

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

FLAVIA GALVAN TEDESCO

**Formulações de *Beauveria bassiana* no controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, (Hemiptera: Thaumastocoridae) e isolamento de fungos entomopatogênicos e endofíticos em plantios de eucalipto**

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS

2018

FLAVIA GALVAN TEDESCO

**Formulações de *Beauveria bassiana* no controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, (Hemiptera: Thaumastocoridae) e isolamento de fungos entomopatogênicos e endofíticos em plantios de eucalipto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Michele Potrich  
Coorientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nédia de Castilhos Ghisi e Prof. Dr. Sandro Augusto Rhoden

DOIS VIZINHOS

2018

T256f Tedesco, Flavia Galvan  
Formulações de *Beauveria bassiana* no controle de  
*Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapá  
(Hemiptera: Thaumastocoridae) e isolamento de fungos  
entomopatogênicos e endofíticos em plantios de eucalipto. /  
Flavia Galvan Tedesco – Dois Vizinhos, 2018.  
69 f.:il.

Orientadora: Prof. Dra. Michele Potrich.  
Coorientadora: Prof. Dra. Nédia de Castilhos  
Coorientador: Prof. Dr. Sandro Augusto Rhoden  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Programa de pós-graduação em  
Agroecossistemas, Dois Vizinhos, 2018.  
Bibliografia p. 58-67

1. Eucalipto. 2. Fungos entomopatogênicos. 3. Percevejo.  
I. Potrich, Michele, orient. II. Castilhos, Nédia de, coorient. III.  
Rhoden, Sandro Augusto, coorient. IV Universidade  
Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. V. Título

CDD: 632.4

Ficha catalográfica elaborada por Keli Rodrigues do Amaral Benin CRB: 9/1559

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Dois Vizinhos  
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
**Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas**



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**Título da Dissertação n° 018**

**Formulações de *Beauveria bassiana* no controle de *Thaumastocoris peregrinus*  
Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) e isolamento de fungos  
entomopatogênicos e endofíticos em plantios de eucalipto**

**Flavia Galvan Tedesco**

Dissertação apresentada às oito horas e trinta minutos do dia vinte e seis de fevereiro de dois mil e dezoito, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGROECOSSISTEMAS, Linha de Pesquisa – Manejo e Conservação de Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (Área de Concentração: Agroecossistemas), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho .....

Banca examinadora:

---

**Dra. Michele Potrich**  
UTFPR-DV

---

**Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro**  
Neves  
UEL

---

**Dra. Aline Pomari Fernandes**  
UFFS

---

**Reservado à Coordenação**

\*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.



Dedico a minha amada mãe,  
Lourdes Galvan Tedesco e ao meu  
amado pai Jossimar Tedesco.

## Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por todas as provações e por todas as minhas conquistas até hoje.

A minha mãe que sempre me apoia com seu jeito calmo e sereno, obrigada por sempre estar ao meu lado e me apoiar em todas as minhas decisões. Ao meu pai com seu jeito único, por não medir esforços para me apoiar e ajudar a seguir em frente.

Ao meu irmão Douglas, pelas ajudas nas coletas, sem você eu não conseguiria, também pelos abraços e conversas de incentivo, até mesmo pelas briguinhas que nos fazem mais próximos a cada dia.

Ao meu namorado Marcos Antônio Stasiak, obrigada por não desanimar e me apoiar a cada dia, pelos afetos, carinhos e amor transmitidos todos os dias. Obrigada pelas ajudas nas coletas, nos experimentos e em toda a fase de laboratório, pelos lanches no meio da madrugada no laboratório para que eu continuasse firme. Prometo ser mais presente e amorosa a cada dia. Meu orgulho por você aumenta a cada dia, te desejo muito sucesso na nova fase que se inicia em sua vida.

A minha amada nona Zulida Mora Galvan por todo amor, carinho e dedicação. Por nos mostrar o verdadeiro valor e o significado de FAMÍLIA, te amo nona. Aos meus avós Silvio e Ezelide Tedesco muito obrigada pelo amor e carinho, obrigada por todo cuidado que sempre tiveram comigo, Amo vocês.

A minha orientadora, por todo o conhecimento a mim transmitido, obrigada por ser muito mais que orientadora, por ser amiga, companheira, psicóloga e mãe. Obrigada por esses sete anos que convivemos juntas, obrigada por acreditar em mim. Que esse amor que você tem pelo seu trabalho contagie outras pessoas, assim como fez comigo ☺☺.

Aos meus co-orientadores, Nédia de Castilhos Ghisi e Sandro Augusto Rhoden, por aceitarem a coorientação, pelo conhecimento transmitido e por estarem sempre presentes nos meus momentos de desespero com a molecular.

Ao professor Everton Ricardi Lozano, pelos sete anos de companheirismo no laboratório e por todo conhecimento transmitido, muito obrigada.

Aos professores Flavio Endrigo Cechim e Sergio Miguel Mazaró pelas explicações e esclarecimentos sobre indução de resistência, pelas ajudas na execução dos experimentos e apoio.

As minhas amadas amigas Joseane e Amanda, por me ajudarem sempre nos experimentos. Obrigada por me ouvirem nos momentos de angústia e por me apoiarem

sempre, obrigada pelas conversas, risadas e pelos litros e litros de café e chimarrão compartilhados, vocês são maravilhosas todo sucesso do mundo a vocês.

Também aos meus colegas do laboratório de Controle Biológico, Fernanda, Rodrigo, Leonardo, Gabriela, Ingrid, Adriana, Willian, Yasmin, Gregori, Marcus e Raiza pelas ajudas na montagem de experimentos, pelas conversas, risadas e também pelos cafés.

De modo geral, a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para que este meu sonho se tornasse realidade, meu MUITO OBRIGADA!!



## RESUMO

TEDESCO, Flavia, Galvan. **Formulações de *Beauveria bassiana* no controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, (Hemiptera: Thaumastocoridae) e isolamento de fungos entomopatogênicos e endofíticos em plantios de eucalipto.** 2018. 67 f. Dissertação, (Mestrado em Agroecossistemas) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial inseticida de *Beauveria bassiana* sobre o percevejo-bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus*, coletar, identificar e caracterizar molecularmente fungos entomopatogênicos e endofíticos provenientes de plantios de eucalipto. No primeiro bioensaio *B. bassiana* foi testado em diferentes formulações sobre adultos e ninfas de 3º instar de *T. peregrinus*. Para o segundo bioensaio, a formulação de *B. bassiana* que apresentou maior virulência foi testada em diferentes concentrações ( $1,0 \times 10^8$ ;  $0,5 \times 10^8$ ;  $1,0 \times 10^7$ ;  $0,5 \times 10^7$ ;  $1,0 \times 10^6$ ;  $0,5 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) sobre adultos de *T. peregrinus*. Para o terceiro bioensaio as formulações de *B. bassiana* foram testadas quanto a capacidade de ativar as rotas metabólicas, realizando-se análises de fitoalexinas e Fal. O quarto bioensaio foi a partir de coletas de solo em cinco plantios de eucalipto. Os fungos desenvolvidos foram submetidos à análise molecular através da técnica de ISSR-PCR, com os *primers* CCA, CGA e CT. Também foi utilizado a técnica ITS com os *primers* ITS1 e ITS4 e o sequenciamento do DNA dos fungos. O Quinto bioensaio foi realizado a partir de coletas de folhas de eucalipto, provenientes dos mesmos povoamentos nos quais foram coletadas as amostras de solo, com o intuito de encontrar fungos endofíticos. Os fungos endofíticos também foram submetidos à análise molecular através da técnica de ISSR-PCR com os *primers* EF1-728F, EF1-986R, (EF1a) T1 e Bt-2b. Em seguida realizou-se a técnica ITS com os *primers* ITS1 E ITS4 e o sequenciamento do DNA dos fungos. No primeiro bioensaio ressalta-se os tratamentos/formulações T1 e T2, que acarretaram mortalidade de 94% e 92% respectivamente de adultos de *T. peregrinus*. Para ninfas de 3º instar de *T. peregrinus* os tratamentos T1, T2 e T4, provocaram mortalidade de 100%, 100% e 84% respectivamente. Já no segundo bioensaio as concentrações que causaram maior mortalidade de adultos de *T. peregrinus* foram  $1,0 \times 10^8$ ;  $0,5 \times 10^8$ ;  $1,0 \times 10^7$ ;  $1,0 \times 10^6$ ;  $0,5 \times 10^6$  que diferiram estatisticamente da concentração  $0,5 \times 10^7$  e da testemunha. No bioensaio de indução de resistência o tratamento T2 diferiu dos demais tratamentos e da testemunha, apresentando um valor de 0,3316 para fitoalexinas e de 0,0674 para Fal. Nas amostras de solo coletadas nos plantios de eucalipto, foram encontrados 15 isolados de possíveis fungos entomopatogênicos, com a análise ISSR-PCR foi possível obter resultados de amplificação com os três *primers* empregados. A análise filogenética dos fungos entomopatogênicos dividiu estes em três gêneros diferentes, *Penicillium*, *Mortierella* e *Purpureocillium*. Nas folhas de eucalipto também foram encontrados 15 isolados de possíveis fungos endofíticos, com a análise ISSR-PCR foi possível obter resultados de amplificação com os *primers* utilizados. Com análise filogenética destes fungos foram identificados três gêneros sendo: *Aspergillus*, *Botryosphaeria* e *Neofusicoccum*. Salienta-se que o fungo entomopatogênico *B. bassiana*, apresenta potencial para controle de *T. peregrinus* e também possui potencial como indutor de resistência. Com a identificação molecular dos fungos encontrados nas amostras de solo, e nas folhas constatou-se que a cultura do eucalipto, pode apresentar micro-organismos que tem potencial como controladores de insetos e doenças.

**Palavras-chave:** Agroecossistema. Eucalipto. Solo. Caracterização molecular

## ABSTRACT

TEDESCO, Flavia, Galvan. *Beauveria bassiana* formulations in the control of *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, (Hemiptera: Thaumastocoridae) and isolation of entomopathogenic and endophytic fungi in eucalyptus plantations. 2018. 67 f. Dissertation, (Master in Agroecosystems) - Postgraduate Program in Agroecosystems. Federal Technological University of Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

This work aimed to evaluate the potential insecticide of *Beauveria bassiana* on the eucalyptus bronze bug, *Thaumastocoris peregrinus*, to collect, identify and molecularly characterize entomopathogenic and endophytic fungi from eucalyptus plantations. In the first bioassay *B. bassiana* was tested in different formulations on adults and 3rd instar nymphs of *T. peregrinus*. For the second bioassay, the most virulent *B. bassiana* formulation was tested at different ( $1,0 \times 10^8$ ;  $0,5 \times 10^8$ ;  $1,0 \times 10^7$ ;  $0,5 \times 10^7$ ;  $1,0 \times 10^6$ ;  $0,5 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) on *T. peregrinus* adults. For the third bioassay the formulations of *B. bassiana* were tested for the ability to activate the metabolic routes, being carried out of phytoalexins and Fal. The fourth bioassay was from soil collections in five eucalyptus plantations. The fungi developed were submitted to molecular analysis using the ISSR-PCR technique, with the CCA, CGA and CT primers. The ITS technique with ITS1 and ITS4 primers and DNA sequencing of fungi were also used. The fifth bioassay was performed from eucalyptus leaves collected from the same stands in which soil samples were collected, in order to find endophytic fungi. Endophytic fungi were also subjected to molecular analysis using the ISSR-PCR technique with primers EF1-728F, EF1-986R, (EF1a) T1 and Bt-2b. Then the ITS technique was performed with the ITS1 and ITS4 primers and DNA sequencing of the fungi. In the first bioassay the treatments / formulations T1 and T2, which caused mortality of 94% and 92%, respectively, of adults of *T. peregrinus* are highlighted. For *T. peregrinus* 3rd instar nymphs T1, T2 and T4 treatments caused 100%, 100% and 84% mortality, respectively. In the second bioassay, the concentrations that caused the highest adult mortality of *T. peregrinus* were  $1,0 \times 10^8$ ;  $0,5 \times 10^8$ ;  $1,0 \times 10^7$ ;  $1,0 \times 10^6$ ;  $0,5 \times 10^6$  that differed statistically from the concentration  $0,5 \times 10^7$  and the control. In the resistance induction bioassay the T2 treatment differed from the other treatments and from the control, presenting a value of 0.3316 for phytoalexins and 0.0674 for Fal. In the soil samples collected from eucalyptus plantations, 15 isolates of possible entomopathogenic fungi were found, with the ISSR-PCR analysis it was possible to obtain amplification results with the three primers appointed. Phylogenetic analysis of entomopathogenic fungi divided these into three different genera, *Penicillium*, *Mortierella* and *Purpureocillium*. In the eucalyptus leaves were also found 15 isolates of possible endophytic fungi, with the ISSR-PCR analysis it was possible to obtain amplification results with the primers used. With phylogenetic analysis of these fungi, three genera were identified: *Aspergillus*, *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum*. It should be noted that the entomopathogenic *B. bassiana* fungus presents potential for *T. peregrinus* control and also has potential as an inducer of resistance. With the molecular identification of the fungi found in the soil samples, and in the leaves it was verified that the eucalyptus crop, can present microorganisms that have potential as controllers of insects and diseases.

**Keywords:** Agroecosystem. Eucalyptus. Soil. Molecular characterization

## Lista de Ilustrações

- Figura 1: Representação da obtenção de cada uma das replicatas de solo, provenientes das propriedades com plantio de eucalipto, que foram utilizadas para preparação dos bioensaios ..... 37
- Figura 2: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos, com o primer CCA. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas e os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra. .... 44
- Figura 3: Porcentagem de similaridades existente, com o primer CCA, entre os quinze indivíduos de fungos entomopatogênicos estudados, gerado a partir do programa estatístico Past ver. 3.18 pelo índice de Jaccard. .... 44
- Figura 4: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos, com o primer CGA. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas e os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra. .... 45
- Figura 5: Porcentagem de similaridades existente, com o primer CGA, entre os quinze indivíduos de fungos entomopatogênicos estudados, gerado a partir do programa estatístico Past ver. 3.18 pelo índice de Jaccard. .... 45
- Figura 6: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos, com o primer GT. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas e os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra. .... 46
- Figura 7: Porcentagem de similaridades existente, com o primer GT, entre os quinze indivíduos de fungos entomopatogênicos estudados, gerado a partir do programa estatístico Past ver. 3.18 pelo índice de Jaccard. .... 46
- Figura 8: Árvore filogenética construída com sequências do primer ITS1 da região de rDNA de fungos entomopatogênicos de solo com plantio de eucalipto. Utilizando o método neighbor-joining. Os números acima indicam a frequência (em porcentagem) de cada ramificação. .... 47
- Figura 9: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos endofíticos, com os primers (EF1a)-T1 e Bt-2b. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas e os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra. .... 51

Figura 10: Porcentagem de similaridades existente, com os primers (EF1a)-T1 e Bt-2b, entre os quinze indivíduos de fungos endofíticos estudados, gerado a partir do programa estatístico Past ver. 3.18 pelo índice de Jaccard. .... 52

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos endofíticos, com os primers EF1-986R e EF1-728F. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas e os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra. .... 52

Figura 12: Porcentagem de similaridades existente, com os primers EF1-986R e EF1-728F, entre os quinze indivíduos de fungos endofíticos estudados, gerado a partir do programa estatístico Past ver. 3.18 pelo índice de Jaccard..... 53

Figura 13: Árvore filogenética construída com sequências do primer ITS1 da região de rDNA de fungos endofíticos de folhas de eucalipto. Utilizando o método neighbor-joining. Os números acima indicam a frequência (em porcentagem) de cada ramificação. .... 54

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Mortalidade (%) ( $\pm$  EP) e longevidade em horas, de adultos e ninfas de terceiro ínstar de *Thaumastocoris peregrinus*, quando confinados com folhas de *Eucalyptus dunni* tratadas com *Beauveria bassiana* ou água destilada esterilizada. F: Resultado na ANOVA, p: porcentagem de significância. .... 27

Tabela 2: Mortalidade (%) ( $\pm$  EP) e longevidade em horas, de adultos de *Thaumastocoris peregrinus*, quando confinados com folhas de *Eucalyptus dunni* tratadas com diferentes concentrações de *Beauveria bassiana* ou água destilada esterilizada. F: Resultado na ANOVA, p: porcentagem de significância. .... 29

Tabela 3: Fitoalexinas ( $\pm$ EP) e fenilalanina amônia-liase (Fal) ( $\pm$ EP), para cotilédones de soja, para os cinco tratamentos (T1, T2, T3, T4 e T5), sendo que T1, T2, T3, T4 são diferentes formulações do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e T5 composto pela testemunha com água destilada esterilizada. F: Resultado na ANOVA, p: porcentagem de significância. .... 30

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1 CULTURA DO EUCALIPTO.....	14
2.1.1 Interações biológicas na cultura do Eucalipto .....	14
2.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	15
2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	17
2.4 INSETOS EXÓTICOS DO EUCALIPTO .....	18
2.4.1 <i>Thaumastocoris peregrinus</i> (Hemiptera: Thaumastocoridae).....	19
<b>Capítulo I- Potencial de quatro formulações a base de <i>Beauveria bassiana</i> para controle de <i>Thaumastocoris peregrinus</i></b> .....	21
<b>3 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
4.1 VIRULENCIA DE <i>Beauveria bassiana</i> SOBRE <i>Thaumastocoris peregrinus</i> .....	24
4.2 POTENCIAL DE <i>Beauveria bassiana</i> COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS .....	25
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
5.1 VIRULENCIA DE <i>Beauveria bassiana</i> SOBRE <i>Thaumastocoris peregrinus</i> .....	27
5.2 POTENCIAL DE <i>Beauveria bassiana</i> COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS .....	30
<b>Capítulo II- Identificação e caracterização molecular de fungos entomopatogênicos e endofíticos coletados em plantios de eucalipto</b> .....	33
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
2.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SOLO, PREPARO DAS SOLUÇÕES E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	36
2.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ..	37
2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ENDOFÍTICOS .....	38
2.4 ISSR-PCR DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS .....	39
2.5 ISSR-PCR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	40
2.6 ITS-PCR DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ENDOFÍTICOS .....	40
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	43

3.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	43
3.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	50
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As florestas plantadas tornaram-se uma importante atividade econômica no Brasil, por produzirem riqueza e desenvolvimento social, bem como menor impacto ambiental. A área ocupada por plantios florestais no Brasil, em 2016, foi de 7,84 milhões de hectares, sendo que destes, 5,7 milhões de hectares são plantios de eucalipto, o que representa 72,7% do total de plantios florestais do país (IBÁ, 2017). A eucaliptocultura é uma alternativa promissora no que se refere ao uso da madeira, por sua versatilidade e redução de pressão sobre extração de madeira de florestas nativas. Os extensos plantios estabelecidos no país, favoreceram a adaptação de alguns insetos, junto a isso, a disponibilidade de alimento e a baixa diversidade dos plantios interferiu no equilíbrio das populações destes insetos, possibilitando, muitas vezes, um aumento populacional descontrolado, elevando-os ao status de pragas (QUEIROZ; BARBOSA, 2014). Em um agroecossistema pode-se encontrar uma intensa biodiversidade organismos, dentre esses, insetos e micro-organismos.

8Devido ao fato dos micro-organismos serem encontrados naturalmente no ambiente, estes podem ocasionar doenças em populações de artrópodes. Em muitos casos, esse controle populacional torna-se expressivo e contribui para a redução na aplicação de inseticidas químicos (ALVES; LOPES, 2008). Entre estes micro-organismos, alguns fungos entomopatogênicos possuem vantagens sobre os demais entomopatógenos, pois conseguem manter-se no solo e/ou na água como saprófitos e eventualmente parasitar insetos (CARRANO-MOREIRA, 2014). Estes entomopatógenos infectam os insetos tanto via oral quanto por contato, o que facilita o controle de insetos que podem comprometer a produção florestal e/ou agrícola (ALVES, 1998).

Além dos fungos entomopatogênicos, os fungos endofíticos também são encontrados com grande diversidade no ambiente. Estes associam-se as plantas e colonizam seus tecidos vegetais. Essa colonização não causa danos e auxilia na sanidade da planta controlando micro-organismos fitopatogênicos e insetos (AZEVEDO, 1999; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Fungos endofíticos de eucalipto não possuem seu potencial estudado quanto ao controle de insetos-praga. No entanto, uma vasta diversidade é explorada em diferentes espécies vegetais.

A correta identificação dos fungos entomopatogênicos e endofíticos é de extrema importância, para se confirmar a espécie com que se está trabalhando. Para esta finalidade são utilizadas técnicas de biologia molecular, os marcadores moleculares. Dentre os



marcadores, destaca-se: ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), que é utilizado para a identificação de fungos, principalmente de isolados retirados de um mesmo agroecossistema (GARRIDO-JURADO et al., 2015; JOSHI et al., 2009; MAHLANZA et al., 2013; ORMOND et al., 2010; RUMA et al., 2015; TAKATSUKA, 2007; WANG et al., 2013). Outro marcador é o sequenciamento de locais específicos do genoma, como por exemplo ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que também pode ser utilizado na taxonomia molecular para distinguir a espécie com que se está trabalhando (DOLINSKY, 2007).

Os fungos entomopatogênicos e endofíticos, perante ao seu potencial, são pouco estudados para o controle de insetos-pragas de espécies florestais. O controle de insetos é realizado, muitas vezes, com a utilização de inseticidas químicos, o que eleva os gastos e causa a contaminação ambiental. Uma alternativa para diminuir custos e impactos é utilizar o controle biológico, o qual ocorre naturalmente, podendo ser conservado ou incrementado através da aplicação de produtos comerciais.

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. é utilizado para o controle de diversos insetos-praga, e também está sendo utilizado em estudos para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae), sendo que o mesmo já foi citado como de ocorrência natural causando mortalidade em *T. peregrinus* a campo (LORENCETTI, et al., 2017; RIBEIRO, 2016; SOLIMAN, 2014).

Um dos insetos-praga mais importantes da cultura do eucalipto é o percevejo bronzeado, *T. peregrinus*, inseto sugador que com seu aparelho bucal perfura e suga a seiva das folhas, reduzindo a taxa fotossintética, levando-as a senescência prematura (WILCKEN; FILHO, 2008; SMANIOTTO, MÁRCIA et al., 2017).

O potencial proporcionado pelos fungos entomopatogênicos para o controle de pragas florestais, faz com que estes se tornem cada vez mais estudados e procurados. Contudo, uma mesma espécie de fungo entomopatogênico apresenta diferentes isolados, sendo que cada um pode apresentar virulência diferente, sobre uma determinada espécie de inseto. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial inseticida de *Beauveria bassiana* sobre o percevejo-bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus*, coletar, identificar e caracterizar molecularmente fungos entomopatogênicos e endofíticos provenientes de plantios de eucalipto.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CULTURA DO EUCALIPTO

O eucalipto tem ocorrência natural na Austrália e foi introduzido no Brasil em 1904 (EMBRAPA, 2014). O objetivo da introdução da espécie no país foi para suprir as necessidades de lenha, postes e dormentes das estradas de ferro na região sudeste do Brasil (DOSSA; BELLOTE; RODIGHIERI, 2002; EMBRAPA, 2012, EMBRAPA, 2014).

Um dos principais fatores que determinaram a expansão do eucalipto no mercado foi a produtividade, devido ao seu rápido crescimento. A produtividade média de plantios de eucalipto atingiram 35,7 m<sup>3</sup>/ha/ano, resultado que fez com que o Brasil liderasse o ranking global de produtividade florestal em 2016 (IBÁ, 2017).

As florestas plantadas tornaram-se uma importante atividade no Brasil, pois geram recursos financeiros e desenvolvimento social, bem como baixo impacto ambiental. A eucaliptocultura é uma alternativa promissora no que se refere ao uso da madeira, por sua versatilidade e redução de pressão sobre as florestas nativas. A área ocupada por plantios florestais no Brasil, em 2016, foi de 7,84 milhões de hectares, sendo que destes, 5,7 milhões de hectares são ocupados pelos plantios de eucalipto, o que representa 72,7% do total de plantios florestais do país (IBÁ, 2017).

A proximidade taxonômica, morfológica e fisiológica do eucalipto com diferentes espécies brasileiras, por este pertencer a família Myrtaceae (a qual possui muitas espécies no país), favoreceu a adaptação de alguns insetos a esta espécie. A disponibilidade de alimento somada à baixa heterogeneidade dos plantios, interferem no equilíbrio das populações destes insetos, possibilitando muitas vezes um aumento populacional descontrolado, incorporando-os ao status de pragas (CARRANO-MOREIRA, 2014; QUEIROZ; BARBOSA, 2014; EMBRAPA, 2010).

#### 2.1.1 Interações biológicas na cultura do Eucalipto

O agroecossistema é formado por uma elevada diversidade de seres vivos conectados e dependentes uns dos outros (VIVAN, 1998). Em um plantio de eucalipto verifica-se essa diversidade de diferentes tipos de organismos, dentre esses, insetos e micro-organismos. Os insetos que fazem parte deste agroecossistema possuem diferentes

funções e nem sempre são pragas. No entanto, os insetos considerados pragas, são aqueles que trazem dano econômico à cultura e necessitam de um controle (CARRANO-MOREIRA, 2014).

Assim, esses insetos, dentro do agroecossistema, podem ser controlados por micro-organismos de solo, como os fungos entomopatogênicos, ou pelos fungos que vivem em associação com as plantas colonizando seus tecidos vegetais, chamados endofíticos (ALVES, 1998; SPEIGHT; HUNTER; WATT, 2008).

Os fungos entomopatogênicos podem ser facilmente encontrados em solos de diferentes agroecossistemas. Devido à sua etiologia, morfologia, , variabilidade genética e sua forma de dispersão os fungos entomopatogênicos são importantes no controle de insetos-praga (ALVES, 1998).

Já os fungos endofíticos colonizam os tecidos dos hospedeiros, sem causar nenhum malefício (HYDE; SOYTONG, 2008). Entretanto, na cultura do eucalipto estes fungos não possuem seu potencial estudado quanto a controle de insetos-praga. No entanto, uma vasta diversidade é encontrada em diferentes espécies vegetais.

## 2.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Os fungos entomopatogênicos foram os primeiros patógenos de insetos utilizados no controle microbiano. A grande variabilidade genética destes entomopatógenos e a capacidade de infectar insetos em todos os estádios de desenvolvimento, podem ser consideradas vantagens quando comparados a outros entomopatógenos (ALVES, 1998; ALVES; LOPES, 2008; LOUREIRO et al., 2012; PRESTES et al., 2015).

Devido a ocorrência natural destes fungos nos agroecossistemas, quando em condições favoráveis, proporcionam epizootias naturais, controlando assim populações de pragas. As estratégias para utilizar fungos no controle de insetos são consideradas simples e econômicas por estes conseguirem realizar epizootias em condições de umidade e temperatura adequada (SILVA; NEVES; SANTORO, 2005). Para isto, a infecção da maioria dos fungos entomopatogênicos se inicia quando o conídio ou esporo cai sobre o corpo do inseto e por forças eletrostáticas e em alguns casos substância mucilaginosa fazem com que estes fiquem aderidos ao corpo. O conídio começa a germinar e forma o tubo germinativo, até encontrar regiões de fácil penetração (boca, espiráculos, ânus e até ferimentos), formando então na extremidade do tudo germinativo um apressório. Na parte inferior do apressório ocorre uma diferenciação tornando a mais fina e iniciando o

processo de penetração. As hifas então começam a penetrar no sistema adiposo do inseto, depois no sistema digestório que começa a obstruir fazendo com que o inseto reduza sua alimentação, o fungo libera toxinas que matam as bactérias que estão no trato digestório do inseto, os movimentos do inseto se tornam reduzidos e o fungo começa a migrar para outros tecidos, colonizando todo o corpo do inseto. Posteriormente o fungo se reproduz, sendo então necessário sair do corpo do inseto. A saída do micélio para que ocorra a esporulação acontece geralmente pelas regiões menos rígidas com as articulações e espiráculos, e acontece na forma assexuada começando a conidiogênese (ALVES, 1998).

Devido ao seu modo de ação, os fungos entomopatogênicos possuem vantagens sobre os outros entomopatógenos no controle de alguns insetos que apresentam aparelho bucal sugador labial, como cochonilhas, percevejos, pulgões, cigarrinhas, dentre outros. Cochonilhas *Orthezia praelonga* Douglas (Hemiptera: Ortheziidae), coletadas em pomar de laranjeira, sem utilização de produtos químicos ou biológicos apresentaram fungos do gênero *Penicillium*, *Trichoderma*, *Metarhizium*, *Beauveria* e *Lecanicillium* (WEILER, 2011). Destaca-se ainda a ocorrência natural de *B. bassiana* em *T. peregrinus*, no estado do Paraná (LORENCETTI et al., 2017).

Diante dos fatores descritos, os fungos entomopatogênicos são constantemente estudados para o controle de insetos-praga como, populações de *Glycaspis brimblecombei* (Hemiptera: Psyllidae) psilídeo-de-concha do eucalipto. A Embrapa Florestas-Colombo, verificou que esta espécie pode ser controlada por diferentes fungos entomopatogênicos (SANTANA, 2003). Em outros estudos, verificou-se que isolados de *B. bassiana* e *Isaria* sp. são capazes de promover infecção em adultos de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae), inseto-praga de espécies florestais (LORENCETTI et al., 2017).

Os fungos entomopatogênicos também são estudados quanto à possibilidade de indução de resistência nas plantas. Estes estudos objetivam observar se os fungos, além de causar doença nos insetos, pode estimular as rotas metabólicas das plantas, ativando assim os mecanismos de defesa. A indução de resistência busca estudar produtos que possam desencadear mecanismos de defesa na planta. Sendo que existem múltiplos mecanismos de defesa, os quais são eficientes. Esses mecanismos podem ou não ser desencadeados pela chegada de patógenos nas plantas (BARROS et al., 2010).

Na identificação de fungos entomopatogênicos, encontrados nos agroecossistemas, pode-se utilizar técnicas de caracterização morfológica e também técnicas de Biologia Molecular. Esta técnica possui enfoque na estrutura e função dos

genes a nível molecular. Utilizando as técnicas de biologia molecular pode-se avaliar a espécie de fungo que está se trabalhando, bem como relacionar quais espécies de fungos foram coletadas em um determinado agroecossistema (DOLINSKY, 2007).

Dentre vários métodos, o controle biológico é a forma mais eficaz e correta dentro da área florestal e também para os processos de certificação florestal, somado ao controle alternativo, com a utilização de produtos fitossanitários de origem natural. Além dos fungos entomopatogênicos, os fungos endofíticos também podem apresentar potencial para provocar a mortalidade em insetos.

### 2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos vivem, sistematicamente, no interior das plantas, onde se associam ao hospedeiro colonizando tecidos de diferentes estruturas como: folhas, raízes e ramos. Essa interação pode ser simbiótica pois não causa danos e pode auxiliar na sanidade da planta contribuindo para o controle de micro-organismos fitopatogênicos e insetos (AZEVEDO, 1999; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Todas as espécies vegetais podem apresentar algum tipo de interação com fungos endofíticos, podendo agregar um ou mais micro-organismos (SILVA, 2014), que, em algum estágio do seu ciclo de vida, irão colonizar partes do vegetal ( BORGES et al., 2009; SOUZA et al., 2004).

Os fungos endofíticos *Epicoccum nigrume* e *Neotyphodium* sp. apresentam capacidade de controlar patógenos que causam apodrecimento radicular de pupunheiras (*Bactris gasipaes* Kunth) *in vitro* (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005). O fungo endofítico *Curatella americana*, inibe o fitopatógeno *Colletotrichum truncatum* (OLIVEIRA, et al. 2011). Fungos endofíticos tais como: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. impedem o crescimento do mofo-cinzento. A espécie *Botrytis cinnerea* (*in vitro*) demonstrou não causar prejuízos as folhas do seu hospedeiro, *Eucalyptus benthamii* (SBRAVATTI JÚNIOR et al., 2013).

Com o potencial ainda inexplorado no controle de insetos, a caracterização molecular dos fungos endofíticos é de suma importância, por auxiliar na confirmação da espécie e mostrar também a diversidade de fungos existentes em folhas de diferentes espécies de eucalipto. A técnica ISSR-PCR é uma técnica para diferenciar espécies e isolados geneticamente bastante próximos e pode ser usada para taxonomia de fungos

entomopatogênicos coletados de um mesmo agroecossistema (ORMOND et al., 2010), como também ser aplicada para os fungos endofíticos.

## 2.4 INSETOS EXÓTICOS DO EUCALIPTO

A introdução de insetos exóticos no setor florestal brasileiro vem causando perdas na produção (IPEF, 2003). Estes insetos são considerados insetos-praga após a caracterização da injúria, juntamente com dano econômico, ambiental e social (CARRANO-MOREIRA, 2014). Muitos insetos estão causando danos e comprometendo a produção das florestas de eucalipto, portanto é necessária a busca constante de alternativas de controle.

Alguns dos principais insetos-praga do eucalipto no Brasil são as formigas cortadeiras *Atta* spp. e *Acromyrmex* spp. (Hymenoptera: Formicidae), os cupins *Cryptotermes* spp. e *Heterotermes* spp. (Isoptera: Termitidae), as lagartas desfolhadoras *Caligo* spp., *Glena* spp. e *Thyrintina arnobia* (Lepidoptera), os besouros desfolhadores *Gonipterus* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae), os psilídeos *Glycaspis* spp. (Hemiptera: Psyllidae) e o percevejo-bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae) (QUEIROZ; BARBOSA, 2014).

Como exemplo dos insetos que ocasionam danos à cultura *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemiptera: Psyllidae), vulgarmente conhecido como psilídeo-de-concha, é um inseto originário da Austrália e se alimenta da seiva de *Eucalyptus* spp. (BORGES et al., 2009). Os danos causados por esses insetos são decorrentes da sucção da seiva das folhas, e em casos de elevada infestação as conchas que protegem as ninfas impedem a realização da fotossíntese. Ocorrendo desta forma a descoloração das folhas e posteriormente queda das mesmas (LAUDONIA; GARONNA, 2010).

*Gonipterus platensis*, (Coleoptera: Curculionidae) e *Gonipterus pulverulentus* (Coleoptera: Curculionidae) são popularmente conhecidos como gorgulhos-do-eucalipto (SOUZA et al., 2016). Os danos causados por esses insetos ocorrem durante todo o ciclo. Iniciando com a eclosão das larvas e a alimentação pela raspagem do limbo foliar. As larvas, quanto mais desenvolvidas maior é a quantidade de alimento necessária, causando assim, danos nas brotações. Finalmente os adultos passam a se alimentar também das folhas e de ramos tenros (CORASSA; SOUZA, 2014; TOOKE, 1955).

A vespa-da-galha, *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) é um inseto de origem australiana, ocasionando desfolha, encarquilhamento e secamento de ponteiros quando presentes nos ramos mais finos, e modificação das folhas quando presentes na nervura central e pecíolo (LUNZ; CALÁBRIA; COSTA, 2014; WILCKEN; FILHO, 2008). O percevejo-bronzeado *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae), é um inseto sugador que ataca a cultura do eucalipto e, atualmente, é uma das pragas mais importantes dessa cultura (SMANIOTTO, MÁRCIA et al., 2017; WILCKEN; FILHO, 2008).

#### 2.4.1 *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae)

O percevejo-bronzeado do eucalipto, *T. peregrinus*, apresenta coloração castanha com adultos medindo cerca de 3 mm de comprimento e 0,96 mm de largura (CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006). Este inseto é originário da Austrália e foi registrado no Brasil, em 2008, no estado do Rio Grande do Sul, na cidade de São Francisco de Assis, sobre híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. O percevejo-bronzeado disseminou-se para vários estados do país, como: São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Goiás (BARBOSA et al., 2010; LORENCETTI, et al., 2015; WILCKEN et al., 2010).

Os danos causados por *T. peregrinus* estão relacionados ao seu aparelho bucal sugador labial, o qual utiliza para perfurar e sugar a seiva das folhas, as quais, passam a ficar com aspecto prateado, reduzindo a área fotossintética, seguindo para uma morfologia bronzeada e, conseqüentemente, ocorrendo a queda das mesmas (BARBOSA et al., 2010; CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006; SOLIMAN et al., 2012; SMANIOTTO et al., 2017; WILCKEN et al., 2010).

O inimigo natural registrado é o parasitoide *Cleruchoides noackae* Lin. e Huber (Hymenoptera: Mymaridae), o qual inviabiliza os ovos do percevejo através da postura dos seus ovos no interior dos ovos do percevejo (EMBRAPA, 2010; IPEF, 2010; BARBOSA et al., 2017). Outros estudos vêm sendo desenvolvidos na busca de possíveis inimigos naturais nativos do Brasil e com potencial para controlar *T. peregrinus*, como a larva do predador *Chrysoperla externa* Hagen (Neuroptera: Chrysopidae), conhecido como bicho-lixeiro, a qual se alimenta das ninfas de *T. peregrinus* (WILCKEN et al., 2010). Outro predador identificado é *Atopozelus opsimus* Elkins (Hemiptera: Reduviidae), que se alimenta tanto de ninfas quanto de adultos de *T. peregrinus*

(SOLIMAN, 2010). Além disso, destacam-se os fungos entomopatogênicos (VICENTINI; FARIA; OLIVEIRA, 2001; XAVIER; ÁVILA, 2006; LOUREIRO et al., 2012; SILVA et al., 2012; PRESTES et al., 2015) e a possibilidade de utilizar fungos endofíticos.

Devido ao fato do percevejo-bronzeado se alimentar por sucção, a alternativa mais viável para controle por entomopatógenos é a utilização dos fungos, isto porque os fungos entomopatogênicos agem tanto por contato quanto por ingestão, sendo uma vantagem frente a outros entomopatógenos, os quais na maioria dos casos age apenas por ingestão. Por ser também um inseto sugador, o inseto pode ingerir fungos endofíticos que se encontram no interior das plantas.

A grande versatilidade da utilização dos fungos se dá devido a estes micro-organismos conseguirem infectar o inseto em todas as suas fases de desenvolvimento, e também serem facilmente encontrados no ambiente. Produtos biológicos a base de fungos entomopatogênicos apresentam potencial para o controle de insetos, em especial insetos sugadores, como *T. peregrinus*. No entanto *T. peregrinus* ainda não possui produtos biológicos registrados para seu controle, pois são necessários estudos de desenvolvimento que selecionem um isolado virulento, de preferência com capacidade de causar epizootias e que possam chegar a uma formulação comercial (ALVES, 1998; AGROFIT, 2018).

Por serem os fungos entomopatogênicos e endofíticos de ocorrência natural, podem ser isolados, caracterizados e testados quanto ao potencial para controlar *T. peregrinus*. Outra forma de fazer com que o percevejo se alimente menos, reduza a reprodução e, conseqüentemente, diminua sua população é tornando sua alimentação menos preferida, por meio da indução de resistência. Para isto, é necessário buscar formas de desencadear os mecanismos de defesa da planta (BARROS et al., 2010).



**Capítulo I- Potencial de quatro formulações a base de *Beauveria bassiana* para controle de *Thaumastocoris peregrinus***

### 3 INTRODUÇÃO

O percevejo-bronzeado do eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae), é um inseto de coloração castanha, com adultos medindo cerca de 3 mm de comprimento. Este inseto foi registrado no Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, em 2008. Os danos causados por *T. peregrinus* estão relacionados ao seu aparelho bucal sugador labial, o qual utiliza para sugar a seiva das folhas, que passam a ficar com aspecto prateado seguindo para uma coloração bronzeada e, conseqüentemente, ocorrendo a queda das mesmas (BARBOSA et al., 2010; CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006; SMANIOTTO, et al., 2017; SOLIMAN et al., 2012; WILCKEN et al., 2010).

O controle de pragas florestais é realizado, muitas vezes, com a utilização de inseticidas sintéticos, o que gera custos, contaminação e impacto ao ambiente e dos aplicadores e é um empecilho na certificação florestal. Na tentativa de minimizar os danos causados às plantas e não prejudicar o ambiente, o controle biológico, alternativo e a indução de resistência vêm se destacando (GALLO et al., 2002; KOUL; WALIA, 2009; LACEY et al., 2015; SCHWAN-ESTRADA, 2009). No que se refere ao controle biológico os fungos entomopatogênicos possuem vantagem sobre os demais microorganismos, pois conseguem manter-se no solo e/ou na água como saprófitos e, eventualmente, parasitar insetos (CARRANO-MOREIRA, 2014).

*Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. é uma espécie de fungo entomopatogênico que pode ser encontrada naturalmente sobre insetos (PISSINATI et al., 2009; PRESTES et al., 2015) ou no solo (FERNÁNDEZ-BRAVO et al., 2016; MASCARIN; JARONSKI, 2016). Este fungo já foi registrado causando epizootia em insetos adultos de *T. peregrinus* em campo (LORENCETTI et al., 2017). A infecção dos insetos ocorre via tegumento, oral e também pelo sistema respiratório, quando os conídios do fungo aderem à cutícula do inseto (ALVES, 1998; ALVES; LOPES, 2008; ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013), sendo esta, uma vantagem quando comparado a outros entomopatogênicos. O fungo entomopatogênico *B. bassiana*, além de causar a mortalidade do inseto, como já verificado em laboratório e em campo (LORENCETTI et al., 2017), pode induzir a resistência em plantas. Este fato pode ocorrer, pois a quitosana é um material encontrado na parede celular de algumas espécies de fungos (AZEVEDO et al., 2007) e é descrita na literatura como indutora de resistência em plantas a doenças (FELIPINI; PIERO, 2009; LORENCETTI et al., 2015; MAZARO et al., 2012).

Este potencial apresentado pelos fungos entomopatogênicos para o controle de insetos de importância florestal, torna-os cada vez mais destacados. Além disso, uma mesma espécie de fungo entomopatogênico apresenta inúmeros isolados, sendo que cada um pode apresentar diferente potencial de virulência sobre uma determinada espécie de inseto. Soma-se a isso a formulação utilizada nos produtos comerciais, que podem potencializar ou não sua ação. O fungo *B. bassiana* é produzido em escala comercial (HALFELD-VIEIRA et al., 2016), o que faz com que produtores tenham acesso ao mesmo para utilização em sua propriedade e este seja utilizado com maior frequência em relação aos demais e em maior número de culturas (AGROFIT, 2018). Porém, cada produto apresenta uma formulação específica. O fato de entrar em contato com as plantas, pode, além de controlar *T. peregrinus*, atuar ativando as rotas metabólicas fazendo com que ativem os mecanismos de resistência vegetal. Soma-se a isso o fato de não haver produto (bioinseticida) biológico registrado para este inseto.

Neste sentido objetivou-se avaliar a virulência de quatro formulações do fungo entomopatogênico *B. bassiana* para o controle de *T. peregrinus* e o potencial destas na indução de mecanismos de resistência de plantas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os insetos adultos de *T. peregrinus* utilizados nos experimentos foram obtidos da segunda geração a partir de ovos oriundos da Embrapa Florestas, que foram mantidos em criação estabelecida no Laboratório de Controle Biológico I da UTFPR-DV. A criação é mantida em sala climatizada ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R.  $60 \pm 10\%$ , fotofase de 12 h), em ramos de *Eucalyptus dunnii* (Maiden) (Myrtales: Myrtaceae) obtidos a partir do povoamento existente na própria instituição. Os ramos foram coletados e desinfetados com hipoclorito de sódio a 1%, posteriormente, estes ramos foram alocados em erlenmeyers de 250 mL com água para manter a turgidez dos mesmos, os quais são trocados a cada três dias. Para a oviposição de *T. peregrinus* foram fornecidas tiras de papel toalha, nas quais os adultos depositam seus ovos nas depressões.

As quatro formulações à base de *B. bassiana*, foram fornecidas pela empresa Simbiose® Indústria e Comercio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos LTDA (Termo de Cooperação Técnica N° 06/2017, processo N° 23064.002826.2017-11).

### 4.1 VIRULENCIA DE *Beauveria bassiana* SOBRE *Thaumastocoris peregrinus*

Para realização dos bioensaios foram utilizadas folhas de *E. dunnii*, as quais não continham tratamento fitossanitário. Na sequência as mesmas foram desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1% e, após secas, foram imersas por cinco segundos na solução dos respectivos tratamentos/formulações T1, T2, T3 e T4 (quatro formulações distintas do fungo *B. bassiana* isolado IBCB 66) na concentração de  $1,0 \times 10^8$  conídios.mL<sup>-1</sup>. A testemunha (T5) foi composta por água destilada esterilizada contendo Tween 80® (0,01%). O pecíolo de cada folha tratada foi acoplado na tampa de um vidro (capacidade de 5 mL) contendo água, a fim de manter a turgidez destas. As folhas acopladas nos vidros foram dispostas dentro de caixas esterilizadas de poliestireno cristal transparente, tipo gerbox, (11×11×3,5cm) sendo, substituídas a cada três dias, e estas não receberam os tratamentos.

Cada tratamento foi composto por cinco caixas de poliestireno cristal transparente, tipo gerbox, contendo uma folha de *E. dunnii* com 10 insetos cada, sendo cada caixa considerada uma repetição. Foram realizados dois bioensaios, um com insetos adultos e outro com as ninfas de terceiro ínstar de *T. peregrinus*, com idade e origem controladas. As caixas gerbox contendo os tratamentos e os insetos foram vedadas com filme PVC,

devidamente identificadas e, posteriormente, transferidas para uma câmara climatizada tipo B.O.D. (temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R.  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 12 h). Os insetos foram avaliados a cada 12 horas, por um período de 168 horas a fim de verificar a mortalidade e a longevidade.

A formulação de *Beauveria bassiana* que apresentou maior virulência, foi testada em seis concentrações diferentes, para isto foram utilizadas as seguintes concentrações: T1) *Beauveria bassiana*  $1,0 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ; T2) *Beauveria bassiana*  $0,5 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ; T3) *Beauveria bassiana*  $1,0 \times 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ; T4) *Beauveria bassiana*  $0,5 \times 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ; T5) *Beauveria bassiana*  $1,0 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  e; T6) *Beauveria bassiana*  $0,5 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  e T7) testemunha, composta por água destilada esterilizada contendo Tween 80<sup>®</sup> (0,01%). A metodologia para realização deste bioensaio seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente, no entanto avaliado apenas em adultos de *T. peregrinus*.

#### 4.2 POTENCIAL DE *Beauveria bassiana* COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS

As sementes de soja produzida de forma orgânica *Glycine max* (L.) Merrill, cultivar BRS 284, foram fornecidas pela empresa Gebana Brasil e utilizadas neste bioensaio, por ser uma planta padrão para avaliar mecanismos de indução de resistência. Os tratamentos utilizados foram quatro formulações diferentes de um mesmo isolado de *B. bassiana* (IBCB 66), e a testemunha composta por água destilada esterilizada. As sementes de soja, previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio a 1 %, foram semeadas em areia esterilizada no interior de bandejas brancas (60×40cm), e mantidas em casa de vegetação. Depois de 10 dias da emergência dos cotilédones os mesmos foram colhidos e passaram por um processo de lavagem com água destilada esterilizada.

Na parte superior dos cotilédones foi realizado um corte de 2 mm, o qual recebeu 40 $\mu\text{L}$  da suspensão dos respectivos tratamentos, cada tratamento foi composto por quatro repetições e cada repetição possuía quatro cotilédones de soja, totalizando 80 cotilédones. Em seguida os cotilédones foram pesados e inseridos em placas de petri (60×15mm) forradas com papel filtro esterilizado e umedecido, sendo alocados quatro cotilédones por placa. Posteriormente as placas foram tampadas e incubadas em BOD a  $26^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  no escuro, por 20 horas. Os cotilédones foram retirados e colocados em beakers de vidro contendo 10 ml de água destilada e então agitados em mesa agitadora orbital tipo Shaker

a temperatura ambiente por uma hora para a extração de gliceolina. A solução foi filtrada em papel filtro Whatman nº41 e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 285nm, de acordo com metodologia descrita por Hahn; Albersheim (1978).

#### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de mortalidade de *T. peregrinus*, fitoalexinas e fenilalanina amônia liase (Fal) dos cotilédones de soja foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors e Shapiro–Wilk, seguindo os pressupostos de normalidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott (SILVA; AZEVEDO, 2016).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 VIRULENCIA DE *Beauveria bassiana* SOBRE *Thaumastocoris peregrinus*

O fungo *B. bassiana*, nos tratamentos/formulações T1 e T2, ocasionou maior mortalidade de adultos de *T. peregrinus* num menor espaço de tempo, diferindo dos demais tratamentos. A formulação T4 também diferiu dos demais tratamentos, porém provocando mortalidade inferior à observada quando *T. peregrinus* entrou em contato com T1 e T2. O tratamento T3 não diferiu da testemunha (F 20,95 e p <0,001) (Tabela 1).

Os tratamentos T1, T2 e T4 de *B. bassiana* provocaram maior mortalidade, num menor espaço de tempo, em ninfas de 3º ínstar de *T. peregrinus*. Neste caso apenas o tratamento T3 não se mostrou eficiente para o controle das ninfas, não diferindo da testemunha (F 7,76 e p <0,001) (Tabela 1).

Tabela 1: Mortalidade (%) ( $\pm$  EP) e longevidade em horas, de adultos e ninfas de terceiro ínstar de *Thaumastocoris peregrinus*, quando confinados com folhas de *Eucalyptus dunni* tratadas com *Beauveria bassiana* ou água destilada esterilizada. F: Resultado na ANOVA, p: porcentagem de significância.

	Tratamento	Mortalidade (%)	Longevidade (horas)
Adultos	<i>B. bassiana</i> (T1)	94,0 $\pm$ 4,00 a	59,74
	<i>B. bassiana</i> (T2)	92,0 $\pm$ 4,89 a	81,39
	<i>B. bassiana</i> (T3)	20,0 $\pm$ 5,47 c	85,20
	<i>B. bassiana</i> (T4)	52,0 $\pm$ 13,92 b	116,50
	Testemunha	6,0 $\pm$ 4,00 c	108,00
	F		20,95
	P		<0,01
	CV		31,94
Ninfas 3º Ínstar	Tratamento	Mortalidade (%)	Longevidade (horas)
	<i>B. bassiana</i> (T1)	100,0 $\pm$ 0,00 a	54,24
	<i>B. bassiana</i> (T2)	100,0 $\pm$ 0,00 a	58,32
	<i>B. bassiana</i> (T3)	64,0 $\pm$ 9,79 b	83,25
	<i>B. bassiana</i> (T4)	84,0 $\pm$ 9,79 a	77,42
	Testemunha	32,0 $\pm$ 19,33 b	132,00
	F		7,76
P		<0,01	
	CV		30,19

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,001).

Do mesmo modo que as formulações testadas neste trabalho, isolados de *B. bassiana* e de *Isaria* sp. (IBCB 75, IBCB 210, IBCB 254, UTFPR 01, IBCB 367) foram patogênicos ao percevejo-bronzeado *T. peregrinus* em condições de laboratório. No

entanto, a maior porcentagem de mortalidade confirmada foi ocasionada por *Isaria* sp. (87%) seguido por *B. bassiana*, IBCB 254, IBCB 210, UTFPR 01 e IBCB 75 (80,1%, 75,3%, 72,5% e 37%), respectivamente, (LORENCETTI et al., no prelo).

Diferentes isolados de fungos entomopatogênicos já foram estudados e testados sobre outros insetos da ordem Hemiptera. Dentre estes, isolados de *B. bassiana* demonstram potencial inseticida sobre ninfas e adultos de *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera: Cydnidae) (XAVIER; ÁVILA, 2006), *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) (ARAUJO-JUNIOR; MARQUES; OLIVEIRA, 2009), *Gyropsylla spagazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) (ALVES et al., 2013) e *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae) (SHRESTHA; ENKEGAARD; STEENBERG, 2015).

*Beauveria bassiana* em formulação comercial, isolado IBCB 66, foi testado sobre ovos, ninfas e adultos de *T. peregrinus* em condições de laboratório. No entanto, o isolado foi virulento apenas para ninfas de 4º e 5º ínstar do percevejo. Em análise histológica realizada com adultos deste inseto foi observado a presença de conídios, conidióforos e hifas do fungo entomopatogênico *B. bassiana* (RIBEIRO, 2016). Os dados obtidos por este autor diferem dos dados obtidos neste estudo, no qual se utilizou o mesmo isolado, IBCB 66, no entanto, em outra formulação. No presente trabalho o fungo entomopatogênico *B. bassiana* foi virulento a adultos e ninfas de 3º ínstar de *T. peregrinus*.

O tratamento/formulação T1 causou maior mortalidade em adultos e ninfas de 3º ínstar de *T. peregrinus*, sendo 94% em 59,74 horas para adultos e 100% em 54,24 horas para ninfas. Desta forma, este foi avaliado em diferentes concentrações sobre adultos de *T. peregrinus*.

O fungo *B. bassiana* nas concentrações  $1,0 \times 10^8$ ;  $0,5 \times 10^8$ ;  $1,0 \times 10^7$ ;  $1,0 \times 10^6$ ;  $0,5 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> reduziram a longevidade de adultos de *T. peregrinus*, diferindo da concentração  $0,5 \times 10^7$  e da testemunha. No entanto destaca-se a concentração  $1,0 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> que além de provocar mortalidade significativa, também reduziu a longevidade para 47,52 horas, (F 6,43 e p <0,001) (Tabela 2).



Tabela 2: Mortalidade (%) ( $\pm$  EP) e longevidade em horas, de adultos de *Thaumastocoris peregrinus*, quando confinados com folhas de *Eucalyptus dunnii* tratadas com diferentes concentrações de *Beauveria bassiana* ou água destilada esterilizada. F: Resultado na ANOVA, p: porcentagem de significância.

Tratamentos	Mortalidade (%)	Longevidade (horas)
$1,0 \times 10^8$ (T1)	$44,99 \pm 0,00$ a	47,52
$0,5 \times 10^8$ (T2)	$37,26 \pm 4,90$ a	107,03
$1,0 \times 10^7$ (T3)	$38,03 \pm 2,00$ a	107,68
$0,5 \times 10^7$ (T4)	$29,43 \pm 6,52$ b	127,20
$1,0 \times 10^6$ (T5)	$37,32 \pm 4,64$ a	133,29
$0,5 \times 10^6$ (T6)	$32,91 \pm 4,47$ a	155,20
Testemunha	$19,67 \pm 4,00$ c	123,43
F	6,43	
P	<0,001	
CV	28,98	

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,001$ ).

O isolado IBCB 66 de *B. bassiana*, mesmo isolado utilizado no presente estudo, é virulento a ninfas de 2º a 4º ínstar de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em condições de laboratório. Diferentes concentrações foram testadas ( $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), sendo que a concentração letal média ( $\text{CL}_{50}$ ), foi de  $0,4 \times 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  (PINTO, et al., 2012).

Isolados de fungos entomopatogênicos, sendo quatro de *Beauveria bassiana*, dois de *Beauveria pseudobassiana*, seis de *Metarhizium anisopliae* e um de *Isaria fumosorosea*, na concentração  $1 \times 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , foram testados sobre o percevejo-de-renda do plátano *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) em condições de laboratório. O isolado de *B. bassiana* KTU – 2, provocou maior mortalidade em ninfas e adultos do percevejo, sendo então testado em diferentes concentrações. ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), com isto o cálculo de concentração letal média ( $\text{CL}_{50}$ ) de  $5,51 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  para adultos e  $3,96 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  para ninfas (SEVIM et al., 2013).

Quatro isolados de *Metarhizium anisopliae*, três de *Beauveria bassiana*, um de *B. pseudobassiana*, um de *Isaria fumosorosea* e um de *Myriodontium keratinophilum* foram testados em condições de laboratório na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  em ninfas e adultos de *Corythucha arcuata* (Say) (Hemiptera: Tingidae). O isolado de *B. bassiana* KTU – 2, apresentou maior mortalidade de ninfas e adultos do percevejo, sendo assim, o mesmo foi aplicado em diferentes concentrações para determinação da  $\text{CL}_{50}$ , sendo  $1,17 \times 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  para ninfas e  $6,44 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  para adultos (SÖNMEZ; DEMIRBAĞ; DEMIR, 2016).

## 5.2 POTENCIAL DE *Beauveria bassiana* COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS

A formulação de *B. bassiana* T2 foi a maior indutora da produção de fitoalexinas em cotilédones de soja, sendo que está foi significativamente diferente das demais formulações (T2, T3 e T4) e da testemunha. Para a Fal o tratamento T2 também difere dos demais tratamentos e da testemunha, apresentando um valor de 0,0674. Destaca-se que os maiores valores para fitoalexinas e Fal foram obtidos em cotilédones de soja submetidos ao tratamento T2 (Tabela 3).

Assim, como neste trabalho, a testemunha apresentou uma pequena produção de fitoalexinas, provavelmente induzida pelo dano mecânico realizado sobre os cotilédones, sendo que estas são metabólitos secundários, produzidos pela planta em reação ao estresses físico, químico e/ou biológico (CAVALCANTI; BRUNEALLI; STANGARLIN, 2005).

Tabela 3: Fitoalexinas ( $\pm$ EP) e fenilalanina amônia-liase (Fal) ( $\pm$ EP), para cotilédones de soja, para os cinco tratamentos (T1, T2, T3, T4 e T5), sendo que T1, T2, T3, T4 são diferentes formulações do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e T5 composto pela testemunha com água destilada esterilizada. F: Resultado na ANOVA, p: porcentagem de significância.

Tratamentos	Fitoalexinas	Fal
<i>B. bassiana</i> (T1)	0,1406 $\pm$ 0,012 b	0,0495 $\pm$ 0,019 b
<i>B. bassiana</i> (T2)	0,3316 $\pm$ 0,059 a	0,0674 $\pm$ 0,002 a
<i>B. bassiana</i> (T3)	0,0281 $\pm$ 0,007 c	0,0294 $\pm$ 0,002 c
<i>B. bassiana</i> (T4)	0,0224 $\pm$ 0,005 c	0,0316 $\pm$ 0,001 c
Testemunha (T5)	0,0278 $\pm$ 0,002 c	0,0363 $\pm$ 0,001 c
F	24,20	
P	<0,001	

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,001).

Na agricultura sustentável a redução do uso de químicos sintéticos tem grande importância. Junto a isso, estratégias que buscam diminuir o uso desses produtos vêm ganhando espaço no mercado, como, por exemplo, as estratégias de induzir resistência em plantas, a doenças (WALLER et al., 2005). Dentre os principais indutores de resistência em plantas destaca-se a quitosana, pois a mesma aumenta a produção vegetal e também pode agir no controle de alguns micro-organismos fitopatogênicos (BERGER; STAMFORD, THAYZA; STAMFORD, 2011; FELIPINI; PIERO, 2009; MAZARO et al., 2012)

A quitosana atua ligando-se a receptores presentes na membrana celular das plantas, imitando o reconhecimento que ocorre na influência mútua incompatível entre a planta e o patógeno, podendo inibir as proteinases e promover a lignificação, alterar o metabolismo das fitoalexinas, induzir a formação de compostos fenólicos, peroxidase, fenilalanina amônia-liase (Fal) e ativar enzimas quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006; LABANCA, 2002; MAZARO et al., 2008; RODRIGUES; BEZERRA NETO; COELHO, 2006; TERRY; JOYCE, 2004; ZHANG; QUANTICK, 1998). A quitosana, obtida a partir da desacetilação da quitina é encontrada na parede celular de algumas espécies de fungos, insetos e crustáceos (AZEVEDO et al., 2007). Devido ao fato da quitosana ser encontrada na parede celular de fungos, pode-se inferir que o fungo *Beauveria bassiana* tenha agido como indutor de resistência em cotilédones de soja, no tratamento T2. As formulações em pó do fungo (T3 e T4) podem apresentar algum composto que inibiu a ativação das rotas metabólicas, sendo que para a comprovação desta observação é necessário a realização de outros estudos bioquímicos.

A Fal é muito estudada em plantas, pois trata-se de uma enzima do metabolismo secundário (STANGARLIN et al., 2011). Esta enzima permite a síntese de compostos como lignina, flavonóides (antocianinas), fitoalexinas e o ácido salicílico (EMILIANI et al., 2009). Buscando obter frutos mais saudáveis sem a utilização de produtos químicos, trabalhos realizados com quitosana mostraram que a mesma atua na resistência sistêmica de morangueiros. Sendo assim, produtos que contenham quitosana em sua composição (MAZARO et al., 2012), ou até mesmo fungos entomopatogênicos como no caso deste estudo, podem ativar os mecanismos de defesa em plantas.

Estudos utilizando extrato alcoólico de pitanga, *Eugenia uniflora* da família Myrtaceae, como indutor de resistência, utilizam quitosana a 1% como indutor referência (MAZARO et al., 2008). Outros trabalhos realizados com diferentes produtos fitossanitários alternativos como indutores de resistência também utilizam a quitosana a 1% como indutor de resistência referência (LORENCETTI et al., 2015).

As quatro formulações de *B. bassiana* reduziram a longevidade de adultos e ninfas de 3º ínstar de *T. peregrinus*, realçando os tratamentos/formulações T1 e T2 que reduziram a longevidade de adultos e T1, T2 e T4 que reduziram a longevidade de ninfas. Bem como o tratamento T1 na concentração  $1,0 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> que causou mortalidade e reduziu consideravelmente a longevidade de *T. peregrinus*. Além da virulência os tratamentos/formulações de *B. bassiana* também atuam como indutores de resistência. Destacando-se o tratamento/formulação T2 que apresentou potencial como

indutor de resistência, expressando valores consideráveis para fitoalexinas e atividade da Fal. Assim, salienta-se que as formulações de *B. bassiana*, isolado IBCB66, apresentam potencial para controle de *T. peregrinus*, no entanto, testes são necessários quando novas formulações são produzidas.

**Capítulo II- Identificação e caracterização molecular de fungos entomopatogênicos e endofíticos coletados em plantios de eucalipto**

## 1 INTRODUÇÃO

O percevejo-bronzeado, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé, 2006 (Hemiptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae) é considerado inseto-praga das espécies de eucalipto. Possui coloração castanho amarelada, 3 mm de comprimento, aparelho bucal do tipo sugador labial, o qual é utilizado para sugar a seiva das folhas e estas passam a ficar com aspecto prateado, seguindo para uma morfologia bronzeada, até a senescência das mesmas (CARPINTERO; DELLAPÉ, 2006; SMANIOTTO, et al., 2017; WILCKEN et al., 2010).

O controle de insetos-praga geralmente é realizado com produtos fitossanitários sintéticos, e no caso de *T. peregrinus*, o produto piretroide a base de bifentrina (Capture 400 EC) é o único registrado, que age no inseto por contato e ingestão (AGROFIT, 2018). Como alternativa aos produtos fitossanitários sintéticos, pesquisas vem sendo realizadas com a utilização de fungos entomopatogênicos (LORENCETTI et al., 2017; VELOZO, 2015) e fungos endofíticos para controle deste inseto. Além das pesquisas, o potencial do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* foi verificado em plantio comercial de eucalipto, causando mortalidade em insetos adultos de *T. peregrinus* (LORENCETTI, et al., 2017).

Os fungos entomopatogênicos possuem grande variabilidade genética, o que destaca a vantagem desses no controle de insetos, sendo outra vantagem a capacidade de infectar o hospedeiro em qualquer fase do seu ciclo, desde ovos a adultos (ALVES, 1998). A infecção pelo fungo entomopatogênico pode ocorrer tanto via tegumento quanto via oral, fazendo com que os fungos tenham vantagens sobre os outros micro-organismos (ALVES, 1998; CARRANO-MOREIRA, 2014). Os fungos entomopatogênicos são normalmente coletados em solo (AQUINO DE MURO et al., 2005; Buseti et al., 2010; GARRIDO-JURADO et al., 2015), no entanto, há poucos registros de isolamentos a partir de solos com plantios de eucalipto.

Além dos fungos entomopatogênicos, os fungos endofíticos apresentam potencial ainda pouco explorado para o controle de insetos. Os fungos endofíticos associam-se às plantas colonizando seus tecidos vegetais como: folhas, raízes e ramos sem ocasionar danos, mas sim auxiliando na sanidade desta controlando micro-organismos fitopatogênicos e insetos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Pode existir uma interação simbiótica entre fungos endofíticos e as plantas, na qual o fungo passa a proteger as plantas de doenças, insetos e até mesmo de mamíferos herbívoros. Estes

fungos produzem alterações fisiológicas na planta tornando-a impalatável (AZEVEDO, 1999). Neste caso, o principal local para encontrar espécies e isolados de fungos endofíticos é no tecido vegetal (BERNARDI-WENZEL et al., 2012; MÁRQUEZ; BILLS; ZABALGOGEAZCOA, 2011; MUSSI-DIAS et al., 2012; PAUL et al., 2006).

Para se realizar a identificação de fungos entomopatogênicos e endofíticos pode-se utilizar técnicas de caracterização morfológica e também técnicas de Biologia Molecular. A caracterização morfológica é a base para se iniciar a triagem e classificar somente os fungos de interesse.

Na biologia molecular a extração de DNA dos fungos, juntamente com as técnicas de ISSR-PCR e ITS pode auxiliar na identificação dos mesmos. O sequenciamento de locais específicos do genoma, como por exemplo ITS (*Internal Transcribed Spacer*), pode ser utilizado na taxonomia molecular para distinguir a espécie com que se está trabalhando (DOLINSKY, 2007). A coleta de solo e de material vegetal, para isolamento de fungos entomopatogênicos e endofíticos, é uma prática de fundamental importância para manter a preservação de biodiversidade de fungos nos agroecossistemas, bem como para testes de potencial de controle sobre insetos considerados pragas. Além disso, estudar possíveis interações no ambiente. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar fungos entomopatogênicos e endofíticos em cinco plantios de eucalipto.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico I e II da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV). As amostras de solo foram coletadas em cinco propriedades, sendo quatro na cidade de Ampére, que está localizada a uma latitude de 25° 54' 54" S e uma longitude de 53° 28' 22" W, e uma na cidade de Dois Vizinhos, que está localizada a uma latitude 25° 44' 01" S e uma longitude de 53° 03' 26" W, ambas as cidades no sudoeste do Paraná. As análises de extração de DNA e ISSR-PCR também foram realizadas na UTFPR-DV, sendo estas efetivadas no Laboratório de Biologia Molecular. As amostras de fungos para sequenciamentos foram enviadas a empresa Myleus Biotecnologia®.

### 2.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SOLO, PREPARO DAS SOLUÇÕES E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

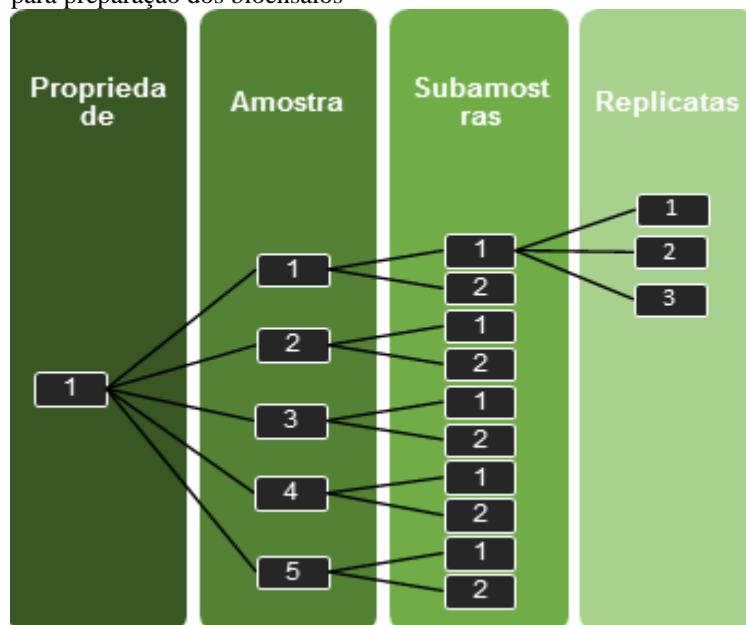
As coletas de solo foram realizadas em plantios de eucalipto com diferentes idades (aproximadamente 8 a 9 anos) e espécies, pois os mesmos já se encontravam implantados nas propriedades. Em cada propriedade foram coletadas aleatoriamente cinco amostras de solos, de forma a abranger todo o povoamento florestal. Estas amostras foram retiradas a 30 centímetros de profundidade, utilizando-se, para isto, um anel de coleta de solo (5 cm de altura e 6,5 cm de diâmetro). A primeira camada de matéria orgânica foi descartada e cada amostra possuiu uma quantidade, aproximada, de 100 gramas.

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos desinfetados e identificadas com o número da propriedade e da amostra correspondente. As mesmas foram armazenadas em geladeira a 2°C, com prazo não superior a dez dias, no Laboratório de Controle Biológico II, para manter a integridade das amostras, até a preparação dos bioensaios. Toda amostra foi composta por duas subamostras de 1g cada. Cada grama de solo das subamostras foi diluída em 100 mL de água destilada esterilizada, obtendo-se então a suspensão padrão. Desta suspensão foram retirados, com o auxílio de uma pipeta, 10 mL e diluídos em 90 mL de água destilada esterilizada, obtendo-se então a primeira diluição, o mesmo procedimento foi realizado em 90 mL de água destilada esterilizada,



obtendo-se a segunda diluição ( $10^{-2}$ ), a qual foi utilizada para o isolamento dos fungos (Figura 1).

Figura 1: Representação da obtenção de cada uma das replicatas de solo provenientes das propriedades com plantio de eucalipto, que foram utilizadas para preparação dos bioensaios



Fonte: Tedesco (2015).

Uma quantidade de  $1000\mu\text{L}$  da segunda diluição  $10^{-2}$  foi aplicada, com o auxílio de uma micropipeta em placas de petri ( $12\text{ cm } \varnothing$ ) com meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), sendo que cada uma das diluições apresentou três repetições (três placas), na qual a suspensão foi distribuída com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Posteriormente, cada placa foi fechada e vedada com filme de PVC, e alocadas em câmara climatizada B.O.D, durante sete dias, a  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com 12 horas de fotoperíodo.

Após o crescimento dos fungos, as placas passaram por uma triagem visual, de acordo com coloração e textura, permanecendo somente fungos com características de serem entomopatogênicos. Posteriormente à triagem, os fungos foram dispostos em lâminas, com corante azul de metileno, para avaliação e identificação microscópica. O material foi observado em microscópio de luz (Alltion, objetiva 640) e o morfotipo dos fungos foi analisado com base na literatura (ALVES, 1998).

## 2.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Foram coletadas folhas de eucalipto sem tratamento fitossanitário, estas provenientes dos mesmos povoamentos nos quais foram coletadas as amostras de solo, as folhas retiradas foram folhas maduras, porém não em estado de senescência. Estas foram armazenadas em sacos plásticos, identificadas e levadas para o laboratório de Controle Biológico I da UTFPR-DV. Na sequência, as amostras foram levadas ao fluxo laminar horizontal e passaram pelo processo de desinfecção adaptado de Araújo et al., (2010), 1 minuto em álcool (70%), 3 minutos no hipoclorito de sódio (5%), 30 segundos em álcool (70%) e duas lavagens em água destilada esterilizada. As folhas permaneceram no fluxo até a perda do excesso de umidade.

Na sequência, 50 fragmentos foliares foram retirados com o auxílio de um vazador (0,5 cm Ø) de cada um dos pontos amostrais, totalizando 250 fragmentos de folhas por propriedade. De cada folha foram retiradas duas amostras foliares, fragmentos de 0,5 cm Ø, as quais foram dispostas em placas de petri (14 cm Ø), com meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) contendo antibiótico (Tetraciclina 75µg/100ml H<sub>2</sub>O), sendo adicionados 5 fragmentos por placa. As placas foram fechadas, vedadas e acondicionadas em B.O.D, durante sete dias, a 28 ± 2°C, sem fotoperíodo.

Após o crescimento dos fungos, as placas passaram por uma triagem visual, de acordo com coloração e textura, permanecendo somente fungos com características de serem endofíticos. Posteriormente à triagem, os fungos foram dispostos em lâminas, com corante azul de metileno, para avaliação e identificação microscópica. O material foi observado em microscópio de luz (Alltion, objetiva 640) e o morfotipo dos fungos foi analisado com base na literatura (ARAÚJO et al., 2010).

### 2.3 EXTRAÇÃO DE DNA DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ENDOFÍTICOS

Inicialmente foi realizada a extração do DNA, utilizando-se o protocolo do kit Promega®. Para isto, tubos tipo Eppendorf de 1,5mL foram numerados para fungos entomopatogênicos e para fungos endofíticos. Posteriormente, em cada um dos Eppendorf, foram adicionados 300µL de EDTA e acrescentando-se a amostra do fungo correspondente mais 0,1g de micropérolas de vidro (*glass beads*) de aproximadamente 0,5 mm.

Os Eppendorf foram agitados em agitador de tubos tipo vortex por, aproximadamente, 3 minutos e deixados em temperatura ambiente por 10 minutos com

agitação periódica. Posteriormente foram adicionados 300µL de solução de lise nucleica (*Nuclei Lysis Solution*) e 100µL de solução de precipitação de proteína (*Protein Precipitation Solution*) e mais uma vez foram agitados com o auxílio do agitador tipo vortex por 20 segundos. As amostras ficaram em gelo por cinco minutos e após este processo foram centrifugadas a 15.000 rpm por três minutos. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um novo Eppendorf de 1,5mL, contendo 300 µL de isopropanol a temperatura ambiente.

Na sequência, o Eppendorf foi invertido com cuidado e, posteriormente, centrifugado a 15.000 rpm por dois minutos. O sobrenadante foi retirado por inversão e adicionados 300µL de etanol 70% (gelado), invertendo-se o eppendorf várias vezes para lavar o pellet, sendo realizada nova centrifugação a 15.000 rpm por dois minutos. O Eppendorf permaneceu invertido para retirar o etanol e foi deixado aberto, virado para baixo, em papel filtro por 15 minutos, para secar. Foram adicionados 50µL de solução de reidratação de DNA (*DNA Rehydration Solution*) e 1,5µL de solução de RNase (*RNase Solution*) e agitando os microtubos, posteriormente, em agitador tipo vortex por um segundo. Os tubos foram centrifugados por cinco segundos e incubados a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, foram incubados a 65°C por 60 minutos em banho-maria, agitando-se periodicamente o tubo.

Em uma segunda etapa procedeu-se a quantificação do DNA através da eletroforese a ~80V em gel de agarose 1% por 60 minutos, realizando análise sob luz ultravioleta. Nesta fase pôde-se observar a integridade do DNA, e fazer a quantificação do mesmo. Em seguida, após a obtenção efetiva dos DNA's dos fungos, foi realizada a padronização de todas as amostras de DNA, deixando todas as amostras com a mesma concentração.

#### 2.4 ISSR-PCR DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

No processo ISSR-PCR foram utilizados três *primers* sendo eles: CGA [5-DHB (CGACGACGACGACGA)], CCA [5-DD(CCACCACCACCACCA)], e GT [5-YHY(GTGTGTGTGTG)] da Invitrogen®. A reação foi realizada com um total de 25µl, sendo estes compostos por: 2,5 µl de tampão, 0,5 µl de dnTP, 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl do primer, 0,1 µl de Taq DNA polimerase, 2 µl de DNA e 18,65 µl de água Milli-Q.

No termociclador foram acondicionados os Eppendorfs que continham os compostos citados acima, e estes passaram por um programa de amplificação inicial de 94°C por três minutos, seguidos de 39 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 55°C por um minuto, 72°C por três minutos, posterior aos ciclos, o processo continuou com extensão final de 72°C por 10 minutos e mantendo a 4°C após a conclusão do programa. Após este processo as amostras amplificadas pela PCR seguiram para a eletroforese em gel de 1% de agarose, por 1 hora e 20 minutos em 80 volts para confirmação de sucesso da PCR. Após, o gel foi transferido para o transiluminador e fotografado com o auxílio de um foto documentador.

O gel formado para a análise da ISSR-PCR, foi analisado visualmente e dele foi extraído uma estimativa do tamanho das bandas em pares de base, estes dados foram colocados em uma tabela a qual possuía dados de ausência e presença de bandas, para então facilitar a contagem das bandas e então realizar o índice de similaridade de Jaccard.

## 2.5 ISSR-PCR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

No processo ISSR-PCR para os fungos endofíticos foram utilizados quatro *primers* sendo eles: EF1-728F [5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'], EF1-986R [5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'], (EF1a) T1 [5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3'] e Bt-2b [5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'] da DNA express<sup>®</sup>. A reação e os passos empregados no termociclador foram os mesmos utilizados para os fungos entomopatogênicos descritos no item anterior.

## 2.6 ITS-PCR DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ENDOFÍTICOS

A caracterização molecular dos fungos através da amplificação pela PCR da região do espaçador transcrito interno (ITS) do rDNA utilizou dois *primers*, ITS1 [5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'] e ITS4 [5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'] da Invitrogen<sup>®</sup>. O volume da reação final foi 25 µL, contendo 2,5 µl de tampão, 0,5 µl de dnTP, 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl do *primer* forward ITS1, 0,5 µl do *primer* reverse ITS4, 0,1 µl de Taq DNA polimerase, 2 µl de DNA e 18,15 µl de água Milli-Q. As condições de amplificação foram 95°C iniciais a 2 min, 35 ciclos de 95°C a 1min, 55°C a 1 min e 60°C a 1 minuto, como extensão final de 60°C por 5 min em termociclador.

Posteriormente as amostras amplificadas pela PCR-ITS seguiram para a eletroforese em gel de 1,0% de agarose, por duas horas em 80 volts para confirmação da amplificação. Posteriormente, o gel foi transferido para o transiluminador e fotografado.

Após as amostras seguiram para o processo de purificação com Poly ethylene glycol (PEG). Em Eppendorf de 1,5mL adicionou-se 50 µl de PEG (PEG 8000 20%; NaCl 2,5 M), em seguida transferiu-se para este mesmo Eppendorf o produto de PCR e misturou-se, incubou-se a 37°C por 15 min, em seguida os tubos foram colocados em centrífuga (Spinlab SL-5F) e centrifugados a 12.000 rpm por 15 min. Com o auxílio de uma micropipeta o sobrenadante foi retirado e descartado, sendo então adicionado 62,5 µl de etanol 80% (gelado), logo após os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por dois minutos, imediatamente os tubos foram invertidos para descarte do sobrenadante e colocados para secar por 30 minutos sobre papel filtro, e por último adicionados 13 µl de água Milli-Q.

Para visualização da purificação realizou-se uma eletroforese com gel de agarose a 1%, por duas horas em 80 volts. As amostras que apresentaram bandas visíveis foram enviadas à empresa Myleus Biotecnologia® para o sequenciamento, onde as amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. Todas as sequências de DNA obtidas, foram analisadas utilizando DNA Baser versão 4.36.0. Para a pesquisa de gênero, foi utilizado o site BLAST([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)), a identificação de espécies foi determinada com base no melhor resultado obtido para a identidade juntamente com a análise filogenética. A determinação da distância genética dos isolados foi analisada na qual as sequências foram alinhadas a partir do software Mega versão 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004) com o agrupamento pelo método “neighbor-joining” (SAITOU; NEI, 1987), usando “p-distance” para nucleotídeos com a opção “the pairwise gap deletion” e bootstrap com 10.000 repetições.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no programa estatístico Past versão 3.18 com o índice de similaridade de Jaccard, obtendo-se então as estimativas de similaridade. No mesmo programa, elaborou-se um gráfico (similaridade dos indivíduos), como tentativa de formação de grupos.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

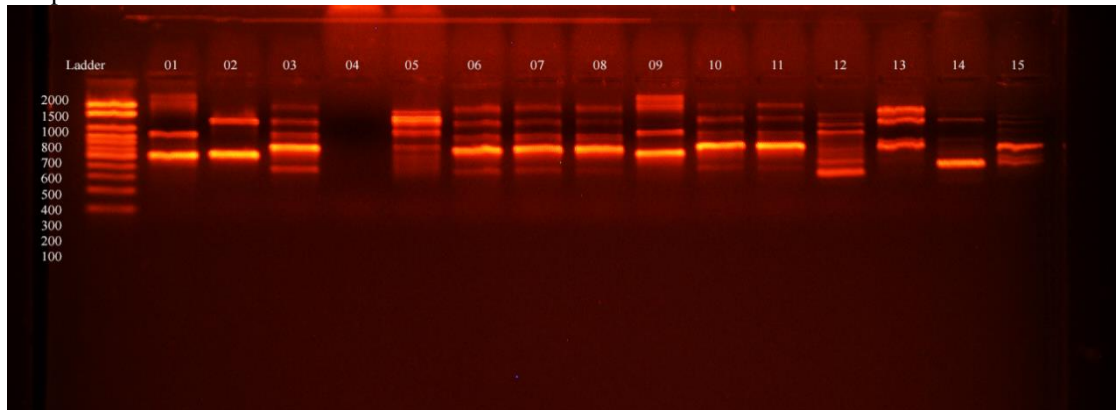
A presença de fungos entomopatogênicos no solo de plantios de eucalipto foi conferido via caracterização morfológica, análise microscópica e comparação com o material existente na literatura. Os fungos foram encontrados nas cinco propriedades estudadas nas cidades de Ampére e de Dois Vizinhos, no estado do Paraná. Nestas, foram encontrados 15 isolados de possíveis fungos entomopatogênicos. Os mesmos foram divididos em quatro morfotipos, com critérios visuais.

A extração de DNA dos possíveis fungos entomopatogênicos encontrados no solo, com o kit Promega<sup>®</sup>, foi positiva. Tanto o protocolo quanto o kit Promega<sup>®</sup> testados foram ideais para a realização de extração de DNA dos isolados fúngicos estudados neste trabalho. Com a caracterização molecular, foi possível identificar diferentes espécies de fungos existentes no solo com plantio de eucalipto. Os iniciadores utilizados juntamente com a técnica ISSR-PCR foram eficazes na caracterização dos fungos entomopatogênicos. A técnica ISSR-PCR é considerada eficaz para diferenciar isolados de fungos coletados de um mesmo agroecossistema (ORMOND et al., 2010). Neste estudo a técnica também se mostrou eficiente para diferenciar 15 isolados de fungos provenientes de plantios de eucalipto.

Os isolados 05, 06, 08 e 09 são provenientes da propriedade A, localizada no município de Dois vizinhos, os isolados 07, 13, 14 e 15 são oriundos da propriedade B do município de Ampére. Já os isolados 10, 11 e 12 pertencem a propriedade C também do município de Ampére, os isolados 01, 02 e 04 são originários da propriedade D do município de Ampére e o isolado 03 pertence a ultima propriedade E também localizada em Ampére.

Com a técnica ISSR-PCR foi possível obter resultados de amplificação com os três *primers* utilizados, CCA, CGA e GT. O protocolo para a extração de DNA e à amplificação dos genes permitiu a avaliação da diversidade fúngica do solo com plantio de eucalipto. O *primer* CCA mostrou resultados positivos na amplificação do DNA dos isolados de fungos entomopatogênicos. As bandas formadas são brilhantes e visíveis, facilitando a análise de presença e ausência das mesmas (Figura 2).

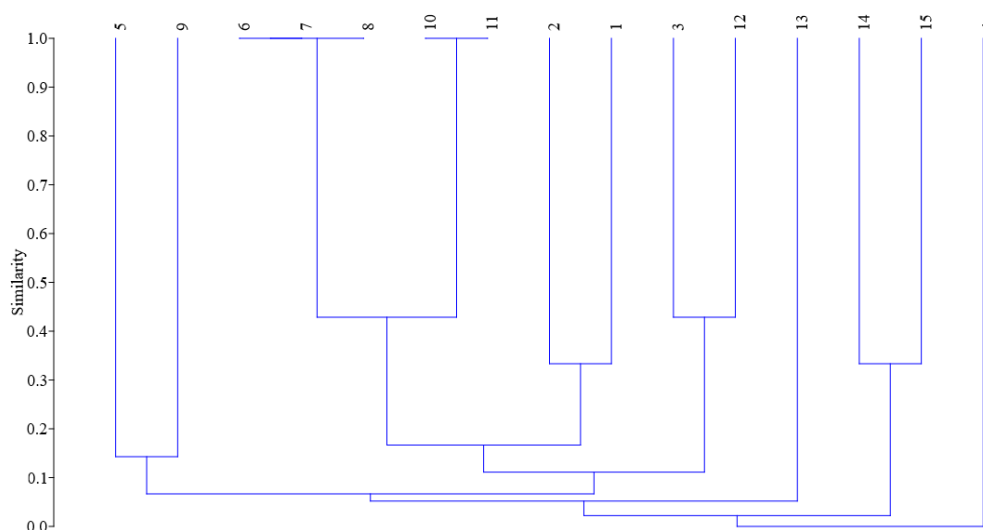
Figura 2: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos, com o *primer* CCA. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas e os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra.



Fonte: A autora (2018).

A partir do índice de similaridade de Jaccard, pode-se observar variação no grau de similaridade entre os indivíduos, sendo que em alguns a similaridade é zero e em outros chega a 100%. Com base nestes valores, gerou-se um cladograma de similaridade, para melhor interpretação dos dados (Figura 3). Houve similaridade de 100 % entre os indivíduos 06, 07 e 08, sendo que os indivíduos 06 e 08 pertencem a propriedade A localizada em Dois Vizinhos e o indivíduo 07 a propriedade B localizada em Ampére. Também ocorreu similaridade de 100% entre os indivíduos 10 e 11 pertencentes a propriedade C localizada no município de Ampére.

Figura 3: Porcentagem de similaridades existente, com o *primer* CCA, entre os quinze indivíduos de fungos entomopatogênicos estudados, gerado a partir do programa estatístico Past ver. 3.18 pelo índice de Jaccard.

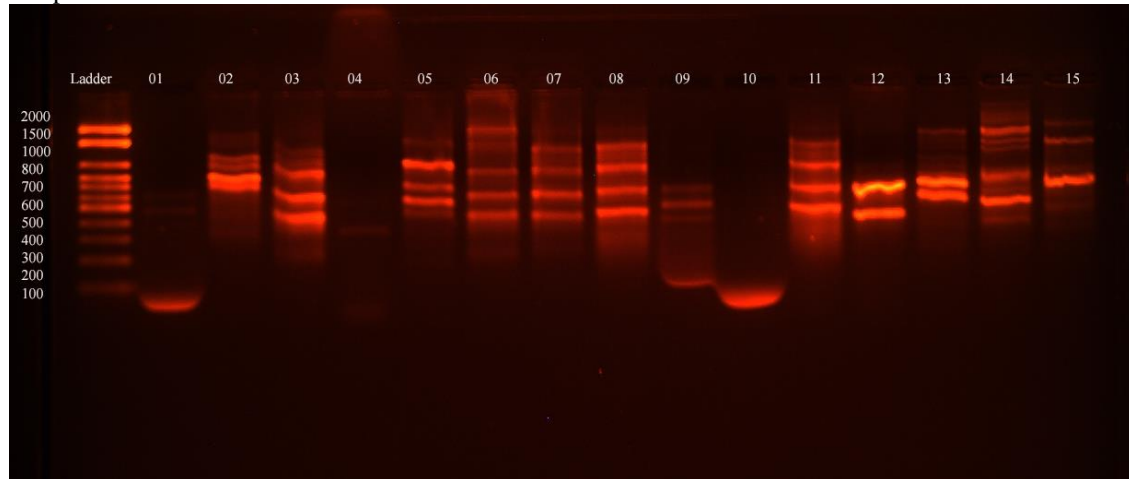


Fonte: A autora (2018).



O *primer* CGA também foi capaz de amplificar o DNA de fungos entomopatogênicos. Observa-se à amplificação do *primer* CGA de forma consistente em todos os isolados analisados (Figura 4).

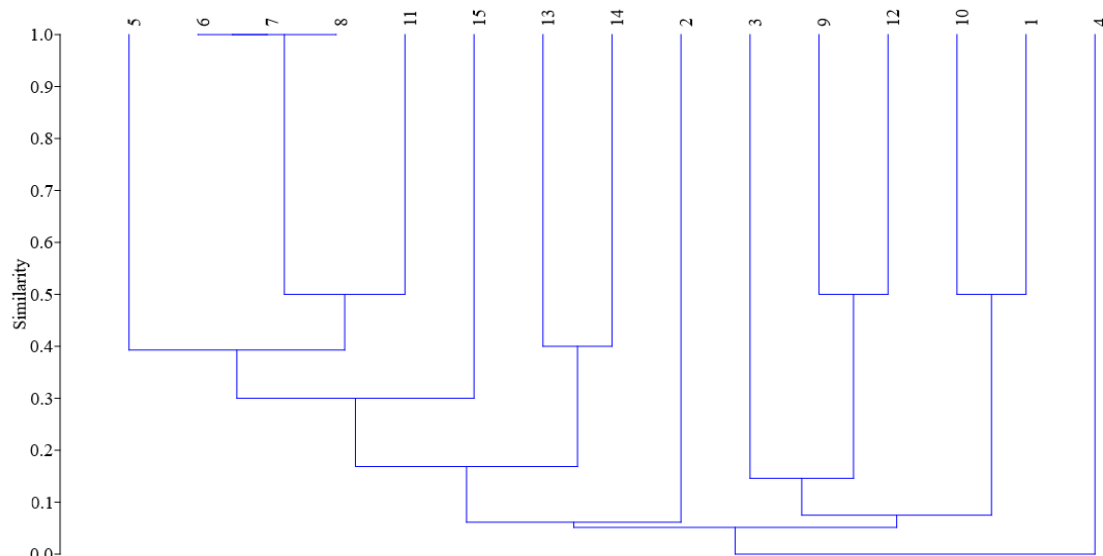
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos, com o *primer* CGA. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas e os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra.



Fonte: A autora (2018).

A variação de similaridade existente entre os indivíduos de fungos entomopatogênicos pelo *primer* CGA é observada a partir do cladograma gerado a partir do índice de similaridade de Jaccard, o qual também apresenta similaridade de 100% entre os isolados 06, 07 e 08, no qual dois destes, 06 e 08 pertencem a mesma propriedade A, e o isolado 07 pertence a propriedade B (Figura 5).

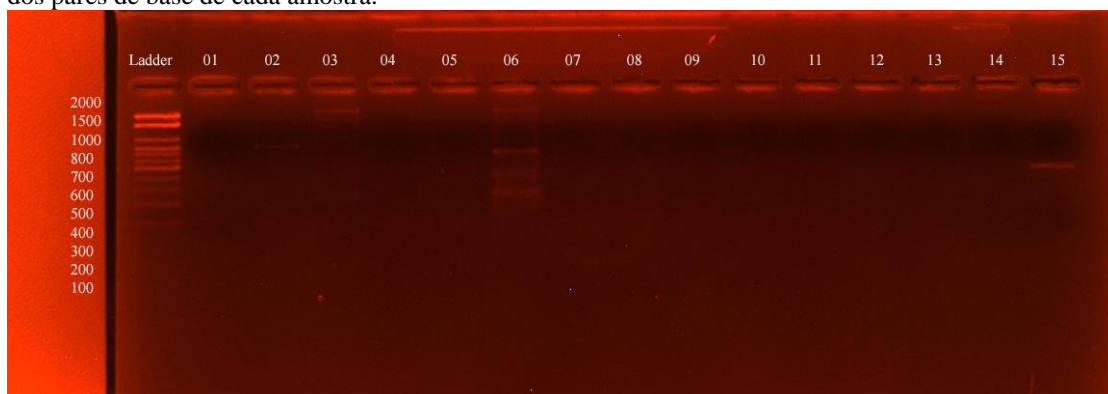
Figura 5: Porcentagem de similaridades existente, com o *primer* CGA, entre os quinze indivíduos de fungos entomopatogênicos estudados, gerado a partir do programa estatístico Past ver. 3.18 pelo índice de Jaccard.



Fonte: A autora (2018).

O *primer* GT apresentou resultados positivos na amplificação do DNA dos isolados 02, 03, 06 e 15, no entanto, para os outros indivíduos não gerou qualquer produto de amplificação, ou seja, não foi possível visualizar as bandas de DNA no gel de agarose (Figura 6).

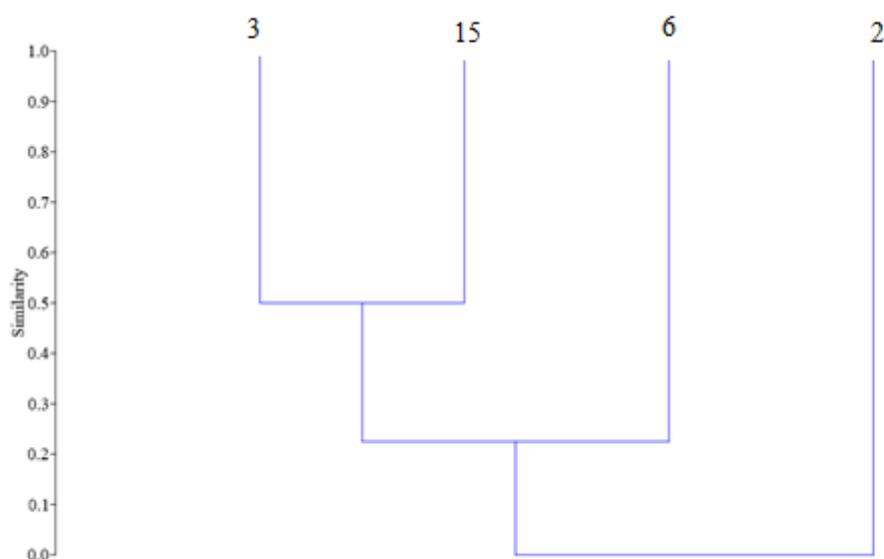
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos, com o *primer* GT. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas e os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra.



Fonte: A autora (2018).

A partir da amplificação do DNA dos indivíduos 02, 03, 06 e 15 foi possível calcular o índice de Jaccard apenas para estes isolados. Sendo assim, a similaridade variou de 0 a 50% para esses isolados (Figura 7).

Figura 7: Porcentagem de similaridades existente, com o *primer* GT, entre os quinze indivíduos de fungos entomopatogênicos estudados, gerado a partir do programa estatístico Past ver. 3.18 pelo índice de Jaccard.



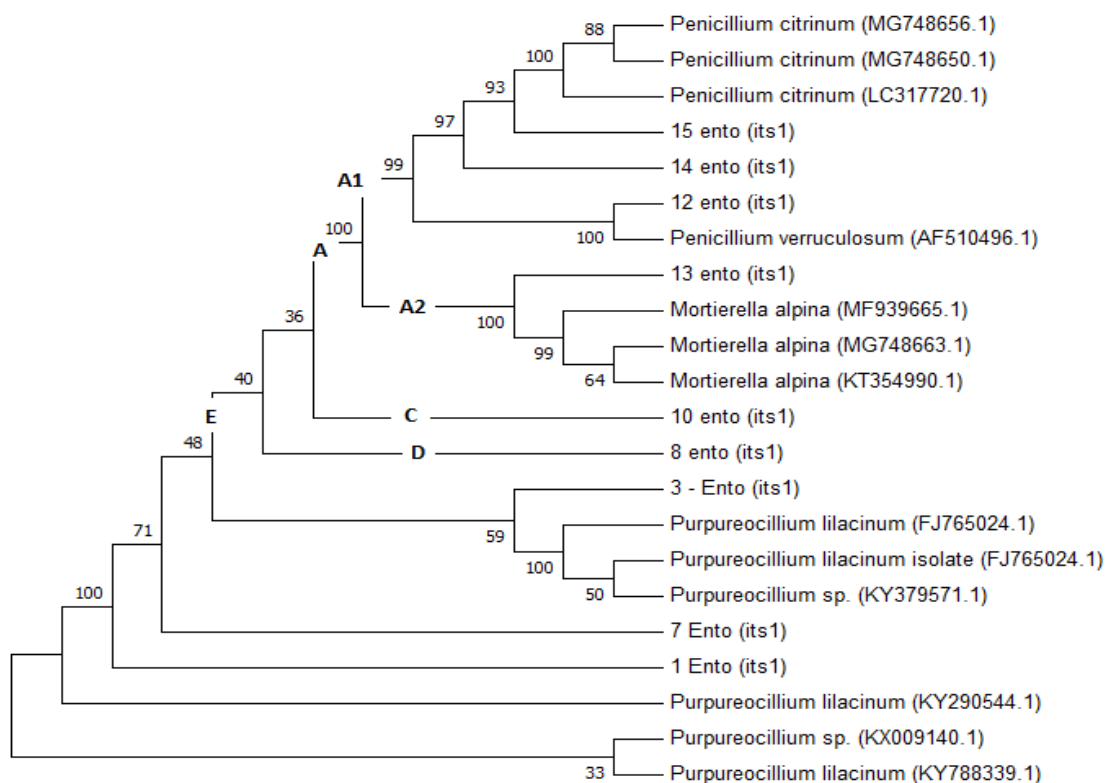
Fonte: A autora (2018).

Na ISSR-PCR das 15 amostras de fungos entomopatogênicos, os *primers* CCA e CGA produziram 54 e 58 fragmentos, respectivamente. No entanto, apenas 29 fragmentos do *primer* CCA são polimórficos e do *primer* CGA 43 fragmentos são polimórficos. O *primer* GT apresentou nove fragmentos, sendo todos polimórficos.

A amplificação da região ITS resultou em um único produto para todos os isolados. O tamanho do produto variou entre 800 e 600 pb para todos os isolados de fungos entomopatogênicos.

A análise filogenética dos entomopatogênicos foi dividida em cinco maiores cladogramas (A-E). Os fungos na subdivisão A1 (15,14 e 12) identificados como *Penicillium* sp., ordem Eurotiales. No clado A2 o fungo 13, identificado como *Mortierella* sp., pertencente a ordem Mortierellales. Os fungos nas linhas C e D não foram identificados na análise. No Clado E, os fungos 3, 7 e 1 foram identificados como *Purpureocillium* (ordem Hypocreales) (Figura 8). Sendo que para os isolados 01, 07, 08 e 10 não foi possível realizar a identificação devido a problemas com o DNA, como amplificação inespecífica.

Figura 8: Árvore filogenética construída com sequências do primer ITS1 da região de rDNA de fungos entomopatogênicos de solo com plantio de eucalipto. Utilizando o método neighbor-joining. Os números acima indicam a frequência (em porcentagem) de cada ramificação.



Fonte: A autora (2018).

Foi evidenciado uma ampla diversidade de espécies de fungos entomopatogênicos em solos com plantio de eucalipto. Sendo positivo para a própria cultura, pois espécies de insetos-praga, que entrarem em contato com este solo, poderão ser controladas, naturalmente.

Percebe-se neste trabalho, que importantes espécies já relatadas em literatura foram identificadas através da técnica molecular, a exemplo de *Purpureocillium lilacinum* Thom, *Mortierella alpina* Peyronel e espécies do gênero *Penicillium*. Assim, podemos constatar a diversidade existente de fungos entomopatogênicos em plantios de eucalipto, e também observar que os mesmos são encontrados nos mais diferentes agroecossistemas.

No Paquistão, 25.720 insetos de grãos armazenados de seis espécies diferentes foram coletados e, destes, foram isoladas 24 espécies diferentes de fungos. Dentre os fungos coletados, algumas espécies de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* Metsch, *Purpureocillium lilacinum* e *Lecanicillium attenuatum* Zare & W. Gams (WAKIL; GHAZANFAR; YASIN, 2014). No referido trabalho a espécie de *P. lilacinum* é coletada a partir de insetos já, no presente trabalho, a espécie foi coletada em solo, observando assim que esta espécie possui fácil dispersão ou que a presença desta no solo é potencial para contaminar insetos para causar seu controle.

Quarenta e dois fungos entomopatogênicos isolados do pulgão-verde-do-pessegeiro *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae), foram separados e identificados morfológicamente, de acordo com coloração da colônia, forma e cor do conídio, como fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium* e *Paecilomyces*, os mesmos, após esta identificação, seguiram para o sequenciamento da região ITS. O sequenciamento da região ITS ampliada de todos os isolados, demonstrou fragmentos de aproximadamente 500 pb, mostrando identidades parecidas com a caracterização morfológica, três isolados de *Aspergillus*, nove isolados de *B. bassiana*, oito isolados de *L. attenuatum*, um isolado de *M. anisopliae*, um isolado de *M. flavoviride* e vinte isolados de *P. lilacinum* (LEE et al., 2015).

*Beauveria bassiana* e *P. lilacinum* foram avaliados na reprodução do pulgão de algodão *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Os fungos foram aplicados em plantas de algodão que continham a presença dos pulgões, reduzindo a reprodução destes (LOPEZ et al., 2014). Outros estudos mostram que solos e detritos de plantas utilizadas como substrato de fungos de formigueiros, possuem uma vasta diversidade de fungos, dentre eles os fungos entomopatogênicos *P. lilacinum* e *M. anisopliae* var. *anisopliae*

(WOOLFOLK et al., 2016). Assim como neste trabalho a espécie de *P. lilacinum* foi encontrada no solo.

Outros fungos entomopatogênicos foram isolados na Coréia, três novas espécies de *Penicillium* foram isoladas de três insetos de espécies diferentes. Para a identificação das espécies, amostras de DNA genômico dos fungos foi extraído e através da análise de ITS, utilizando os *primers* ITS1, ITS4 e ITS5, foi possível identificar *Penicillium* sp. (KNU12-3-2) isolado do coleoptera *Lixus imperessiventris* Roelofs, enquanto *Penicillium polonicum* (KNU12-1-8) e *Penicillium steckii* (KNU12-2-9) foram isolados dos insetos *Muljarus japonicas* e *Meloe proscarabaeus*, respectivamente (LAMSAL et al., 2013). Corroborando com o trabalho de Lamsal et al., (2013) o gênero *Penicillium* também foi observado no presente trabalho.

Fungos entomopatogênicos foram testados por Maketon; Amnuaykanjanasin; Kaysorngup (2014), sobre larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) e o gênero *Penicillium* sp. causou 100% de mortalidade de larvas de 3º instar após duas horas de aplicação do fungo. A partir do sequenciamento utilizando os *primers* ITS4 e ITS5, os autores verificaram que a espécie do fungo utilizado nos testes é *Penicillium citrinum* Thom, a mesma espécie encontrada no presente trabalho em plantios de eucalipto.

Estudos relatam a presença de fungos infectando ovos e larvas de *Pteroptyx bearni* Olivier (Coleoptera: Lampyridae) em projeto de criação ex-situ. As duas espécies de fungos infectaram formas distintas do ciclo de vida de *P. bearni*, sendo *P. citrinum* infectando os ovos e *Trichoderma harzianum* Rifai infectando as larvas do vaga-lume (FOO; SEELAN; DAWOOD, 2017).

*Beauveria bassiana* é uma espécie de fungo entomopatogênico clássica, que pode ser encontrada naturalmente sobre insetos ou no solo de todos os países. A infecção do fungo em insetos ocorre via tegumento, oral e também pelo sistema respiratório, onde após passadas 12 a 18 horas o fungo irá germinar, este período depende da quantidade de nutrientes presentes no corpo do inseto. Depois de 72 horas, o inseto estará completamente colonizado pelo fungo, morrendo por falta de nutrientes e pelo acúmulo de substâncias tóxicas (ALVES, 1998).

Outros estudos realizados com coleta de solos em cultivo orgânico e convencional de videiras, mostrou ocorrência dos fungos entomopatogênicos *Beauveria* sp. e *Paecilomyces* sp. A ocorrência natural destes fungos no solo pode vir a colaborar para

que possam ser reduzidas as aplicações de produtos fitossanitários na área (BUSETTI et al., 2010).

Os fungos entomopatogênicos também podem ser obtidos a partir de corpos de insetos infectados. Como observado em, soldados de *Atta sexdens rubropilosa* Forel e *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera, Formicidae) (CASTILHO et al., 2010) e em insetos adultos de *T. peregrinus* no município de Realeza no estado do Paraná (LORENCETTI et al., 2017).

Isolados de *Beauveria* (104 *B. bassiana*, 5 *Beauveria* spp., 1 *B. brongniartii*) foram coletados em diferentes países e submetidos a diferentes tipos de análise molecular, sendo ISSR-PCR uma delas, mesma análise utilizada no presente trabalho. Para ISSR-PCR utilizou-se os *primers* 5'DD(CCA)<sub>5</sub>, 5'BDB(ACA)<sub>5</sub> e 5'VHV(TGT)<sub>5</sub>. Cada um dos iniciadores apresentou uma média de 15-20 bandas, sendo destas 14 em média polimórficas (AQUINO DE MURO et al., 2005).

Estudos realizados com 59 isolados de *Beauveria bassiana* e um isolado de *Beauveria brongniartii* utilizando os *primers* CCA, CGA e GT, os mesmos utilizados neste trabalho, mostram que os *primers* CCA e GT possuem todas as bandas polimórficas, com 31 e 29 fragmentos respectivamente cada. Já o *primer* CGA apresentou 26 fragmentos, sendo apenas 23 polimórficos (TAKATSUKA, 2007). Outros estudos com cinco isolados de *B. bassiana* utilizando os mesmos *primers* mostram que esses não geraram bons produtos, reproduzindo bandas fracas e ambíguas, sendo então descartados (WANG et al., 2013).

Com a mesma técnica de ITS e os mesmos *primers* utilizados no presente trabalho, estudos mostram que para sete cepas de *B. bassiana* os *primers* ITS1 e ITS4 foram bons amplificadores. A pesquisa BLAST realizada para as sequências ITS adquiridas para as cepas estudadas confirmou a caracterização morfológica de *B. bassiana* (MITINA et al., 2011).

Com a identificação morfológica e molecular dos fungos encontrados nas amostras de solo, foi possível realizar a identificação dos mesmos. Assim como nos trabalhos citados, a técnica de ISSR-PCR e ITS mostraram-se boas para a caracterização dos fungos. No qual identificou-se três gêneros de fungos, *Penicillium*, *Mortierella* e *Purpureocillium*.

### 3.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Com a caracterização morfológica, análise microscópica e com a comparação com o material já existente em literatura, foi possível observar que existe a presença de fungos endofíticos nas folhas de eucalipto. Os fungos de interesse foram encontrados nas cinco propriedades estudadas das cidades de Ampére e Dois Vizinhos, no estado do Paraná.

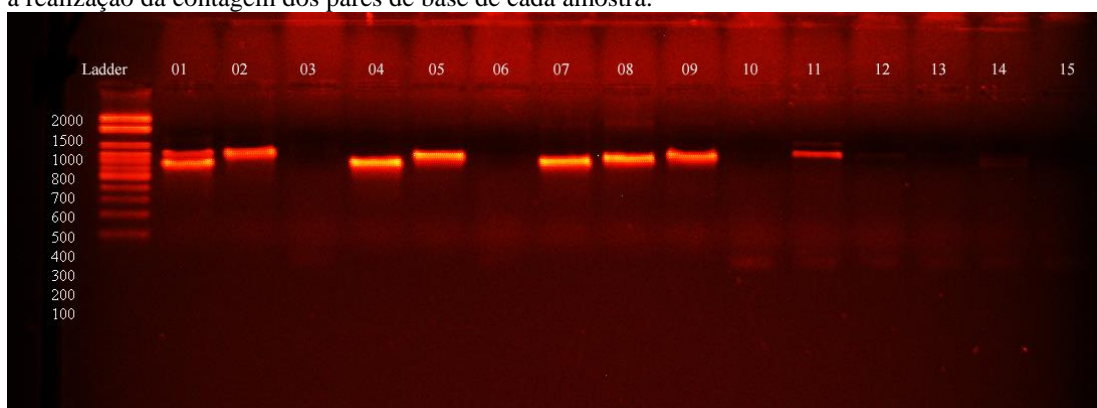
A extração de DNA dos fungos endofíticos, encontrados em material vegetal de eucalipto, com o protocolo e o kit Promega<sup>®</sup>, foi ideal para a realização de extração de DNA dos isolados estudados neste trabalho. Com a técnica ISSR-PCR foi possível obter resultados de amplificação com os quatro *primers*, EF1-728F, EF1-986R, (EF1a) T1 e Bt-2b, utilizados. Esta técnica foi de grande valia para se obter a amplificação dos 15 isolados de fungos endofíticos.

A amplificação da região ITS resultou em um único produto para todos os isolados. O tamanho do produto variou entre 800 e 600 pb para todos os isolados de fungos entomopatogênicos.

Os *primers* (EF1a)-T1 e Bt-2b mostraram bons resultados na amplificação do DNA dos isolados de fungos endofíticos, possuindo bandas bem visíveis e brilhantes. Não foram gerados produtos de amplificação apenas para os isolados 03, 06, 10, 13 e 15 (Figura 9).

Os isolados 07, 08 e 09 pertencem a propriedade A, localizada no município de Dos Vizinhos, os isolados 02, 03, 04, 05 e 06 são oriundos da propriedade B no município de Ampére. O isolado 01 pertence a propriedade C também do município de Ampére, já os isolados 10, 11 e 12 são originários da propriedade D no município de Ampére, e os isolados 13, 14 e 15 são provenientes da propriedade E também localizada em Ampére.

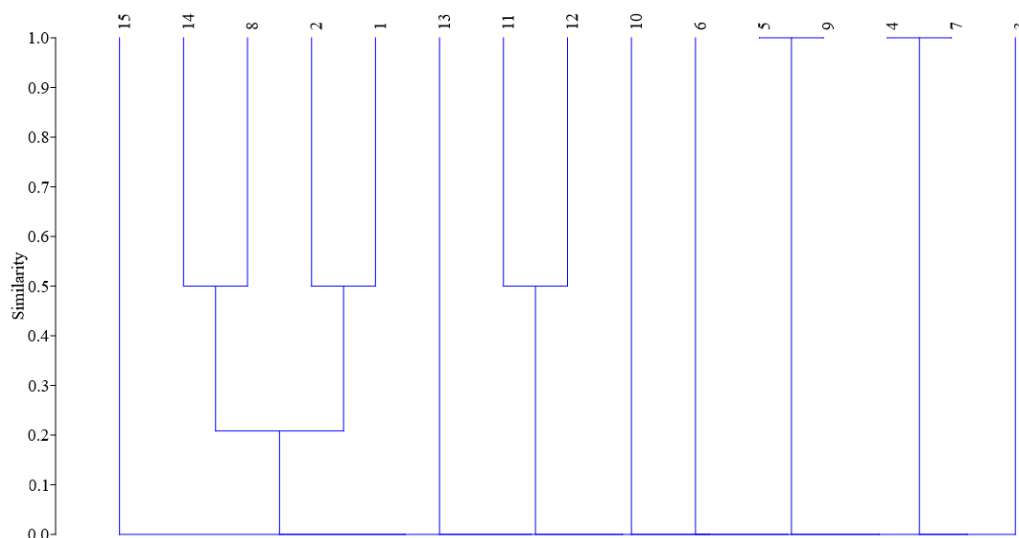
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos endofíticos, com os *primers* (EF1a)-T1 e Bt-2b. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas e os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra.



Fonte: A autora (2018).

A variação de similaridade existente entre os indivíduos de fungos endofíticos pelos *primers* (EF1a)-T1 e Bt-2b pode ser observada através do cladograma criado a partir do cálculo do índice de Jaccard. Observa-se que alguns indivíduos apresentam similaridade de 100%, já outros não possuem qualquer similaridade (Figura 10).

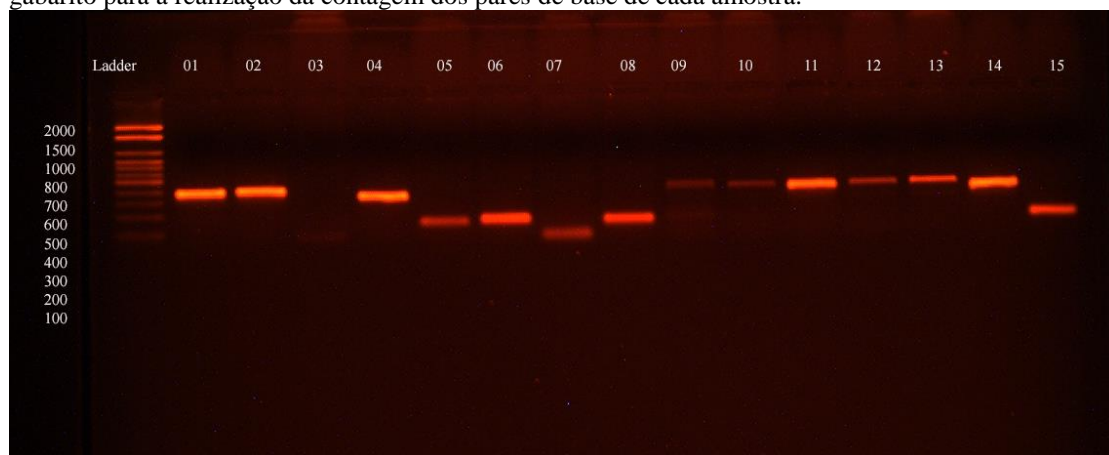
Figura 10: Porcentagem de similaridades existente, com os *primers* (EF1a)-T1 e Bt-2b, entre os quinze indivíduos de fungos endofíticos estudados, gerado a partir do programa estatístico Past ver. 3.18 pelo índice de Jaccard.



Fonte: A autora (2018).

Com os *primers* EF1-986R e EF1-728F, foi possível visualizar o produto da ISSR-PCR em todos os indivíduos. As bandas de DNA de todos os isolados de fungos endofíticos mostraram-se visíveis e brilhantes, com exceção da banda formada pelo indivíduo 03 (Figura 11).

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do DNA de cada um dos isolados de fungos endofíticos, com os *primers* EF1-986R e EF1-728F. A numeração no alto das bandas é representada pelas espécies de fungos estudadas e os números das laterais são o ladder que serve como gabarito para a realização da contagem dos pares de base de cada amostra.



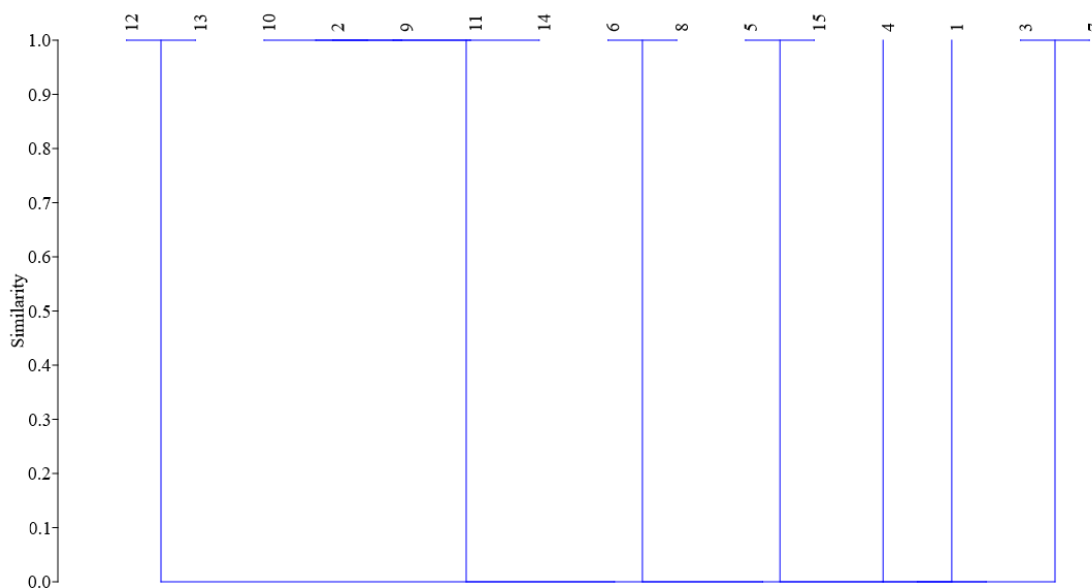
Fonte: A autora (2018).



Com o cladograma criado com o índice de similaridade de jaccard, a partir da utilização dos *primers* EF1-986R e EF1-728F, foi possível observar que a maioria dos indivíduos apresentam similaridade de 100%. Apenas os indivíduos 01 e 04 possuem similaridade de 0%, pertencendo a isolados de *Aspergillus* e *Fusarium* respectivamente (Figura 12).

Afim de esclarecer a diversidade de fungos endofíticos presentes em folhas de eucalipto foi utilizada a caracterização molecular por meio da técnica de ISSR-PCR. No processo de ISSR-PCR para os 15 isolados de fungos endofíticos, os *primers* (EF1a)-T1 e Bt-2b produziram 13 fragmentos e os *primers* EF1-986R e EF1-728F apresentaram 15 fragmentos em gel de agarose a 1%. Todos os fragmentos observados no gel apresentavam boas características, sendo visíveis e brilhantes.

Figura 12: Porcentagem de similaridades existente, com os *primers* EF1-986R e EF1-728F, entre os quinze indivíduos de fungos endofíticos estudados, gerado a partir do programa estatístico Past ver. 3.18 pelo índice de Jaccard.

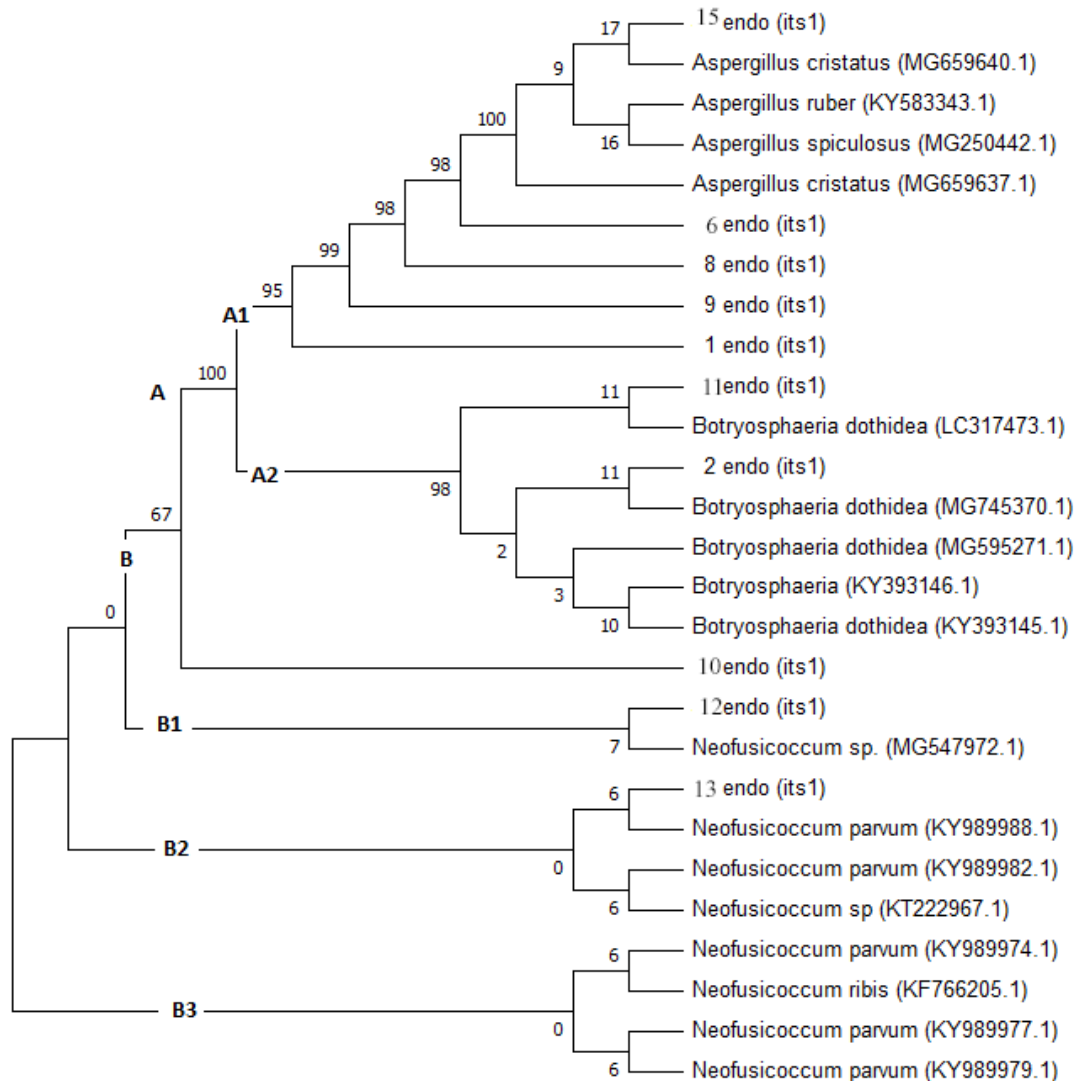


Fonte: A autora (2018).

A análise filogenética dos fungos endofíticos, utilizando sequenciamento da região ITS, está representada na (Figura 13). A análise foi dividida em dois maiores clados (A e B) e subdivididos. No clado A1 os fungos 01, 09, 08, 06 e 15 foram identificados como *Aspergillus* sp., pertencente a ordem *Eurotiales*. Os fungos no clado A2 (11 e 02) pertencem ao gênero *Botryosphaeria* sp., ordem *Botryosphaeriales*. No clado

B1 e B2 o gênero *Neofusicoccum* sp. (12 e 13) também pertence a ordem Botryosphaeriales.

Figura 13: Árvore filogenética construída com sequências do *primer* ITS1 da região de rDNA de fungos endofíticos de folhas de eucalipto. Utilizando o método neighbor-joining. Os números acima indicam a frequência (em porcentagem) de cada ramificação.



Fonte: A autora (2018).

Os fungos endofíticos também são capazes de controlar alguns patógenos de plantas, como no caso dos fungos endofíticos *Epicoccum nigrum* e *Neotyphodium* que controlam os patógenos que causam apodrecimento radicular da pupunheira *Bactris gasipaes* Kunth (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005).

Estudos realizados na província de La Coruña, na Galiza, Espanha e em Coimbra, Portugal com folhas jovens e adultas de *Eucalyptus globulus*, mostram a grande diversidade de fungos endofíticos existente. Um total de 513 isolados de fungos

endofíticos foram encontrados nas folhas de *E. globulus*, sendo que destes 301 foram encontrados em folhas jovens e 212 indivíduos obtidos a partir de folhas adultas. Os fungos mais encontrados foram: *Hormonema* sp., *Valsa fabianae*, *Readeriella dimorphospora*, *Neofusicoccum eucalyptorum*, *Teratosphaeria molleriana*, *Mycosphaerella fori* (= *Pseudocercospora fori*), *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., e *Penicillium* spp. (MÁRQUEZ; BILLS; ZABALGOGEAZCOA, 2011). Assim como no presente trabalho, o gênero *Neofusicoccum* também foi encontrado em folhas de eucalipto.

Na Argentina foram coletados 65 isolados fungicos a partir de passas pretas, esses isolados foram analisados molecularmente pela técnica de ISSR-PCR, utilizando os *primers* CTC (GT)<sub>8</sub> e AG (CTC)<sub>5</sub>. Dentre todos os isolados identificou-se várias espécies de *Aspergillus*. No gel, de agarose a 1,5%, foi possível visualizar 78 fragmentos com diferentes tamanhos, variando de 200 a 2500 pb (GIAJ MERLERA et al., 2015). Assim, como no presente trabalho também foram observadas diferentes espécies de *Aspergillus* com os fragmentos variando entre 800 e 600pb.

Amostras de fungos endofíticos da província de Chungnam, república da Coreia foram obtidas a partir de folhas e raiz da planta de dente-de-leão branco, ao todo 72 isolados, sendo 39 isolados das folhas e 33 das raízes. Após o sequenciamento e a pesquisa realizada no BLAST, descobriu-se uma diversidade de 19 gêneros de fungos endofíticos diferentes sendo estes: *Ceriporia*, *Polyporus*, *Alternaria*, *Apodus*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Leptodontidium*, *Leptosphaeria*, *Dothideales*, *Myrothecium*, *Nemania*, *Neoplaconema*, *Pestalotiopsis*, *Phaeosphaeria*, *Phoma*, *Plectosphaerella* e *Terfezia* (PAUL et al., 2006). No presente trabalho também foi encontrado o gênero *Aspergillus* em folhas de eucalipto.

Assim, como no presente trabalho, espécies de *Aspergillus* foram encontradas na Índia. Onde 17 isolados de *Aspergillus flavus* foram coletados em diferentes zonas agroecológicas de milho, estes tiveram amplificação por PCR com os *primers* ITS1 e ITS4 resultando na amplificação de um produto de aproximadamente 600 pb. Nas análises as semelhanças de percentual mínimo e máximo entre as cepas testadas de *A. flavus* variaram de 0 a 88% (MOHANKUMAR et al., 2010).

Devido a vasta diversidade de fungos endofíticos encontrados nas folhas de eucalipto, o gênero *Botryosphaeria* sp., encontrado no presente estudo se trata de um fitopatógeno do eucalipto, já relatado em outros estudos (SMITH et al., 1996; SMITH; WINGFIELD, 1994).

Com a caracterização molecular, foi possível identificar as diferentes espécies de fungos endofíticos existentes em folhas de eucalipto. O marcador molecular (ISSR-PCR) juntamente com os *primers* utilizados foram eficazes na caracterização dos fungos endofíticos.

Diversos trabalhos têm sido realizados com o intuito de se descobrir a diversidade de fungos endofíticos existentes nas mais diversas espécies vegetais. Alguns destes trabalhos encontraram fungos como: *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Pestalotia*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Glomerella*, *Pestalotiopsis*, *Myrothecium*, *Dothideomycete* e *Cordyceps*. Todos analisados através de técnicas moleculares como ISSR-PCR e ITS (JOSHI et al., 2009; MAHLANZA et al., 2013; MUSSI-DIAS et al., 2012; RHODEN et al., 2012; RUMA et al., 2015; VITORINO, LUCIANA et al., 2016)

Com a identificação morfológica e molecular dos fungos encontrados nos tecidos vegetais de eucalipto, foi possível realizar a identificação dos mesmos. Assim como nos trabalhos citados, a técnica de ISSR-PCR e ITS mostraram-se boas para a caracterização de tais fungos. Assim, no presente trabalho identificou-se e caracterizou-se três gêneros de fungos *Aspergillus*, *Botryphaeria* e *Neofusicoccum* com maior percentual de *Aspergillus*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os quatro isolados de *Beauveria bassiana* reduziram a longevidade de adultos e ninfas de 3º ínstar de *Thaumastocoris peregrinus*. Sendo então, o fungo entomopatogênico *B. bassiana* promissor para o controle do inseto-praga. Além do potencial inseticida os tratamentos/formulações de *B. bassiana* também atuam como indutores de resistência, neste sentido considera-se a possibilidade da utilização de *B. bassiana* em futuros testes em laboratório e campo, bem como, o potencial para formulação de um produto biológico a partir destes tratamentos/ formulações utilizadas.

Nas coletas de solo em cinco plantios de eucalipto foi possível observar uma diversidade de fungos e a partir da identificação morfológica e molecular dos fungos encontrados nas amostras de solo, foi possível realizar a identificação dos mesmos. Onde foram identificados através das técnicas moleculares três gêneros de fungos, *Penicillium*, *Mortierella* e *Purpureocillium*.

Com as coletas de folhas de eucalipto também foi possível observar uma diversidade de fungos existentes no material vegetal. E com a identificação morfológica e molecular dos fungos encontrados nos tecidos vegetais de eucalipto, foi possível realizar a identificação dos mesmos. Assim, no presente trabalho identificou-se e caracterizou-se três gêneros de fungos *Aspergillus*, *Botryosphaeria* e *Neofusicoccum* com maior percentual de *Aspergillus*.

Desta forma, observamos que a própria cultura do eucalipto, já apresenta micro-organismos que tem potencial como controladores de insetos e doenças. Pesquisas realizadas nestes ambientes são promissoras para formulação de um novo produto biológico. No entanto, é necessário a realização e novos testes com os fungos entomopatogênicos e endofíticos encontrados nos plantios de eucalipto sobre o percevejo-bronzeado, *T. peregrinus* e também testes utilizando os fungos como indutores de resistência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2017. Disponível em: < [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 20 set. 2018.

ALMEIDA, C. V. DE; YARA, R.; ALMEIDA, M. DE. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 467–470, 2005.

ALVES, SÉRGIO, B.; LOPES, ROGÉRIO, B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008.

ALVES, L. F. A. et al. Susceptibility of *Gyropsylla spegazziniana* ( Lizer & Trelles ) ( Hemiptera : Psyllidae ) to *Beauveria bassiana* ( Bals . ) Vuill . **Agricultural Entomology**, v. 80, n. 3, p. 363–366, 2013.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª EDIÇÃO ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

AQUINO DE MURO, M. et al. Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). **Mycological Research**, v. 109, n. 3, p. 294–306, 2005.

ARAÚJO-JUNIOR, J. M. DE; MARQUES, E. J.; OLIVEIRA, J. V. DE. Potencial de Isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do Óleo de Nim no Controle do Pulgão *Lipaphis erysimi* ( Kalt . ) ( Hemiptera : Aphididae ). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. August, p. 520–525, 2009.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 225–229, 1999.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27–34, 2007.

BARBOSA, L. R. et al. Registro de *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera, Thaumastocoridae) no Estado do Paraná. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 30, n. 61, p. 75–77, 2010.

BARBOSA, L. R. et al. Establishment in the Field of *Cleruchoides noackae* (Hymenoptera: Mymaridae), an Exotic Egg Parasitoid of *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae). **Florida Entomologist**, v. 100, n. 2, p. 372–374, 2017.

BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231–239, 2010.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, v. 25, n. 2, p. 108–118, 2006.

- BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231–239, 2010.
- BERGER, L. R. R.; STAMFORD, THAYZA, C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 195–215, 2011.
- BERNARDI-WENZEL, J. et al. ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill). **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 86–96, 2012.
- BORGES, W. DE et al. Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1137–1163, 2009.
- BUSETTI, Aline; VARGAS, Lucia, R. B.; SPECHT, Alexandre; BARROS, Neiva, M. de. **Isolamento de fungos entomopatogênicos em solo de videira cultivada sob manejo orgânico e convencional**. In: XVIII Encontro de Jovens Pesquisadores, 2010, Caxias do Sul.
- CARPINTERO, D. L.; DELLAPÉ, P. M. A new species of *Thaumastocoris* Kirkaldy from Argentina (Heteroptera: Thaumastocoridae: Thaumastocorinae). **Zootaxa**, n. 1228, p. 61–68, 2006.
- CARRANO-MOREIRA, A. **Manejo Integrado de Pragas Florestais: fundamentos ecológicos, conceitos e táticas de controle**. [s.l.: s.n.].
- CASTILHO, A. M. C. et al. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1243–1249, 2010.
- CAVALCANTI, L. S.; BRUNEALLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. FEALQ ed. Piracicaba: [s.n.].
- CORASSA, J. DE N.; SOUZA, R. M. DE. Besouros desfolhadores em plantações florestais. In: **Entomologia Florestal Aplicada**. [s.l.: s.n.]. p. 256.
- DIGUTA, C. F. et al. PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. **Food Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1145–1154, 2011.
- DOLINSKY, L. C. DE B. As Diversas Aplicações da Genética Molecular no século XXI: uma Nova era nas Ciências Biológicas- artigo de revisão. **Saude & Ambiente em Revista**, v. 2, n. 1, p. 21–25, 2007.
- DOSSA, Derli; SILVA, Helton, D.; BELLOTE, Antonio, F. J.; RODIGHERI, Honorino, R. Produção e Rentabilidade do Eucalipto em Empresas Florestais. **Comunicado Técnico 83**. Colombo, 2002. Disponível em: <[http://www.cnpf.embrapa.br/publica/comuntec/edicoes/com\\_tec83.pdf](http://www.cnpf.embrapa.br/publica/comuntec/edicoes/com_tec83.pdf)>. Acesso em: 29 nov 2017.

EMBRAPA. **Pragas de importância econômica**. 2010. Disponível em:<  
[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto\\_2ed/Pragas\\_Ordem\\_Coleoptera.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto_2ed/Pragas_Ordem_Coleoptera.htm) >. Acesso em: 25 de nov 2017.

EMBRAPA. Pesquisas da Embrapa Rondônia revelam potencial do estado para a eucaliptocultura. 2012. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/1480998/pesquisas-da-embrapa-rondonia-revelam-potencial-do-estado-para-a-eucaliptocultura>>. Acesso em: 03 dez. 2017.

EMBRAPA. Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda. 2014. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/121607/1/Apostila-Serie-TT-Eucalipto.pdf>>. Acesso em: 27 dez 2017.

EMILIANI, G. et al. A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. **Biology Direct**, v. 4, n. 1, p. 7, 2009.

FELIPINI, R. B.; PIERO, R. M. DI. Em Pós - Colheita Pela Imersão De Frutos Em Quitosana. **Pesq. agropec. bras.**, v. 44, n. 12, p. 1591–1597, 2009.

FERNÁNDEZ-BRAVO, M. et al. Responses to abiotic environmental stresses among phylloplane and soil isolates of *Beauveria bassiana* from two holm oak ecosystems. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 141, p. 6–17, 2016.

FOO, K.; SEELAN, J. S. S.; DAWOOD, M. M. ( Coleoptera : Lampyridae ) Eggs and Larvae from. **Insects**, v. 66, n. 8, p. 1–12, 2017.

GALLO, D. (IN MEMORIAN) et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GARRIDO-JURADO, I. et al. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 130, p. 97–106, 2015.

GIAJ MERLERA, G. et al. Diversity of black Aspergilli isolated from raisins in Argentina: Polyphasic approach to species identification and development of SCAR markers for *Aspergillus ibericus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 92–101, 2015.

HAHN, M. G.; ALBERSHEIM, P. Isolation and partial characterization of an elicitor form yeast extract. **Plant Physiology**, v. 62, p. 107–111, 1978.

HALFELD-VIEIRA, B. D. A. et al. **Defensivos Agrícolas Naturais Uso e Perspectivas**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2016.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. In: **Fungal Diversity**. [s.l: s.n.]. p. 163–173.



IBÁ. **Indústria Brasileira de Árvores**. 2017. Disponível em: <[http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf)>. Acesso em: 20 set. 2017.

IPEF – Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. **Ocorrência do Psíldeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) (Hemiptera: Psyllidae) em florestas de eucalipto no Brasil**. 2003. Disponível em: <<http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/bitstream/handle/123456789/3823/ipef-circular-tecnica-2003-dezembro-n-201.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 29 set 2017.

IPEF – Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. **PROTEF realiza importação de inimigo natural de praga do eucalipto**. 2010. Disponível em: <<http://www.ipef.br/ipefexpress/nr015.htm>>. Acesso em: 05 dez 2017.

JOSHI, S. D. et al. Molecular characterization of *Pestalotiopsis* spp. associated with tea (*Camellia sinensis*) in southern India using RAPD and ISSR markers. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 377–383, 2009.

KOUL, O.; WALIA, S. Comparing impacts of plant extracts and pure allelochemicals and implications for pest control. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n. 49, 2009.

KUMAR, S., TAMURA, K.; NEI, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, 5:150-163.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. Piracicaba, 2002, 107p. Dissertação de mestrado. ESALQ, USP.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.

LAMSAL, K. et al. Mycobiology Three New Records of *Penicillium* Species Isolated from Insect Specimens in Korea. **Mycobiology**, v. 41, n. 2, p. 116–119, 2013.

LAUDONIA, S.; GARONNA, A. PIETRO. The red gum lerp psyllid, *Glycaspis brimblecombei*, a new exotic pest of *Eucalyptus camaldulensis* in Italy. **Bulletin of Insectology**, v. 63, n. 2, p. 233–236, 2010.

LEE, W. W. et al. Screening and evaluation of entomopathogenic fungi against the green peach aphid, *Myzus persicae*, using multiple tools. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 3, p. 607–615, 2015.

LOPEZ, D. C. et al. The entomopathogenic fungal endophytes *Purpureocillium lilacinum* (formerly *Paecilomyces lilacinus*) and *Beauveria bassiana* negatively affect cotton aphid reproduction under both greenhouse and field conditions. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e103891, 2014.

LORENCETTI, GRASIELLE, ADRIANE, T. et al. Registro de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero e Dellapé na Região Sudoeste do Paraná Record of *Thaumastocoris peregrinus* in the Southwest Region of Paraná State , Brazil. **Floresta e Ambiente**, v. 22, n. 3, p. 434–436, 2015.

LORENCETTI, GRASIELLE, ADRIANE, T. et al. OCORRÊNCIA ESPONTÂNEA DE *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill. 1912 (ASCOMYCETES: CLAVICIPITACEAE) SOBRE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE). **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, 2017.

LORENCETTI, G. A. T. et al. Produtos alternativos para controle de *Thaumastocoris peregrinus* e indução de resistência em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 22, n. 4, p. 541–548, 2015.

LORENCETTI, G. A. T. et al. EFICIÊNCIA DE *Beauveria bassiana* VUILL. E *Isaria* sp. PARA O CONTROLE DE *Thaumastocoris peregrinus* CARPINTERO & DELLAPÉ (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE). 2017.

LOUREIRO, E. S. et al. Eficiência de Isolados de *Metarhiziumsoptiae* (MESTSCH.)SOROK. No Controle Da Cigarrinha-Da-Raiz Da Cana-De-Açúcar , *Mahanarva fimbriolata* (STAL, 1854) (Hemiptera:Cercopidae ), em Condições De Campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 47–53, 2012.

LUNZ, A. M.; CALÁBRIA, K. C. L.; COSTA, V. A. Registro da vespa-da-galha- -do-eucalipto, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), no Pará: descrição e recomendações. **Comunicado Técnico 241 Embrapa**, n. Figura 1, p. 1–5, 2014.

MAHLANZA, T. et al. In vitro generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 2, p. 249–262, 2013.

MAKETON, M.; AMNUAYKANJANASIN, A.; KAYSORNGUP, A. A rapid knockdown effect of *Penicillium citrinum* for control of the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 727–736, 2014.

MÁRQUEZ, S. S.; BILLS, G. F.; ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal species diversity in juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus* from plantations affected by Mycosphaerella leaf disease. **Annals of Applied Biology**, v. 158, n. 2, p. 177–187, 2011.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, 2016.

MAZARO, S. M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1824–1829, 2008.

MAZARO, S. M. et al. Enzimas associadas à indução de resistência em morangueiro pelo uso de quitosana e Acibenzolar-S-Methyl. **Revista de Ciências Exatas e Naturais**,

v. 14, n. 1, p. 91–99, 2012.

MITINA, G. V et al. Polymorphism of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) strains isolated from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Moldova. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 1, p. 50–54, 2011.

MOHANKUMAR, M. et al. Analysis of molecular variability among isolates of *Aspergillus flavus* by PCR-RFLP of the its regions of rDNA. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 4, p. 446–451, 2010.

MUSSI-DIAS, V. et al. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 261–266, 2012.

OLIVEIRA, Carolina, T.; OLIVEIRA, Ana, P. P. de; SUGAI, Larissa, S. M.; POSSIEDE, Yvelise, M. controle biológico: fungos endofíticos com potencial antagônico a antracnose da soja (*Glycine max* (L.) Merr). In: X CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 2011, São Lourenço. **Anais eletrônicos...** minas Gerais: 2011. Disponível em: < <http://www.seb-ecologia.org.br/xceb/resumos/1839.pdf>>. Acesso em: 04 de mai. 2016.

ORMOND, E. L. et al. A fungal pathogen in time and space: the population dynamics os *Beauveria bassiana* in a conifer forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 74, p. 146–154, 2010.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. **Insects**, v. 4, n. 3, p. 357–374, 2013.

PAUL, N. C. et al. Diversity of Endophytic Fungi Associated with *Taraxacum coreanum* and Their Antifungal Activity. **Mycobiology**, v. 34, n. 4, p. 185–90, 2006.

PEIXOTO NETO, P. A. D. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos Endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 62–77, 2002.

PINTO, ANA, PAULA, F. et al. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psilídeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 1673–1680, 2012.

PISSINATI, A. et al. Ocorrência do fungo entomopatogênico *Beauverria bassiana* (Salsamo) Vuill. em população de *Aracanthus* sp. (Coleoptera: Curculionidae) em feijoeiro. **Revista Biotemas**, v. 22, p. 219–223, 2009.

PRESTES, T. M. V. et al. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Moniliales: Moniliaceae) e patogenicidade sobre *Protortonia navesi* Fonseca (Hemiptera: Monophlebiidae) na cultura da mandioca, em Marechal Cândido Rondon, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 0, p. 1–4, 2015.

QUEIROZ, Dalva, L. de; BARBOSA, Leonardo, R; **Árvore do conhecimento eucalipto – pragas**. 2014. Disponível em: <

[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/eucalipto/arvore/CONTAG01\\_57\\_1912200211917.html#>](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/eucalipto/arvore/CONTAG01_57_1912200211917.html#>). Acesso em: 04 nov 2017.

RHODEN, S. A. et al. Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *Trichilia elegans* (Meliaceae). **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 3, p. 2513–2522, 2012.

RIBEIRO, R. R. *Beauveria bassiana* VUILL. (ASCOMYCETES: CLAVICIPITACEAE) SOBRE *Thaumastocoris peregrinus* CARPINTEIRO & DELLAPÉ (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE). [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. Tracheiphilum em Caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492–499, 2006.

ROMANAZZI, G. et al. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 75, p. 24–27, 2013.

RUMA, K. et al. Genetic diversity and antimicrobial activity of endophytic *Myrothecium* spp. isolated from *Calophyllum apetalum* and *Garcinia morella*. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 11, p. 1533–1543, 2015.

SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4: 406-425.

SANTANA, Dalva, L. de Q.; MENEZES, Ayres, J.; SILVA, Helton, D. da; BELLOTE, Antônio, F. J.; FAVARO, Rodolfo, M. **O Psilídeo-de-concha (*Glycaspis brimblecombei*) em Eucalipto**. 2003. Disponível em:< <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

SBRAVATTI JÚNIOR, J. A. et al. Seleção in vitro de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Floresta**, v. 43, n. 1, p. 145–152, 2013.

SCHWAN-ESTRADA, R. F. Extratos Vegetais E De Cogumelos No Controle. **Horticultura Brasileira**, v. 2, p. 4038–4045, 2009.

SEVIM, A. et al. Evaluation of entomopathogenic fungi against the sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Say) (Hemiptera: Tingidae). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 37, n. 5, p. 595–603, 2013.

SHRESTHA, G.; ENKEGAARD, A.; STEENBERG, T. Laboratory and semi-field evaluation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) against the lettuce aphid, *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae). **Biological Control**, v. 85, p. 37–45, 2015.

SILVA, E. A. R. et al. SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS

ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Leptopharsa heveae* (HEMIPTERA: HETEROPTERA, TINGIDAE). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 549–556, 2012.

SILVA, R. Z. DA; NEVES, P. M. DE O. J.; SANTORO, P. H. Técnicas e parâmetros utilizados nos estudos de compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e produtos fitossanitários 1 Techniques and parameters used in compatibility studies between entomopathogenic fungi and phytosanitary products 1. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, p. 305–312, 2005.

SILVA, Igor, P. da. Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v.10, n.18, 2014.

SMANIOTTO, MÁRCIA, A. et al. BIOLOGIA DE *Thaumastocoris peregrinus* CARPINTERO E DELLAPÉ (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) EM DEZ ESPÉCIES DE EUCALIPTO. **Ciência Florestal**, v. 27, p. 679–685, 2017.

SMITH, H. et al. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp and *Eucalyptus* spp in South Africa **South African Journal of Botany**, 1996.

SMITH, H. et al. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp and *Eucalyptus* spp in South Africa. **African Journal of Botany**, v 62, n 2, p. 86-88, 1996.

SMITH, H.; WINGFIELD, G. H. J. K. J. Canker and die-back of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. **Plant Pathology**, v. 43, p. 1031–1034, 1994.

SOLIMAN, E. P. **BIOECOLOGIA DO PERCEVEJO BRONZEADO *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE) EM EUCALIPTO E PROSPECÇÃO DE INIMIGOS NATURAIS**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS, 2010.

SOLIMAN, E. P. et al. Biology of *Thaumastocoris peregrinus* in different eucalyptus species and hybrids. **Phytoparasitica**, v. 40, n. 3, p. 223–230, 2012.

SOLIMAN, E. P. **Controle biológico de *Thaumastocoris peregrinus* (hemiptera: thaumastocoridae) com fungos entomopatogênicos**. [s.l.] Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, Universidade Estadual Paulista, 2014.

SÖNMEZ, E.; DEMIRBAĞ, Z.; DEMIR, İ. Pathogenicity of selected entomopathogenic fungal isolates against the oak lace bug, *Corythucha arcuata* Say. (Hemiptera: Tingidae), under controlled conditions. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 40, n. 5, p. 715–722, 2016.

SOUZA, A. Q. L. DE et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185–195, 2004.

- SOUZA, Natalia, M. de. et al. Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). 2016. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr209.pdf>>. Acesso em: 02 Jan. 2018.
- SPEIGHT, M. R.; HUNTER, M. D.; WATT, A. D. **Ecology of insects. Concepts and application**. Hoboken: J ed. [s.l.: s.n.].
- STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, p. 18–46, 2011.
- TAKATSUKA, J. Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. **Applied Entomology and Zoology**, v. 42, n. 4, p. 563–571, 2007.
- TEDESCO, F.G. **Fungos entomopatogênicos em solo com plantio de eucalipto**: 2015. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2015.
- TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: A brief review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, n. 1, p. 1–13, 2004.
- TOOKE, F. G. C. **The eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll. a study of its ecology and control by biological means**. Pretoria: Department of Agriculture and Forestry, 1955. 282 p. 1955.
- VELOZO, S. G. M. **IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE DIFERENTES ISOLADOS DE *Fusarium* spp. PARA O CONTROLE DE *Thaumastocoris peregrinus* (HEMIPTERA: THAUMASTOCORIDAE)**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS, 2015.
- VICENTINI, S.; FARIA, M.; OLIVEIRA, M. R. V. DE. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 97–103, 2001.
- VITORINO, LUCIANA, C. et al. Growth promotion mediated by endophytic fungi in cloned seedlings of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* hybrids. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 48, p. 2729–2738, 2016.
- VIVAN, J. L. **Agricultura e florestas: princípios de uma interação vital**. Guaíba: Li ed. [s.l.: s.n.].
- WAKIL, W.; GHAZANFAR, M. U.; YASIN, M. Naturally Occurring Entomopathogenic Fungi Infecting Stored Grain Insect Species in Punjab, Pakistan. **Journal of Insect Science**, p. 1–8, 2014.
- WALLER, F. et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to

salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 38, p. 13386–13391, 2005.

WANG, J. JIE et al. Diversity analysis of *Beauveria bassiana* isolated from infected silkworm in southwest China based on molecular data and morphological features of colony. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 1263–1269, 2013.

WILCKEN, Carlos, F.; FILHO, Evoneo, B. Vespa-Da-Galha do Eucalipto (*Leptocybe Invasa*) (Hymenoptera: Eulophidae): Nova Praga de Florestas de Eucalipto no Brasil. 2008. Disponível em: < <http://www.ipef.br/rotecao/alerta-leptocybe.invasa.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2017.

WILCKEN C F. Percevejo bronzeado do eucalipto *Thaumastocoris peregrinus* (Hemiptera: Thaumastocoridae): ameaça às florestas de eucalipto brasileiras. Botucatu: IPEF; 2008. Programa de Proteção Florestal - PROTEF/IPEF. Available from: <http://www.ipef.br/rotecao/alerta-percevejo.pdf>.

WILCKEN, C. F. et al. Bronze bug *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero and Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae) on *Eucalyptus* in Brazil and its distribution. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 2, p. 201–205, 2010.

WOOLFOLK, S. et al. Fungi associated with *Solenopsis invicta* Buren (Red Imported Fire Ant, Hymenoptera: Formicidae) from mounds in Mississippi. **Southeast. Nat.**, v. 15(2), p. 220–234, 2016.

XAVIER, L. M. S.; ÁVILA, C. J. Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin a *Scaptocoris carvalhoi* Becker (Hemiptera, Cydnidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 4, p. 540–546, 2006.

ZHANG, D.; QUANTICK, P. C. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 763–767, 1998.