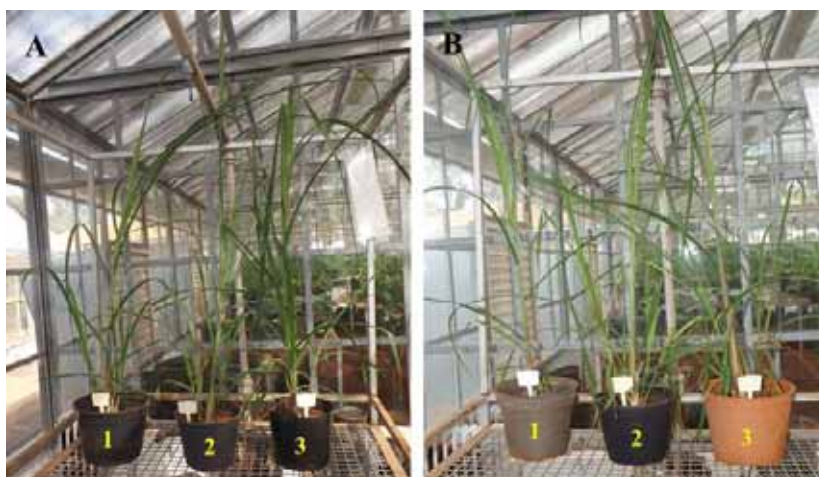


Figura 17. A- Inoculação via foliar em cana de açúcar var. RB 96 6928: 1- Isolado *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009); 2- Testemunha e 3- *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006). B- Inoculação via raiz em cana de açúcar var. RB 96 6928: 1- Isolado *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009); 2- Testemunha e 3- *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006).

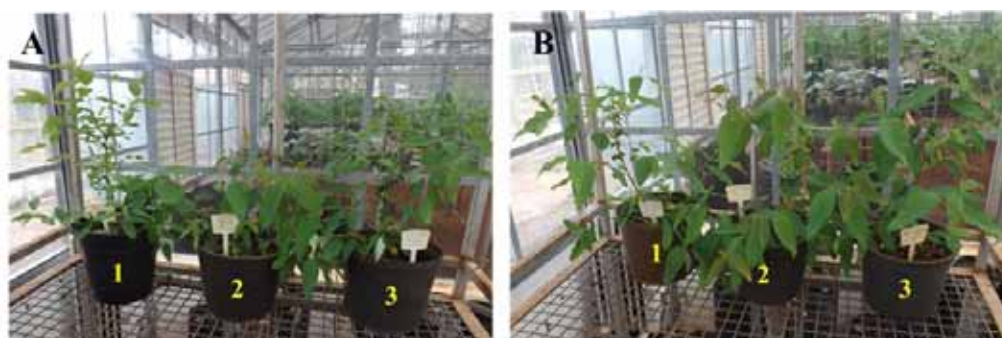


Figura 18. A-Inoculação via foliar em *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone H-13): 1- Isolado *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009); 2- Testemunha e 3- *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006). B- Inoculação via raiz em *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone H-13): 1- Isolado *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009); 2- Testemunha e 3- *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006).

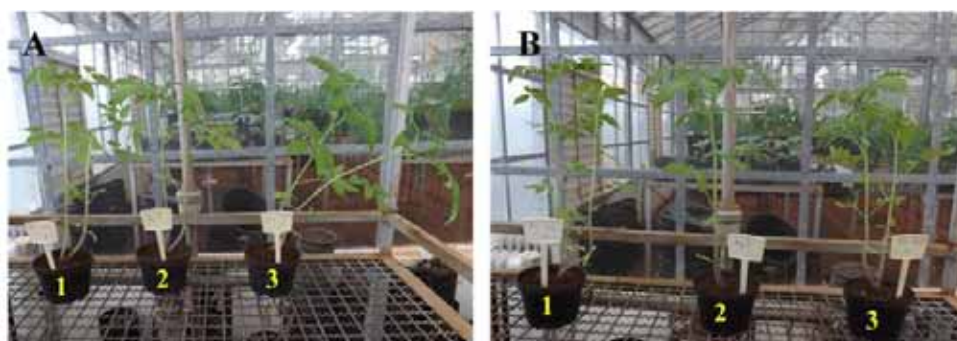


Figura 19. Inoculação via foliar em tomateiro cultivar Santa Cruz Kada Gigante (A): Isolado *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009) (1), Testemunha (2), *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006) (3). Inoculação via raiz em tomateiro cultivar Santa Cruz Kada Gigante (B): Isolado *Fusarium equiseti* (ISO-DPV-LCBPF009) (1); Testemunha (2); *Fusarium proliferatum* (ISO-DPV-LCBPF006) (3).

5 CONCLUSÕES

Fusarium proliferatum, *F. equiseti* e *F. tricinctum* são patogênicos a *T. peregrinus*;

Os isolados ISO-DPV-LCBPF006 (*F. proliferatum*) e ISO-DPV-LCBPF009 (*F. equiseti*) demonstram maior virulência;

Os isolados ISO-DPV-LCBPF006 (*F. proliferatum*) e ISO-DPV-LCBPF009 (*F. equiseti*) apresentaram crescimento micelial principalmente nas regiões do tórax (inserção das pernas), abdome (regiões intersegmentares) e cabeça (aparelho bucal).

Trifloxistrobina + Tebuconazol, Azoxistrobina + Ciproconazol e Piraclostrobina são altamente tóxicos para os isolados ISO-DPV-LCBPF006 (*F. proliferatum*) e ISO-DPV-LCBPF009 (*F. equiseti*).

Os isolados ISO-DPV-LCBPF006 (*F. proliferatum*) e ISO-DPV-LCBPF009 (*F. equiseti*) não são fitopatogênicos às plantas de tomateiro *Lycopersicon esculentum* cultivar Santa Cruz Kada Gigante, cana de açúcar *Saccharum officinarum* variedade RB 96 6928 e mudas clonais de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone H-13).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABRAF. **Anuário estatístico ABRAF 2013 ano base 2012**. Abraf. Brasília, 142 p., 2013. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp>>. Acesso em: 10 Out. 2014.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 06 dez. 2014.

AKBAR, K., HAQUE, H.; ABBAS, H. M. *Fusarium acridiorum*, a parasite of desert locust. **FAO - Plant Protection Bulletin**, v. 6, p. 59, 1958.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças de eucalipto**. Viçosa/MG: UFV, 2009. 500 p.

ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M.; MOINO JÚNIOR, A.; ALVES, L. F. A. **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. p. 637-711. Piracicaba, 1998.

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.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Coor.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.

ANDRADE, E. N. Uma praga do eucalipto. **Chácaras e Quintais**, v.37, n.5, p.463-465, 1928.

ARANTES, A. M. V. T.; CORREIA, A. C. B. Diversidade de fungos associados à *Parlatoria ziziphus* (Hemiptera: Diaspididae) em citros. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 3, p 477-483, 1999.

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

BARDDAL, H. P. O.; SANTOS, F.; LINZMEIER, A. M.; BARBOSA, L. R. Método de criação de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) em laboratório. In: Evento de iniciação científica da Embrapa Florestas, v. 8. VIII EVINCI. **Anais...** Colombo, 2009.

BERTI FILHO, E.; ALVES, S. B.; CERIGNONI, J. A.; STAPE, J.L. Ocorrência de *Beauveria* (Bals.) Vuill. em adultos de *Gonipterus scutellatus* (Gyllenhal) (Coleoptera, Curculionidae). **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 67, n. 3, p. 293-294, 1992.

BERTI FILHO, E.; CERIGNONI, A.; SOUZA JÚNIOR, C. N. Primeiro registro de *Phoracanta semipunctata* (Fabricius, 1975) (Coleoptera, Cerambycidae) no Estado de São Paulo. **Revista Agricultura**, v. 70, n. 1, p. 16, 1995.

BIEZANKO, C. M.; BOSQ, J. M. Cerambycidae de Pelotas e seus arredores. **Agros**, v. 9, p. 3-15, 1956.

BOLGER, M.; COKER, R.D.; DINOVI, M.; GAYLOR, D.; GELDERBLUM, W.; OLSEN, M.; PASTER, N; RILEY, R. T.; SHEPARD, G.; SPEIJERS, G. J. A. Fumonisin. Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Foods. In: FAO Food and Nutrition Paper. **World Health Organization**, Geneva, 2001. p. 103–279.

BOTTALICO, A. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles. **European Journal of Plant Pathology**, v. 80, p. 85–103, 1998.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; GOTT, K. P.; BACKHOUSE, D. **Laboratory Manual for *Fusarium* Research**. 3. ed. Sydney: University of Sydney/Royal Botanic Gardens, 1994. 134p.

BUTTON, G. *Thaumastocoris peregrinus*. Forest Facts. 2 p. 2007. Disponível em: <<http://www.nctforest.com/showpage.asp?id=44&contentid=423&catid=24>>. Acesso em 15 Jun. 2013.

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

CARNE, P. B.; TAYLOR K. Insect pest. In: Hillis, W. E & A. G. Brown (ed.). **Eucalyptus for wood production**. 2 ed. Melbourne: CSIRO, Academic Press, p 155–168. 1984.

CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P. M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae), **Zootaxa**, v. 1228, n.9, p. 61-68, 2006.

CARRUTHERS, R. I.; SAWYER, A. J.; HURAL, K. Use of Fungal Pathogens for Biological Control of Insect Pests, Sustainable Agricultural Research and Education in the Field Proceeding. **National Academic Press**, Washington, p. 336-372. 1991.

CHIPPENDALE, G. M. **Flora of Australia: Myrtaceae-Eucalyptus, Angophora**. Canberra, Austrália: Australian Government Publishing Service, 1988. v. 19, 542 p.

DAL POGETTO, M. H. F. A.; WILCKEN, C. F.; CHRISTOVAM, R. S.; PRADO, E. P.; GIMENES, M. J. Effect of formulated entomopathogenic fungi on red gum lerp psyllid *Glycaspis brimblecombei*. **Research Journal of forestry**, v. 5, n. 2, p. 99-106, 2011.

DAMIN, S.; VILANI, A.; FREITAS, D.; KRASBURG, C.; QUEIROZ, J. A.; KAGIMURA, F. Y.; ONOFRE, S. B. Ação de fungicidas sobre o crescimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium* sp. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 41-49, 2011.

DAVIS, G. R. F., SMITH, J. D., SCHIEFER, B.; LOEW, F. M.. Screening for mycotoxins with larvae of *Tenebrio molitor*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 26, p. 299-303, 1975.

DIAS, T. S. M. In: E. F. VILELA, R. A.; ZUCHI, F. **Pragas introduzidas**. p. 11. Ribeirão Preto, SP, Brasil: Holos. 2000.

DITTRICH-SCHRÖDER, G.; HARNEY, M.; NESER, S.; JOFFE, T.; BUSH, S.; HURLEY, B. P.; WINGFIELD, M. J.; SLIPPERS, B. Biology and host preference of

Selitrichodes neseri: A potential biological control agent of the Eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa*. **Biological Control**, v. 78, p. 33-41, 2014.

DITTRICH-SCHRÖDER, G.; WINGFIELD, M. J.; HURLEY, B.P.; SLIPPERS, B. Diversity in Eucalyptus susceptibility to the gall-forming wasp *Leptocybe invasa*. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 14, p. 419–427, 2012.

DRAGANOVA, S.; TAKOV, D.; PILARSKA, D.; DOYCHEV, D.; MIRCHEV, P. ; GEORGIEV, G. Fungal Pathogens on Some Lepidopteran Forest Pests in Bulgaria. **Acta Zoologica Bulgarica**, v. 65, n. 2, p. 179-186, 2013.

EPPO. Data sheets on quarantine pest: *Gonipterus gibberus* and *Gonipterus scutellatus*. **Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 368-370, 2005.

FAO. **Overview of Forest Pests**, South Africa. FAO Forestry Dept, Working Paper FBS/30E, p. 35. 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Forestry Department. ***Phoracantha recurva* Newman, 1840 and *Phoracantha semipunctata* (Fabricius, 1775)**. Forest Pest Species Profile. 2007. Disponível em: < <http://www.fao.org/forestry/13573-071a1d62e881e7324b20e33baf707164.pdf>>. Acesso em: 20 Set. 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Forestry Department. ***Glycaspis brimblecombei***. Forest Pest Species Profile. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/forestry/37414-078b9936edf4b343e8a7afade1e0c6bf4.pdf>>. Acesso em: 20 Set. 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Forestry Department. ***Leptocybe invasa***. Forest Pest Species Profile. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/forestry/13569-05912e0e2fe9054c3ed4904ae597e3310.pdf>>. Acesso em: 20 Set. 2014.

FARIA, M. R.; WRIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237–256, 2007.

FEDDE, G. F., A parasitic fungus disease of *Adelges piceae* (Homoptera: Phylloxeridae) in North Carolina. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 64, p. 749-750, 1971.

FENILLI, R. Primeiro registro de *Gonipterus platensis* Marelli, 1926 e *Gonipterus gibberus* Boisduval, 1835 (Coleoptera, Curculionidae, Gonipterinae) no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.11, n.2, p.293-294, 1982.

FERMAM, R. K. S.; ANTUNES, A. M. S.. Uso de defensivos agrícolas, limites máximos de resíduos e impacto no comércio internacional: estudo de caso. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 7, n. 2, p.197-214, 2009.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa/MG: SIF, 1989. 570 p.

FERREIRA, F. A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle de doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. 98 p. Mogi Guaçu: International Paper, 2002.

FURTADO, E. L.; DIAS, D. C.; OHTO, C. T.; ROSA, D. D. **Doenças do eucalipto no Brasil**. 74 p. Botucatu, 2009.

GARCIA JÚNIOR, D.; VECHIATO, M. H.; MENTEN, J. O. M. Efeito de fungicidas no controle de *Fusarium graminearum*, germinação, emergência e altura de plântulas em sementes de trigo. **Summa Phytopathologica**. v. 34. n. 3. p. 280-283, 2008.

GARCIA, A.; FIGUEIREDO, E.; VALENTE, C.; MONSERRAT, V. J.; BRANCO, M. First record of *Thaumastocoris peregrinus* in Portugal and of the neotropical predator Hemerobius bolivari in Europe. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 66, n. 2, p. 251-256, 2013.

GLENN, E.A. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 213–240, 2007.

GONCALES, C. R. Infestation of *Orthezia praelonga* on citrus. **FAO - Plant Protection Bulletin**, v. 12, n. 4, p. 92-93, 1964.

GOWDA, J.; PRABHU, S.T.; PATIL, R. S. Evaluation of botanicals and synthetic insecticides against eucalyptus gall wasp *Leptocybe invasa* (Eulophidae: Hymenoptera) in Karnataka. **Karnataka Journal Agriculture Science**, v. 23, n. 1, p. 200-202, 2010.

GUPTA, S.; KRASNOFF, S. B.; UNDERWOOD, N. L.; RENWICK; J. A. A.; ROBERTS, D. W. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Mycopathologia**, v. 115, p. 185-189, 1991.

HAJEK, A. E. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. **Advances in Microbial Ecology**, v. 15, p. 193-249, 1997.

HALBERT, S. E.; GILL, R. J.; NISSON, J. N. Two Eucalyptus psyllids new to Florida (Homoptera: Psyllidae). **Entomology Circular**, v. 407, p. 1-2, 2001.

HAMILL, R.L.; HIGGENS, G.E.; BOAZ, H.E.; GORMAN, M. The structure of beauvericin, a new desipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. **Tetrahedron Lett**, v. 49, p. 4255–4258, 1969.

HEGEDUS, D.; KHACHATOURIANS, G. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. **Biotechnology Advances**, v. 13, p. 455–490, 1995.

HUMBER, R. A. Collection of entomopathogenic fungal cultures: Catalog of strains, U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. **Bulletin ARS-110**, 1992.

HURLEY, B.; SLIPPERS B.; WINGFIELD, M. *Thaumastocoris peregrinus* in Africa and South America, p. 21. In: International Union of Forest Research Organizations (IUFRO). Supplement to the Montes Claros Declaration. **IUFRO meeting**, Spain, 23–27 March, 2011.

IDE, S.M.; RUIZ, C. G.; SANDOVAL, A. C.; VALENZUELA, J. E. Detección de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) asociado a *Eucalyptus* spp. en Chile. **Bosques**, Valdivia, v. 32, n. 3, p. 309–313, 2011.

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

JONES, R. L. Role of field studies in assessing environmental behavior of herbicides. **Brighton Crop Protection Conference**, Brighton/UK, v. 3, p. 1275–1282, 1994.

JURADO, M.; MARÍN; CALLEJAS, C.; MORETTI, A.; VÁZQUEZ, C.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. **Food Microbiology**, v. 27, p. 50–57, 2010.

KEYSER, C. A.; FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; ROBERTS, D. W. Heat-induced post-stress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy?. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 120, p. 67–73, 2014.

KHACHATOURIANS, G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: HOWARD, D.H.; MILLER, J.D. (Eds.). **The Mycota: Human and animal relationship**. Berlin: Springer, 1996. p. 331–364.

KIM, I.; MENDEL, Z.; PROTASOV, A.; BLUMEBERG, D.; LA SALLE, J. Taxonomy, biology and efficacy of two Australian parasitoids of the eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fischer & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). **Zootaxa**, v. 1910, p. 1–20, 2008.

KOMMEDAHL, T.; WINDELS, C.E. Root, stalk and ear infecting *Fusarium* species on corn in the USA. In: NELSON, P.E.; TOUSSON, T.A.; COOK, R.J. (eds). ***Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy***. Philadelphia: Pennsylvania State University Press, 1981. p. 94–103.

KURUVILLA, S.; JACOB, A. Comparative susceptibility of nymphs and adults of *Nilaparvata lugens* to *Fusarium oxysporum* and its use in microbial control. **Journal of Tropical Agriculture**, Kerala/Índia, v. 17, p. 287-288, 1979a.

KURUVILLA, S.; JACOB, A. Host range of the entomogenous fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht and its safety to three crop plants. **Current Science**, v. 48, p. 603, 1979b.

KURUVILLA, S.; JACOB, A. Studies on *Fusarium oxysporum* Schlecht infecting rice brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* Stal. **Journal of Tropical Agriculture**, Kerala/Índia, v. 18, p. 51-54, 1980.

LAZO, M. L. S. R. Caracterização e patogenicidade de fungos entomopatogênicos isolados do percevejo bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.

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

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Ames/USA: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

LIMA, A. C. V.; DIAS, T. K. R.; BARBOSA, L. R.; SOLIMAN, E. P.; SA, L. A. N.; MASSON, M. V.; NEVES, D. A.; WILCKEN, C. F. Primeira ocorrência do percevejo bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) no estado da Bahia. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA. **Anais...**Natal/RS, 2010.

LIN, N.; HUBER, J. T.; LA SALLE, J. The Australian genera of *Mymaridae* (Hymenoptera: Chalocidoidea). **Zootaxa**, v. 1596, p. 1-111, 2007.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; CASTELLA, G.; KOSTECKI, M.; GOLINSKI, P.; RITIENI, A.; CHELKOWSKI, J. Beauvericin Production by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3084–3088, 1998.

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 isolados de *Beauveria bassiana* Vuill (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). In: I CONGRESSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA UTFPR, 2011, Dois Vizinhos/PR. **Anais...** Dois Vizinhos, UTFPR, 2011.

LUCKMANN, W. H.; METCALF, R. L. The pest-management concept. In: METCALF, R. L.; LUCKMANN, W. H. **Introduction to insect pest management**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1994, cap.1, p. 1-34.

MALLY, C. W. The Eucalyptus snout-beetle (*Gonipterus scutellatus*). **Journal of the Department of Agriculture**, Union of South Africa. v. 9, p. 442, 1924.

MARASAS, W. F. O. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 239–243, 2001.

MARTINEZ, G.; BIANCHINI, M. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). **Agrociencia**, Montevideo, v. 14, n. 1, p. 15-18, 2010.

MARTINEZ-CROSA G. *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Delappé, 2005 (Heteroptera: Thaumastocoridae): new pest found in eucalyptus in Uruguay. p. 32–33. In: IUFRO Recent Advances in Forest Entomology, Pretoria, South Africa. 2008.

MASCARIN, G.M.; DUARTE, V.S.; BRANDÃO, M.M.; DELALIBERA JR., I. Natural occurrence of *Zoophthora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on *Thaumastocoris peregrinus* (Heteroptera: Thaumastocoridae) na invasive pest recently found in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, p 401-404. 2012.

MENDEL, Z.; PROTASOV, A.; FISHER, N.; LA SALLE, J. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), and invasive gall inducer on Eucalyptus. **Australian Journal of Entomology**, v. 43, p. 51-63. 2004.

MEYERSON, L. A., MOONEY, H. A. Invasive alien species in an era of globalization. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, 199–208, 2007.

MOIO, S. G.; CORAL, D. J.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E.; WILCKEN, C. F. *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) feeding behavior on native Myrtaceae and *Eucalyptus urophylla* in Brazil. In: XXXVI Congreso Nacional de Entomología 2014 (Santiago 26, 27 y 28 de noviembre). **Anais...**Santiago, 2014.

MOORE, G. E. Isolating entomogenous fungi and bacteria, and tests of fungal isolates against the southern pine beetle. **Journal of Economic Entomology**, v. 63, p. 1702-1704, 1970.

MOORE, G. E. Pathogenicity of three entomogenous fungi to the southern pine beetle at various temperatures and humidities. **Environmental Entomology**, v. 2, p. 54-57, 1973.

MORQUER, R.; NYSTERAKIS, F., Rôle des fusariées entomophytes comme destructeur d'insectes. **Bulletin de la Société d'histoire naturelle de Toulouse**, v. 79, p. 281-318. 1944.

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

MUTITU, E. K.; GARNAS, J. R.; HURLEY, B. P.; WINGFIELD, M. J.; HARNEY, M.; BUSH, S. J.; SLIPPERS, B. Biology and rearing of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid for biological control of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 5, p. 1979-1985, 2013.

NADEL, R. L.; NOACK, A. E. Current understanding of the biology of *Thaumastocoris peregrinus* in the quest for a management strategy. **International Journal of Pest Management**, v. 58, n. 3, p. 257-266, Jul./Set. 2012.

NADEL, R. L.; SLIPPERS, B.; SCHOLE, M. C.; LAWSON, S. A.; NOACK, A. E.; WILCKEN, C. F.; BOUVET, J. P.; WINGFIELD, M. J. DNA bar-coding reveals source and patterns of *Thaumastocoris peregrinus* invasions in South Africa and South America. **Biological Invasions**, v. 12, p. 1067-1077, 2010.

NARDO, E. A. B.; MORAES, G. J.; SÁ, L. A. N.. Regulamentação do uso de agentes microbianos de controle. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p. 1119-1140.

NAYAK, P.; SRIVASTAVA, R. P. Occurrence of a new fungal disease on green-horned caterpillar of rice. **Current Science**, v. 47, p. 380-381, 1978.

NOACK, A. E.; CASSIS, G.; ROSE, H.A. Systematic revision of *Thaumastocoris peregrinus* Kirkaldy (Hemiptera: Heteroptera: Thaumastocoridae). **Zootaxa**, n. 3121, p. 1-60, 2011.

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

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

NYEKO, P.; MUTITU, K. E.; OTIENO, B. O.; NGAE, G. N.; DAY, R.K. Variations in *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) population intensity and infestation on eucalyptus germplasms in Uganda and Kenya. **International Journal of Pest Management**, v. 56, p. 137–144, 2010.

PAINE, T. D.; STEINBAUER, M. J.; LAWSON, S. A. Native and exotic pests of Eucalyptus: a worldwide perspective. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 181-201, 2011.

PENFOLD, A. R.; WILLIS, J. L. **The Eucalyptus**. London: Leonard Hill, 1961. 551 p.

PEREIRA, J. M.; MELO, A. P. C.; FERNANDES, P. M.; SOLIMAN, E. P. Ocorrência de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) no Estado de Goiás. **Ciência Rural**: Santa Maria, v. 43, n. 2. Fev. 2013.

PROKOPY, R.; KOGAN, M. Integrated pest management. In: RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. **Encyclopedia of insects**. Amsterdam: Academic Press, 2009, p. 523-528.

QUEIROZ, D. L. Pragas exóticas e potenciais a eucaliptocultura no Brasil. In: Manejo fitossanitário de cultivos agroenergéticos, 2009, Brasília/DF, **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. p. 239-249.

RANGEL, D. E.; FERNANDES, E. K.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS; D. W. Culture of *Metarhizium robertsii* on salicylic-acid supplemented medium induces increased conidial thermotolerance. **Fungal Biology**, v. 116, n. 3, p. 438–442, 2012.

ROBERTS, D. W. World Picture of biological control of insects by fungi. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 21, p. 41-46, 1962.

ROSADO-NETO, G. H. Gonipterinae dos eucaliptos: Primeiro registro de *Gonipterus scutellatus* para o Estado de São Paulo, Brasil, e algumas considerações sobre *G. gibberus* (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.37, n.3, p.465-467, 1993.

SAN ROMAN, L. M.; FIRMINO, A. C.; FURTADO, E. L.; WILCKEN. C. F. Identificação e caracterização de *Fusarium* sp. e *Paecilomyces* sp. entomopatogênicos isolados do percevejo-bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). In: XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2012, Curitiba/PR. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia. **Anais...**Curitiba : Embrapa, 2012.

SANTANA, D. L. Q.; BURKHARDT, D. Eucalyptus psyllids in Brazil. **Journal of Forest Research**, v. 12, p. 337–344, 2007.

SAVARIS, M.; LAMPERT, S.; PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R.. Primeiro registro de *Thaumastocoris peregrinus* para o estado de Santa Catarina, e novas áreas de ocorrência para o Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 11, p. 1874-1876, 2011.

SCHULTZ, B.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Doenças registradas em *Eucalyptus benthamii* no Brasil. In: I CICPG - Congresso de Iniciação Científica e pós Graduação. **Anais...** Florianópolis, 2010.

SOLIMAN, E. P. **Controle biológico de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) com fungos entomopatogênicos**. 2014. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014.

SOLIMAN, E.P.; WILCKEN, C. F.; PEREIRA, J. M.; DIAS, T. K. R.; ZACHÉ, B.; DAL POGETTO, M. H. F. A.; BARBOSA, L. R. Biology of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) in different eucalyptus species and hybrids. **Phytoparasitica**, Tel Aviv, v. 40, p.223-230, 2012.

SOPOW, S.; GEORGE, S.; WARD, N. Bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*: a new Eucalyptus pest in New Zealand. **Surveillance**, Wellington, v. 39, p. 43-46, 2012.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho, **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, 2007.

SOUZA, G. K.; PIKART, T. G.; PIKART, F. C.; SERRÃO, J. E.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C. First Record of a Native Heteropteran Preying on the Introduced Eucalyptus Pest, *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 95, n. 2, p. 517-520, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Plantarum. 2005.

SUMA, P.; NUCIFORA, S.; BELLA, S. New distribution record of the invasive bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Heteroptera, Thaumastocoridae) in Italy. **EPPO Bulletin**, v. 44, n. 2, p. 179-182, 2014.

TANADA, Y. Epizootiology of Infection Diseases. In: STEINHAUS, E. A. **Insect Pathology: An Advanced Treatise**. v. 2. Nueva York: Academic Press, 1963. p. 423-475.

TANZINI, M. R.; ALVES, S. B.; SETTEN, A. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados no controle de *Leptopharsa heveae* para fungos entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 4, p. 65-69, 2002.

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

Tree Protection Co-operative Programme (TPCP). **The Bronze Bug: the battle continues**. Tree Protection News, v. 19, p. 9. 2010.

Tree Protection Co-operative Programme (TPCP). **Towards understanding and controlling *Thaumastocoris peregrinus***. Tree Protection News, v. 16, p. 16 - 17, 2008.

TREMBLAY, E. Observations on hemp weevils. Notes on morphology, biology and chemical control. **Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri, Portici**, v. 26, p. 139-190, 1968.

VIVEAGRO. **SAG releases of biological control of eucalyptus bug**. 2010. Disponível em: <<http://www.viveagro.cl/index.php/sag-libera-controlador-biologico-del-chinche-del-eucalipto/>>. Acesso em: 05 dez. 2014.

VIVEIRO FLORESTAL. **Researchers import natural enemies to control pest of eucalyptus**. 2010. Disponível em: <<http://www.viveirotresirmaos.com/br/artigos/index.php?id=5>>. Acesso em: 05 dez. 2014.

WEIMIN, L.; YINGPING, X.; JING, D.; JIAOLIANG, X.; YANFENG, Z.; YAOBIN, L.; JUN, W. Pathogenicity of Three Entomopathogenic Fungi to *Matsucoccus matsumurae*. **Plos One**, v. 9, n. 7, 2014.

WILCKEN C. F.; SOLIMAN E. P.; DAL POGETTO M. H. F. A.; LIMA A. C. V.; PRADO E. Biocontrol of Eucalyptus bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) with entomopathogenic fungi in Brazil, p. 37. In: Population dynamics, biological control, and integrated management of forest insects, 2010, Eberswalde, Germany. **Anais...** Eberswalde: IUFRO, 2010b.

WILCKEN, C. F.; BARBOSA, L. R.; SÁ, L. A. N.; SOLIMAN, E. P.; LIMA, A. C. V.; POGETTO, M. H. F. A. D.; DIAS, T. K. R. Manejo de pragas exóticas em florestas de eucalipto. In: II Encontro Brasileiro de Silvicultura, 2011, Campinas. **Anais...** Campinas: 2011.

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

WILCKEN, C. F.; COUTO, E. B.; ORLATO, C.; FERREIRA-FILHO, P. J.; FIRMINO, D. C. Ocorrência do psílideo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) em florestas de eucalipto no Brasil. **Circular técnica IPEF**, Piracicaba, v. 201, p. 1-11, 2003.

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

WILCKEN, C. F.; POGETTO, M. H. F. A. D.; COUTO, E. B.; FERREIRA FILHO, P. J. Eficiência de *Beauveria bassiana* (Boveril) no controle do gorgulho do eucalipto *Gonipterus scutellatus* (Coleóptera: Curculionidae) em condições de laboratório. In: IX Simpósio de Controle Biológico. **Anais...** Recife, p. 109, 2005.

WILCKEN, C. F.; SOLIMAN, E. P.; SÁ, L. A. N.; BARBOSA, L. R.; DIAS, T. K. R.; FERREIRA-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, p. 201-206, 2010a.

WYLIE, F. R.; SPEIGHT, M. R. **Insect pests in tropical forestry**. 2. ed. Wallingford, UK: CABI. 2012.

ZALAF, L. S. R.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; NETO, S. S.; TANZINI, M. R. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, p. 279-302, 2008.

ZANUNCIO, J. C. **Manual de pragas em florestas**. Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia e controle. Piracicaba: IPEF/SIF, 1993. 140 p.

ZANUNCIO, J. C.; FAGUNDES, M.; ANJOS, N.; ZANUNCIO, T. V.; CAPITANI, L. R. Levantamento e flutuação populacional de lepidópteros associados à eucaliptocultura: V – Região de Belo Oriente, Minas Gerais, junho de 1986 a maio de 1987. **Revista Árvore**, v.14, p. 35-44, 1990.