

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Estudo de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok: Toxicidade a compostos extraídos de *Tibraca limbativentris* Stal (Heteroptera: Pentatomidae), efeitos de agroquímicos utilizados na cultura do arroz e aumento da patogenicidade a *T. limbativentris* com doses subletais de inseticidas químicos.**

**RODRIGO ALVES DA SILVA**

Orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião  
Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Eliane Dias Quintela

Goiânia-GO

2012

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

### 2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Rodrigo Alves da Silva				
E-mail:	Rodrigo_quimico@yahoo.com.br				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não		
Vínculo empregatício do autor					
Agência de fomento:				Sigla:	
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Estudo de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch) Sorok: toxicidade a compostos extraídos de <i>Tibraca limbativentris</i> Stal (Heteroptera: Pentatomidae), efeitos de agroquímicos utilizados na cultura do arroz e aumento da patogenicidade a <i>T. limbativentris</i> com doses subletais de inseticidas químicos.				
Palavras-chave:	Controle biológico, fungo entomopatogênico, sustentabilidade				
Título em outra língua:	Study of <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch) Sorok: toxicity of the compounds extracted from <i>Tibraca limbativentris</i> Stal (Heteroptera: Pentatomidae), effects of agrochemicals used in rice crops and enhanced pathogenicity to <i>T. limbativentris</i> with sublethal doses of chemical insecticides.				
Palavras-chave em outra língua:	Biological control, entomopathogenic fungi, sustainability				
Área de concentração:	Química do Cerrado e do Pantanal				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	28/09/2012				
Programa de Pós-Graduação:	Doutorado		multiinstitucional	em	Química UFG/UFMS/UFU
Orientador (a):	Prof. Dr. Luciano Morais Lião				
E-mail:	liciano@quimica.ufg.br				
Co-orientador (a):	Eliane Dias Quintela				
E-mail:	Quintela@cnpaf.embrapa.br				

### 3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

\_\_\_\_\_  
Rodrigo Alves da Silva

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Estudo de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok: Toxicidade a compostos extraídos de *Tibraca limbativentris* Stal (Heteroptera: Pentatomidae), efeitos de agroquímicos utilizados na cultura do arroz e aumento da patogenicidade a *T. limbativentris* com doses subletais de inseticidas químicos.**

RODRIGO ALVES DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião  
Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Eliane Dias Quintela

Goiânia-GO

2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**GPT/BC/UFG**

S586e Silva, Rodrigo Alves da.  
Estudo de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok  
[manuscrito] : toxicidade a compostos extraídos de *Tibraca limbativentris* Stal (Heteroptera: Pentatomidae), efeitos de agroquímicos utilizados na cultura do arroz e aumento da patogenicidade a *T. limbativentris* com doses subletais de inseticidas químicos / Rodrigo Alves da Silva. - 2012.  
127 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião; Coorientadora: Profª. Drª. Eliane Dias Quintela.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de tabelas, figuras, abreviaturas e símbolos.

1. Pragas – Controle biológico – Sustentabilidade. 2. Fungos entomopatogênicos – Controle biológico. I. Título.

CDU: 661.164.2:582.28

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutor em Química, apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, em 28/09/2012.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Dr. Luciano Morais Lião – IQ/UFG

---

Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri – IQ/UFG

---

Prof. Dr. João Batista Fernandes – DQ/UFSCar

---

Prof. Dr. José Alexandre Barrigossi – CNPAF/Embrapa

---

Prof. Dr. Raúl Alberto Laumann – CENARGEN/Embrapa

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Irene Gabriel da Silva e Valdivino Alves da Silva pelo sublime modo que me educaste: Na humildade, na bondade e na dignidade, procurando sempre com zelo a justiça até mesmo nas situações que levam ao desconforto.

Aos meus irmãos pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Ao meu amigo e companheiro de todas as horas, Aurélio Augusto, pelo grande incentivo e apoio moral e técnico.

Aos meus colegas da área de entomologia: José Alexandre Barringossi, José Francisco, Edmar Cardoso, Genoquinha Vaz e Edson Dijalma pelo apoio e companheirismo durante meus quatro anos prazerosos de trabalho na Embrapa Arroz e Feijão.

Ao meu amigo Gabriel Mascarin pelo valioso apoio técnico, moral e pela aprendizagem que me proporcionou na área de microbiologia e entomologia.

Ao professor Pedro Ferri pela grande colaboração na área de cromatografia.

Aos Professores Luciano Morais e Eliane Quintela, pela valiosa orientação propiciada na realização deste trabalho, pela paciência, confiança depositada, formação pessoal e de caráter e pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa.

A Embrapa arroz e Feijão e ao Instituto de Química da UFG pela oportunidade e condições de trabalho oferecidas durante o doutorado.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
<b>Capítulo 1 – Considerações Teóricas</b>	<b>1</b>
1.1. O ARROZ	2
1.1.1. Aspectos gerais	2
1.1.2. Importância na nutrição humana	2
1.1.3. Produção, consumo e aspectos econômicos	4
1.1.4. Doenças do arroz	4
1.1.5. Pragas do arroz	5
1.2. <i>T. limbativentris</i> STAL, 1860 (PERCEVEJO DO COLMO)	6
1.2.1. Aspectos morfológicos e Biológicos	6
1.2.2. Danos causados a cultura do arroz	9
1.2.3. Controle biológico por fungos entomopatogênicos	10
1.3. O FUNGO <i>M. anisopliae</i>	11
1.3.1. Processo de infecção do fungo <i>M. anisopliae</i>	14
1.3.2. Fatores de virulência do fungo <i>M. anisopliae</i>	15
1.4. ECOLOGIA QUÍMICA	17
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
<b>Capítulo 2 – Toxicidade de compostos extraídos da gândula abdominal dorsal (GAD) e da glândula metatorácica (GMT) do <i>T. limbativentris</i> a <i>M. anisopliae</i>.</b>	<b>29</b>
2.1. INTRODUÇÃO	30
2.2. OBJETIVOS	30
2.2.1. Objetivos Gerais	30
2.2.2. Objetivos Específicos	30
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.3.1. Insetos	31
2.3.2. Fungo	32

2.3.3. Avaliação da susceptibilidade de ovos de <i>T. limbatovenstris</i> ao <i>M. anisopliae</i>	32
2.3.4. Avaliação da susceptibilidade de ninfas e aultos de <i>T. limbatovenstris</i> ao <i>M. anisopliae</i>	33
2.3.5. Extração dos compostos da glândula abdominal dorsal (GAD) em ninfas	35
2.3.6. Extração dos compostos da glândula metatorácica (GMT) em adultos.	35
2.3.7. Elucidação estrutural dos compostos químicos	36
2.3.8. Ensaio antifúngicos	36
2.3.9. Análises estatística	37
2.4. RESULTADOS	38
2.4.1. Avaliação da susceptibilidade de ovos de <i>T. limbatovenstris</i> ao <i>M. anisopliae</i>	38
2.4.2. Avaliação da susceptibilidade de ninfas e adultos de <i>T. limbatovenstris</i> ao <i>M. anisopliae</i>	38
2.4.3. Elucidação estrutural dos compostos químicos	43
2.4.4. Ensaio antifúngicos	44
2.5. DISCUSSÃO	49
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
<b>Capítulo 3 – Efeitos de agroquímicos convencionais utilizados na cultura do arroz a <i>M. anisopliae</i>.</b>	67
3.1. INTRODUÇÃO	68
3.2. OBJETIVOS	69
3.2.1. Objetivos Gerais	69
3.2.2. Objetivos Específicos	69
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.3.1. Fungo	69
3.3.2. Agroquímicos testados	69
3.3.3. Protocolo para ensaio de compatibilidade <i>in vitro</i>	75
3.3.4. Análise estatística	76
3.4. RESULTADO	77
3.5. DISCUSSÃO	85

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
<b>Capítulo 4 – Aumento da patogenicidade de <i>M. anisopliae</i> a controle <i>T. limbativentris</i> com doses subletais de inseticidas químicos.</b>	96
4.1. INTRODUÇÃO	97
4.2. OBJETIVOS	98
4.2.1. Objetivos Gerais	98
4.2.2. Objetivos Específicos	98
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS	99
4.3.1. Colônia de insetos	99
4.3.2. Fungos e inseticidas	99
4.3.3. Determinação da concentração subletal dos inseticidas químicos para adultos de <i>T. limbativentris</i>	100
4.3.4. Comparação da virulência entre duas cepas de <i>M. anisopliae</i> em adultos de <i>T. limbativentris</i>	101
4.3.5. Interação entre <i>M. anisopliae</i> CG-168 e dois inseticidas contra adultos de <i>T. limbativentris</i>	101
4.3.6. Estudo de campo com <i>M. anisopliae</i> e Tiametoxam.	102
4.3.7. Análises estatísticas	103
4.4. RESULTADOS	104
4.4.1. Concentração subletal de Tiametoxam e $\lambda$ -Cialotrina para adultos de <i>T. limbativentris</i> .	104
4.4.2. Comparação da virulência entre duas cepas de <i>M. anisopliae</i> a adultos de <i>T. limbativentris</i>	107
4.4.3. Interação de <i>M. anisopliae</i> com dois inseticidas químicos sobre adultos de <i>T. limbativentris</i>	107
4.4.4. Estudo de campo com <i>M. anisopliae</i> e Tiametoxam	116
4.5. DISCUSSÃO	120
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.	TL <sub>50</sub> nos diferentes estágios de vida do <i>T. limbativentris</i> em diferentes tratamentos com o fungo <i>M. anisopliae</i> .	43
Tabela 2.2.	Dados sobre índice de Retenção, quantificação relativa, compostos extraídos e origem do extrato.	45
Tabela 2.3.	Efeito dos extratos brutos da GAD ,de ninfas, e GMT, de adultos, sobre o crescimento vegetativo de <i>M. anisopliae</i> .	46
Tabela 2.4.	Atividade fungitóxicas dos compostos extraídos de <i>T. limbativentris</i> a 0,1% ao fungo <i>M. anisopliae</i> .	47
Tabela 2.5.	Resultado da concentração inibitória mínima (CIM) dos aldeídos $\alpha,\beta$ -insaturados ao fungo <i>M. anisopliae</i> .	48
Tabela 3.1.	Descrição dos agroquímicos utilizados nos bioensaios <i>in vitro</i> com o <i>M. anisopliae</i> .	71
Tabela 3.2.	Efeito dos inseticidas sobre os parâmetros biológicos do <i>M. Anisopliae</i> CG 168 a 25°C e 12 h de fotofase.	81
Tabela 3.3.	Efeito dos herbicidas sobre os parâmetros biológicos do <i>M. Anisopliae</i> CG 168 a 25°C e 12 h de fotofase.	82
Tabela 3.4.	Efeito dos fungicidas sobre os parâmetros biológicos do <i>M. Anisopliae</i> CG 168 a 25°C e 12 h de fotofase.	83
Tabela 3.5	Classificação toxicológica dos agroquímicos registrados para produção do arroz ao <i>Metarhizium anisopliae</i> sepa CG 168 com base no índice biológico (IB) proposto por Rossi-Zalaf, <i>et al.</i> (2008).	84
Tabela 4.1.	Determinação das concentrações letais de Tiametoxam e $\lambda$ -Cialotrina sobre adultos de <i>T. limbativentris</i> , utilizando o modelo Probit, sob condições de laboratório.	105
Tabela 4.2.	Virulência de duas cepas de <i>M. anisopliae</i> sobre adultos de <i>T. limbativentris</i> , em condições de	109

laboratório.

- Tabela 4.3. Susceptibilidade de adultos de *T. limbativentris* 112  
expostos a *M. anisopliae* CG-168 e Tiametixam  
aplicado individualmente ou em combinação sob  
condições de laboratório.
- Tabela 4.4. Interações entre *M. anisopliae* com os inseticidas 114  
Tiametoxam e  $\lambda$ -Cialotrina , com base na mortalidade  
observada em laboratório comparada com a  
mortalidade esperada.
- Tabela 4.5. Eficácia de *M. anisopliae* (Cepa ESALQ-1037), 115  
combinada com uma concentração subletal de  
Tiametoxam em adultos de *T. limbativentris* coletados  
com um e sete dias após aplicação em parcelas de  
campo.
- Tabela 4.6. Interação entre *M. anisopliae*  $1 \times 10^{12}$  conídios viáveis/ha 119  
e doses subletais de Tiametoxam (12.5 g/ha) com base  
na mortalidade observada em condições de laboratório  
a partir de insetos coletados em experimento de campo.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	<i>Tibraca limbativentris</i> stal – A) Ninfa de primeiro instar (tamanho real de 1,5mm x 1,0mm); B) Ninfas de segundo instar (tamanho real de 2,3mm x 1,5mm); C) Ninfa de terceiro instar (tamanho real de 4,0mm x 2,2mm); D) Ninfa de quarto instar (tamanho real de 5,5mm x 3,2mm); E) Ninfa de quinto instar (tamanho real de 9,5mm x 6,5mm); F) Adulto (tamanho real de 13,7mm x 7,4mm).	9
Figura 1.2.	Posturas de <i>T. limbativentris</i>	9
Figura 1.3.	Plantas de arroz com coração morto	10
Figura 1.4.	Plantas de arroz com panícula branca	10
Figura 1.5.	Conídios de <i>M. anisopliae</i> com ampliação de 400x	12
Figura 1.6.	Cadáver de insetos de diferentes ordens tomados por esporos de <i>M. anisopliae</i> (Muscardine Verde)	14
Figura 1.7.	Esquema ilustrativo representando o processo de infecção de <i>M. anisopliae</i> .	15
Figura 2.1.	Criação do <i>T. limbativentris</i> em sistema de vasos	32
Figura 2.2.	Eclosão de ninfas do <i>T. limbativentris</i> ao longo do tempo após aplicação do <i>M. anisopliae</i> .	38
Figura 2.3.	Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do tempo de ninfas de primeiro instar de <i>T. limbativentris</i> após aplicação do de <i>M. anisopliae</i> nas concentrações de $5 \times 10^6$ conídios/mL e $5 \times 10^7$ conídios/mL.	39
Figura 2.4.	Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do tempo de ninfas de segundo instar de <i>T. lembativentris</i> após aplicação de <i>M. anisopliae</i> nas concentrações de $5 \times 10^6$ conídios/mL e $5 \times 10^7$ conídios/mL.	40
Figura 2.5.	Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do	40

tempode ninfas de terceiro ínstar de *T. lembativentris* tratadas com *M. anisopliae* nas concentrações de  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL.

- Figura 2.6. Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do tempo de ninfas de quarto instar de *T. lembativentris* após aplicação do de *M. anisopliae* nas concentrações de  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL. 41
- Figura 2.7. Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do tempo de ninfas de quinto ínstar de *T. lembativentris* após aplicação de *M. anisopliae* nas concentrações de  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL. 41
- Figura 2.8. Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do tempo de adultos de *T. lembativentris* expostos ao fungo *M. anisopliae* nas concentrações de  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL. 42
- Figura 2.9. Compostos caracterizados via CG-EM, extraídos de diferentes estágios de vida de *T. limbativentris*. 44
- Figura 2.10. Representação do padrão de fragmentação na formação do cátion m/z 68 a partir da reação de retro Diels-Alder do D-limoneno. 50
- Figura 2.11. Cromatograma (CG) dos componentes extraídos da DAG de ninfas de primeiro instar. 50
- Figura 2.12. Espectro de massas do D-limoneno. 51
- Figura 2.13. Espectro de massa do tridecano. 52
- Figura 2.14. Espectro de massa do tetradecanal. 53
- Figura 2.15. Cromatograma (CG) dos componentes extraídos da DAG de ninfas de segundo a quinto instar instar. 53
- Figura 2.16. Espectro de massa do (E)-2-hexenal. 54

Figura 2.17.	Cromatograma (CG) dos componentes extraídos da MTG de adultos do <i>T. limbativentris</i> .	55
Figura 2.18.	Espectro de massa do undecano.	55
Figura 2.19.	Espectro de massa do decano.	56
Figura 2.20.	Espectro de massa do (E)-2-octenal.	56
Figura 2.21.	Espectro de massa do (E)-2-decenal.	57
Figura 2.22.	Padrão de fragmentação do 4-oxo-(E)-2-hexenal na formação dos íons m/z 55 e m/z 83.	58
Figura 2.23.	Espectro de massa do 4-oxo-(E)-2-hexenal.	58
Figura 2.24.	Estrutura molecular do aminoácido Cistina.	62
Figura 2.25.	Formação de uma imina pela reação entre aldeídos e aminas.	62
Figura 3.1.	Estrutura molecular dos inseticidas químicos testados na avaliação do efeito dos mesmos sobre <i>M. anisopliae</i>	73
Figura 3.2.	Estrutura molecular dos herbicidas e fungicidas químicos testados na avaliação do efeito dos mesmos sobre <i>M. anisopliae</i>	74
Figura 4.1	Curva de mortalidade acumulativa (% ± EP) de adultos <i>Tibraca limbativentris</i> após aplicação de diferentes concentrações de Tiametoxam e λ-Cialotrina, estimado pelo método de Probit e sobre a mortalidade natural obtida no grupo de controle.	106
Figura 4.2.	Curvas cumulativas de mortalidade (% ± EP) de adultos de <i>T. limbativentris</i> após a exposição ao tratamento individual e combinado entre as concentrações de Tiametoxam (0,38 e 0,77 ppm) e as suspensões de conídios de <i>M. anisopliae</i> ( $5 \times 10^6$ , $5 \times 10^7$ , $5 \times 10^8$ conídios/mL).	110

- Figura 4.3.. Curva de mortalidade cumulativa (% ,  $\pm$  EP) de adultos de *T. limbativentris* após a exposição ao tratamento individual e combinado entre a dose subletal de Karate Zeon™ (200 ppm) e uma suspensão de conídios de *M. anisopliae* ( $5 \times 10^7$  conídios/mL). 111
- Figura 4.4 Curva de mortalidade acumulativa (%  $\pm$  EP) de adultos de *T. limbativentris* coletados após um e sete dias da aplicação dos tratamentos com *m. anisopliae* ESALQ-1037, duas doses de Tiametoxam e um tratamento combinando o *M. anisopliae* ( $1 \times 10^{12}$  conídios/ha) com Tiametoxam (12.5 g/ha). 118
- Figura 4.5 Efeito de doses subletais de Tiametoxam (12.5 g/ha) e dose cheia (50 g/ha) e *M. anisopliae* ESALQ-1037 (Ma) 1 L na formulação óleo emulsionável ( $1 \times 10^{12}$  conídios viáveis/ha) aplicado isoladamente e combinado com Tiametoxam em dose subletal. 119

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CENARGEN	Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos.
CNPAF	Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão.
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization
IRGA	Instituto Rio Grandense do Arroz
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NIST	National Institute of Standards and Technology
ANOVA	Analysis of Variance
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrômetro de massa.
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL <sub>30</sub>	Concentração Letal para 30% da população
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal para 50% da população
CL <sub>95</sub>	Concentração Letal para 95% da população
CS	Suspensão de Encapsulado
EC	Concentrado Emulsionável
EP	Erro Padrão
GAD	Glândula Abdominal Dorsal
gl	Graus de Liberdade

GLM	General Linear Model
GMT	Glândula Metatorácica
i.a.	Ingrediente Ativo
IB	Índice Biológico
LSD	least significance difference
m/z	Razão Massa Carga
∅	Fluxo
ppm	Parte por Milhão
RPM	Revoluções por Minuto
SL	Concentrado Solúvel
TL <sub>30</sub>	Tempo Letal para 30% da população
TL <sub>50</sub>	Tempo Letal para 50% da população
TL <sub>95</sub>	Tempo Letal para 95% da população
UE	Unidade Experimental
UR	Umidade Relativa
WG	Granulado Dispersível
WP	Pó Molhável

## RESUMO

O presente estudo foi dividido em capítulos que inclui diversos aspectos da interação entre o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* com o percevejo do colmo do arroz *T. limbativentris* como se seguem:

O capítulo 1 (**Considerações teóricas**) descreve uma introdução sobre os elementos envolvidos neste estudo como: A importância da cultura do arroz para o Brasil, assim como aspectos sócio-econômicos e fitossanitário dessa cultura. O mesmo capítulo também aborda informações sobre o percevejo do colmo do arroz, *Tibraca limbativentris* stal (1869) como aspectos morfológicos, biológicos, importância como praga e métodos de controle químico e biológico. Sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin esse capítulo aborda aspectos gerais como taxonomia, morfologia, processo de infecção desse fungo aos seus hospedeiros e fatores de virulência. Para finalizar o capítulo foi explorado o assunto sobre ecologia química abordando as interações interespecíficas e intraespecíficas entre os insetos da família pentatomidae com ênfase nos estudos sobre compostos de defesas já elucidados nesta família de insetos.

O capítulo 2 (**Toxicidade de compostos extraídos da Glândulas Metatorácica (GMT), de adultos, e da Abdominal Dorsal (GAD), de ninfas, de *T. limbativentris* a *M. anisopliae***) descreve os resultados relacionados a diferença de susceptibilidade entre os estágios de vida do *T. limbativentris* ao fungo *M. anisopliae* e correlaciona estes resultados a atividade fungitóxica dos aldeídos (E)-2-octenal e (E)-2-decenal, extraído da glândula metatorácica (MTG) de adultos, e também o (E)-2-hexenal, extraído da glândula abdominal dorsal (DAG) nos estágios ninfais de segundo a quinto instar deste percevejo, por meio de coleta de exúvias. Todos os compostos extraídos foram caracterizados por CG-EM e o potencial fungitóxico determinado por meio da concentração inibitória mínima (MIC) desses compostos capaz de inibir totalmente a germinação do fungo. O aldeído (E)-2-decenal foi o mais ativo, apresentando MIC de 0,003% (30 ppm), em comparação com o (E)-2-hexenal e o (E)-2-octenal que apresentaram MIC de 0,012 e 0,025% respectivamente.

O capítulo 3 (**Efeito de agroquímicos convencionais utilizados na cultura do arroz ao fungo *M. anisopliae***.) descreve a avaliação da compatibilidade do *M. anisopliae* à oito inseticidas, cinco herbicidas e quatro fungicidas registrados para a cultura do arroz. Neste trabalho avaliou-se a germinação (GER), o crescimento vegetativo (CV) e a esporulação (ESP) do fungo após três horas em mistura, sob agitação, com os agroquímicos. Os parâmetros avaliados do fungo foram equacionados segundo a fórmula:  $IB = [(CV*47)+(ESP*43)+(GER*10)]/100$ ; no qual através do valor índice biológico (IB) determinou-se a seletividade dos agroquímicos ao fungo. Entre os agroquímicos testados, os inseticidas Bravic™, Actara™, Karate Zeon™; os herbicidas Roundup™, Basagran™, Kifix™ e o fungicida Priori™ foram compatíveis ao *M. anisopliae*. No entanto, o fungicida Priori™ retardou a germinação do fungo, até 20 horas após o contato nenhum conídio germinado foi observado neste tratamento e após 48 horas foi observado 43% germinação.

O capítulo 4 (**Aumeto da patogenicidade de *M. anisopliae* a *T. limbativentris* com doses subletais de inseticidas químicos**.) descreve a interação do *M. anisopliae* combinado com concentrações subletais de tiametoxam contra adultos do *T. limbativentris*. A combinação tem como hipótese superar resistência química natural do *T. libentriventris* ao *M. anisopliae*. Os resultados mostraram que o *T. limbativentris* foi mais susceptível ao *M. anisopliae* associado a doses subletais de tiametoxam (Actara™) ou λ-cialotrina (Karate Zeon™) do que ao

fungo isolado. E ainda foi verificado uma concentração ótima para o fungo ( $5 \times 10^7$  conídios.mL), através de correlação com concentrações do inseticida tiametoxam. O fungo nesta concentração misturado ao tiametoxam a 3.1 ppm causou mortalidade de 80%, enquanto a taxa de mortalidade nos tratamentos com o fungo isolado e o tiametoxam 3.1 ppm foi de 38 e 35% respectivamente. As doses subletais de Actara™ (3,1ppm) Karate Zeon™ (186ppm) foi estimada pela equação Probit. Com a intenção de utilizar uma cepa comercial do *M. anisopliae* foi comparada a virulência da cepa CG-168, utilizadas em todos os ensaios anteriores, com a cepa ESALQ-1037, registrada comercialmente. Segundo resultados ambas as cepas tiveram virulência semelhante para adultos de *T. limbativentris*.

No experimento de campo, foram preparados cinco tratamentos: Fungo + Actara™ dose subletal (50g/há), Fungo, Actara™ dose subletal (50g/há), Actara™ dose cheia (200g/ha) e o controle; os quais foram aplicados nos insetos contidos em gaiolas em campo. Após um e sete dias da aplicação, foram coletados 20 insetos de cada gaiola e avaliados em laboratório. Segundo resultados, na avaliação da primeira coleta, o tratamento com a mistura do *M. anisopliae* com 50g/ha Actara™ apresentou taxa de mortalidade 54% contra 40, 32, 26 e 18% respectivamente para os tratamentos Actara™ dose cheia (200g/ha), Fungo, Actara™ dose subletal (50g/há) e Controle. Na avaliação da segunda coleta, o tratamento com o fungo + Actara™ destacou em relação aos demais, causando taxa de mortalidade de 50% enquanto o tratamento com o fungo isolado foi de 16% e os demais de 0%. Nesta avaliação constatou-se um sinergismo entre o fungo e a dose subletal do inseticida.

Em resumo, nossos resultados destacam o potencial de concentrações subletais do inseticida tiametoxam (neonicotinóide) em aumentar a susceptibilidade dos adultos de *T. limbativentris* ao fungo *M. anisopliae*. Na verdade, esta estratégia consiste em um método de controle eficaz e viável para combater o percevejo do colmo do arroz em campo, do ponto de vista de um manejo integrado pragas com sustentabilidade.

## ABSTRACT

This study was divided in chapters that include various aspects of the interaction between the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* with rice stink bug *T. limbativentris* as follows:

Chapter 1 (**Theoretical considerations**) describes an introduction about the elements involved in this study as: the importance of rice crops for Brazil, as well as socio-economic and planted areas with this crop. It also covers information about life cycle and ecology of the rice stink bug, *Tibraca limbativentris* stal (1869) along with its importance as a pest. Chemical and biological control measures are discussed as well. Regarding the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, general aspects of taxonomy, morphology, infection process of this fungus to their hosts and virulence factors were also addressed. To sum up, chemical ecology was explored addressing intraspecific and interspecific interactions among insect family pentatomidae with emphasis on studies of chemical compounds of defense in order to understand the natural resistance of this group of insects to entomopathogenic fungi.

Chapter 2 (**Toxicity of compounds extracted from the cuticle and the stink methathoracic gland (MTG) of *T. limbativentris* to the fungus *M. anisopliae***) describes the susceptibility of different life stages of *T. limbativentris* to *M. anisopliae* and correlates these results with the fungicidal activity of aldehydes (E)-2-octenal and (E)-2-decencal extracted from metathoracic scent glands (MTG) of adults as well as the (E)-2-hexenal, extracted from dorsal abdominal scent glands (DAG) of nymphal stages (second to fifth instar), by collecting exuviae. All compounds extracted were characterized by GC-MS and their fungistatic potential determined measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) of these compounds, which expresses the ability of these compounds to inhibit the conidial germination of this fungus entirely. The aldehyde (E)-2-decencal was the most harmful to *M. anisopliae* germination, with MIC of 0.003% (30 ppm) compared to the (E)-2-hexenal and (E)-2-octenal, which in turn showed MIC of 0.012 and 0.025%, respectively.

Chapter 3 (**Effect of pesticides used in conventional rice cultivation with the entomopathogenic fungus *M. anisopliae***.) Describes the assessment of the compatibility of *M. anisopliae* to eight insecticides, five herbicides and four fungicides registered for rice cultivation. In this study we evaluated the germination (GER), vegetative growth (VG) and sporulation (ESP) of the fungus after three hours in the mixture, stirring with agrochemicals. The parameters evaluated were the fungus equated using the following formula:  $BI = [(VG * 47) + (ESP * 43) + (10 * GER)] / 100$ , in which through the biological index value (BI) was possible to determine the compatibility level of agrochemicals to the fungus. Among the tested pesticides, insecticides Bravic™, Actara™, Karate Zeon™; herbicide Roundup™, Basagran™, Kifix™ and fungicide Piori™ were the only products compatible with *M. anisopliae*.

Chapter 4 (**enhanced pathogenicity to *T. limbativentris* with sublethal doses of chemical insecticides.**) describes the interaction of *M. anisopliae* combined with sublethal concentrations of thiamethoxam against adults of *T. limbativentris*. This combination as hypothesis has to overcome the natural chemical resistance of *T. limbativentris* to *M. anisopliae*. The results showed that *T. limbativentris* was more susceptible to *M. anisopliae* (strain CG-168) associated with sublethal doses of thiamethoxam (Actara™) or lambda-cyhalothrin (Karate Zeon™) than the fungus alone. In addition, the optimum concentration was observed for the fungus at  $5 \times 10^7$  conidia combined with concentrations of the insecticide thiamethoxam. The fungus in

this concentration mixed with thiamethoxam at 3.1 ppm caused 80% adult mortality, whereas the mortality rates in treatments with the fungus and 3.1 ppm thiamethoxam both applied alone were 38 and 35% respectively. Sublethal doses of Actara™ (3.1 ppm) and Karate Zeon™ (186 ppm) was estimated by Probit equation. For the purpose of using a commercial strain of *M. anisopliae*, the virulence of strain CG-168, used in all previous tests, was compared to strain 1037-ESALQ, registered commercially. According to the results both strains had similar virulence to adult *T. limbativentris*.

commercially registered in Brazil market. According to the results, adults of *T. Limbativentris* were similarly susceptible to both strains of *M. anisopliae*.

In the field experiment, five treatments were prepared: Fungus + Actara™ sublethal dose (50g/ha), Fungus, Actara™ sublethal dose (50g/ha) Actara™ full dose (200g/ha) and control; which were applied on rice plants infested with insects inside nylon cages under field conditions. After seven and 14 days of application, 20 insects were collected from each cage and evaluated in the laboratory. According to the results, the evaluation of the first collection, mixture of *M. anisopliae* with 50g/ha Actara™ caused 54% mortality compared with 40, 32, 26 and 18% respectively for the full dose of Actara™ (200g/ha), fungus alone, Actara™ sublethal dose (50g/ha) and control. In the second collection, fungus + Actara™ highlighted in relation to the others, causing a 50% mortality, while treatment with the fungus alone the mortality was 16% and the others treatment was 0%. As a result, we found a synergism effect between fungus and sublethal dose of the insecticide.

In summary, our results highlight the potential of sublethal concentrations of the neonicotinoid insecticide thiamethoxan in increasing the susceptibility of adults of *T. Limbativentris* to the fungus *M. anisopliae*. In fact, this strategy consists in a control method effective and feasible to combat this stink rice bug in the field from a viewpoint of an integrated pest management and sustainability.

# Capítulo 1

## Considerações teóricas

## **1.1. O ARROZ**

*“...Nenhuma outra cultura agrícola alimenta tantas pessoas, sustenta tantas famílias, é tão crucial para o desenvolvimento de tantas nações e apresenta alto impacto sobre o nosso meio ambiente. A produção de arroz alimenta quase a metade do planeta todos os dias, fornece a maior parte da renda para milhões de habitantes rurais pobres, pode derrubar governos e cobre 11% da terra agricultável do planeta.”(Cantrell, 2002).*

### **1.1.1. Aspectos gerais**

O arroz é constituído por sete espécies, *Oryza barthii*, *O. glaberrima*, *O. latifolia*, *O. longistaminata*, *O. punctata*, *O. rufipogon* e *O. sativa*, sendo a *O. sativa* a espécie mais comercializada. É uma planta da família das gramíneas que junto com o trigo e o milho, constituem a base da alimentação humana, sendo responsáveis por cerca da metade da ingestão energética e proteica dos indivíduos (YOUNG & PELLET, 1994). É a terceira maior cultura cerealífera do mundo, ficando atrás apenas do milho e trigo.

Em muitos países em desenvolvimento, o arroz é considerado o produto de maior importância econômica, sendo básico para cerca de 24 bilhões de pessoas, e o aumento crescente de seu consumo impõe aos setores produtivos a busca de novas tecnologias visando o aumento da produtividade (CANTRELL, 2002).

Diante da importância das características nutricionais e aceitação pelos consumidores, o produto arroz deverá cada vez mais ser focado quanto à questão de segurança alimentar, estratégica e política para a melhoria da nutrição e qualidade de vida do povo dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

### **1.1.2. Importância na nutrição humana.**

A alimentação humana consome carboidratos, proteínas, lipídios, minerais e vitaminas. Os carboidratos potencialmente digestíveis fornecem cerca de 60% do valor calórico total ingerido diariamente pela espécie humana. Eles são indispensáveis para manter a integridade funcional do tecido nervoso e, em condições normais, é a única fonte de energia para o cérebro. Tem as finalidades de

fornecer energia ao organismo, desenvolver e restaurar tecidos e manter as funções vitais (VELOSO & BASSINELO 2006).

As principais fontes de carboidratos são os grãos de cereais. O arroz é um glicídio de fácil digestão, alto valor energético e índice glicêmico que se caracteriza por absorção lenta e gradual pelo organismo. O arroz contém um hidrato de carbono complexo, que mantêm o nível de energia por períodos maiores. Na alimentação com arroz, há uma economia de proteínas, pois o corpo não usa a proteína da dieta ou das reservas para abastecer as necessidades de energia quando há um hidrato de carbono disponível (VELOSO & BASSINELO 2006).

A proteína do arroz é a mais nobre entre os cereais. A fração proteica do arroz, embora quantitativamente pequena, apresenta uma boa composição de aminoácidos para o metabolismo humano, quando metabolizado, gera menos resíduos nitrogenados, favorecendo a função renal de filtragem desses catabólitos (JULIANO, 1993).

Como produto da Cesta Básica Brasileira, o arroz é responsável por 12% das proteínas e 18% das calorias da dieta básica (VELOSO & BASSINELO 2006). No Brasil, o arroz é consumido preferencialmente nas formas branco polido, parboilizado e integral, sendo o branco polido o mais consumido. É um cereal muito versátil, podendo ser consumido também na forma de cereais matinais, macarrão, biscoitos, pães, farinhas, pastas, sorvetes, doces e bebidas (VELOSO & BASSINELO 2006). Do farelo extrai-se o óleo, rico em gama-orizanol, que possui propriedades antioxidantes que protegem vasos do coração dos danos dos radicais livres e ajuda a manter os níveis de colesterol dentro da normalidade. Como produtos processados, o arroz pode ser encontrado na forma de pratos semiprontos, com temperos, arroz expandido, farinhas instantâneas, pellets e também na forma enriquecida, com adições de cálcio, de ferro e zinco.

O arroz é considerado um bom complemento para qualquer prato à base de carnes, é ingrediente de várias receitas e de fácil preparo. Na alimentação de pessoas saudáveis, o arroz complementado com feijão, carne ou ovo, supre com excelência a necessidade de aminoácidos essenciais para o equilíbrio do organismo

(VELOSO & BASSINELO 2006). Nesse contexto, o arroz agrega valores nutricionais e culturais inquestionáveis, contribuindo para uma alimentação adequada.

### **1.1.3. Produção, consumo e aspectos econômicos.**

Pela importância do arroz na alimentação das populações de vários países, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) comemorou em 2004 o ano internacional do arroz, com o objetivo de encorajar os governantes a criar políticas de incentivo a produção e consumo do arroz e abertura dos mercados, pois naquela época temiam a possibilidade de desabastecimento e aumento da fome e desnutrição. Esse produto foi incentivado devido a sua aceitação, valor nutricional e área para cultivo.

O arroz é cultivado em todos os continentes, tanto em regiões tropicais quanto temperadas. A Ásia contribui com cerca 90% da produção mundial, sendo que entre os 10 maiores produtores mundiais, apenas o Brasil, Nigéria e Costa do Marfim não pertencem ao continente asiático.

A produção de arroz no Brasil é expressiva, ocupando a terceira posição em termos de produção de grãos, sendo antecedido pela soja e pelo milho (IBGE, 2010). Em relação à produção mundial ocupa a nona posição.

Mesmo o Brasil estando entre os 10 maiores produtores mundiais de arroz, a partir da década de 80 passou a importar pequenas quantidades, 5% da demanda total. A partir de 1989/90, se tornou um dos principais importadores deste cereal, chegando a 2 milhões de toneladas (ALONÇO et al., 2005), colocando o Brasil entre os dez maiores importadores, absorvendo cerca de 5% do volume das exportações mundiais (FERREIRA et al., 2005).

### **1.1.4. Doenças do arroz**

Em qualquer fase do desenvolvimento, o arroz é susceptível a doenças que podem afetar a produtividade e a qualidade dos grãos. A prevalência e a severidade das doenças dependem de uma série de fatores como: virulência do patógeno, ambiente mais favorável, incidência do patógeno e fator de resistência da cultivar. Segundo a literatura, existe mais de 80 doenças catalogadas em todo o mundo para cultura do arroz (PRABHU et al., 2005).

As lavouras brasileiras de arroz estão expostas a ocorrência de diversas doenças. Entre estas, destaca-se a brusone, causada pelo fungo *Pyricularia grisea*, cujos danos em anos favoráveis a sua ocorrência podem comprometer até 100% da produção do arroz. Outras doenças fúngicas importantes na cultura do arroz são a mancha parda (*Bipolaris oryzae*), escaldadura da folha (*Rhynchosporium oryzae*), mancha estreita (*Cercospora oryzae*), mancha das bainhas (*Rhizoctonia oryzae*), queima das bainhas (*Rhizoctonia solani*), cárie do grão (*Tilletia barclayana*) e falso carvão (*Ustilaginoidea virens*). Como as principais doenças do arroz são causadas por fungos fitopatógenos, o método de controle mais utilizado é o uso de fungicidas sintéticos. No entanto, o uso intensivo desses fungicidas pode causar danos a microbiota natural do agroecossistema, eliminando fungos benéficos às práticas agrícolas como antagonistas a outros fitopatógenos, decompositores e entomopatogênicos (PRABHU *et al.* 2005).

Para minimizar a ação deletéria desses produtos aos fungos benéficos, deve-se implementar boas práticas de manejo como: dimensionamento adequado das fontes de água, realizar a irrigação no momento necessário, semear na época recomendada, destruir os restos de cultura e utilizar produtos fitossanitários seletivos (PRABHU *et al.*, 1999).

#### **1.1.5. Pragas do arroz**

Entre as espécies de insetos mais prejudiciais ao arroz estão *Spodoptera frugiperda* (lagarta-da-folha), *Oryzophagus oryzae* (gorgulho-aquático), *Tibraca limbativentris* (percevejo-do-colmo) e *Oebalus poecilus* (percevejo-do-grão). O conhecimento sobre bases técnicas do Manejo Integrado de Pragas (MIP) é essencial para o controle eficaz das espécies supracitadas, resultando assim em menores riscos de impacto ambiental negativo (FERREIRA & BARRIGOSI 2001).

Nesse sistema, o manejo integrado de pragas, baseia-se no inter-relacionamento dos elementos dos agroecossistemas, tais como clima, solo, planta, medidas culturais, organismos benéficos, controle químico e fitófagos. Dessa forma, constitui-se um plano de medidas voltado a diminuição do uso de agrotóxicos na produção convencional. O MIP é um conceito aberto, por definição, a todas as tecnologias, modernas ou mais antigas, que permitem controlar com eficiência as

pragas muito numerosas e diversificadas, com os menores custos econômico e ambiental (FERREIRA & BARRIGOSI 2001).

Na cultura do arroz, o principal método de controle de pragas ainda é o uso de agrotóxicos. Esse método é extremamente agressivo aos organismos benéficos (predadores, parasitoides, microrganismos benéficos, polinizadores entre outros), contamina o solo e a água, e, além disso, pode induzir os insetos pragas a adquirir resistência aos inseticidas sintéticos, exigindo doses mais altas ou a necessidade constante de estar renovando os produtos, tornando mais oneroso os custos de produção.

Diante de toda essa problemática causada pelo uso intensivo de agrotóxicos e uma crescente preocupação com a segurança alimentar, cria-se uma necessidade de um método de controle alternativo menos agressivo ao meio ambiente e a saúde do homem.

## **1.2. *Tibraca limbativentris* STAL, 1860 (PERCEVEJO DO COLMO DO ARROZ)**

A cultura do arroz, no aspecto fitossanitário, conta com uma série de fatores adversos entre doenças e pragas, dentre os quais se destaca o percevejo do colmo (*Tibraca limbativentris* Stal, 1860) (Fig. 1.1 F), como uma praga importante na cultura do arroz. Essa praga pode, em determinadas condições, causar prejuízos de até 80% no rendimento de grãos (FERREIRA et al 1997). E ainda, segundo os seus hábitos de vida, mesmo identificado a tempo, é de difícil controle (FERREIRA et al., 1986).

### **1.2.1. Aspectos morfológicos e biológicos.**

As posturas de *Tibraca limbativentris* (Fig. 1.2) ocorrem na superfície das folhas e possuem, aproximadamente, 20 ovos agrupados dispostos alternadamente em duas ou mais fileiras. Os ovos são de formato cilíndricos, medindo 1 mm de comprimento e 0,8 mm de largura, possuem coloração esverdeada, escurecendo com a proximidade da eclosão (BOTTON et al., 1996; FERREIRA et al., 1997; SILVA et al., 2004).

O período ninfal apresenta cinco instares. No primeiro (Fig. 1.1 A), as ninfas têm 1,5 mm de comprimento e 1,0 mm de largura, são de coloração marrom avermelhado, sendo o abdome verde amarelado com manchas marrons. As ninfas de segundo instar (Fig. 1.1B) têm 2,3 mm de comprimento e 1,5 mm de largura, apresentam pequenas pontuações claras na cabeça e tórax sendo predominantemente de cor verde, o abdome tem três manchas grandes na linha média dorsal, e parte ventral verde. No terceiro instar (Fig. 1.1 C), essas têm em média, 4,0 mm de comprimento e 2,2 mm de largura, cabeça marrom escura, tórax com pontuações marrons claras, sobre o fundo branco amarelado na parte dorsal, abdome com três manchas dorsais em cores semelhantes ao tórax, porém claras, estendendo-se na parte ventral. As de quarto instar (Fig. 1.1 D) medem 5,5 mm de comprimento e 3,2 mm de largura, cabeça, com pontuações marrons escuras, em geral branco amareladas, tórax com coloração semelhante a da cabeça e pernas branco amareladas, tecas alares começam a aparecer, o abdome tem pontuações marrons claras sobre fundo branco brilhante, coloração clara também na parte ventral. No quinto e último instar (Fig. 1.1E) as ninfas medem 9,5 mm de comprimento e 6,5 mm de largura, cabeça branco amarelada com pontuações cinza escuras, tórax com superfície colorida semelhante á da cabeça, manchas claras arredondadas no pronoto, o abdome é preto brilhante com manchas grandes e alaranjadas no dorso, pernas de cores mais claras como no quarto instar (FERREIRA et al. 1997).

As fêmeas medem, em média, 13,7 mm de comprimento e 7,4 mm de largura, são maiores que os machos, os quais medem 12,5 mm de comprimento e 7,1 mm de largura. Os adultos apresentam cabeça de formato triangular, marrom, com pontuação preta e bordas alaranjadas. Os olhos são salientes, marrom-escuros contornados de branco-amarelado, dois ocelos vermelho-escuros localizados entre e um pouco atrás dos olhos compostos. Antenas da cor da cabeça com 5,5 mm de comprimento, tendo cinco segmentos pilosos dos quais o terceiro é o maior, lábio de aproximadamente 6 mm de comprimento, indo um pouco além do terceiro par de pernas, possui quatro segmentos marrons, sendo o último mais escuro. O tórax tem pronoto bem desenvolvido, marrom com laterais amarelo brilhantes e pontuado como as demais partes dorsais, ângulos antero-laterais com saliências pouco pronunciadas, escutelo triangular, com ápice semi-arredondado, base apresentando

três pontos, sendo um no meio e um junto a cada vértice, hemiélitros do comprimento do abdome, cada um com um ponto amarelo no córion. Pernas totalmente marrons com tarsos trímeros. O abdome é coberto pelo escutelo e hemiélitros, com apenas parte do conexivo visível, o qual é marrom, com quatro manchas pretas de cada lado. O corpo do adulto, em geral, apresenta-se marrom claro na parte dorsal e marrom escuro na parte ventral, com uma faixa na margem do abdome (FERREIRA et al. 1997; GALLO et al., 2002).

A fase de ovo tem duração média de sete dias (BOTTON et al., 1996; SILVA et al., 2004) e sobrevivência de 89%. Em condições controladas, em laboratório, Silva et al. (2004) observaram duração do período ninfal de 55,4 dias, sendo o 4° e o 5° instares, os que mais duraram, tendência similar à ocorrida para outros pentatomídeos, como *Euschistus heros* (COSTA et al., 1998).

O ciclo de vida de *T. limbativentris* é de cerca de 60 dias (SILVA et al., 2004) a uma temperatura média de 26 °C. Em casa de vegetação, com temperatura média de 28 °C, Botton et al. (1996) obtiveram duração menor do ciclo de vida, 37,5 dias. Ciclo este considerado longo, quando comparado a de outros pentatomídeos como *Nezara viridula* (Linnaeus, 1726) e *Euschistus heros* (Fabricius, 1794), com 37 e 38,6 dias, respectivamente (COSTA et al., 1998). De acordo com Silva et al. (2004) fêmeas de *T. limbativentris* atingiram maturidade sexual, registro da primeira cópula, em  $14,2 \pm 7,48$  dias após a emergência, período maior do que o observado nos machos,  $11,3 \pm 6,86$  dias. As fêmeas apresentaram período de oviposição de  $39,2 \pm 10$  dias em que depositaram  $92,2 \pm 27,4$  ovos/fêmea, e longevidade de  $59,3 \pm 25,2$  dias, menor que a longevidade dos machos,  $68,5 \pm 23,6$  dias (SILVA et al., 2004).

Em regiões de clima temperado, após a colheita, as populações infestantes podem migrar para sítios de hibernação, em áreas de refúgio, como restos culturais ou gramíneas e ciperáceas nativas, permanecendo nestes locais em diapausa reprodutiva, ao redor das áreas de lavoura, retornando quando o arroz inicia o perfilhamento (LINK et al., 2006; COSTA& LINK, 1992b).

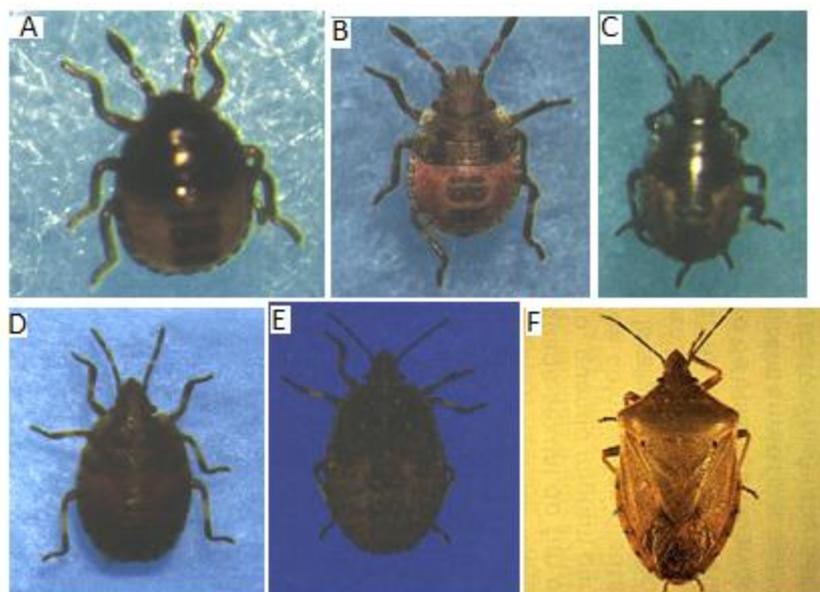


Figura 1.1 – *Tibraea limbativentris* stal – A) Ninfa de primeiro instar (tamanho real de 1,5mm x 1,0mm); B) Ninfas de segundo instar (tamanho real de 2,3mm x 1,5mm); C) Ninfa de terceiro instar (tamanho real de 4,0mm x 2,2mm); D) Ninfa de quarto instar (tamanho real de 5,5mm x 3,2mm); E) Ninfa de quinto instar (tamanho real de 9,5mm x 6,5mm); F) Adulto (tamanho real de 13,7mm x 7,4mm). Foto: Ferreira et al. 1997 com adaptações.



Figura 1.2 – Postura de *T. limbativentris*

Foto: (FERREIRA et al. 1997)

### 1.2.2. Danos causados a cultura do arroz.

Em altas infestações, *T. limbativentris* provoca perdas consideráveis na produção, principalmente se o ataque ocorrer nas fases de pré-floração e formação

dos grãos (COSTA & LINK, 1992a). Os danos desta espécie são observados a partir do segundo instar, cuja picada na base das plantas provoca o aparecimento do sintoma conhecido como “coração-morto” (Fig. 1.3) na fase vegetativa e o sintoma da “panícula-branca” (Fig. 1.4) na fase reprodutiva (COSTA & LINK, 1992a; FERREIRA et al, 1997; SILVA et al., 2004).



Figura 1.3 – Plantas com coração morto

Fonte: (FERREIRA et al 1997)



Figura 1.4 – Plantas com panícula branca

Fonte: (FERREIRA et al 1997)

Costa & Link (1992a), verificaram que o nível de dano econômico desta praga está associado à fase fenológica da planta, na fase vegetativa 1 inseto/m<sup>2</sup> reduz a produção em 58,7 kg/ha e na fase reprodutiva, a redução na produção é de 65,16 kg/ha.

No Brasil, recomenda-se que o controle químico deva ser realizado quando a infestação, em plantas com 40 a 50 dias de idade, for de 1 a 2 percevejos por 15 colmos (FERREIRA et al. 1997; MARTINS et al. 2000). Para tal controle as recomendações indicam o uso de Actara 250 WG (neonicotinóide), Karate Zeon (piretróide) ou Malathion 500 CE Sultox (organofosforado) (AGROFIT, 2009).

### 1.2.3. Controle biológico por fungos entomopatogênicos

Estudos realizados por Martins et al. (1987, 1994 e 2004) demonstraram o potencial dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin e *Beauveria*

*bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Moniliales - Moniliaceae) para controle do *T. limbativentris*.

Em outro estudo, Martins et al. (1998) avaliaram os efeitos de cepas de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre *T. limbativentris*, em condições de laboratório e campo. Em laboratório, usaram suspensões de  $5 \times 10^7$  esporos/mL, e no campo, suspensões de  $1 \times 10^{12}$  esporos/ha. Somente as cepas 172, catalogado como CG-169 na Embrapa CENARGEN, e 171 de *M. anisopliae* evidenciaram ser virulentas em condições de laboratório e campo.

Em experimento de campo com *T. limbativentris* confinados em gaiola, Martins et al. (2004), ao utilizarem as cepas 171 e 172 de *M. anisopliae* e a 164 de *B. bassiana*, em suspensão aquosa ( $10^{13}$  esporos/ha) e grânulos (13,9 kg de esporos/ha), verificaram que, em relação à testemunha, todos os tratamentos diminuíram o crescimento populacional do inseto de forma significativa. Posteriormente, esses mesmos autores realizaram outro experimento em área de produção de arroz, utilizando como tratamentos: Monocrotofos (200 g de i.a/ha) Cp 172 de *M. anisopliae*, em suspensão ( $7,2 \times 10^{13}$  de esporos/ha) e em arroz descascado (20 kg de material fúngico/ha), e testemunha. Avaliação feita 30 dias após a aplicação do fungo e 16 dias após a aplicação do Monocrotofos indicou eficiência de controle para ambas as estruturas celulares.

Em testes de laboratório para verificar a virulência de cepas de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para *T. limbativentris*, Martins & Lima (1994) concluíram que a Cp 172 de *M. anisopliae* era a mais virulenta, acumulando, em 25 dias após a aplicação, uma mortalidade 37% superior à da testemunha.

### **1.3. O FUNGO *Metarhizium anisopliae*.**

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Fig. 1.5) é um dos mais conhecidos e importantes agente microbiano de controle de pragas, tendo seu mecanismo de ação bem conhecido (ALVES 1998 ).



Figura 1.5 – Conídios de *M. anisopliae* com ampliação de 400x

O primeiro relato utilizando o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* para controle de pragas foi publicado em 1978 pelo russo Metchnikoff. O fungo foi aplicado em larvas de curculionídeos, conhecida como broca da beterraba. Este fungo parasita naturalmente mais de 300 espécies de diferentes ordens, entre elas pragas importantes da agricultura, da pecuária e insetos vetores de doenças (ALVES, 1998). Segundo Zimmermann (1993), pragas como cupins, gafanhotos, cigarrinhas e besouros tem sido controladas por este fungo. Esse fungo por ser cosmopolita é amplamente utilizado em vários países como Austrália, Cuba, EUA e Brasil.

No Brasil existem vários estudos no sentido de viabilizar programas de controle biológico de insetos pragas por este fungo. Os hospedeiros mais explorados são: carrapatos, broca da bananeira, cupim de montículo em pastagens, pragas de grãos armazenados, larvas de escarabeídeos que atacam a cana de açúcar, cigarrinhas da cana de açúcar (*Mahanarva posticata* e *Mahanarva. fimbriolata*) e cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*) (BARBOSA et al., 1990; ZHIOUA, 1997; CASTRO et al., 1999; KAAYA, 2000; ALMEIDA et al., 2003; PAIÃO et al., 2001; ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2002; BATISTA FILHO et al., 2002; LEITE et al., 2003; REIS et al., 2003; GARCIA et al., 2005; MARANGA et al.,

2005; LOPES et al, 2007; PEREIRA et al., 2008). Em 1995, estima-se que 150.000 hectares de canaviais receberam a aplicação do fungo (LEITE, et al., 2003).

*M. anisopliae* coevoluiu em associação com os insetos, e foi classificado durante muito tempo como Deuteromiceto, e pertencente à classe Hiphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae (ZIMMERMANN, 1993; DRIVER et al., 2000)'. Entretanto, utilizando-se de análises de sequências da região de ITS do rDNA, Liu et al. (2001) identificaram o fungo *M. anisopliae* como sendo a forma anamorfa de *Cordyceps brittlebankisoides*, dando-o assim uma nova classificação como um Ascomiceto.

Morfologicamente o *M. anisopliae* apresenta-se como um fungo filamentosos, com um corpo de frutificação semelhante a um esporodóquio agregado a hifas intimamente entrelaçadas, contendo uma massa compacta de conidióforos característicos, simples ou ramificados, resultando em células esporogênicas denominadas fiálides; das quais se originaram os fialospóros (WANG et al, 2002).

Os conídios são uninucleados, hialinos e fracamente coloridos, se formando sobre conidióforos simples que, justapostos, resultam em uma massa regular sobre o inseto (ALVES, 1998). A doença é conhecida como muscardine verde, pois no final da conidiogênese, os cadáveres apresentam tons de verde que variam do claro ao escuro, acinzentado ou ainda esbranquiçado (WANG et al., 2002) (Fig. 1.6).

Alves (1998) cita que os sintomas causados pela patogenia sobre o hospedeiro incluem inquietação, perda da sensibilidade, descoordenação dos movimentos e paralisia, levando os à morte. O ciclo total da doença é de 5 a 12 dias e varia em função de condições ambientais (temperatura, luz, umidade, radiação ultravioleta), condições nutricionais e susceptibilidade do hospedeiro.



Figura 1.6 – Cadáver de insetos de diferentes ordens tomados por esporos de *M. anisopliae* (Muscardine Verde).

Fonte: [www.itafortbioprodutos/fung/meth/h24957.html](http://www.itafortbioprodutos/fung/meth/h24957.html)

### 1.3.1. Processo de infecção do fungo *M. anisopliae*

No processo de infecção, o *M. anisopliae* constitui de uma série de eventos de natureza mecânica e bioquímica (Fig. 1.7). Esse mecanismo começa pela deposição do conídio sobre a cutícula do hospedeiro (adesão), seguida pela germinação do conídio (germinação), penetração através da cutícula por ação mecânica e processo enzimático (formação de apressórios e grampo de penetração), invasão, colonização do corpo do inseto, produção de toxinas, exteriorização das estruturas fúngicas, produção de conídios sobre a carcaça do hospedeiro e disseminação (ST. LEGER et al., 1996). O tempo de infecção e colonização pode variar, dependendo do hospedeiro e das condições ambientais (WANG et al., 2002).

O fungo ao encontrar condições ambientais favoráveis, faz com que seus esporos interajam hidrofobicamente com a cutícula do hospedeiro. Após a penetração da cutícula pelos tubos germinativos, o fungo *M. anisopliae* rapidamente invade os órgãos internos, causando paralisia e a morte do hospedeiro (GARCIA et al, 2005). Quanto mais conídios penetram, mais toxinas ou enzimas são liberadas, aumentando a mortalidade do inseto. Depois da morte, se as condições forem favoráveis, o fungo cresce e esporula servindo de fonte de inóculo para outros

indivíduos (DRIVER et al., 2000), A fonte natural de inóculo mais importante para iniciar uma epizootia é o solo (ALVES, 1998; FRANCESCHINI et al., 2001).

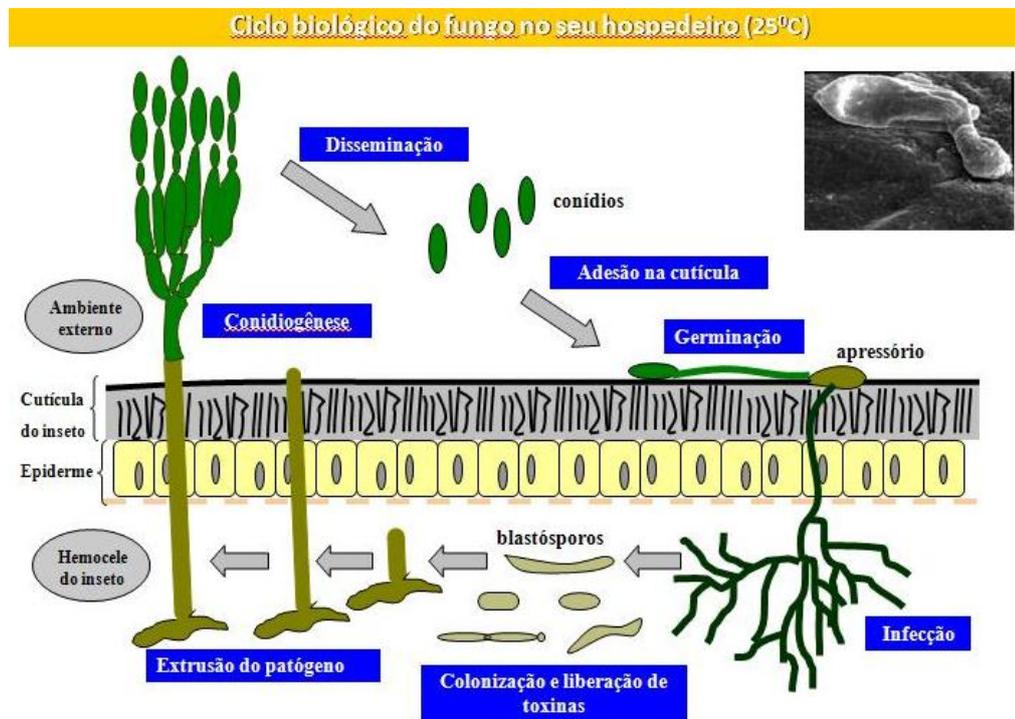


Figura 1.7 – Esquema ilustrativo representando o processo de infecção do *M. anisopliae*.

Segundo St. Leger et al. (1991) o processo de adesão conidial é de fundamental importância para a formação de apressórios, uma vez que representa o primeiro evento da relação fungo hospedeiro e visa à penetração no inseto. A fixação dos conídios no inseto hospedeiro representa o evento inicial no estabelecimento de micoses, e ocorre via cutícula aonde adere e germina. Alves (1998) cita que o fungo *M. anisopliae* atua por contato e age de forma mais lenta que os inseticidas químicos. Contudo, apresentam maior competência para manter o controle, podendo permanecer sobre os insetos mortos na forma de conídios ou mesmo no solo, sendo este, considerado o maior reservatório do *M. anisopliae*. A velocidade de infecção deste fungo está relacionada à estrutura tegumentar dos hospedeiros. Ele produz uma série de enzimas proteolíticas e quitinolíticas que provavelmente, estão envolvidas na sua patogenicidade (JOSHI et al., 1997), sendo responsáveis pela regulação e indução da degradação da quitina (ST. LERGER et al., 1996). Tanto as proteases quanto as quitinases e lipases estão envolvidas na patogenicidade dos fungos entomopatogênicos aos seus hospedeiros (ST. LERGER

et al., 1999), atuando sinergisticamente para degradar e penetrar na cutícula do hospedeiro para posteriormente atingir a hemolinfa, rica em nutrientes (JOSHI et al., 1997).

### **1.3.2. Fatores de virulência do fungo *M. anisopliae***

O desenvolvimento e a virulência dos fungos entomopatogênicos responde drasticamente a fatores ambientais como temperatura, luz, pH, umidade e nutrientes (MILNER et al., 2000). Segundo Alves (1998), a temperatura e a umidade relativa do ar são fatores ambientais relevantes no desenvolvimento das relações parasito-hospedeiro, influenciando na germinação dos esporos, no desenvolvimento do tubo germinativo e na penetração do *M. anisopliae* no hospedeiro. O *M. anisopliae* exige umidade relativa do ar entre 70-90% para a germinação, a infecção e a conidiogênese do fungo (HALLSWORTH & MAGAN, 1999).

Entre os fatores bióticos que afetam o desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos, vários trabalhos relatam a ação fungistática de alguns aldeídos presentes na cutícula do hospedeiro que afeta a germinação do *M. anisopliae* (BORGES et al., 1993; SOSA-GÓMEZ et al., 1997). Soza-Gómez et al. (1997) isolou os aldeídos (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal e (E)-2-decenal da exúvia de quinto instar de *N. viridula* e verificou o alto potencial fungistático desses aldeídos ao *M. anisopliae*.

Segundo St. Leger (1991), a variação de virulência de isolados de fungos entomopatogênicos está relacionada com a composição química da cutícula e os processos bioquímicos envolvidos para a formação do tubo germinativo e colonização do hospedeiro. Outros fatores relacionados à patogenicidade incluem a dimensão de conídios, taxa de crescimento do fungo e atividade enzimática (ST, LEGER et al., 1996; 1999). A velocidade de ação do fungo depende da dosagem do fungo e das espécies hospedeiras envolvidas (BATISTA FILHO et al., 2002; ALMEIDA et al., 2003; LEITE et al., 2003; PEREIRA et al., 2008). Alves (1998) citou que a variação da patogenicidade pode estar associada a fatores como baixa virulência do isolado, especificidade e tolerância do hospedeiro e aplicação em subdoses. As dosagens utilizadas nas aplicações de isolados do fungo *M. anisopliae* variam muito (LEITE et al., 2003), sendo que em alguns casos, mais de uma

aplicação do fungo parece ser necessária para se obter resultados satisfatórios (ALMEIDA et al., 2002). Pereira et al. (2008) constataram que as doses  $16 \times 10^{11}$  e  $20 \times 10^{11}$  de conídios viáveis por hectare do isolado IBCB-425 e ESALQ-1037 foram eficientes no controle de *D. flavopicta*, em pastagem de capim braquiária (*B. decumbens*).

Kaaya (2000) afirma que os tipos das formulações do isolado de *M. anisopliae* podem influenciar na atividade, na eficiência e na resistência aos fatores ambientais. Em trabalhos desenvolvidos com *M. anisopliae* e *B. bassiana*, no controle de pragas verificou-se que as maiores eficiências foram encontradas nas formulações à base de óleo (PRIOR & JOLLANDS, 1988; BATEMAN, 1993; BATISTA FILHO et al., 2002; MARANGA et al., 2005).

Na seleção de isolados de *M. anisopliae* em laboratório, onde se comparou 79 isolados de diferentes hospedeiros e procedência sobre ninfas de *M. fimbriolata*, os isolados IBCB-348, IBCB-408, IBCB-410 e IBCB-425 foram os mais virulentos e produtivos (LOUREIRO et al., 2003). A maioria dos fungos atua por contato e por ingestão, o que permite estudos de seleção de cepas ou isolados (LEITE et al., 2003). Almeida & Batista Filho (2002) citam que a principal fase de um programa de controle microbiano é a seleção de isolados dos patógenos.

#### **1.4. ECOLOGIA QUÍMICA**

Ecologia química é a ciência que estuda as interações químicas entre organismos tais como plantas e animais; animais e animais; plantas e plantas; e, animais e microrganismos (ZARBIN et al., 2009). O estudo da ecologia química é de particular importância para entender as relações entre insetos sociais como formigas, abelhas, vespas e térmitas, onde as substâncias voláteis assumem papel primordial na comunicação e manutenção da organização social (SCHOWALTER, 2006). Em uma nomenclatura mais generalista, essas substâncias são denominadas semioquímicos (ZARBIN et al., 2009). Esse termo genérico engloba os compostos químicos envolvidos nas interações intraespecífica (feromônios) e interespecíficas (aleloquímicos) dos insetos (SCHOWALTER, 2006).

Entre os insetos, vários tipos de feromônios são reconhecidos com base nos comportamentos que induzem (JURENKA, 2004). Os comportamentos mediados por feromônios incluem a atração do sexo oposto para acasalamento (feromônios

sexuais), a agregação de ambos os sexos a um local específico para alimentação, proteção contra predadores ou acasalamento (feromônios de agregação) e demarcação ou a formação de trilhas (feromônios de trilha). Além da comunicação química entre espécies, a ecologia química também envolve os estudos com substâncias químicas defensivas que são utilizadas para afetar predadores potenciais e também como agentes antimicrobianos para se proteger de parasitas como bactérias, fungos, nematóides e protozoários. Os compostos de defesa são fisiologicamente ativos em organismos e podem ter sido selecionados ao longo do processo evolutivo como mecanismos de defesa contra inimigos naturais (HERRERA & PELIMYR, 2002; PANIZZI & PARRA, 1991).

Das 480 espécies-praga agrícolas no Brasil, identificadas até 2009, 103 já tiveram voláteis identificados, deste total de espécies-praga com compostos identificados, oito pertencem às famílias Pentatomidae e Coreidae (ZARBIN et al., 2009).

Com relação aos pentatomídeos que atacam os cultivos no Brasil, quatro possuem os feromônios sexuais identificados: *E. heros*, *N. viridula*, *Thianta sp.*, *Piezodorus guildinii* (Cull, 1788) e *T. limbiventris* (BAKER et al., 1987; ALDRICH et al., 1989; ALDRICH et al., 1991; BORGES et al., 2006). Somente no final da década de 90 houve a identificação do feromônio sexual de um pentatomídeo-praga por pesquisadores brasileiros. Na ocasião foi identificado o feromônio sexual da espécie *E. heros* (BORGES et al., 1998).

Pentatomídeos são comumente conhecidos como “Stink bugs” (bichos fedidos ou malcheirosos), porque em resposta a perturbações ou agressão, imaturos e adultos produzem secreções defensivas com odor desagradável (BAKER et al., 1987). Estes compostos possuem dupla finalidade, para defesa contra predadores e como feromônio de alarme (PAREJA et al., 2007). Estes compostos de repelência em adultos são produzidos na glândula meta torácica (GMT). Por outro lado, em imaturos, são produzidos na glândula dorso-abdominal (GAD) (ALDRICH, 1978). Quando liberados em quantidades menores ou diferentes proporções, componentes das secreções de defesa podem funcionar como feromônio de agregação de ninfas e adultos (FUCARINO et al., 2004).

Os primeiros compostos de defesa da família Pentatomidae identificados foram (E)-2-heptenal e tridecano, identificados como sendo produzidos pela espécie *Oebalus pugnax* (Fabricius) (BLUM et al., 1960). Os pentatomídeos produzem uma

diversificada variedade de compostos para alarme e defesa, principalmente aldeídos e hidrocarbonetos. As moléculas mais comuns são os aldeídos (E)-2-hexenal, (E)-2-decenal, 4-oxo-(E)-2-hexenal, (E)-2-octenal e o hidrocarboneto. Ainda não há estudos que predizem se estes compostos podem inferir nas relações taxonômicas dentro do grupo Pentatomidae, em consequência da baixa quantidade de espécies estudadas e compartilhamento de compostos por espécies de gêneros diferentes (PAREJA et al., 2007). A produção de compostos por pentatomídeos machos com a função de feromônio sexual, geralmente, ocorre em glândulas exócrinas localizadas em diferentes partes do corpo do inseto, principalmente glândulas tegumentares da região ventral do abdome ou esternitos (glândula esternal) (ALDRICH et al., 1978; ALDRICH, 1995).

## 1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Web Page: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>. Acessado em 18/07/2009.

ALDRICH, J. R. Chemical communication in the true bugs and parasitoid exploitation. In R Carde, W Bell, eds Chemical ecology of insects. New York: Chapman & Hall, 363p, 1995.

ALDRICH, J. R.; BLUM, M. S.; LLOYD, H. A.; FALES, H. M. Pentatomid natural products, Journal of Chemical Ecology, 4:2 p.161-172, 1978.

ALDRICH, J.R.; HOFFMANN, M.P.; KOCHANSKY, J.P.; Lusny, W.R.; EGER, J.E.; PAYNE, J.A. Identification and attractiveness of a major pheromone component for Nearctic *Euschistus spp.* stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). Environmental Entomology. 20: p.478-483, 1991.

ALDRICH, J.R.; LUSBY, W.R.; MARRON, B.E.; NICOLAOU, K.C., HOFFMANN, M.P.; WILSON, L.T. Pheromone blends of green stink bugs and possible parasitoid selection. Naturwissenschaften 76: p.173-176, 1989.

ALMEIDA, J.E.M. & A. BATISTA FILHO. Controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Açúcar, Álcool e Subprodutos. 21: p.84-89, 2002.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A.S. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (Hem.; Cercopidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo. 70:1, p.101-103, 2003.

ALONÇO, A. dos S. et al. Importância econômica, agrícola e alimentar do arroz. In: PEREIRA, D. P. Cultivo do arroz irrigado no Brasil. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. EMBRAPA - CPACT. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>> Acesso em: 22 out. 2011.

ALVES, S.B. Fungos Entomopatogênicos, in Controle Microbiano de Insetos, ed. S.B. Alves, Piracicaba: Fealq, pp. 289–381, 1998.

BAKER, R.; BORGES, M.; COOKE, N. G.; HERBERT, R. H. Identification and synthesis of (Z)-(1S,3R,4S)(-)-2-(3,4-epoxy-4-methylcyclohexenyl)-6-methylhepta-2,5-diene, the sex pheromone of the southern green stinkbug, *Nezara viridula* (L.). Journal of the Chemical Society and Chemical Communications, 53, p. 414-416, 1987.

BARBOSA, F. R. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de cigarrinhas-daspastagens. In: Fernandes, O. A.; Corrêa, A. do C. B.; and Bortoli, S. A. de (eds.). Manejo integrado de pragas e nematóides,. V.1. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina, Veterinária e Zootecnia (FUNEP), Jaboticabal, SP, Brasil. p. 171-182, 1990.

BATEMAN, R.P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. Annals of Applied Biology 122: p.145-152, 1993.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA J.E.M.; SANTOS, A.S.; MACHADO, L.A.; ALVES S.B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). Açúcar, Álcool e Subprodutos 21: p.84-89, 2002.

BLUM, M.S., TRAYNHAM, J.G.; CHIDESTER, J.B.; BOGGUS, J.D. n-Tridecane and trans-2-heptenal in scent gland of the rice stink bug, *Oebalus pugnax* (F.) Science 132: p. 1480-1481, 1960.

BORGES, M., LEAL, S. C. M., TIGANO, M. S., VALADARES, M. C. C., Efeito do feromônio de alarme do percevejo verde, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae), sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Anais da Sociedade Entomologica do Brasil. 22: p.505-512 1993.

BORGES, M.; BIRKETT, M.; ALDRICH, J. R.; OLIVER, J. E.; CHIBA, M.; MURATA, Y.; LAUMANN, R. A.; BARRIGOSI, J. A.; PICKETT, J. A.; MORAES, M. C. B. Sex attractant pheromone from the rice stalk stink bug, *Tibraca limbativentris* Stal. Journal of Chemical Ecology, 32:12, p. 2749-2761, 2006.

BORGES, M.; MORI, K.; COSTA, M. L. M.; SUJII, E. R. Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros* (Het., Pentatomidae). *Journal of Applied Entomology*, 122: 6, p. 335-338, 1998.

BOTTON, M.; MARTINS J.F.S.; LOECK, A.E.; ROSENTHA, M.L. Biologia de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 em plantas de arroz. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 25: p.21-26. 1996.

CANTRELL, R. Arroz: Por quê é tão essencial para a segurança e estabilidade global. *Perspectivas Econômicas*, publicação eletrônica do Departamento de Estado dos Estados Unidos, 7:2, p.22-25, 2002.

CASTRO, A.B.A.; BITTENCOURT, V.R.E.T.; DAEMON, E.; VIEGAS, E.C. Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas não alimentadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae). *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida, Seropédica*, 21:1-2, p. 95-102, 1999.

COSTA, E.C. & LINK, D. Avaliação de danos de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) em arroz irrigado. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 21: p.187-195, 1992a.

COSTA, E.C. & LINK, D. Dispersão de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) em arroz irrigado. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 21: p.197-202, 1992b.

COSTA, M.L.M.; BORGES M.; VILELA, E.F. Biologia Reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 27:4, p.559-568, 1998.

CRONIN, J.T. & ABRAHAMSON, W. Do parasitoids diversity in response to hosp-plant shifts by phytophagous insects? *Ecological Entomology*, 26: p.347–355, 2001.

DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J.W.H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycology Research* 14: p.134-150, 2000.

FAO FAOSTAT Database Results . Disponível em: <http://apps1.fao.org/servlet>  
Acessado em: 03/10/2010.

FERREIRA, C.M.; RUCATTI, E.G.; DEL VILLAR, P.M. Produção e aspectos econômicos. In: A cultura do arroz no Brasil. Ed. Santos, A. B.; Stone, L. F.; Vieira, N. R. A. Brasília DF: Embrapa p. 97-115, 2005.

FERREIRA, E. Fauna prejudicial. *In*: A cultura do arroz no Brasil. Ed. Santos, A. B.; Stone, L. F.; Vieira, N. R. A. Brasília DF: Embrapa, p. 585- 659, 2005.

FERREIRA, E. & BARRIGOSI, J.A.F. Controle integrado de pragas em arroz. Embrapa Arroz e Feijão, Goiás, 18p, 2001.

FERREIRA, E.; MARTIN, J.F.S.S.; RANGEL, P.H.N.; CUTRIM V. A. Resistência do arroz ao percevejo-do-colmo. Pesquisa Agropecuária Brasileira 21: 565-569,1986.

FERREIRA, E.; ZIMMERMANN, F.J.P; DOS SANTOS, A.B.; DAS NEVES, B.P.  
FERREIRA, J.M.S.; ARAÚJO, R.P.C.; SARRO, F.B. Perspectivas para o uso de fungos entomopatogênicos no controle microbiano das pragas do coqueiro. Embrapa Tabuleiro Costeiros, Aracajú, 24p, 2001.

FERREIRA, E., ZIMMERMANN, F.J.P.; SANTOS, A.B.; NEVES, B.P.O. O percevejo-do-colmo na cultura do arroz. Goiânia, Embrapa-CNPAP, 43p. (Documentos, 75). 1997.

FRANCESCHINI, M. O entomopatogeno *Metarhizium anisopliae*. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 23: p.32-37, 2001.

FUCARINO, A.; MILLAR, J.G.; MCELFFRESH, J.S.; COLAZZA, S. Chemical and physical signals mediating conspecific and heterospecific aggregation behaviour of first instar stink bug. Journal of Chemical Ecology. 30: p. 1257-1269, 2004.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. Entomologia Agrícola, Piracicaba: SP, FEALQ, 2002. 920p.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J.; PRETTE, N.; BECHARA, G.H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. Brazilian Journal of Microbiology, 36:4, p.368- 372, 2005.

HALLSWORTH, J.E. & MAGAN, N. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *paecilomyces farinosus*. Journal of invertebrate pathology. 74: p.261-266, 1999.

HERRERA, C.M. & PELLMYR, O. Plant-Animal Interactions: An Evolutionary Approach. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2002.

IBGE – Censo de produtividade agrícola em 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/agricultura/censo2010/default.shtm> Acessado em: 05/02/2012

JOSHI, L.; ST. LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W. Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. Gene 197: p.1-8, 1997.

JULIANO, B.O. Rice in human nutrition. Rome: FAO. P. 35-59, 1993.

JURENKA R. Insect pheromone biosynthesis. Topics in Current Chemistry, 239:97–132, 2004.

KAAYA, G.P. Laboratory and field evaluation of entomogenous fungi for tick control. Annals of the New York Academy of Sciences, 916: p. 559-564, 2000.

LEITE, J.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. Produção de fungos entomopatogênicos. 1º Ed. Ribeirão Preto, 92p. 2003.

LINK, F.M., LINK, D.; ANTUNES, V.M.; de RAMOS, J.P. Nível de infestação de *Tibraca limbativentris* na colheita do arroz irrigado, safra 2004/05. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ, Anais do II Congresso Brasileiro da Cadeia Produtiva de arroz. 2006.

LIU, Y.; HUANG, T.; MACMORRIS, M.; BLUMENTHAL, T. Interplay between AAUAAA and the trans-splice site in processing of a *Caenorhabditis elegans* operon pre-mRNA. *Rna*. 7: p.176–181, 2001.

LOPES, R.B.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F.L.; PÉREZ, C.A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16:1, p. 27- 31, 2007.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para o controle da cigarrinha da raiz da cana, *Mahanarva fimbriolata*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO. Resumo. São Pedro-SP, 2003. p.85, 2003.

MARANGA, R.O.; KAAIA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. *Mycopathologia*. 15:4, p.527-532, 2005.

MARTINS, J.F.S.; MAGALHÃES, B.P.; LORD, J.C.; FERREIRA, E.; ZIMMERMANN, F.J.P.. Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) percevejo do grão do arroz. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 16: p.81-91, 1987.

MARTINS, J.F.S. & LIMA, M.G.A. Fungos entomopatogênicos no controle do percevejo do colmo do arroz *Tibraca limbativentris* Stal. virulência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 23: p39-44, 1994.

MARTINS, A.S.P. Fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico e perspectivas de aplicação nos Açores. Dissertação de mestrado, Universidade de Açores, Ponta Delgada, Portugal, 93pp. 1998.

MARTINS, J.F.S.; BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; QUINTELA, E.D. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no Controle do Percevejo-do-Colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em Lavoura de Arroz Irrigado. *Ciência Rural*, 34: p.1681-1688, 2004.

MARTINS, J.F.S.; CUNHA, U.S.; OLIVEIRA, J.V. Controle de insetos na cultura do arroz irrigado. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D. (Ed), Bases e técnicas do manejo de insetos. Santa Maria: Pallotti, 22: p.137-153, 2000

MILNER, R.J. Current status of *Metarhizium* as a mycoincetecede in Australia. *Biocontrol*, 21: p.47-50, 2000.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick of the *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27:2, p.245-251, 2001.

PANIZZI, A. & PARRA, J.R. Introdução à ecologia nutricional de insetos. In: Panizzi, A.; Parra, J. R. (eds.). *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. São Paulo, Manole LTDA, pp.330, 1991.

PAREJA, M.; BORGES M.; LAUMANN, R.A; MORAES, M.C.B. Inter- and intraspecific variation in defensive compounds produced by five neotropical stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Insect Physiology*. 53: p.639-648, 2007.

PEREIRA, M.F.A.; BENEDETTI, R.A.L.; ALMEIDA, J.E.M. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle de *Deois flavopicta* (stal., 1854), em pastagem de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*). *Arquivo do Instituto Biologico de São Paulo*, 75:4, p.465- 469, 2008.

PRABHU A.S.; FILIPPI M.C.; RIBEIRO, A.S. Doenças e seu controle. In: VIEIRA, N.R. de A.A.; SANTOS, A.B. dos; SANT'ANA, E.P. *A cultura do arroz no Brasil*. Santo Antônio de Goiás - GO. Embrapa Arroz e Feijão, p.262-307, 1999.

PRABHU, A.S.; FILIPPI, M.C.C.; RIBEIRO, A.S. Doenças e seus controles. In: *A cultura do arroz no Brasil*. Santos, A. B.; Stone, L. F.; Vieira, N. R. A. Brasília DF Embrapa Editora p. 561-630, 2005.

PRIOR, C. & JOLLANDS, P. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 52:1, p. 66-72, 1988.

REIS, R.C.S.; CHACÓN, S.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; FACCINI, J.L.H. Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, 1883 na ecdise ninfal de *Amblyomma cooperi* (Nuttal; Warbuton, 1908) (Acari: Ixodidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 12:2, p. 68-70, 2003.

SCHOWALTER, T.D. Insect ecology: an ecosystem approach. Academic Press. Oxford, 2006.

SILVA, C.C.A.; CORDEIRO D.M.; LAUMANN R.; MORAES M.C.B.; BARRIGOSI J.A.; BORGES M.. Ciclo de vida e metodologia de criação de *Tibraca limbativentris* Stal, 1860 (Heteroptera: Pentatomidae) para estudos de ecologia química. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 16p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento). 2004.

SIMAS, N.K.; LIMA E.C.; CONCEIÇÃO,S.R.; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA, F.A.M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue - atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. Química. Nova 27: p.46-49, 2004.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; BOUCIAS, D.G.; NATION, J.L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. Journal of Invertebrate Pathology 69:1 p.31-39, 1997.

ST. LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 57: p.299-310, 1991.

ST. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 50: p.183-212, 1996.

ST. LEGER, R.J.; NELSON, J.O.; SCREEN, S.E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. Microbiology 145: p.2691-99, 1999.

VELOSO, M.M. & BASSINELO, P.Z. Impoância na nutrição humana. *In: A cultura do arroz no Brasil*. Ed. Santos, A. B.; Stone, L. F.; Vieira, N. R. A. Brasília DF: Embrapa Editora p.17-30, 2006.

WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterisation of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiology Letters*, 213: p.251-255, 2002.

YOUNG, V.R. & PELLET, P.L. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *America Journal of Clinical Nutrition*, 59: (Suppl.): p.1203-1212, 1994.

ZARBIN, P.H.G.; MAURO, A.C.M.; RODRIGUES, A.C.M. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura sustentável no Brasil. *Química Nova*, 32:3, p. 722-731, 2009.

ZHIOUA, E. Pathogenity of the entomopathogenicfungus *Metahizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acaris:Ixodidae). *Jornal of Parasitology, Lawrence*, 83:5 p.815-818, 1997.

ZIMMERMANN G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potencial as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37: p. 375-379, 1993.

# Capítulo 2

**Toxicidade de compostos extraídos das glândulas metatorácica (GMT), de adultos, e abdominal dorsal (GAD), de ninfas, do *T. limbativentris* a *M. anisopliae*.**

## 2.1. INTRODUÇÃO

O *T. limbativentris*, mesmo habitando um ambiente com condições micrometeorológicas de umidade e temperatura ideais ao desenvolvimento e disseminação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, um importante inimigo natural deste inseto (MARTINS et al., 2004), apresenta em condições de campo baixas taxas de infecção por esse fungo (MARTINS et al., 2004; RAMPELOTTI et al., 2007).

Segundo Sosa-Gómez et al., (1997) e Borges et al., (1992) a baixa suscetibilidade dos pentatomídeos a fungos entomopatogênicos pode ser atribuída aos aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados voláteis produzidos por essa família de percevejos.

Os aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, contendo 6, 8, 10 e 12 átomos de carbono já foram identificados em pentatomídeos (SOSA-GÓMEZ et al., 1997; MORAIS et al., 2008; FAVARO et al., 2011). De um modo geral, os aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados apresentam alta atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos de diferentes famílias (GORMAN & SCOTT 1980; TROMBETTA et al., 2002).

## 2.2. OBJETIVOS

### 2.2.1. Objetivos Gerais

Isolar e identificar os compostos voláteis da glândula metatorácica de adultos, da glândula abdominal dorsal de ninfas em diferentes estágios de vida, e ainda, avaliar a fungitoxicidade desses compostos ao fungo *M. anisopliae*.

### 2.2.2. Objetivos Específicos

- Extrair e identificar os compostos produzidos pelo *T. limbativentris* na glândula metatorácica em adultos e na glândula abdominal dorsal em ninfas, nos cinco ínstaes da fase imatura.
- Avaliar a fungitoxicidade dos extratos de compostos extraídos do *T. limbativentris* a *M. anisopliae*,
- Avaliar a fungitoxicidade dos compostos isoladamente, identificados nos extratos que apresentarem atividade a *M. anisopliae*.

## 2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.3.1. Insetos

Adultos de *T. limbativentris* foram obtidos a partir de uma colônia de insetos criados em estufa no Centro Nacional de Pesquisa de arroz e feijão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Arroz e Feijão). Os insetos foram alimentados com plantas de arroz da cultivar BR-IRGA 409 cultivadas em vasos (Fig. 2.1). A colônia de insetos foi derivada de uma população de campo originalmente coletada em Santo Antônio de Goiás, GO. Adultos sexados, com idade definida após a emergência foram recolhidos a partir desta colônia estoque e utilizados nos experimentos seguintes.

Ovos de *T. limbativentris* foram obtidos de matrizes mantidas em criação, conforme metodologia supracitada. Os ovos coletados, todos de mesma idade, foram transferidos para uma caixa Gerbox (caixas de poliestireno cristal, com 11cm lateral e 3,5cm de altura, tampadas e com papel mata-borrão cobrindo o fundo). Nos experimentos foram utilizados ovos de cinco dias.

Para obtenção de ninfas 1º instar, as posturas provenientes da criação de adultos, foram acondicionadas em caixa Gerbox sobre papel filtro Watmam nº1, mantida em laboratório e umedecida diariamente com 500 µL de água destilada, que era aplicada de forma homogênea no papel filtro com cuidado para não encharcar os ovos. Após a eclosão, os ovos inviáveis (ausência de ninfas eclodidas) foram retirados, deixando apenas as ninfas de primeiro instar.

As ninfas a partir do segundo instar foram criadas em vasos, conforme metodologia descrita para adultos. Após cada muda, os insetos são transferidos para outro vaso plantado, de tal modo que mantenha os instos separados por fases, de segundo a quinto instar.



Figura 2.1 – Criação do *T. limbativentris* em sistema de vasos

### 2.3.2. Fungo

Em todos os experimentos, utilizou-se a cepa CG-168 de *M. anisopliae*, isolada originalmente de *T. limbativentris* no município de Santo Antônio de Goiás, depositada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia CENARGEN (Brasília, DF). No laboratório o fungo foi inoculado em *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) com a intenção de manter a virulência original do fungo. O fungo foi isolado do *Z. subfasciatus* em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA, Acumedia<sup>®</sup>).

### 2.3.3. Avaliação da susceptibilidade de ovos de *T. limbativentris* ao *M. anisopliae*.

Foi preparada uma suspensão do fungo *M. anisopliae* na qual os conídios, produzidos em BDA, foram coletados por raspagem com espátula de borracha, transferidos para 10 mL de uma solução de Tween 80 (0,01%) e padronizada para  $5 \times 10^7$  conídios/mL por meio de contagem em microscópio de contraste de fase (Leica<sup>®</sup> DM 2500) com auxílio de hemacitômetro. A partir dessa suspensão foi

preparada outra suspensão de concentração  $5 \cdot 10^6$  conídios/mL através de diluição decimal com Tween 80 0,01%. Uma alíquota de cada suspensão foi plaqueada em meio BDA e verificada a viabilidade dos conídios após 20h de incubação.

Com o auxílio de um microaplicador bruker® foram aplicados 10µL de uma suspensão fúngica sobre uma massa de 10 ovos e 10µL de Tween 80 0,01% no controle. Cada massa com 10 ovos foi colocada sobre a superfície de um papel filtro qualitativo Whatman nº 1 de 5,5 cm de diâmetro, previamente umedecido com 500µL de água destilada, acondicionados em uma placa de Petri de 6 cm de diâmetro e mantidos em incubadora do tipo BOD a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR de  $70 \pm 8\%$  e 12h de fotofase. O experimento consistiu em dois tratamentos com fungo nas concentrações de  $5 \times 10^7$  conídios/mL e  $5 \times 10^6$  conídios/mL e um controle com Tween 80 0,01%. Foram utilizados 60 ovos por tratamento divididos em seis repetições.

As avaliações foram feitas diariamente, quantificando o número de ninfas eclodidas, número de ovos inviáveis e o número de ovos infectados pelo fungo.

#### **2.3.4. Avaliação da susceptibilidade de ninfas e adultos de *T. limbativentris* ao *M. anisopliae*.**

Foram realizados três experimentos separadamente: o primeiro com ninfas de primeiro e segundo instares, o segundo com ninfas de terceiro ao quinto instares, e o terceiro com insetos adultos.

No primeiro experimento foi avaliado o potencial de virulência do fungo nas dosagens de  $5 \times 10^6$  e  $5 \times 10^7$  conídios/mL sobre ninfas de primeiro e segundo instar.

Para este experimento preparou-se uma suspensão de *M. anisopliae*, na qual conídios foram coletados por raspagem com alça de platina e transferidos para 10 mL de uma solução de Tween 80 (0,01%), padronizada para  $5 \times 10^7$  conídios/mL por meio de contagem em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse 80i) com auxílio de hemacitômetro. A partir da suspensão fúngica de  $5 \times 10^7$  conídios/mL foi preparada mais uma suspensões de  $5 \times 10^6$  conídios/mL por diluição. Foram separados 30 insetos de cada instar, colocados a cada 10 insetos em Erlenmeyer de 500 mL. Para anestésiar os insetos, foi injetado gás  $\text{CO}_2$ , durante 20 segundos,

dentros dos Erlenmeyer e tampados com algodão hidrófilico. Para cada estágio de vida do inseto utilizado neste experimento foram preparados três tratamentos, que foram as duas suspensões fúngicas descritas anteriormente e o controle (Tween 80 0,01%). Nos tratamentos com o fungo, foram aplicados 5 µL da suspensão fúngica na região dorsal. As testemunhas foram tratadas com 5 µL de Tween 80 0,01% sobre a mesma região. Foram utilizados seis repetições por tratamento. Cada repetição era composta por cinco insetos, acondicionados em um tubo de vidro de 2,5 cm de diâmetro interno e 20 cm de altura; em cada tubo continha três colmos de arroz da cultivar BR-IRGA-409 com a base envolta por algodão hidrófilico umedecido com 1 mL de água destilada. Após a aplicação de todos os tratamentos e acondicionados nos tubos todos os insetos, os tubos foram tampados com tecido *voile* (30 µm de porosidade) presos por atilhos de borracha. Todos os insetos foram incubados em incubadora do tipo BOD a  $26 \pm 1^\circ \text{C}$ , UR de  $70 \pm 12\%$  e 12h de fotofase.

Tanto o segundo quanto o terceiro experimento, foram conduzidos seguindo a mesma metodologia descrita para o primeiro experimento, com exceção; do número de tratamentos que nestes são quatro, o controle (Tween 80 0,01%) e três suspensões fúngicas nas concentrações de  $5 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^6$  conídios/mL; e também o volume aplicado nos insetos, que foram 10 µL nos dois últimos experimentos.

Nos três experimentos supracitados, para cada tratamento com o fungo, uma alíquota de 0,5 mL de cada suspensão fúngica foi espalhada em meio BDA, contido em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, para verificar a viabilidade dos conídios após 20h de incubação a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  e UR de  $75 \pm 10\%$ .

Em todos os experimentos, as avaliações de insetos mortos e vivos foram feitas diariamente. Os insetos mortos foram transferidos para câmara úmida para posterior confirmação da infecção por *M. anisopliae*.

### **2.3.5. Extração dos compostos da glândula abdominal dorsal (GAD) em ninfas.**

A extração dos compostos das GAD's foi feita a partir das exúvias de ninfas de primeiro a quinto instar, quando ocorre a mudança de estágio de vida nesta família de instos, a GAD permanece na exúvia.

Foram separadas 50 exúvias de primeiro instar, 36 de segundo, 28 de terceiro, 18 de quarto e 12 exúvias de quinto instar, coletadas com no máximo 24 horas após a ecdise. O quantitativo das exúvias foi baseado em outros trabalhos (KRALL et al., 1999; FAVARO et al., 2011).

O processo de extração foi estático, no qual as exúvias foram mantidas por 24 horas em 2 mL de hexano de grau cromatográfico, previamente destilado. Após esse período, o extrato foi filtrado com algodão hidrofílico preso na ponta de uma pipeta de Pasteur, transferido para um frasco de vidro âmbar, previamente autoclavado e lavado com o mesmo solvente utilizado na extração, e acondicionado em freezer a -20°C até o momento das análises.

### **2.3.6. Extração dos compostos da glândula metatorácica (GMT) em adultos.**

Foram selecionados cinco machos e cinco fêmeas do inseto adulto. Os insetos foram colocados em Erlenmeyer de 250 mL, anestesiados com gás CO<sub>2</sub> e posteriormente mortos em freezer. Os insetos foram dissecados, segundo a metodologia descrita por Favaro et al. (2011). Foram fixados em uma placa de isopor por alfinetes perfurando-os no tórax e no final do abdome, foram cortadas as pernas e dissecados com auxílio de um microscópio estereoscópio (Leica<sup>®</sup> S6D). Os tergitos foram removidos, e os tecidos no interior da cavidade do corpo foram cuidadosamente removidos para expor a GMT de cor alaranjado. A GMT foi perfurada por um tubo capilar de vidro, e a mistura de substâncias do seu interior extraída por capilaridade e diluída em 2mL de hexano grau cromatográfico (Merck<sup>®</sup>), previamente destilado. O extrato foi acondicionado em freezer a -20°C até o momento das análises.

### 2.3.7. Identificação estrutural dos compostos químicos

Cerca de 1 mL de cada extrato (ninfas e adultos), foi concentrado para aproximadamente 0,1 mL com fluxo de N<sub>2</sub> gasoso, desidratado com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e injetados 1 µL de cada extrato em GC-MS, da marca Shimadzu, modelo QP5050A, coluna CB-5 de 30m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro com fase estacionária constituída de 5% de metilcenil polissiloxano com espessura do filme de 0,5 µm, temperatura do injetor de 220 °C, temperatura inicial da coluna de 60 °C com gradiente de aquecimento de 3°C/min, gás de arraste Hélio, com fluxode 1 mL/min, detector de ionização por impacto de elétrons (70 eV) operando na temperatura de 280°C, e, scan de análise de 60 minutos.

O tempo de retenção linear foi calcula segunda equação ( $I_r = 100n + 100(t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n)$ ) proposta por VAN DEN DOOL & KRATZ (1963), na qual  $I_r$  = índice de retenção do composto,  $t_x$  = tempo de retenção do composto a ser identificado e  $t_n$  e  $t_{n+1}$  = tempo de retenção dos hidrocarbonetos de referência mais próximos eluídos antes de depois do composto a ser identificado.

Os espectros de massas obtidos e os índices de retenções lineares calculados foram comparados com a literatura (ADAMS 2007; MARQUES et al., 2007; MORAIS et al., 2008) e base de dados NIST. Para confirmar a elucidação dos compostos, foram injetados os padrões analíticos comerciais (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal, (E)-2-decenal, dodecano, undecano e tridecano, todos da marca Sigma-Aldrich® adquiridos da empresa Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin, USA).

### 2.3.8. Ensaio antifúngicos

Numa placa de Petri de 6 cm de diâmetro contendo meio de cultura (BDA) mais antibiótico tetraciclina 100 mg/L foram inoculados 2 µL de uma suspensão de *M. anisopliae* a  $5 \times 10^7$  conídios/mL. No mesmo ponto da inoculação, foram aplicados 3 µL do extrato bruto (todos os extratos de ninfas e adultos). Foram feitas seis repetições para cada extrato, para cada controle do fungo (no qual foi aplicado apenas o fungo) e para o controle do solvente (no qual foi aplicado 30 µL de hexano de grau cromatográfico (Merck)). Todas as placas foram vedadas com parafilme e colocadas em incubadora do tipo BOD a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e 12 horas de fotofase. Após 12 dias, o crescimento micelial do fungo foi medido com auxílio de

régua graduada tomando-se duas medidas perpendiculares.

Os compostos, extraídos das GAD's e GMT's provenientes dos extratos que apresentaram atividade fungitóxica a *M. anisopliae* (inibição total da germinação), identificados via CG-EM foram testados por meio dos padrões comerciais. Os compostos testados foram (E)-2-decenal, (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal, dodecano, undecano e tridecano (Sigma-Aldrich®). Os compostos foram diluídos para 0,1% com hexano de grau cromatográfico. O bioensaio com os compostos puros foi conduzido conforme procedimento descrito anteriormente para o bioensaio do extrato bruto.

Os compostos a 0,1% que inibiram totalmente o crescimento micelial do fungo foram submetidos ao ensaio para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) nas concentrações de 0,1, 0,05, 0,025, 0,012, 0,003 e 0,0015%. Para aqueles compostos que causaram inibição do crescimento micelial do fungo a 0,0015%, o mesmo foi testado em mais cinco diluições com concentrações sucessivas pela metade, a fim de determinar sua concentração inibitória mínima.

### **2.3.9. Análises estatísticas.**

Os dados de mortalidade acumulada até o último dia de avaliação em cada ensaio, bem como a porcentagem de insetos com micose (colonizados) ou mortalidade confirmada e também o crescimento vegetativo de *M. anisopliae* foram submetido à análise de variância usando um modelo linear generalizado (MLG). Em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Fisher's *least significance difference* (LSD) ao nível de probabilidade de 5%. Todas as análises estatísticas foram processadas no software SAS versão 9.2 (SAS Institute 2008).

O tempo mediano letal (TL<sub>50</sub>) e as curvas de sobrevivência dos insetos expostos a cada um dos tratamentos foi determinado pelo método de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier 1958). As curvas de sobrevivência foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Log-rank (Mantel-Cox) com  $\alpha = 5\%$ .

## 2.4. RESULTADOS

### 2.4.1. Avaliação da susceptibilidade de ovos de *T. limbativentris* ao *M. anisopliae*.

As posturas de *T. limbativentris* tratadas com as concentrações  $5 \times 10^6$  e  $5 \times 10^7$  conídios/mL de *M. anisopliae* foram altamente suscetíveis ao fungo, mostrando uma viabilidade de  $3,75 \pm 0,25$  e  $3,75 \pm 0,75\%$  respectivamente e, por conseguinte, apresentaram significativamente menor proporção de ninfas eclodidas em relação ao controle, cuja viabilidade de ovos foi de  $93,75 \pm 1,22\%$  ( $F = 257,36$ ;  $gl = 2, 21$ ;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 2.2).

A mortalidade e a confirmação da infecção pelo *M. anisopliae* nas ninfas de primeiro instar eclodidas dos ovos tratados com o fungo foi de 100%, em três dias de avaliação, nesse mesmo período a mortalidade no controle foi de 0%.

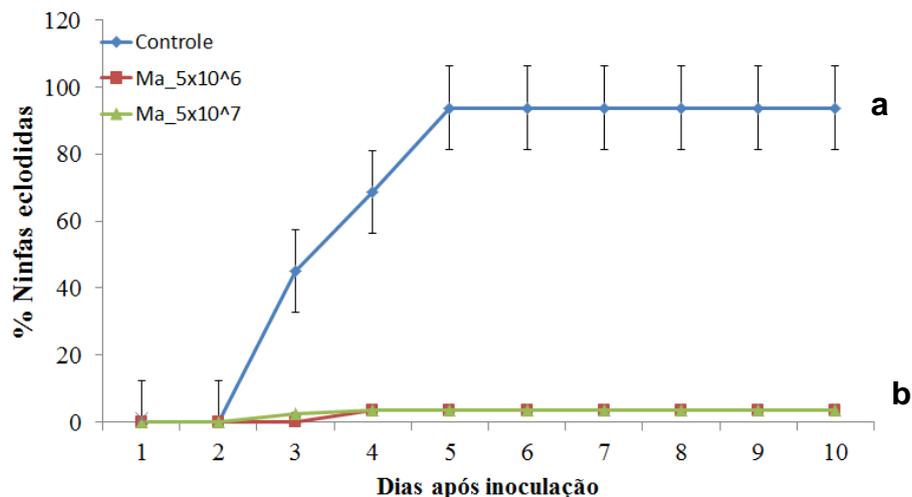


Figura 2. 2 – Percentual acumulado de ninfas eclodidas do *T. limbativentris* após aplicação do *M. anisopliae*. As mesmas letras indicam que as curvas de mortalidade não são significativamente diferentes de acordo com teste Log-Rank (Mantel-Cox) ( $P < 0,05$ ).

### 2.4.2. Avaliação da susceptibilidade de ninfas e adultos de *T. limbativentris* ao *M. anisopliae*.

Conforme apresentado no gráfico da Fig. 2.3, a mortalidade acumulada de ninfas de primeiro instar do *T. limbativentris*, expostas às concentrações de  $5 \times 10^6$  conídios/mL ( $TL_{50} = 6$  dias) e  $5 \times 10^7$  conídios/mL ( $TL_{50} = 5$  dias) de *M. anisopliae*

(CG-168), diferiram significativamente do controle ( $\chi^2 = 47,11$ ;  $gl = 2$ ;  $P < 0,0001$ ). No entanto, não houve diferença significativa na mortalidade das ninfas comparando os tratamentos com o fungo ( $\chi^2 = 0,83$ ;  $gl = 2$ ;  $P = 0,88$ )

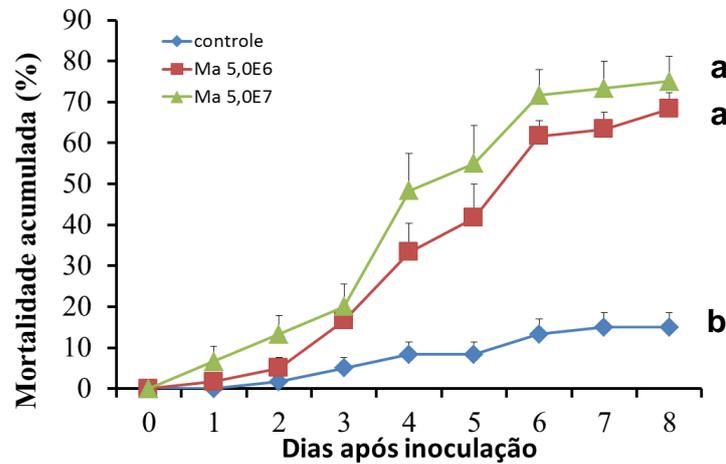


Figura 2.3 – Avaliação da mortalidade ao longo do tempo de ninfas de primeiro instar após aplicação do de *M. anisopliae* nas concentrações de  $5 \times 10^6$  conídios/mL e  $5 \times 10^7$  conídios/mL.

Segundo os resultados apresentados na figura Fig. 2.4, as ninfas de segundo instar, tratadas com o fungo na concentração de  $5 \times 10^7$  conídios/mL, tiveram menor tempo de sobrevivência em relação ao controle ( $TL_{50} = 5$  dias) em comparação àquelas tratadas com a menor concentração e do controle não-tratado ( $\chi^2 = 32,85$ ;  $gl = 2$ ;  $P < 0,0001$ ). O tratamento com fungo a  $5 \times 10^6$  conídios/mL não diferiu do controle. Portanto, ninfas de segundo instar foram significativamente mais suscetíveis a *M. anisopliae* em concentrações acima de  $5 \times 10^7$  conídios/mL.

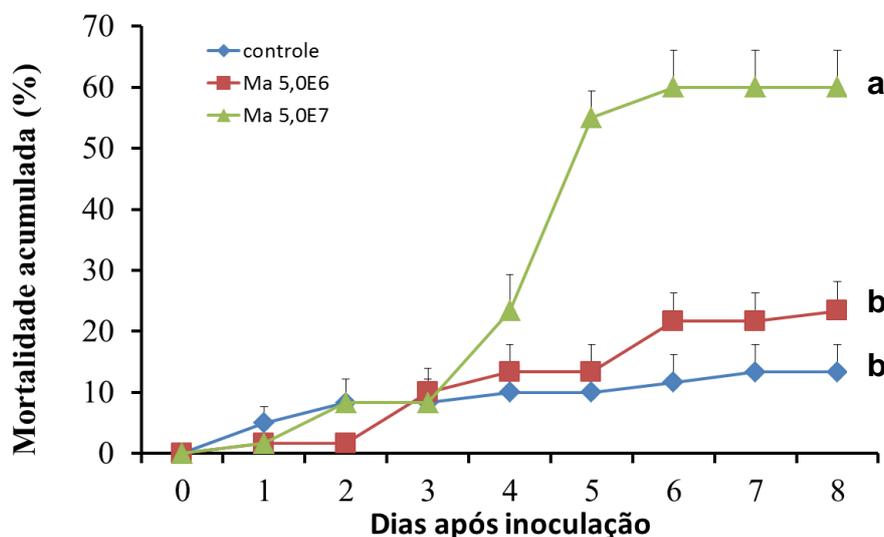


Figura 2.4 – Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do tempo de ninfas de segundo instar após aplicação de *M. anisopliae* nas concentrações de  $5 \times 10^6$  conídios/mL e  $5 \times 10^7$  conídios/mL. As mesmas letras indicam que as curvas de mortalidade não são significativamente diferentes de acordo com teste Log-Rank (Mantel-Cox) ( $P < 0,05$ ).

O resultado da susceptibilidade de ninfas de terceiro instar expostas ao fungo, apresentado na figura 2.5, mostra que as ninfas tratadas com as concentrações de  $5 \times 10^7$  ( $TL_{50} = 7$  dias) e  $5 \times 10^8$  conídios/mL ( $TL_{50} = 6$  dias) do *M. anisopliae* (CG-168) sobreviveram por menos tempo em comparação àquelas tratadas com a concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/mL e do controle não-tratado ( $\chi^2 = 71,63$ ;  $gl = 3$ ;  $P < 0,0001$ ). Portanto, ninfas de terceiro instar foram significativamente mais suscetíveis às concentrações de  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL do fungo.

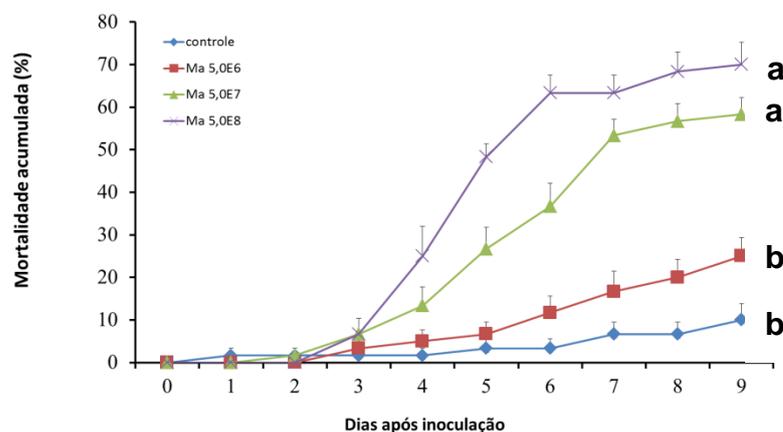


Figura 2.5 – Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do tempo de ninfas de terceiro instar tratadas com *M. anisopliae* nas concentrações de  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL. As mesmas letras indicam que as curvas de mortalidade não são significativamente diferentes de acordo com teste Log-Rank (Mantel-Cox) ( $P < 0,05$ ).

De acordo com a figura 2.6, a mortalidade das ninfas de quarto instar tratadas com o fungo nas concentrações de  $5 \times 10^7$  ( $TL_{50} = 8$  dias) e  $5 \times 10^8$  conídios/mL ( $TL_{50} = 6$  dias) diferiram do controle, no entanto, a maior concentração do fungo resultou em maior eficiência ( $\chi^2 = 71,66$ ;  $gl = 3$ ;  $P < 0,0001$ ). A mortalidade das ninfas no tratamento com o fungo na concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/mL não diferiu do controle.

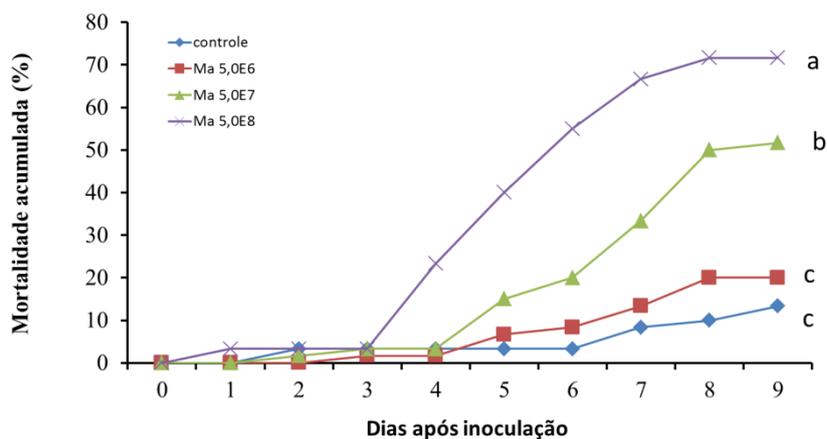


Figura 2.6 – Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do tempo de ninfas de quarto instar após aplicação de *M. anisopliae* nas concentrações de  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL. As mesmas letras indicam que as curvas de mortalidade não são significativamente diferentes de acordo com teste Log-Rank (Mantel-Cox) ( $P < 0,05$ ).

O comportamento da curva de mortalidade para ninfas de quinto instar (Fig. 2.7) é semelhante às de quarto instar (Fig. 2.6), seguindo o mesmo padrão de diferenciação entre os tratamentos, com exceção da  $TL_{50}$  que é de nove dias para o tratamento com o fungo a  $5 \times 10^7$  conídios/mL e de sete dias para o tratamento com o fungo a  $5 \times 10^8$  conídios/mL (Tabela 2.1) ( $\chi^2 = 45,78$ ;  $gl = 3$ ;  $P < 0,0001$ ).

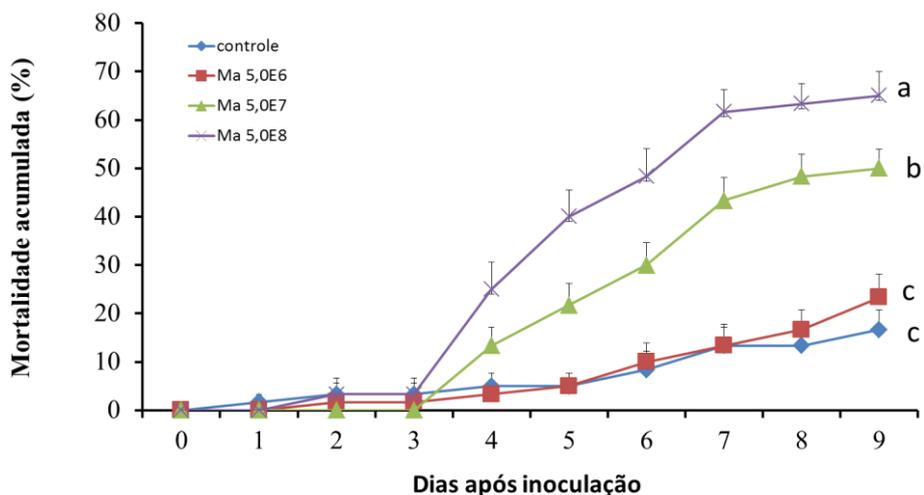


Figura 2.7 – Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do tempo de ninfas de quinto instar após aplicação de *M. anisopliae* nas concentrações de  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL. As mesmas letras indicam que as curvas de mortalidade não são significativamente diferentes de acordo com teste Log-Rank (Mantel-Cox) ( $P < 0,05$ ).

Assim como ninfas de quarto e quinto ínstars, o percentual de mortalidade dos adultos de *T. limbiventris* apresentaram o mesmo padrão de diferenciação entre os tratamentos. No entanto, os adultos apresentaram menor susceptibilidade ao fungo, tendo um maior tempo de sobrevivência no tratamento com o fungo na concentração de  $5 \times 10^8$  conídios/mL ( $TL_{50} = 9$  dias) ( $\chi^2 = 48,98$ ;  $gl = 3$ ;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 2.8) em comparação com as ninfas de quinto instar ( $TL_{50} = 7$  dias). O fungo na concentração de  $5 \times 10^7$  conídios/mL causou mortalidade inferior a 50% somente em adultos.

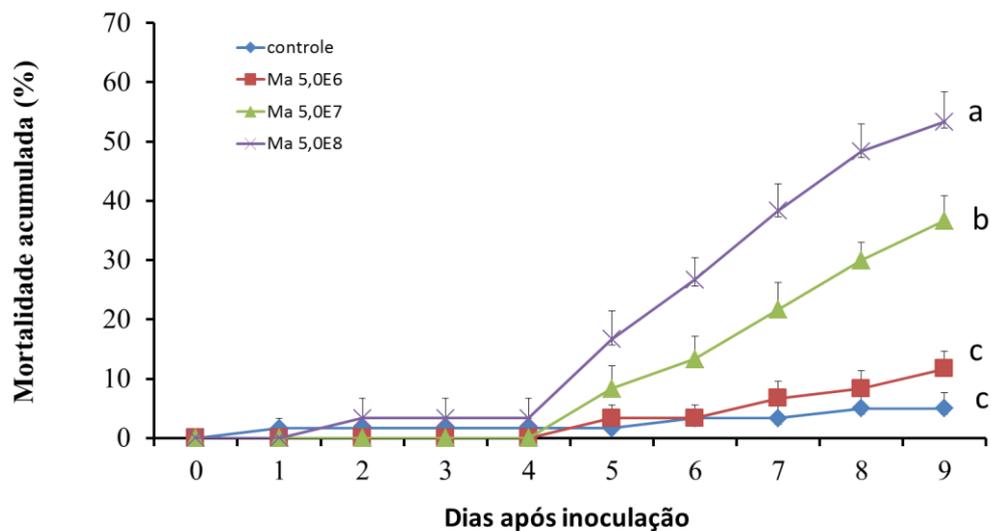


Figura 2.8 – Avaliação da mortalidade acumulada ao longo do tempo de adultos do *T. limbiventris* expostos ao fungo *M. anisopliae* nas concentrações de  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL. As mesmas letras indicam que as curvas de mortalidade não são significativamente diferentes de acordo com teste Log-Rank (Mantel-Cox) ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2.1. TL<sub>50</sub> nos diferentes estágios de vida do *T. limbativentris* em diferentes tratamentos com o fungo *M. anisopliae*.

<b>Estágios de vida o</b> <b><i>T. limbativentris</i></b>	<b>Tratamento com <i>M.</i></b> <b><i>anisopliae</i> 5 x 10<sup>6</sup></b> <b>conídios/mL</b>	<b>Tratamento com <i>M.</i></b> <b><i>anisopliae</i> 5 x 10<sup>7</sup></b> <b>conídios/mL</b>	<b>Tratamento com <i>M.</i></b> <b><i>anisopliae</i> 5 x 10<sup>8</sup></b> <b>conídios/mL</b>
<b>Primeiro instar</b>	6 dias	5 dias	Não tratado
<b>Segundo instar</b>	Mortalidade < 50 %	5 dias	Não tratado
<b>Terceiro Instar</b>	Mortalidade < 50 %	7 dias	6 dias
<b>Quarto Instar</b>	Mortalidade < 50 %	8 dias	6 dias
<b>Quinto Instar</b>	Mortalidade < 50 %	9 dias	7 dias
<b>Aduto</b>	Mortalidade < 50 %	Mortalidade < 50 %	9 dias

### 2.4.3. Caracterização estrutural dos compostos químicos

Os compostos elucidados (Fig. 2.9 e Tabela 2.1) foram caracterizados. Todos os compostos foram confirmados por padrões analíticos, com exceção do 4-oxo-(E)-2-hexenal. No entanto, esse composto foi comparado ao padrão de fragmentação de massa com a literatura, e ainda verificou-se que se tratava de um composto comum em pentatomídeos (BORGES et al., 1992; PAREJA et al., 2007; MORAIS et al., 2008). Os Índices de Retenção e a quantificação relativa dos compostos caracterizados estão representados na Tabela 2.2, página 43.

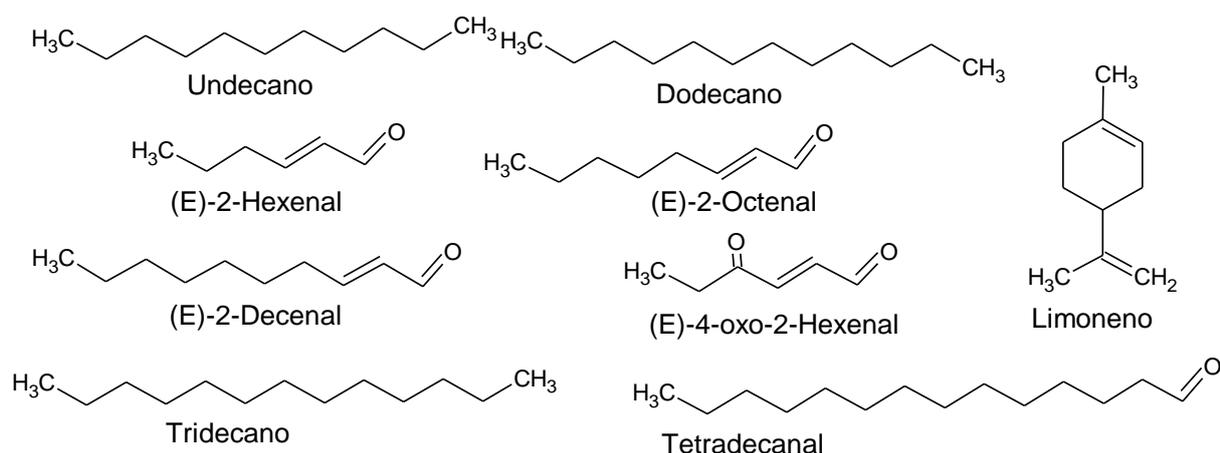


Figura 2.9 – Compostos caracterizados via CG-EM, extraídos de diferentes estágios de vida de *T. limbativentris*.

#### 2.4.4. Ensaios antifúngicos.

Todos os extratos obtidos através da GMT de adultos e GAD de ninfas, exceto de primeiro ínstar, inibiram o crescimento micelial de *M. anisopliae* após 12 dias da inoculação. No entanto, no tratamento com o extrato de ninfas de primeiro ínstar, o crescimento micelial diferiu do controle (Tabela 2.3) ( $X^2 = 38,37$ ;  $gl = 7$ ;  $F=4,42$ ;  $P < 0,001$ ).

Os tratamentos com os hidrocarbonetos apresentaram resultados semelhantes ao controle. O composto tetradeccanal não inibiu totalmente o crescimento micelial do fungo, entretanto, diferiu do controle (Tabela 2.4). Os aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal, (E)-2-decenal apresentaram maior toxicidade ao fungo, inibindo totalmente a germinação de *M. anisopliae* a 0,1% (Tabela 2.4).

O ensaio de CIM demonstrou que o (E)-2-hexenal, (E)-2-octenal e o (E)-2-decenal inibiram totalmente o crescimento do fungo, respectivamente, nas concentrações de 0,012%, 0,025% e 0,003%, demonstrando o alto potencial fungistático desses compostos (Tabela 2.5).

Tabela 2.2 – Dados sobre índice de Retenção, quantificação relativa, compostos extraídos e origem do extrato.

<b>Compostos</b>	<b>Índice de Retenção</b>	<b>Quantificação relativa (%)</b>	<b>Origem do extrato<sup>1</sup></b>
(E)-2-hexenal	856	6,77A <sup>1</sup> e 17,46N2 <sup>1</sup>	Ninfas (2 <sup>a</sup> a 5 <sup>o</sup> ) e Adultos
(E)-2-octenal	1054	28,62	Adultos
(E)-2-decenal	1259	0,90	Adultos
4-oxo-(E)-2-hexenal	965	19,23	Adultos
tetradecanal	1509	32,08 N1 <sup>1</sup> e 39,57N2	Ninfas (1 <sup>o</sup> a 5 <sup>o</sup> )
limoneno	1026	10,25	Ninfas (1 <sup>o</sup> )
dodecano	1099	0,60	Adultos
Tridecano	1200	4,19 N1, 43,95N2 e 42,79A	Todos os estágios

<sup>1</sup> A = Adultos, N1= Ninfas de primeiro instar e N2 = Ninfas de segundo a quinto instar.

Tabela 2.3 - Efeito do extrato bruto da GAD de infas e da GMT de adultos sobre o crescimento vegetativo do *M. anisopliae*.

Tratamentos	Diâmetro da colônia (mm)
	(n = 6)
Testemunha	31,66 ± 1,87a
Controle do solvente <sup>1</sup>	31,52 ± 2,5 a
1º instar	25,33 ± 1,8 b
2º instar	0 c
3º instar	0c
4º instar	0c
5º instar	0c
Adultos	0c

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Tabela 2.4 – Atividade fungitóxica dos compostos extraídos do *T. limbativentris* a 0,1% ao fungo *M. anisopliae*.

Tratamentos	Diâmetro da colônia (mm)
	(n = 6)
Testemunha	34,02 ± 2,0a
Controle do solvente <sup>1</sup>	30,91 ± 2,8 a
Decano	29,85 ± 4,9 a
Undecano	31,00 ± 2,9 a
Tridecano	35,03 ± 1,8 a
Tetradecanal	22,3 ± 5,3 b
(E)-2-hexenal	0 d
(E)-2-octenal	0 d
(E)-2-decenal	0 d

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2.5 - Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) dos aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados ao fungo *M. anisopliae*.

<b>Tratamento</b> (E)-2-hexenal	<b>Crescimento</b> <b>Vegetativo</b>	<b>Tratamento</b> (E)-2-octenal	<b>Crescimento</b> <b>Vegetativo</b>	<b>Tratamento</b> (E)-2-decenal	<b>Crescimento</b> <b>Vegetativo</b>
Testemunha	29,00 ± 1,05 a	Testemunha	31,3± 1,5 a	Testemunha	29,00 ± 1,05 a
Controle solvente <sup>1</sup>	29,27 ± 1,09 a	Controle solvente <sup>1</sup>	29,41± 1,1 a	Controle solvente <sup>1</sup>	29,27 ± 1,09 a
0,1%	0	0,1%	0	0,1%	0
0,05%	0	0,05%	0	0,05%	0
0,025%	0	0,025%	0	0,025%	0
0,012%	0	0,012%	23,95± 1,75	0,012%	0
0,006%	25,01 ± 1,02	0,006%	26,06± 0,8	0,006%	0
0,003%	28,80 ± 0,76	0,003%	30,05± 1,06	0,003%	0
0,0015%	28,22 ± 0,43	0,0015%	30,94± 1,12	0,0015%	29,51 ± 1,14

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste deTukey ao nível de 5% de probabilidade. <sup>1</sup> O solvente utilizado foi hexano grau cromatográfico.

## 2.5. DISCUSSÃO.

Ovos e ninfas de primeiro instar de *T. limbativentris* foram mais suscetíveis a *M. anisopliae* do que os demais estágios. Menos de 4% dos ovos ficaram viáveis ao final de dez dias de avaliação, e entre os viáveis, nenhuma ninfa eclodida chegou ao segundo instar nos dois tratamentos com o fungo. Foi ainda observado o crescimento do fungo no cadáver de todas as ninfas eclodidas. Esse resultado é um indicativo de que *M. anisopliae* é altamente virulento às fases de ovo e ninfas mais jovens deste inseto. Rampelotti et al. (2007) observaram que mais de 80% de uma população de ninfas de primeiro instar de *T. limbativentris* infectadas por *M. anisopliae* não alcançaram o segundo instar; e ainda constataram que os adultos desse inseto foram consideravelmente menos susceptíveis ao *M. anisopliae* comparado com os outros estágios de desenvolvimento. Diante desses resultados, pode-se sugerir que o melhor momento para aplicação do fungo é no período das primeiras posturas, onde o fungo tem maiores chances de infectar um número maior de ovos e ninfas de primeiro instar.

De acordo com os resultados, *T. limbativentris* a partir do segundo instar, apresentaram menor susceptibilidade ao fungo. E ainda, os adultos apresentaram menor suscetibilidade a *M. anisopliae* comparando o percentual de mortalidade e o valor de  $TL_{50}$  entre os estágios de vida do inseto.

De acordo com os resultados obtidos nos bioensaios de todos os extratos brutos, a baixa susceptibilidade de *T. limbativentris* pode ser atribuída a compostos fungistáticos ou fungicidas presentes produzidos por este inseto. Resultados semelhantes foram observados por Sosa-Gomez et al., 1997 e Borges et al., 1992, em estudos com outros pentatomídeos. Em relação às ninfas de primeiro instar, as mais suscetíveis, essas provavelmente não produzem os possíveis compostos fungitóxicos ou eventualmente podem estar presentes em concentrações abaixo do limite da atividade biológica. Segundo o bioensaio para avaliar o efeito do extrato bruto da GAD de infas e da GMT de adultos sobre o crescimento vegetativo do *M. anisopliae*, o único tratamento no qual houve crescimento vegetativo do fungo foi com o extrato da GAD de ninfas de primeiro instar (Tabela 2.3).

Para verificar qual(is) o(s) composto(s) seria(m) responsável(is) pela atividade fungitóxica, os extratos da glândula metarorácica (GMT) de adultos e da glândula dorsal abdominal (GAD) das ninfas foram analisados via CG-EM.

De acordo com o cromatograma da Fig. 2.11, referente ao extrato de ninfas de primeiro instar, podemos observar quatro compostos, caracterizados como dois hidrocarbonetos (limoneno e tridecano) e um aldeído alifático saturado (Tetradecanal). O limoneno que é um monoterpene constituinte do óleo essencial da casca de laranja e também encontrado em várias plantas das mais variadas famílias (Stefanello et al., 2010), tem dois sinais característicos, um referente ao íon molecular  $m/z$  136 e o outro ao pico base do íon radical  $m/z$  68 (Fig. 2.12), no qual corresponde ao fragmento formado pela reação de retro Diels-Alder (Fig. 2.10)

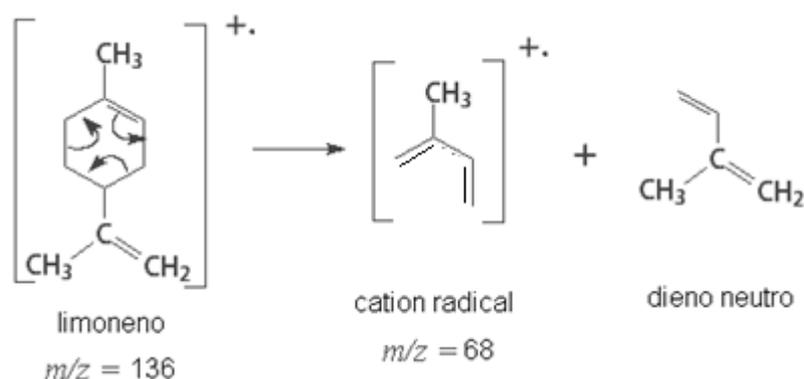


Figura 2.10 – Representação do padrão de fragmentação na formação do cátion  $m/z$  68 a partir da reação de retro Diels-Alder do limoneno.

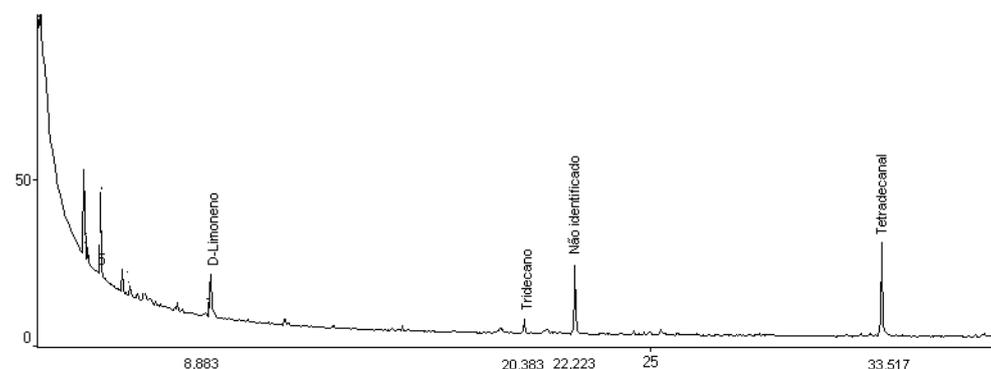


Figura 2.11 – Cromatograma (CG) dos componentes extraídos da GAD de ninfas de primeiro instar.

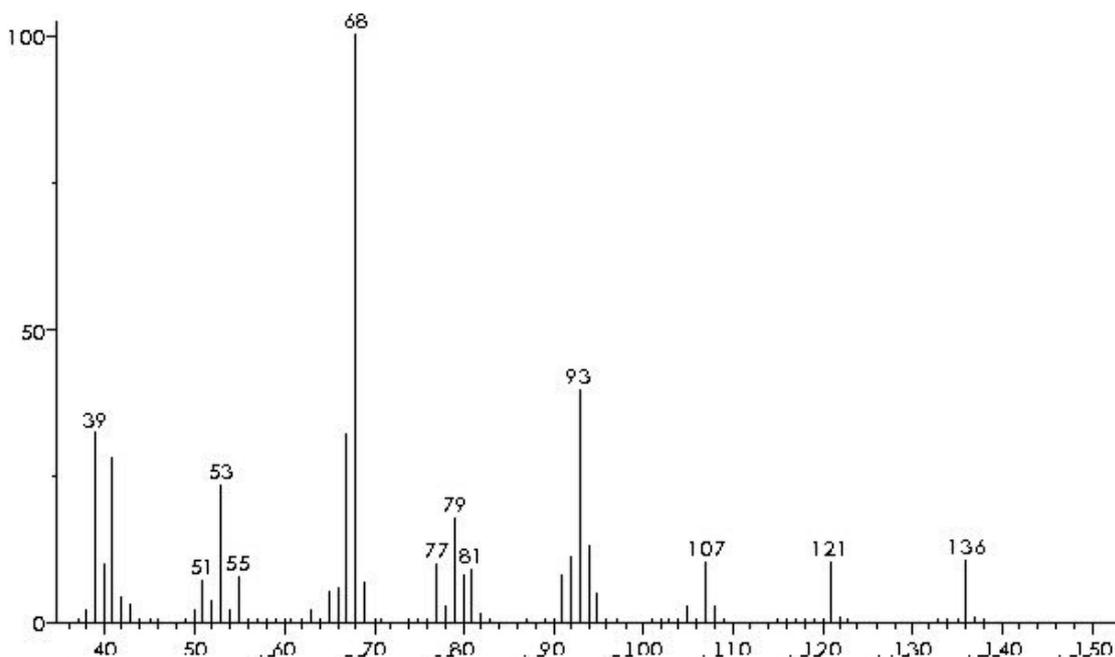


Figura 2.12 – Espectro de massas do limoneno.

O padrão de fragmentação do tridecano, como era esperado, segue a regra de fragmentação dos alcanos lineares, os quais sofrem fragmentação formando uma série de cátions que diferem entre si numa razão  $m/z$  de 14 unidades de massa, isso ocorre devido a possibilidade de fragmentação em diferentes partes da molécula, no entanto, o ponto mais frágil para fragmentação tende a ser o meio da molécula que forma os cátions e radicais mais estáveis (Silverstein & Webster 2000). O íon molecular de baixa intensidade também é uma característica marcante dos hidrocarbonatos saturados, pois não há nenhum fator que estabiliza o íon radical molecular. No EM do *n*-tridecano, o fragmento mais estável ocorre a  $m/z$  57 (Fig. 2.13) e os demais diminuem em intensidade à medida que se diferem em 14 unidades de massa.

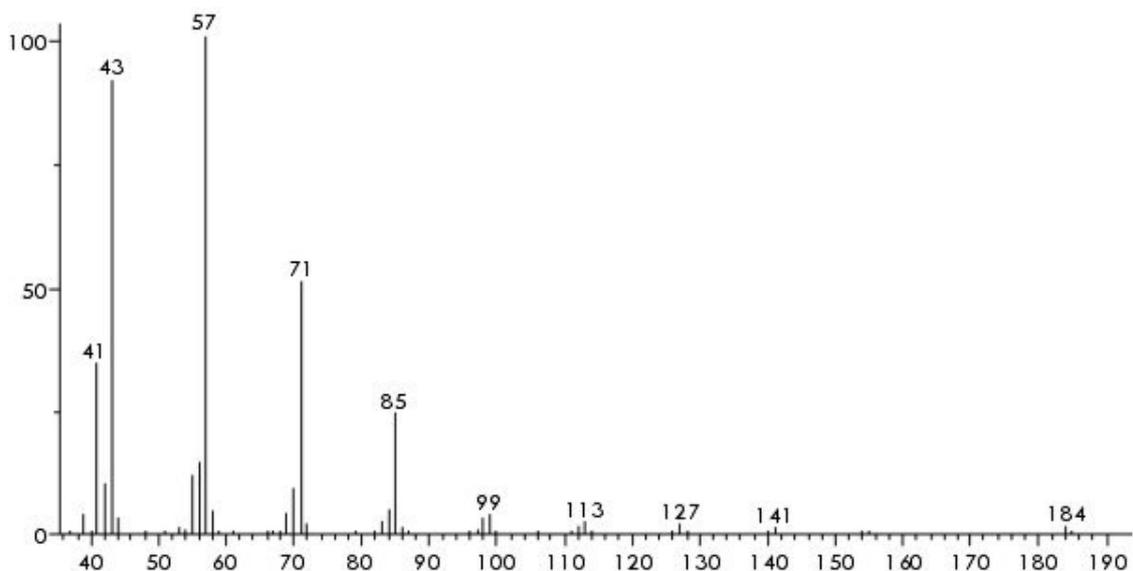


Figura 2.13 – Espectro de massa do tridecano

O tetradecanal segue padrão de fragmentação dos aldeídos e envolve uma quebra  $\alpha$ -carbonila podendo a carga positiva residual ficar no carbono carbonílico originando o fragmento  $m/z$  29 (CHO) (Fig. 2.14). No entanto, esse fragmento não pode ser adotado como uma informação chave, isso porque o fragmento  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+$ , comum em hidrocarbonetos, também responde como pico  $m/z$  29. Outros picos que podemos usar na identificação ocorrem em  $m/z$  194, que corresponde ao fragmento  $\text{M}^+ - 18$  (Eliminação de água);  $m/z$  184, referente ao fragmento  $\text{M}^+ - 28$  (eliminação de etileno);  $m/z$  168 ( $\text{M} - 44$ , perda de  $\text{CH}_2\text{CHOH}$ ). O tetradecanal por ser uma molécula de cadeia longa, assume também o modelo de fragmentação dos hidrocarbonetos de cadeia longa ( $m/z$  43, 57 e 71). Estes fatos são dominantes no espectro do tetradecanal (Fig. 2.14).

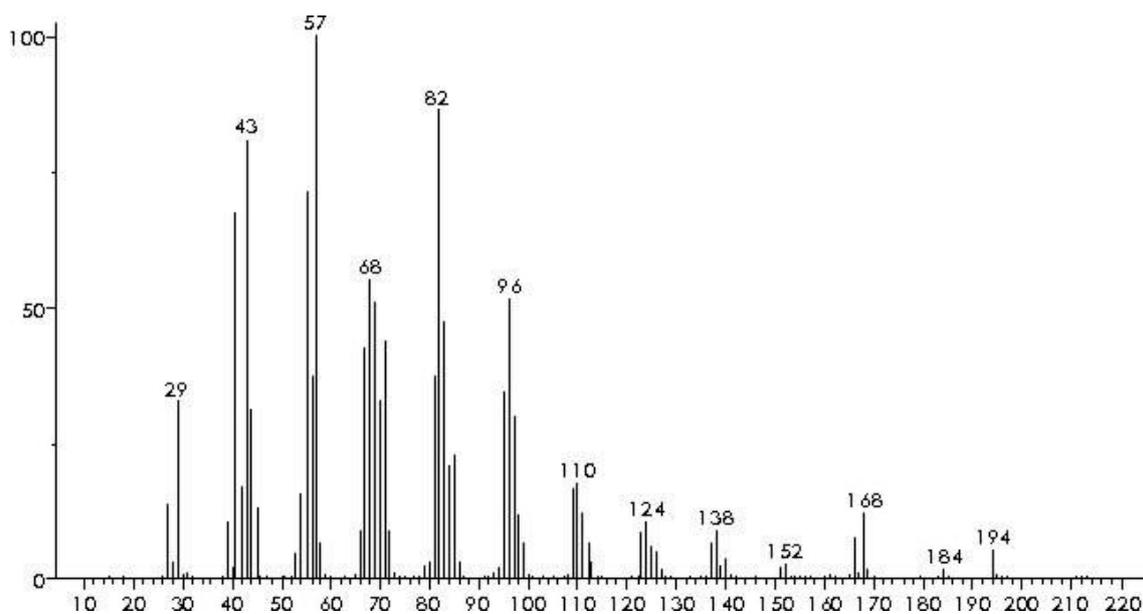


Figura 2.14 – Espectro de massa do tetradecanal.

No cromatograma referente aos compostos extraídos de ninfas de segundo a quinto instar (Fig. 2.15), além do tridecano e do tetradecanal que foram encontrados também em ninfas de primeiro instar, foi caracterizado o (E)-2-hexenal. Como fragmento mais importante para auxiliar na identificação desse grupo de compostos, temos o sinal do pico base com  $m/z$  41 (Fig. 2.16), referente ao íon alílico  $[H_2C-CH=CH_2]^+$ , que é formado pela quebra da ligação alílica favorecida pela conjugação da dupla ligação com o agrupamento carbonila impedindo a migração da ligação dupla. Esse íon é estabilizado por ressonância. Outro pico relevante na caracterização é o pico do íon molecular  $m/z$  98.

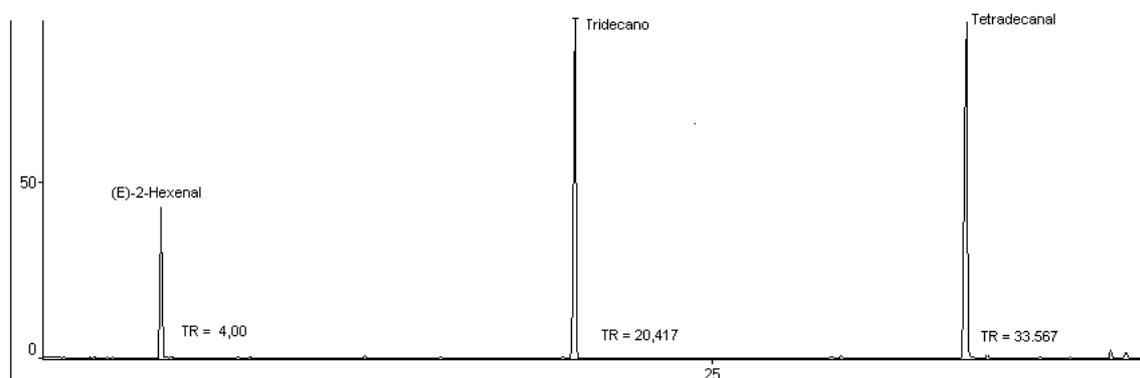


Figura 2.15 - Cromatograma (CG) dos componentes extraídos da GAD de ninfas de segundo a quinto instar.

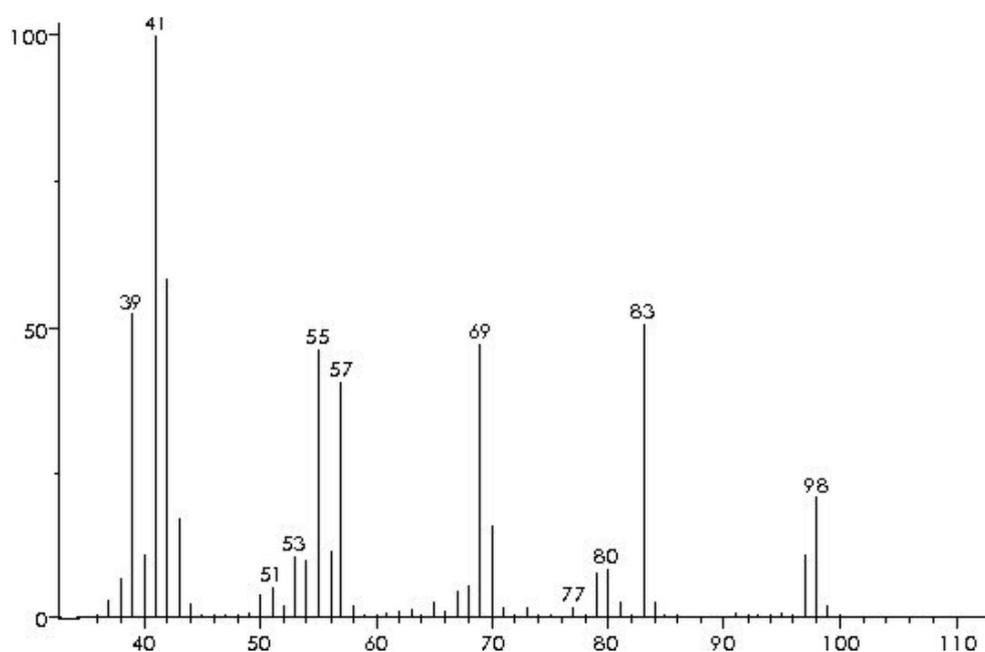


Figura 2.16 – Espectro de massa do (E)-2-hexenal.

Em relação ao cromatograma da Fig. 2.17, relativo ao perfil químico dos insetos adultos, foram identificados os hidrocarbonetos undecano e dodecano, os quais apresentam padrão de fragmentação semelhante ao tridecano, discutido anteriormente. A principal diferença está no pico do íon molecular,  $m/z$  156 para o undecano e  $m/z$  170 para o dodecano (Figuras 2.18 e 2.19).

Em relação aos aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados elucidados a partir desse extrato, o (E)-2-octenal e o (E)-2-decenal, com picos dos íons moleculares  $m/z$  126 e 154, respectivamente (Figuras 2.20 e 2.21), seguem o mesmo padrão de fragmentação discutido para o (E)-2-hexenal.

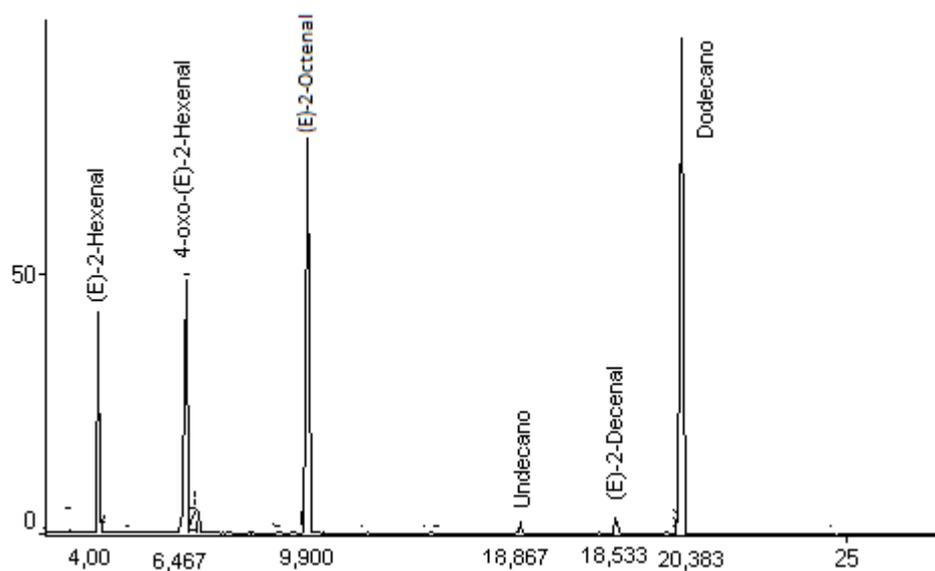


Figura 2.17 - Cromatograma (CG) dos componentes extraídos da GMT de adultos do *T. limbativentris*.

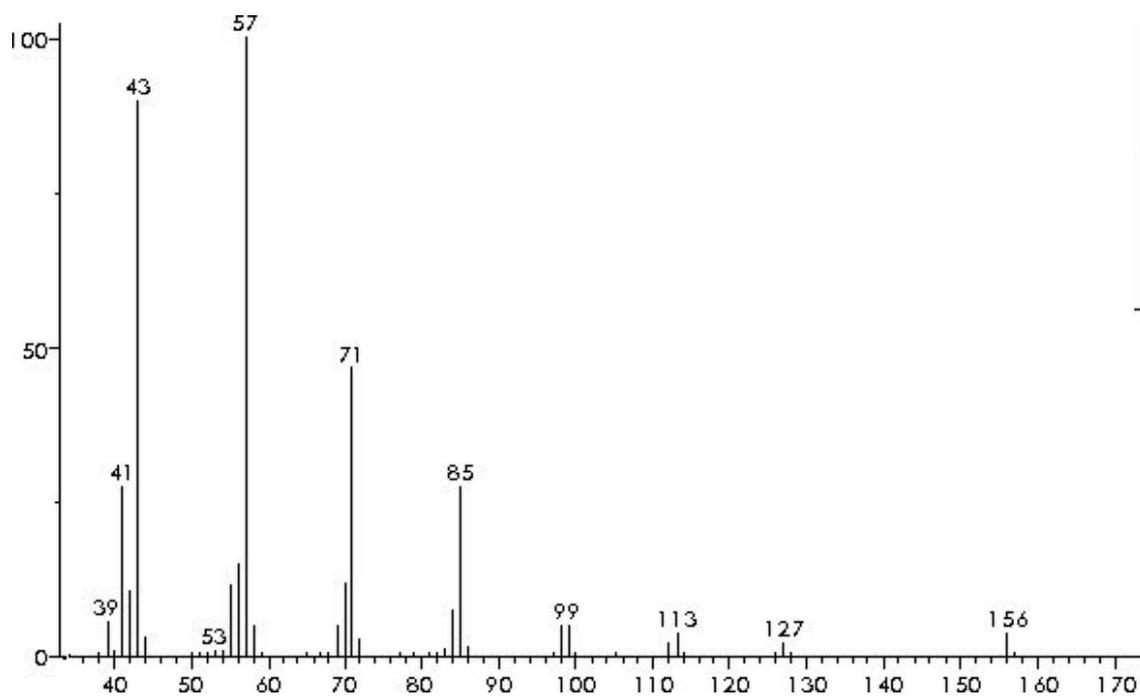


Figura 2.18 – Espectro de massa do undecano.

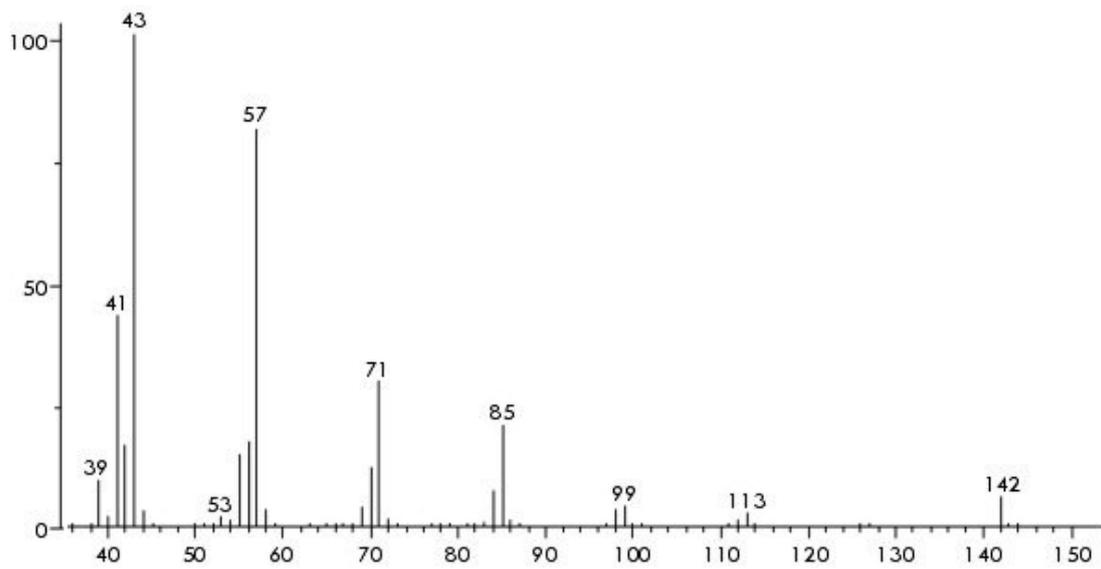


Figura 2.19 – Espectro de massa do decano.

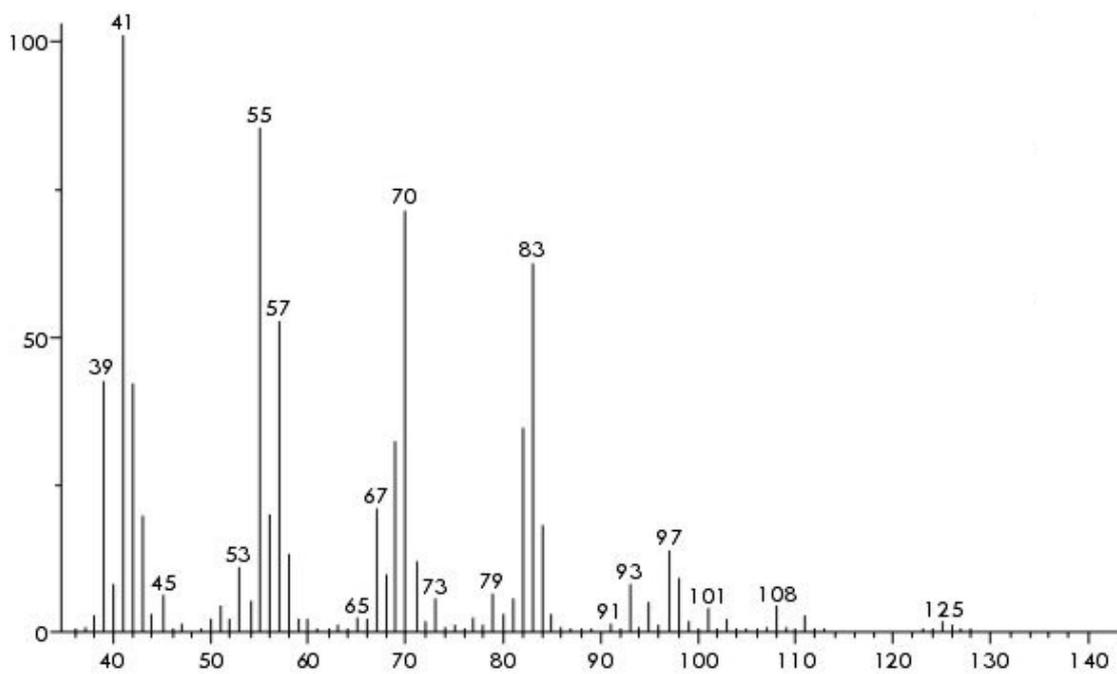


Figura 2.20 – Espectro de massa do (E)-2-octenal.

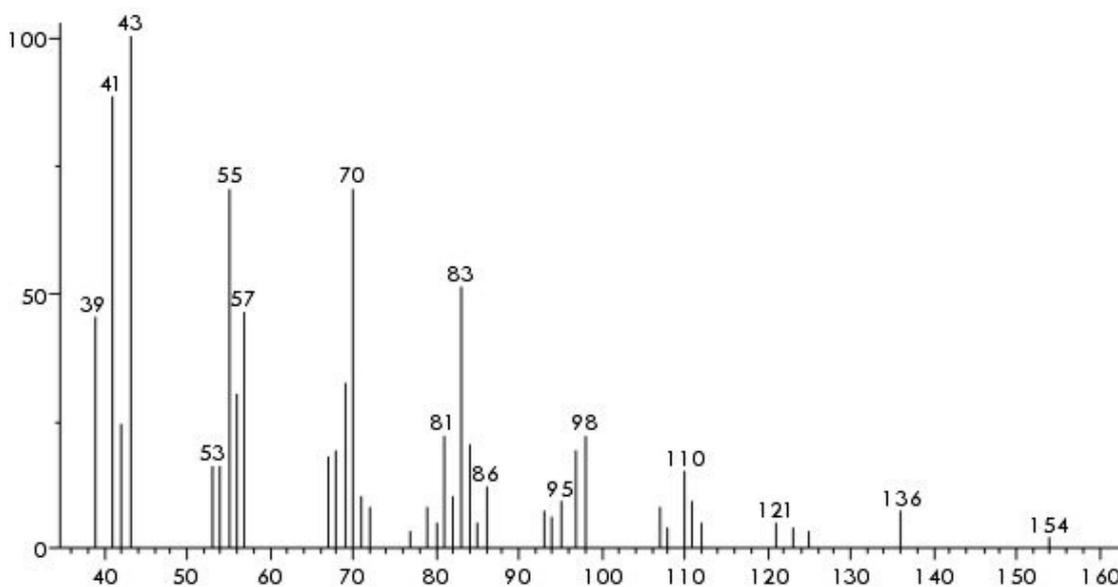


Figura 2.21 - Espectro de massa do (E)-2-decenal.

Assim como foi discutido, o padrão de fragmentação é semelhante dentro de um mesmo grupo químico, o que nos ajuda a direcionar a uma hipótese do grupo funcional. No entanto, para se certificar da real caracterização dos compostos, os espectros de massa e os Índices de Retenção foram comparados com literatura (Sosa-Gomez et al., 1997; Borges et al., 1992; Adms 2007; Marques et al., 2007; Morais et al., 2008; Favaro et al., 2010). Comparou-se ainda, através da injeção de padrões analíticos de todos os compostos, exceto o 4-oxo-(E)-2-hexenal por ser instável não é comercializado. Ainda não obtivemos sucesso na síntese desse composto utilizando a rota sintética proposta por Moreira e Millar (2005). No entanto, 4-oxo-(E)-2-hexenal é um composto característico em pentatomídeos e com um fragmento característico  $m/z$  83 (Fig. 2.22), que corresponde a um íon lactônico, estabilizado por ressonância, formado a partir do rompimento da ligação  $\alpha$  a carbonila cetônica.

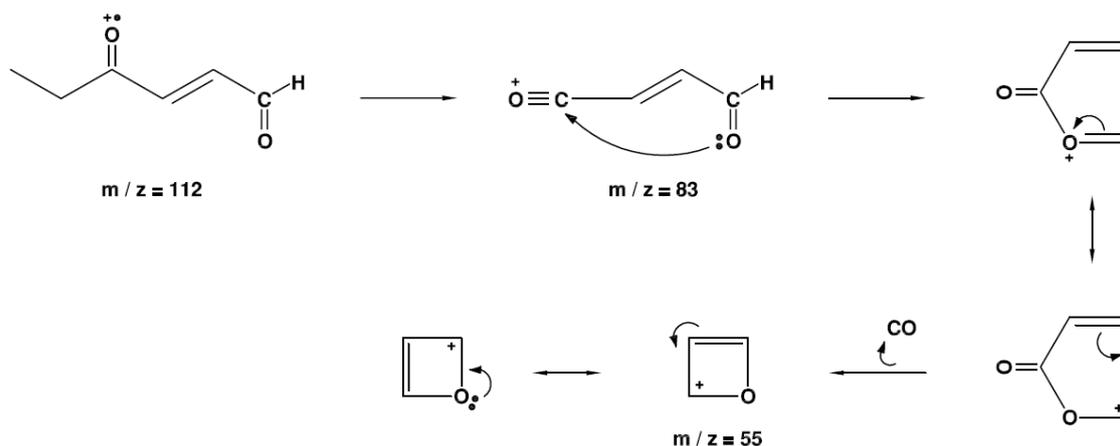


Figura 2.22 – Padrão de fragmentação do 4-oxo-(E)-2-hexenal na formação dos íons  $m/z = 83$  e  $m/z = 83$ .

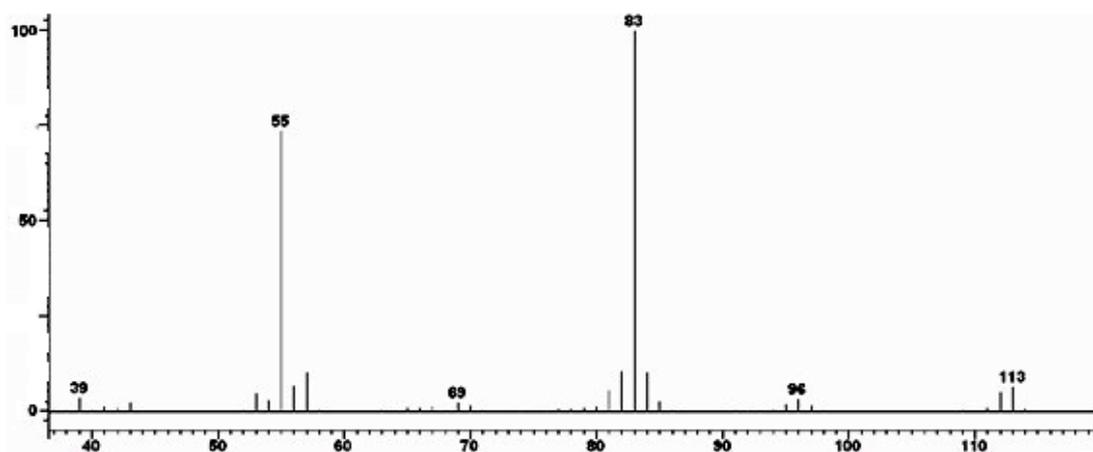


Figura 2.23 - Espectro de massa do 4-oxo-(E)-2-hexenal.

Entre os compostos extraídos de ninfas de primeiro instar o tetradecanal, afetou o crescimento vegetativo do fungo, apesar de não inibir completamente, diferindo o diâmetro da colônia em relação ao controle. Provavelmente este composto pode ser ou estar entre os responsáveis pela diferença entre os diâmetros das colônias comparando o tratamento com o extrato bruto de ninfas de primeiro instar com o controle. Segundo a literatura, o D-limoneno é um potente agente antibacteriano (VAN VUREN E VILJOEN 2007). Sokovic & Griensven (2006) observaram a atividade antifúngica do D-limoneno (MIC 40  $\mu\text{L/L}$ ) frente aos fungos *Verticillium fungicola* e *Trichoderma harzianum*. Hammer et al., (1999) relataram que a germinação de esporos de *Candida albicans* foi completamente inibida pelo D-limoneno a 200  $\mu\text{L/L}$ . Embora o D-

limoneno apresenta atividade antifúngica perante alguns fungos, até o momento não há trabalhos publicados de sua bioatividade frente a fungos da família Clavicipitaceae, na qual pertence o *M. anisopliae*. Este trabalho descreve a identificação do limoneno, no entanto, por não ter identificado qual isômero se tratava, não foi possível avaliar a fungitoxicidade, deixando esta proposta para futuros trabalhos.

Os aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, (E)-2-hexenal, encontrado em ninfas de segundo a quinto instar e adultos, (E)-2-octenal e (E)-2-decenal, encontrados em adultos, apresentaram um alto potencial antifúngico com MIC de 120, 250 e 30 ppm, respectivamente. Borges et al., (1992) também observaram a fungitoxicidade do (E)-2-hexenal e do (E)-2-decenal, extraídos do percevejo da soja *Nezara viridula* (Pentatomidae), a conídios de *M. anisopliae*. Verificou-se ainda, que o (E)-2-decenal foi mais ativo que o (E)-2-hexenal, dados condizentes com este trabalho.

De um modo geral, todos os tipos de aldeídos são intrinsecamente compostos reativos. A eletrofilicidade do grupo carbonílico pode proporcionar uma variedade de reações de adição e condensação. No entanto, particularmente os aldeídos alifáticos  $\alpha,\beta$ -insaturados apresentam maior reatividade quando comparados aos aldeídos de cadeia saturada. Os  $\alpha,\beta$ -insaturados reagem rapidamente com grupos sulfídrico, hidroxílico e principalmente amino, que são grupos químicos comuns na estrutura celular de vários organismos vivos. Trombetta et al., (2002) relatam que os (E)-2-alquenais são conhecidos por possuir notáveis atividades frente a diversas cepas de fungos e bactérias, podendo sua atividade ser comparada a biocidas comerciais como biguanidinas, álcoois e guanidinas. Segundo Bisignano et al., (2001), a ação letal desses compostos sobre os microrganismos é justificada principalmente pela alteração na permeabilidade da membrana citoplasmática celular.

O principal modo de ação dos aldeídos sobre as bactérias é causado pela lise da parede celular. Isso consiste na reação do aldeído com os peptidoglicanos, que é em um esqueleto de glicano (polissacarídeo) formado por ácido N-acetil murâmico e N-acetil glicosamina ligados a cadeias laterais de

peptídeos contendo os aminoácidos D-alanina e L-lisina, e em algumas espécies o ácido diaminopimélico. Pela composição da parede celular peptidoglicona, percebe-se muitos grupos químicos que podem reagir como um nucleófilo, principalmente agrupamento amino.

Shockmagn et al. (1967) e Hughes & Thurman (1970) observaram que enzimas autolíticas, responsáveis pela plasticidade da parede celular, são desnaturadas em contato com aldeídos como: glutaraldeído, (E)-2-hexenal, (E)-2-decenal e (E,E)-2,4-decadienal, e ainda verificaram que estes aldeídos reagem condensando com o aminoácido D-alanina comprometendo a estrutura da membrana celular.

O mecanismo de ação dos (E)-2-alquênais ou qualquer aldeído sobre fungos ainda não foi estudado a fundo como em bactérias (GORMAN E SCOTT, 1980; TROMBETTA et al., 2002; KUBO et al., 1995; DANYERA E STEWART 1998). No entanto, segundo Gorman & Scott (1980), o mecanismo de ação que leva a inibição da germinação de esporos de fungos pelos aldeídos é semelhante ao mecanismo descrito para as bactérias. O componente principal da constituição da parede celular dos fungos são fibras de quitina e córneo formado por unidades de N-acetilglicosamina, que se assemelha ao peptidoglicano de bactérias, tendo assim, o mesmo potencial reativo perante compostos altamente eletrofílicos como os aldeídos.

Outros sítios ativos, segundo Gorman & Scott, (1980), podem incluir os complexos proteína-polissacarídeo, encontrados em células de levedura e outros fungos, e também as ligações -S-S- do aminoácido cistina (Fig. 2.24), que são rompidas pela adição de uma carbonila ao átomo de enxofre. E ainda, assim como na cistina e também em várias proteínas e aminoácidos, o grupo -NH<sub>2</sub>, que é abundante nestas espécies químicas, é altamente reativo com aldeídos formando iminas, também conhecidas como base de Schiff, relativamente estabilizadas por ressonância (Fig. 2.25). Acredita-se que as iminas, por estarem em um meio propício, entre grupos carbinólicos (eletrofílicos), sofram uma reação de Mannich produzindo compostos β-aminocarbonilados. Conseqüentemente são formadas ligações secundárias

intercelulares que resulta na aglutinação do complexo da parede celular levando a célula a morte.

Os aldeídos alifáticos  $\alpha,\beta$ -insaturados, com base nos mecanismos de ação biológica discutidos, parecem não ter seletividade, ou seja, podem causar danos a uma variedade de células diferentes, além da significativa atividade bactericida e fungicida. Caboni et al., (2012) observaram que (E,E)-2,4-decadienal e (E)-2-decenal apresentaram atividade nematicida contra *Meloidogyne javanica*. Sjaastad e Svendsen (2008) relataram que os (E)-2-alquênais e (E,E)-2,4-alquênais, de 9 à 12 átomos de carbono, são compostos mutagênicos, podendo causar dano oxidativo significativo em células A-549 de humanos. Outros estudos indicaram uma associação destes aldeídos com efeitos genotóxicos devido à reação com bases de ácidos nucleicos (LOUREIRO et al., 2000). Krall et al., (1999) verificaram que aves predadoras de insetos evitam se alimentar do pentatomídeo *Cosmopepla bimaculata*, fato que foi atribuído aos compostos de defesa da GMT do pentatomídeo. Verificaram ainda, que as mesmas aves evitaram a dieta artificial contaminada com o composto (E)-2-hexenal, dando preferência para a dieta não contaminada.

Diante dos resultados alcançados por este trabalho e outras bioatividades discutidas dos aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, é oportuno concluir que estes compostos apresentam a função de defesa de *T. limbativentris* contra predadores e microorganismos entomopatogênicos.

Podemos atribuir a maior susceptibilidade das ninfas de primeiro instar a *M. anisopliae* ao fato que neste estágio de vida esse inseto não produz, ou produz em quantidades não detectáveis de aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados, considerando o número de insetos utilizados. Por outro lado, podemos justificar a menor suscetibilidade em adultos por serem os únicos a produzir o (E)-2-octenal em maior proporção, comparado aos outros aldeídos (Tabela 1), e principalmente o (E)-2-decenal, que apresentou maior potencial fungitóxico.

A identificação de substâncias fungitóxicas nos pentatomídeos, abre oportunidade para novas pesquisas com interesse de induzir a isolados

eficientes do fungo *M. anisopliae* maior resistência a estes compostos ou propor estudos sobre formulações com componentes capazes de inativar o sítio de reação desses compostos, podendo assim estabelecer um programa mais consistente e eficaz de controle biológico dessa praga, reduzindo as aplicações de agrotóxicos (Inseticidas sintéticos) nos agroecossistemas de arroz.

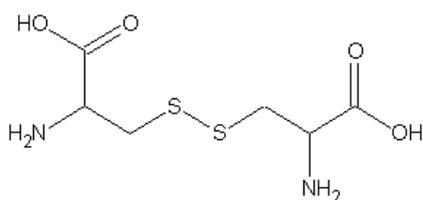


Figura 2.24 – Estrutura molecular do aminoácido Cistina.

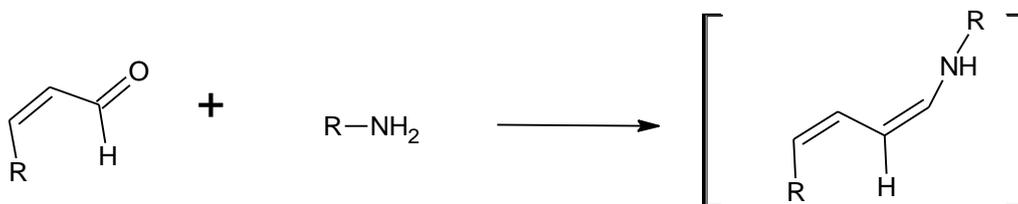


Figura 2.25 – Formação de uma imina pela reação entre aldeídos e aminas.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4<sup>th</sup> Ed. London: Allured Pub. Corp., 2007.

BISIGNANO, G.; LAGANA, M.G.; TROMBETTA, D.; ARENA, S.; ANTONELLA NOSTRO, A.; UCCELLA, N.; MAZZANTI, G.; SAIJA, A. *In vitro* antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L.. Microbiology Letters. 198: p.9-13, 2001.

BORGES, M. & J.R. ALDRICH. Instar-specific defensive secretions of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae). *Experientia* 48: p.893-896, 1992.

BOTTON, M.; MARTINS J.F; LOECK, A.E; ROSENTHAL, M.. *Biologia de Tibraca limbativentris* Stal, 1860 em plantas de arroz. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 25: p.21-26. 1996.

CABONI, P.; NTALLI, N.G.; AISSANI, N.; CAVOSKI, I.; ANGIONI, A. Nematicidal Activity of (E,E)-2,4-Decadienal and (E)-2-Decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. *Journal of agriculture and food chemistry*. 60: p.1146–1151, 2012.

DENYERA, S.P. & STEWAR G.S.A.B. Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41: p.261-268, 1998.

FAVARO, C.F.; RODRIGUES, M.A.C.M.; ALDRICH, J.R.; ZARBIN, P.H.G. Identification of semiochemicals in adults and nymphs of the stink bug *Pallantia macunaima* Grazia (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal Brazilian chemical society*. 22: p.58-64. 2010.

FERREIRA, E.; MARTINS, J.F. da S.; RANGEL, P.H.N.; CUTRIN, V. dos A. Resistência de arroz ao percevejo-do-colmo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 21:5 p.565-569. 1986.

GORMAN, S. P. & SCOTT, E.M. Antimicrobial Activity. Uses and Mechanism of Action of Glutaraldehyde. *Journal of Applied Bacteriology*. 48: p.161-190, 1980.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86: p.985–990 1999.

HUGHES, C. & THURMA, P.N.F. Cross-linking of bacterial cell walls with glutaraldehyde. *Biochemical Journal*, 119: p.925-926, 1970.

KAPLAN, E.L. & MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53: p.457-481, 1958.

KRALL, B. S.; BARTELT, R. J.; LEWIS, C. J.; WHITMAN, D. W. Chemical defense in the stink bug *Cosmopepla bimaculata*. *Journal of Chemical Ecology*, 25: p.2477-2494, 1999.

KUBO, A.; LUNDE, C.S.; KUBO, I. Antimicrobial Activity of the Olive Oil Flavor Compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43: p.1629-1633, 1995.

LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; GOMES, O.F. Trans, trans-2,4-decadienal-induced 1,N2-etheno-29-deoxyguanosine adduct formation. *Chemical Research in Toxicology*. 13: p.601–9, 2000.

MARQUES, F.A.; WENDLER, E.P.; MAIA, B.H.L.N.S.; VENTURAB, M.U. ARRUDA-GATTI. I.C. Identification of Defensive Compounds in Metathoracic Glands of Adults of the Stink Bug *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal Brazilian Chemical society*. 18:6 p.1242-1246, 2007.

MARTINS, J.F.; BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; QUINTELA, E.D. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do Percevejo-do-Colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. *Ciência Rural*, 34:6 p.1681-1688, 2004.

MORAIS M.C.B.; MARTÍN, P.; LAUMANN, R.A.; BORGES M. The Chemical volatiles (Semiochemicals) Produced by Neotropical Stink Bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology* 37(5): p.489-505, 2008.

MOREIRA, J.A. e MILLAR, J.G. Short and simple syntheses Of 4-oxo-(e)-2-hexenal and homologs: Pheromone components and defensive Compounds of hemiptera. *Journal of Chemical Ecology*. 31:4 p.267-279, 2005.

PAREJA, M.; BORGES, M.; LAUMANN, R.A.; MORAES, M.C.B. Inter- and intraspecific variation in defensive compounds produced by five neotropical stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Insect Physiology* 53: p.639-648, 2007.

RAMPELOTTI, F.T.; FERREIRA, A.; PRANDO, H.F.; GRÛTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F. da S.; TCACENCO, F.A.; MATTOS, M.L.T. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. *Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo*. 74:2, p.141-148, 2007.

SAS Institute. *SAS/STAT®, release 9.2 User's Guide*. Cary, NC: USA, 2008.

SHOCKMAGN, D.; POOLEYH, M.; THOMPSONJ, S. Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*. 94: p.1525-1530, 1967.

SILVERSTEIN, R.M. & WEBSTER, F.X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6ª Ed., Rio de Janeiro RJ: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 455p, 2000.

SJAASTAD, A.K. & SVENDSEN K. Exposure to mutagenic aldehydes and particulate matter during panfrying of beefsteak with margarine, rapeseed oil, olive oil or soybean oil. *Annals of Occupational Hygiene (Oxford Journals)*. 52:8 p.739–745, 2008.

SOKOVIC, M. & GRIENSVEN, L.J.L.D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*. 119: p.211–224, 2006.

SOSA-GOMEZ, D.R.; BOUCIAS D.G ; Nation J.L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. Journal of Invertebrate Pathology 69: p.31–39, 1997.

STFANELLO, M.E.A.; CERVI, A.C.; WISNIEWSKI Jr., A.; SIMIONATTO, E.L. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtecta*, Myrtaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia. 20:1 p.82-86 2010.

TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; BISIGNANO, G.; ARENA, S.; CARUSO, S.; MAZZANTI, G.; UCELLA, N.; CASTELLI, F. Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes. Lattes in applied microbiology. 35: p.285-290, 2002.

VAN DEN DOOL H & KRATZ DJ. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J Chromatography 11: p.463-467, 1963.

VAN VUUREN, S.F. & VILJOEN, A.M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. Flavour Fragrance Journal. 22: p.540-544, 2007.

# Capítulo 3

**Efeitos de agroquímicos convencionais utilizados na cultura do arroz ao fungo *M. anisopliae*.**

### 3.1 INTRODUÇÃO.

*Metarhizium anisopliae* é um fungo adaptado para viver como simbiote na rizosfera da planta (Hu e St. Leger 2002), o que torna o solo a sua principal fonte de inóculo. Além disso, o *M. anisopliae* é reconhecido como um importante agente de controle biológico de *T. limbativentris* e também tem mostrado resultados promissores em testes de campo, consequentemente motivando o uso em larga escala para o controle desta praga (Martins et al. 2004; Rampelotti et al. 2007).

O estudo sobre o efeito de pesticidas químicos mais comumente utilizados pelos produtores de arroz no Brasil, em diferentes fases biológicas do *M. anisopliae*, é de suma importância para o estabelecimento de um programa de manejo integrado de pragas para esse inseto. De acordo com alguns investigadores, o potencial nocivo dos produtos químicos agrícolas para o *M. anisopliae* é variável, sendo os compostos fungicidas mais prejudiciais, seguido por inseticidas e herbicidas (LOUREIRO et al. 2002; TANZINI et al. 2002; RACHAPPA et al. 2007; RAMPELOTTI-FERREIRA et al. 2010).

Os micoinseticidas não podem substituir totalmente a necessidade de pesticidas químicos sintéticos em sistemas de produção comercial de arroz. No entanto, como há fortes evidências que indicam efeitos nocivos desses produtos sobre a sobrevivência de fungos entomopatogênicos no agroecossistema, é de extrema importância determinar a compatibilidade dos agrotóxicos e dizer quais são menos nocivos ao *M. anisopliae*, a fim de orientar os produtores de arroz. Além disso, o uso combinado de diferentes medidas de controle, tais como agentes microbianos e inseticidas químicos, compreende um componente importante no manejo integrado de pragas e ajuda a minimizar a resistência nos insetos (GEORGHIU 1994). A toxicidade de produtos fitossanitários sobre esses fungos entomopatogênicos pode variar com a espécie do fungo, cepa, a natureza química do princípio ativo, o modo de ação, a formulação do produto e da dose recomendada (ALVES & LECUONA 1998). Tanzini, et al. (2002) observaram que duas cepas diferentes de *M. anisopliae*

apresentaram respostas diferentes quando expostos a Metamidofós e  $\lambda$ -Cialotrina.

## **3.2. OBJETIVOS**

### **3.2.1. Objetivos Gerais**

Determinar o efeito de diferentes agroquímicos sintéticos convencionais ao *M. anisopliae* (CG-169), em condições de laboratório.

#### 3.2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de oito inseticidas, cinco herbicidas e quatro fungicidas sobre a germinação, o crescimento vegetativo e a esporulação do *M. anisopliae*.
- Determinar a compatibilidade dos agroquímicos testados, segundo equação proposta por Rossi-Zalaf et al. (2008).

## **3.3. MATERIAIS E MÉTODOS.**

### **3.3.1 Fungo**

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa Arroz e Feijão localizado em Santo Antônio de Goiás, GO. Uma cepa do complexo de *M. anisopliae* isolada originalmente de adultos de *T. limbativentris*, após uma epizootia na criação desses insetos em casa de vegetação na Embrapa Arroz e Feijão (CNPAP). Essa cepa do fungo foi depositada na coleção de culturas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), em Brasília, DF, registrado com o código CG-168.

### **3.3.2 Agroquímicos testados**

Os Inseticidas, fungicidas e herbicidas selecionados para os bioensaios foram os mais frequentemente utilizados por produtores de arroz e estão descritos na Tabela 3.1. As concentrações dos produtos agroquímicos testadas foram de acordo com a recomendação do fabricante (AGROFIT 2009). Quando a concentração de um produto foi registrada indicando dose mínima e máxima, foi usada a concentração média. Metamidofós é um inseticida de amplo

espectro, muito conhecido, e que não está registrado para o arroz, apesar de ser amplamente utilizado pelos produtores para controlar *T. limbativentris*. A concentração testada para cada produto foi calculada tendo por base 200 L de água/ha.

**Tabela 3.1.** Descrição dos agroquímicos utilizados nos bioensaios *in vitro* com *Metarhizium anisopliae* CG 168.

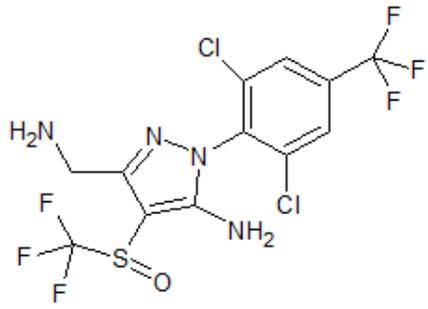
Nome Comercial	Formulação	Grupo Químico	Nome Técnico	Concentração do i.a. (g/L ou g/kg)	Dose (g ou mL/ha)
<b>Inseticidas</b>					
Standak	CS	Pirazol	Fipronil	250	240
Bravik 600 CE	EC	Organofosforado	Parathion metílico	600	400
Nor-trin 250 CE	EC	Piretróides	Cipermetrina	250	100
Actara 250 WG	WP	Neocotinóides	Tiametoxam	250	125
Engeo Pleno	CS	Neocotinóides + Piretróides	Tiametoxam + $\lambda$ -Cialotrina	106 + 141	175
Karate Zeon 50 CS	CS	Piretróides	$\lambda$ -Cialotrina	50	125
Klap	CS	Pyrazol	Fipronil	200	60
Tamaron	CS	Organofosforado	Metamidofós	600	100

**Tabela 3.1** Descrição dos agroquímicos utilizados nos bioensaios *in vitro* com *Metarhizium anisopliae* CG 168.

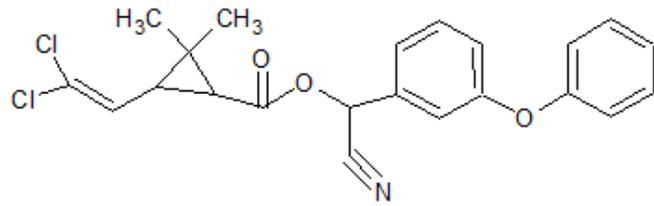
<b>Herbicidas</b>					
Roundup Original	CS	Glycina substituída	Glifosato	480	3250
DMA 806 BR	SL	ácido ariloxialconóico	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	806	1000
Basagran 600	SL	Benzoato de diazonona	Bentazona	600	1200
Kifix	WP	Imidazolinona	Imazapique + Imazapyr	175 + 525	120
Herbadox 500 CE	EC	Dinitroanilinas	Pendimetalina	500	3000
<b>Fungicidas</b>					
Score	EC	Triazol	Difenoconazol	250	275
Stratego 250 EC	EC	Triazol	Propiconazol	250	300
Flint 500 WG	WG	Strobilurina	Trifloxistrobina	500	625
Priori	CS	Strobilurina	Azoxistrobina	250	225

\*Volume da calda de referência = 200 L por hectare.

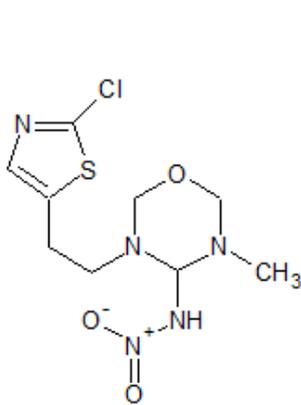
## INSETICIDAS



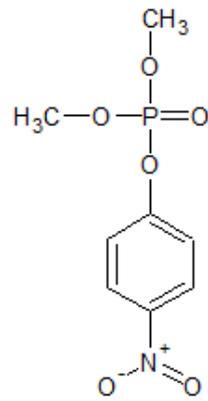
Fipronil



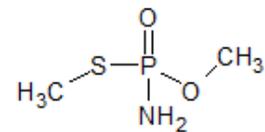
Cipermetrina



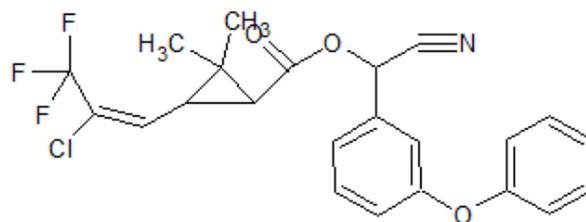
Tiametoxam



Parathion Metílico



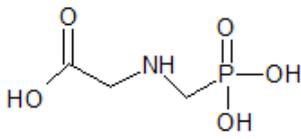
Metamidofós



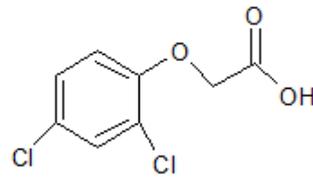
Lâmbida-Cialotrina

Figura 3.1. – Estrutura molecular dos inseticidas químicos testados na avaliação do efeito dos mesmos sobre o fungo *M. anisopliae*

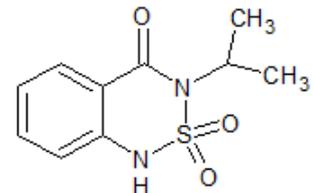
## HERBICIDAS



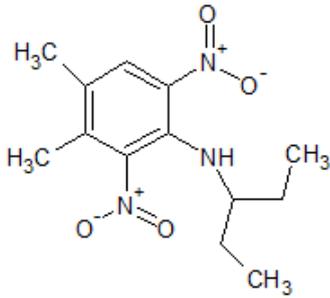
Glifosato



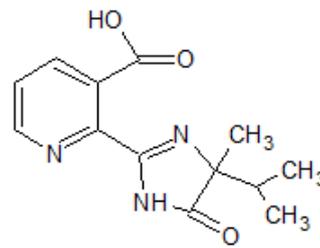
2,4-D



Bentazona

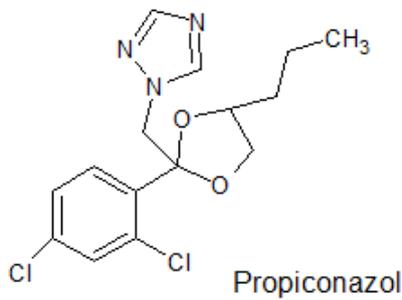


Pendimetalina

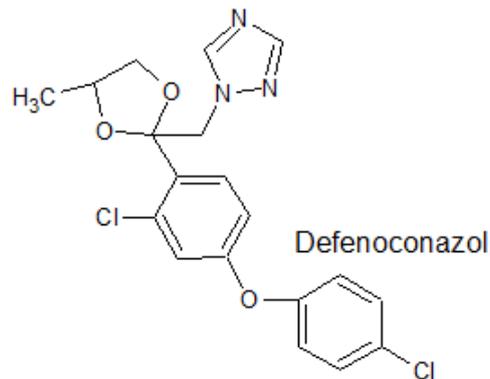


Imazapyr

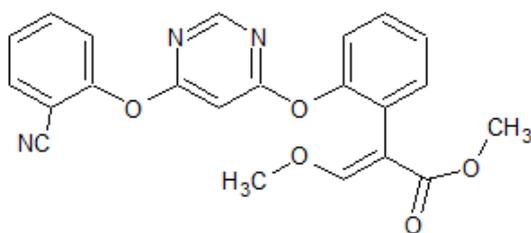
## FUNGICIDAS



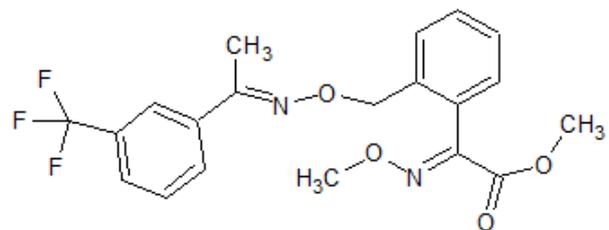
Propiconazol



Defenoconazol



Azoxistrobina



Trifloxistrobina

Figura 3.2. – Estrutura molecular dos herbicidas e fungicidas químicos testados na avaliação do efeito dos mesmos sobre o fungo *M. anisopliae*.

### 3.3.3 Protocolo para ensaio de compatibilidade *in vitro*

No primeiro experimento, foi avaliado o efeito de oito inseticidas sobre a taxa de germinação fúngica. Cada concentração do inseticida foi adicionada a 10 mL de uma suspensão fúngica contendo  $1,9 \times 10^7$  conídios/mL em água destilada além de Tween ® 80 (0,01%). Cada tratamento foi repetido quatro vezes. Em seguida, esta mistura foi vigorosamente agitada em vórtex (Biomixer QL 901) durante dois minutos e mantida sob agitação constante, em um agitador rotativo (Tecnal N206A) a 214 RPM a 25 °C, durante três horas, com a intenção de simular uma mistura em tanque de pulverização dos conídios do fungo com o pesticida. A suspensão de conídios foi submetida novamente ao vórtex e, em seguida, 500 µL de suspensão foram pulverizados sobre uma camada fina (3 mm) do BDA (infusão de batata 20%, dextrose a 2% e agar a 2%) em lâminas de vidro (7,5 x 2,5 cm) usando um pulverizador de mão. Para a germinação de conídios, cada tratamento consistiu de três lâminas (repetições). Após a inoculação dos conídios, as lâminas foram colocadas em câmaras de crescimento (Marconi MA 402) a  $26 \pm 1$  °C, umidade relativa (UR) de  $70 \pm 8\%$  e fotofase de 12 h. O controle consistiu de conídios suspensos numa solução aquosa de 0,01% de Tween ® 80 livre de quaisquer pesticidas. A germinação de esporos foi determinada após 20 e 48 h de incubação através da contagem de 200 conídios aleatoriamente, utilizando um microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse 80i) com 400x de ampliação. Os conídios foram considerados germinados quando observado um tubo de germinação de alongamento maior do que o diâmetro de conídios (LUZ & FARGUES 1997). Este experimento foi realizado em duplicata.

No segundo bioensaio, avaliou-se o efeito dos inseticidas sobre o crescimento micelial e esporulação do fungo. Dois microlitros de cada suspensão original de conídios misturados com pesticidas, cuja preparação foi descrita no ensaio anterior. Em seguida, foram inoculados no centro de uma placa de Petri de 6 cm de diâmetro contendo BDA (10 mL por placa). Cada tratamento foi realizado com quatro repetições (placas). O controle consistiu de conídios suspensos em uma solução aquosa 0,1% de Tween ® 80. As placas foram então colocadas em câmaras de crescimento a  $26 \pm 1$  °C,  $70 \pm 8\%$  de UR e 12 h de fotoperíodo. Depois de nove dias, o diâmetro (mm) da colônia

fúngica foi determinado com base no comprimento e na largura da colônia. Foi utilizado um paquímetro digital (Digimess DG302). Posteriormente, a colônia foi transferida para uma centrífuga equipada com tubos de 50 mL contendo 10 mL de água destilada + Tween ® 80 (0,01%) e vigorosamente agitada em vórtex durante dois minutos, de modo que os conídios foram desprendidos da colônia do fungo. Foram realizadas diluições sucessivas até se obter uma suspensão com concentração desejável para uma boa contagem em câmara de Neubauer numa ampliação de 400x. A produção de conídios foi expressa como número de conídios por colônia. Este experimento foi repetido duas vezes.

O mesmo ensaio de compatibilidade foi feito para cinco herbicidas e quatro fungicidas (Tabela 3.1), utilizando o mesmo protocolo descrito para inseticidas. Para os herbicidas e fungicidas, ambos os experimentos foram repetidos duas vezes.

#### **3.3.4 Análise estatística**

Todos os experimentos foram repetidos duas vezes em datas diferentes, e, em seguida, foram analisados os conjuntos de dados de cada experimento. Os resíduos derivados dos conjuntos de dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe de significância de 5% de probabilidade, a fim de verificar se eles seguiram distribuição normal e variâncias requeridas pelo modelo estatístico paramétrico. Para aqueles que seguiram pressupostos paramétricos, os dados foram submetidos a uma forma de análise de variância (ANOVA, PROC GLM) e, em seguida as medias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Fisher (LSD,  $\alpha = 0,05$ ). Quando os resíduos não corresponderam a pressupostos parâmetros, os dados foram submetidos à análise não paramétrica baseada Kruskal-Wallis com dados ranqueados transformados (PROC NPAR/WAY).

Depois, os meios de classificação foram comparados por LSD de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ), a fim de determinar qual o grupo de produtos químicos (inseticidas, fungicidas e herbicidas) foi mais prejudicial para cada estágio de desenvolvimento de *M. anisopliae*. As médias foram comparadas dentro do mesmo grupo de agroquímicos. As médias foram submetidas ao teste de

Kruskal-Wallis e, em seguida comparadas pelo teste de Fisher LSD ( $\alpha = 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas no SAS versão do programa 9.2 (SAS Institute 2008).

Para determinar a seletividade dos agroquímicos ao *M. anisopliae*, sob condições de laboratório, foi utilizado o índice biológico (IB), proposto por Rossi-Zalaf et al. (2008) como segue:

$$IB = \frac{47(CV) + 43(ESP) + 10(GER)}{100}$$

onde: CV é o percentual de crescimento vegetativo da colônia do fungo em relação ao controle; ESP é o percentual de esporulação colônia em relação ao controle; GER é a porcentagem de germinação dos conídios em relação ao controle. Os valores de "IB" ( $\alpha = 0,05$ ) foram agrupados em três categorias de classificação: 0 a 41 = tóxico; 42-66 = moderadamente tóxico; > 66 = compatíveis. Assim, esta fórmula é considerada prática para classificar pesticidas químicos em termos de sua toxicidade á fungos.

### 3.4 RESULTADOS

Todos os inseticidas inibiram significativamente a germinação dos esporos até 20 h, em comparação ao controle não tratado ( $F = 261,98$ ;  $gl = 8, 45$ ;  $P < 0,0001$ ). Fipronil (250 g/L) e Cipermetrina foram os mais prejudiciais para a germinação dos esporos (redução de 54% e 100%, respectivamente) (Tabela 3.2). Após 48 h, os tratamentos com Tiametoxam e Parathion Metílico não diferenciaram do controle ( $P > 0,05$ ), enquanto os demais inseticidas afetaram negativamente a germinação dos conídios em comparação com a testemunha ( $F = 266,7$ ,  $gl = 8, 45$ ,  $P < 0,0001$ ). Como resultado, Fipronil (250 g/L) e Cipermetrina causaram uma inibição significativa sobre a germinação dos esporos, quando comparados com Tiametoxam, (Tiametoxam +  $\lambda$ -Cialotrina), Parathion Metílico,  $\lambda$ -Cialotrina, Fipronil (200 g/L) e Metamidofós, em períodos de incubação de 20 e 48 horas ( $P < 0,05$ ).

O crescimento micelial foi significativamente reduzido em todos os tratamentos com inseticidas em comparação com o controle ( $\chi^2 = 62,14$ ;  $gl = 8$ ,  $P < 0,0001$ ), exceto para Parathion Metílico, que permitiu o crescimento normal

do fungo ( $P > 0,05$ ). Nenhum crescimento micelial do *M. anisopliae* foi observado no tratamento com Cipermetrina que foi significativamente diferente dos outros tratamentos (Tabela 3.2).

A esporulação do *M. anisopliae* foi significativamente inibida pelos inseticidas ( $\chi^2 = 63,05$ ;  $gl = 8$ ,  $P < 0,0001$ ), exceto para Parathion Metílico, que não diferiu do controle ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3.2). (Tiametoxam +  $\lambda$ -Cialotrina), Fipronil (200 g/L), Fipronil (250 g/L), e Metamidofós foram altamente antagônicos (> 73,7% de redução) à esporulação do *M. anisopliae* ( $P < 0,05$ ). Uma vez que Cipermetrina inibiu totalmente o crescimento micelial do fungo, não foi observado produção de conídios neste tratamento (Tabela 3.2).

De acordo com o índice biológico (IB), Parathion Metílico, Tiametoxam e  $\lambda$ -Cialotrina foram compatíveis com a Cepa CG-168, enquanto Fipronil (200 g/L), Fipronil (250 g/L), (Tiametoxam +  $\lambda$ -Cialotrina) e Metamidofós foram classificados como moderadamente tóxicos (Tabela 3.5). Dos inseticidas testados apenas Cipermetrina não foi compatível com *M. anisopliae*.

Todos os herbicidas inibiram significativamente a germinação após 20 h, e não se observou germinação quando o *M. anisopliae* foi exposto ao Pendimetalina e 2,4-D ( $F = 255,22$ ;  $gl = 5$ , 29;  $P < 0,0001$ ) (Tabela 2.3). Após 48 h, a taxa de germinação dos tratamentos com adição de (Imazapique + Imazapir) e Bentazona foram semelhantes ao controle ( $P > 0,05$ ), enquanto os outros herbicidas reduziram consideravelmente a viabilidade de conídios ( $F = 715,18$ ;  $gl = 5$ , 29;  $P < 0,0001$ ) (Tabela 2.3). Além disso, o Glifosato retardou a germinação dos conídios, com 8,2% de germinação após 20 h e 96,4% após 48 h.

A maioria dos herbicidas reduziu significativamente o crescimento micelial em comparação com o controle ( $\chi^2 = 39,47$ ;  $gl = 5$ ,  $P < 0,0001$ ), exceto para o Glifosato ( $P > 0,05$ ). O 2,4-D causou uma completa supressão do crescimento vegetativo do *M. anisopliae*, e, conseqüentemente, neste tratamento não foi observado nenhuma produção de conídios (Tabela 2.3). Todos os herbicidas mostraram efeito deletério sobre a produção de conídios em relação ao controle ( $\chi^2 = 36,53$ ;  $gl = 5$ ,  $P < 0,0001$ ), sendo Pendimetalina

e 2,4-D os mais deletérios, causando redução na produção de conídios de 81,8% e 100%, respectivamente.

De acordo com o índice biológico, Glifosato, Bentazona e (Imazapique + Imazapir) foram compatíveis com o *M. anisopliae* CG-168, enquanto Pendimentalina foi classificado como moderadamente tóxico e 2,4-D tóxico (Tabela 3.5).

Similar aos outros grupos químicos, todos os fungicidas afetaram negativamente o processo de germinação do *M. anisopliae* tanto a 20 h ( $F = 1246,20$ ;  $gl = 4,20$ ,  $P < 0,0001$ ) quanto a 48 h ( $F = 256,62$ ;  $gl = 4,20$ ;  $P < 0,0001$ ) em comparação com o controle (Tabela 3.4). Trifloxistrobina e Azostrobinas foram os fungicidas mais deletérios a viabilidade fúngica após 20 h, uma vez que nenhum conídio germinado foi observado. No entanto, esse tratamento apresentou alguns conídios germinados após 48 h de incubação (48-52% de viabilidade), indicando que tanto Trifloxistrobina quanto Azostrobinas retardaram a taxa de germinação dos conídios. Tanto o crescimento vegetativo quanto a produção de conídios foram afetados por todos os fungicidas ( $F = 54,4$ ,  $gl = 4,32$ ,  $P < 0,0001$ ;  $F = 107,51$ ;  $gl = 4,32$ ,  $P < 0,0001$ , respectivamente). Propiconazol e Trifloxistrobina causaram mais de 50% de antagonismo sobre o *M. anisopliae*.

De acordo com o índice biológico, Azostrobinas foi o único fungicida compatível com *M. anisopliae* CG-168, enquanto Difenconazol, Propiconazol e Trifloxistrobina foram classificados como moderadamente tóxicos. Nenhum fungicida foi classificado como tóxico para este fungo.

De acordo com as análises para a comparação entre os grupos químicos pelas médias agrupadas, todos os agroquímicos testados afetaram de alguma forma algum parâmetro biológico do fungo. Com relação ao crescimento vegetativo, os inseticidas foram mais deletérios do que herbicidas e fungicidas ( $\chi^2 = 36,97$ ;  $gl = 3$ ,  $P < 0,0001$ ), enquanto que para a produção de conídios todos os agroquímicos, de forma semelhante, reduziram a produção de conídios por colônia em relação ao controle ( $\chi^2 = 33,06$ ;  $gl = 3$ ,  $P < 0,0001$ ). Em relação a viabilidade do fungo, os fungicidas causaram o maior efeito

prejudicial sobre a germinação após 20 h ( $\chi^2 = 64,28$ ;  $gl = 3$ ,  $P < 0,0001$ ) e 48 h após a incubação ( $\chi^2 = 33,31$ ;  $gl = 3$ ,  $P < 0,0001$ ). Além disso, os herbicidas causaram uma menor germinação de esporos após 20 h do que os inseticidas, no entanto, eles não diferem entre si após 48 h.

**Tabela 3.2** Efeito dos inseticidas sobre os parâmetros biológicos a *M. anisopliae* CG 168 a 25°C e 12 h de fotofase.

Tratamentos	Germinação 20h (%) <sup>1</sup>		Germinação 48h (%) <sup>1</sup>		Crescimento Vegetativo (mm) <sup>2</sup>		Produção de Conídios (n x10 <sup>6</sup> conidia/mL) <sup>2</sup>	
	Média±DP	%Redução	Média±DP	%Redução	Média±DP	%Redução	Média±DP	%Redução
	Controle <sup>3</sup>	98,3 ± 1,3 a	-	100 a	-	30,3 ± 1,7 a	-	6,3± 0,8 a
Actara	95,8 ± 1,8 b	2,5	99,8 ± 0,8 ab	1,7	27,5 ± 1,2 b	9,2	4,3 ± 1,2 c	32,6
Bravik	94,7 ± 2,0 b	3,7	99,5 ± 0,8 abc	0,5	30,2 ± 1,2 a	0,3	5,5 ± 0,9 ab	12,8
Engeo Pleno	92,2 ± 3,5 bc	6,2	98,7 ± 1,4 bcd	1,3	21,7 ± 3,7 c	28,4	1,0 ± 0,4 e	83,7
Karate	91,8 ± 5,1 bc	6,5	98,7 ± 0,8 cde	1,3	28,5 ± 1,7 b	5,9	4,8 ± 1,7 bc	24,6
Klap	89,1 ± 5,7 cd	9,3	97,6 ± 1,1 de	2,4	23,3 ± 1,6 c	23,3	1,7 ± 0,4 d	73,7
Tamaron	85,3 ± 3,9 d	13,1	96,8 ± 1,4 e	3,2	23,2 ± 1,0 c	23,6	1,6 ± 0,1 d	74,3
Standak	43,9 ± 3,4 e	54,4	72 ± 7,4 f	28	20,5 ± 1,5 c	32,4	1,6 ± 0,2 d	74,6
Nor-trin	0 f	100	8,0 ± 4,8 g	92	0 d	100,0	0 f	100,0

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste de Fisher's LSD ( $P \leq 0.05$ ). Número de repetições por tratamento: <sup>1</sup> n = 6, <sup>2</sup> n = 8, <sup>3</sup> Foi utilizado solução de Tween 80 (0,01%) como controle.

**Tabela 3.3** Efeito dos herbicidas sobre os parâmetros biológicos a *M. anisopliae* CG 168 a 25°C e 12 h de fotofase.

Tratamentos	Germinação 20h (%) <sup>1</sup>		Germinação 48h (%) <sup>1</sup>		Crescimento Vegetativo (mm) <sup>2</sup>		Produção de Conídios (n x10 <sup>6</sup> conidia/mL) <sup>2</sup>	
	Média±DP	%Redução	Média±DP	%Redução	Média±DP	%Redução	Média±DP	%Redução
	Controle <sup>3</sup>	97,3 ± 1,9 a	-	100 a	-	26,1 ± 0,7 a	-	5,7 ± 0,6 a
Kifix	84,6 ± 6,6 b	12,7	100 a	0	24,6 ± 0,4 b	5,4	4,0 ± 0,6 b	30,9
Basagran	79,1 ± 6,4 c	18,2	100 a	0	23,5 ± 1,4 c	9,8	3,7 ± 1,5 b	36,6
Roundup	8,2 ± 7,6 d	89,1	96,4 ± 1,5 b	3,6	25,4 ± 0,5 a	2,5	4,5 ± 0,6 b	22,6
Herbadox	0 e	100	14,5 ± 6,8 c	85,5	19,6 ± 2,2 d	24,8	1,1 ± 0,3 c	81,8
DMA	0 e	100	2,2 ± 2,0 d	97,8	0 e	100	0 d	100

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste de Fisher's LSD ( $P \leq 0.05$ ). Número de repetições por tratamento: <sup>1</sup> n = 6, <sup>2</sup> n = 8, <sup>3</sup> Foi utilizado solução Tween 80 (0,01%) como controle.

**Tabela 3.4** Efeito dos fungicidas sobre os parâmetros biológicos a *M. anisopliae* CG 168 a 25°C e 12 h de fotofase.

Tratamentos	Germinação 20h (%) <sup>1</sup>		Germinação 48h (%) <sup>1</sup>		Crescimento Vegetativo (mm) <sup>2</sup>		Produção de Conídios (n x10 <sup>6</sup> conidia/mL) <sup>2</sup>	
	Média±DP	%Redução	Média±DP	%Redução	Média±DP	%Redução	Média±DP	%Redução
	Control <sup>3</sup>	97,3 ± 1,9 a	0	100 a	0	26,1 ± 0,7 a	0	5,7 ± 0,6 a
Score	33,7 ± 4,7 b	63,6	87,1 ± 1,9 b	13,1	22,0 ± 1,1 d	15,7	2,9 ± 0,4c	50,2
Stratego	0,3 ± 0,4 c	97	42,7 ± 4,5 d	57,3	22,9 ± 0,4 c	12,2	2,6 ± 0,3 c	54,5
Flint	0 c	100	52,0 ± 6,1 c	48	21,2 ± 0,5 e	18,7	1,1 ± 0,1 d	81,4
Priori	0 c	100	43,2 ± 7,3 d	56,8	24,0 ± 0,4 b	7,9	3,9 ± 0,5 b	33,2

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não difere significativamente pelo teste de Fisher's LSD ( $P \leq 0.05$ ). Número de repetições por tratamento: <sup>1</sup> n = 6, <sup>2</sup> n = 8, <sup>3</sup> Foi utilizado solução de Tween 80 (0,01%) como controle.

**Tabela 3.5** Classificação toxicológica dos agroquímicos ao *M. anisopliae* cepa CG-168 com base no índice biológico (IB) proposto por Rossi-Zalaf et al. (2008).

<b>Agroquímicos</b>	<b>Índice Biológico<sup>1</sup></b>	<b>Classificação</b>
Inseticidas		
Fipronil (250 g/L)	47,2	Moderadamente tóxico
Parathion Metílico	94,0	Compatível
Tiametoxam	81,8	Compatível
Tiametoxam + $\lambda$ -Cialotrina	49,9	Moderadamente tóxico
$\lambda$ -Cialotrina	86,3	Compatível
Fipronil (200 g/L)	56,8	Moderadamente tóxico
Metamodofós	55,6	Moderadamente tóxico
Cipermetrina	0,00	Tóxico
Herbicidas		
Glifosato	80,5	Compatível
2,4-D	0,00	Tóxico
Betazona	78,4	Compatível
Imazapique + Imazapir	83,2	Compatível
Pendimetalina	43,6	Moderadamente tóxico

**Tabela 3.5** - Classificação toxicológica dos agroquímicos ao *M. anisopliae* cepa CG-168 com base no índice biológico (IB) proposto por Rossi-Zalaf et al. (2008).

Fungicidas		
Difenoconazol	65,0	Moderadamente tóxico
Trifloxistrobina	46,5	Moderadamente tóxico
Propiconazol	60,9	Moderadamente tóxico
Azoxistrobina	72,6	Compatível

<sup>1</sup> Para o cálculo do índice de biológico, considerou-se a germinação dos conídios em 20 h. <sup>2</sup> Embora azoxistrobina foi classificada como seletiva ao *M. anisopliae* de acordo com a classificação do índice biológico, não é recomendável o seu uso em combinação com o fungo, uma vez que impediu a germinação de esporos em 20 h.

### 3.5 DISCUSSÃO.

Nenhum dos agrotóxicos testados nas doses recomendadas de campo promoveu efeitos positivos sobre estágios de desenvolvimento de *M. anisopliae*. Por outro lado, essas formulações que foram compatíveis com o fungo, especialmente os inseticidas, poderiam ser utilizadas em doses subletais em combinação com o fungo, a fim de melhorar a sua virulência contra *T. limbativentris* ou até mesmo para ampliar a sua gama de hospedeiros na cultura de arroz.

Embora os inseticidas Metamidofós, Parathin Metílico, (Tiametoxam +  $\lambda$ -Cialotrina),  $\lambda$ -Cialotrina, Fipronil (200 g/L), Tiametoxam e o herbicida (Imzapique + Imazapir) tenham diferido do controle, a germinação dos conídios nestes tratamentos foi elevada, variando de 84,6-95,8%. Por conseguinte, dentro dessa taxa de germinação dos conídios, estes inseticidas seriam adequados para utilizar em conjunto com este fungo no controle biológico.

Alguns dos produtos agroquímicos testados retardaram a germinação de conídios do *M. anisopliae*, uma vez que foi observado o aumento da taxa de germinação no intervalo entre 20 h e 48 h no período de incubação. Por exemplo, Fipronil (250 g/L), Glifosato, Difenoconazol, Propiconazol, Trifloxistrobina e Azoxistrobina mostraram ação fungistática sobre a germinação de conídios após 20 h, porém após 48 horas foi observado um aumento na germinação dos conídios do fungo para estes produtos. Para o Azoxistrobina, não houve conídios germinados após 20 h, mas este fungicida permitiu um maior crescimento micelial e maior produção de conídios em comparação com os outros fungicidas. O efeito destes produtos sobre a germinação dos conídios é provavelmente devido ao ingrediente ativo e/ou alguns componentes dos veículos inertes. Quintela (1996) observou que um dos componentes do veículo inerte do inseticida Admire™ 2 F (Bayer Corporation), afetou a germinação dos conídios de *M. anisopliae*. A atividade fungicida do grupo químico estrobilurinas (Azoxistrobina e Trifloxistrobina) depende da capacidade do ingrediente ativo de interromper a produção de energia na germinação das mitocôndrias e, conseqüentemente, impedir o desenvolvimento dos esporos; fungicidas do grupo dos triazóis (Difenoconazol e Propiconazol) inibem a biossíntese de ergosterol e, conseqüentemente, evitam a formação da membrana da célula fúngica (BARTLETT et al. 2002). Nossos resultados estão de acordo com o modo de ação das estrobilurinas, Azoxistrobina e Trifloxistrobina, uma vez que estes reduziram negativamente a germinação a 20 e 48 h, e os triazóis Difenoconazol e Propiconazol, que também reduziram a germinação, o crescimento micelial e a produção de conídios do *M. anisopliae*.

As formulações com o herbicida 2,4-D e o inseticida Cipermetrina foram as mais nocivas para o fungo, uma vez que inibiram completamente a germinação, o crescimento vegetativo e a produção de conídios. O 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) atua por inibição da acetil-CoA da enzima carboxilase, e como resultado impede a biossíntese de ácidos graxos e glicosilceramidas, que são componentes da membrana lipídica em animais, plantas e fungos (LEIPELT et al. 2001). Ainda não está claro como os inseticidas à base de Cipermetrina podem afetar os fungos. Em contraste com os resultados obtidos

no presente estudo, Rachappa et al. (2007) observaram que os piretróides não causavam danos nos estágios de desenvolvimento de *M. anisopliae*, mas essa interação depende de procedimentos metodológicos, formulação dos pesticidas e dos isolados fúngicos.

A compatibilidade do *M. anisopliae* com Tiametoxam e  $\lambda$ -Cialotrina está de acordo com outros estudos (BATISTA FILHO et al. 2001; NEVES et al, 2001; CAVALCANTI et al. 2002; LOUREIRO et al. 2002; RAMPELOTTI-FERREIRA et al 2010). Mesmo o inseticida Engeo Pleno™ (Tiametoxam e  $\lambda$ -Cialotrina) sendo uma combinação de dois inseticidas compatíveis, o mesmo foi classificado como moderadamente tóxico no presente estudo. De acordo com Alves (1998), a combinação de dois ou mais ingredientes ativos em um agroquímico pode reduzir ou aumentar o grau de compatibilidade pelo efeito sinérgico ou antagônico. No presente estudo, nenhum dos produtos agroquímicos testados foi sinérgico para o *M. anisopliae*.

O inseticida Fipronil (250 g/L), em doses de 160 e 240 mL/ha, não foi prejudicial ao crescimento micelial e à produção de conídios do *M. anisopliae*, sendo classificado como compatível no estudo de Rampelotti-Ferreira et al. 2010). Em nosso estudo, este produto foi classificado como moderadamente tóxico para *M. anisopliae* CG-168 usando o mesmo índice biológico. No entanto, estes resultados não podem ser comparados porque a metodologia experimental e os isolados do fungo foram diferentes. Estes autores incorporaram os agroquímicos ao meio BDA, enquanto que no nosso estudo, os pesticidas foram adicionados em uma suspensão aquosa de conídios e expostos durante três horas. O nosso método simula uma mistura em tanque entre conídios do fungo e agroquímicos, permitindo que os conídios ficassem totalmente expostos ao pesticida por um determinado período, podendo ser considerado mais realista do que o método de incorporação dos pesticidas em meios sólidos. No método de incorporação dos agroquímicos ao meio sólido podem ocorrer alguns inconvenientes como a precipitação de alguns pesticidas e a diluição não uniforme no meio sólido, devido a diferenças de densidade, o que pode comprometer o contato direto entre os agroquímicos e os conídios (SILVA et al. 2005).

De acordo com o índice biológico, Azoxistrobina foi classificado como sendo compatível com o *M. anisopliae*, permitindo o crescimento vegetativo e produção de conídios, embora não houvesse conídios viáveis em 20 h de incubação. No entanto, deve ser levado em conta que qualquer pesticida químico que impede a germinação dos esporos até 20 h, não deve ser utilizado em combinação com este fungo, uma vez que a germinação de conídios é o primeiro passo para iniciar o processo de infecção fúngica no inseto. Se a germinação dos conídios é retardada ou reduzida, a possibilidade do fungo infectar o inseto no campo pode ser bastante reduzida, uma vez que existem fatores abióticos e bióticos que são prejudiciais à sobrevivência do fungo. Por exemplo, a maior parte dos conídios viáveis nas folhas é perdida em aproximadamente 24 h por fatores ambientais, incluindo radiação solar, alta temperatura e baixa umidade relativa (JARONSKI 2010). Além disso, alguns estudos têm mostrado que a taxa de germinação elevada em período inferior a incubação dos fungos entomopatogênicos tem uma relação direta com a sua virulência em hospedeiros (HASSAN et al. 1989; ALTRE et al. 1999; RANGEL et al. 2008). Como afirma Faria et al. (2010) a maior viabilidade dos conídios e a velocidade mais rápida da germinação desempenham um papel importante para o sucesso do controle biológico de insetos e devem ser levados em conta no controle de qualidade de micoinseticidas.

Faria et al. (2010) observaram que apenas os conídios vigorosos de *Beauveria* e *Metarhizium* com taxa de germinação rápida dentro de um período de 24 h de incubação foram considerados viáveis para o controle de insetos. Conídios que germinaram após um período de 24 h, foram considerados esporos debilitados (baixo vigor), uma vez que causaram mortalidades baixas de insetos e não devem ser considerados para o controle de insetos. Com base nesses resultados, foram utilizados apenas os conídios que germinaram a 20 h para calcular o índice biológico, uma vez que os conídios vigorosos e não estressantes são muito mais propensos a ter sucesso na germinação e penetração através da cutícula do inseto e escapar de adversidades ambientais.

O fato de um agroquímico inibir o crescimento micelial não é necessariamente indicativo de redução na esporulação e germinação de

conídios e vice-versa (ZIMMERMANN 1975). Alguns produtos agroquímicos podem atrasar o crescimento micelial, embora possam estimular uma maior produção de conídios mais tarde. Em outros casos, o micopatógeno cresce bem mais sem esporular, portanto, não há uma relação direta entre o crescimento vegetativo e a produção de conídios (TAMAI et al. 2002). Na classificação toxicológica atual proposta por Rossi-Zalaf et al. (2008), há um baixo peso atribuído ao parâmetro viabilidade (isto é, 10%) em comparação com os outros. No entanto, Muitos estudos têm sugerido que a germinação de conídios é parâmetro mais importante do que o crescimento vegetativo e a esporulação em cadáveres, pois a primeira corresponde ao primeiro passo que aciona uma epizootia, e o fungo depende dele para infectar o hospedeiro com sucesso (KHALIL et al. 1985; HIROSE et al. 2005; ALIZADEH et al. 2007). Assim, se um pesticida provoca uma grande redução na germinação dos conídios, pode reduzir a eficácia do entomopatógeno para o seu alvo. Como o crescimento micelial desenvolve dentro do inseto hospedeiro e a concentração dos agrotóxicos, especialmente daqueles com modo sistêmico de ação, é normalmente baixa na hemolinfa, há menor chance dessa fase de desenvolvimento ser afetada negativamente (KHALIL et al. 1985). O índice biológico atual para a classificação toxicológica dos pesticidas tem o mérito de considerar a capacidade de crescimento de fungos saprófitos no ambiente e a formação de fontes de inóculo secundário pela esporulação em cadáveres, que são fatores mais relacionados com a abordagem conservacionista para entomopatógenos em um agroecossistema.

Com base em todos os fatos citados acima, sugerimos fortemente uma revisão na importância dos parâmetros que compõem a equação do índice biológico proposto por Rossi-Zalaf et al. (2008). Essa revisão deve ser feita por pesquisadores envolvidos neste assunto.

Do ponto de vista de um agroecossistema estável e perene, o estabelecimento do fungo na área, seria o fator mais importante a ser considerado, assim o crescimento vegetativo e esporulação em cadáveres são mais importantes do que a germinação de conídios. Por outro lado, em colheitas anuais, em que ciclo da planta é curto e o solo fica mais exposto a radiação solar, seria mais viável e coerente adotar a abordagem inundativa

numa tentativa de reduzir rapidamente a densidade de população. Neste cenário, propágulos fúngicos permanecem mais expostos a fatores ambientais nocivos, tais como a radiação solar, temperatura elevada e assim por diante. Por conseguinte, é desejável que os conídios germinem tão rapidamente quanto possível para escapar desses inconvenientes abióticos. Estudos sobre a compatibilidade para específicos isolados fúngicos com agrotóxicos aplicados em agroecossistema tem o objetivo global de preservar e permitir o estabelecimento de entomopatógenos fúngicos (INGLIS et al. 2001).

No controle de *T. limbativentris* em culturas de arroz que adotam manejo integrado de pragas, duas estratégias podem ser utilizadas para a aplicação concomitante do *M. anisopliae* com agroquímicos tóxicos para este fungo:

1) Aplicar o fungo entre dois e quatro dias antes da pulverização química, para que o fungo tenha tempo suficiente de infectar o hospedeiro (KOUASSI et al. 2003).

2) Utilizar uma formulação de conídios em óleo para reduzir o efeito fungistático dos pesticidas aos fungos. Estudo recente, utilizando a formulação de conídios de *M. anisopliae* em óleo, aplicada de forma aérea, demonstrou que o óleo pode promover proteção contra os produtos com atividade fungistática ou fungicida e também reforça a virulência do fungo no hospedeiro *Diatraea saccharalis* (LOPES et al. 2011).

Em resumo, os fungicidas foram mais prejudiciais para a germinação dos esporos, crescimento micelial e produção de conídios do *M. anisopliae* CG 168 do que os herbicidas e inseticidas, e não devem ser aplicados em conjunto com este fungo. Os defensivos agrícolas compatíveis com *M. anisopliae* CG 168 foram: os inseticidas Bravik™ (400 mL/ha), Actara™ (125 g/ha), e Karate Zeon™ (125 mL/ha) e os herbicidas Roundup Original™ (3250 mL/ha), Basagram™ (1200 mL/ha), e Kifix™ (120 g/ha).

### 3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

AGROFIT. *Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários*. Web Page: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>. Acessado em 23/05/2009.

ALIZADEH, A.; SAMIH, M.A.; KHEZRI, M.; RISEH, R.R. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9: p.31–34, 2007.

ALTRE, J.A.; VANDENBERG, J.D.; CANTONE, F.A. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: p.332–338, 1999.

ALVES, S.B., Fungos entomopatogênicos, in: *Controle Microbiano de Insetos*, ed. S.B. Alves, Piracicaba, SP: Fealq, p.289–381, 1998.

ALVES, S.B. & LECUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano, in: *Controle Microbiano de Insetos*, ed. S.B. Alves, Piracicaba, SP: Fealq, pp. 217-238, 1998.

ALVES, S.B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos, in: *Controle Microbiano de insetos*, ed. S.B. Alves, Piracicaba, SP: Fealq, p.217–238, 1998.

BARTLETT, D.W.; CLOUGH, J.M.; GODWIN, J.R.; HALL, A.A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58: p.649–662, 2002.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, 30: p.437–447, 2001.

CAVALCANTI, R.S.; MOINO JR, A.; SOUZA, G.C.; ARNOSTI, A., Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidaclopride, idpodione e thiamethixan sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo, 69: p.17–22, 2002.

FARIA, M.; HOTCHKISS, J.H.; HAJEK, A.E.; WRAIGHT, S.P., debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. Journal of Invertebrate Pathology, 105: p.74–83, 2010.

GEORGHIOU, G.P., Principles of insecticide resistance management. Phytoprotection, 75: p.51–59, 1994.

HASSAN, A.E.M.; DILLON, R.J.; CHARNLEY, A.K. Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. Journal of Invertebrate Pathology, 54: p.277–279, 1989.

HIROSE, E.; NEVES, P.M.O.J.; ZEQUI, J.A.; MARTINS, C.L.H.; PERALTA, C.H.; MOINO Jr, A. Effects of biofertilizers and neem oil on entomopatogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Brazilian Archives of Biology and Technology, 44: p.419–423, 2005.

HU, G. & ST. LEGER, R.J. Field studies using a recombinant mycoinssecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Applied and Environmental Microbiology, 68: p.6383–6387, 2002.

INGLIS, G.C.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests, in Fungal as biological control agents: progress, problems and potential, eds. T.M. Butt, C.W. Jackson, and N. Magan, Wallingford, UK: CABI Publishing, p. 23–69, 2001.

JARONSKI, S.T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. BioControl, 55: p.159–185, 2010.

KHALIL, S.K.; SHAH, M.A.; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. Agriculture Ecosystems and Environment, 13: p.329–334, 1985.

KOUASSI, M.; CODERRE, D.; TODOROVA, S.I. Effects of the timing of applications on the incompatibility of three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina). *Journal of Applied Entomology*, 127: p.421–426, 2003.

LEIPELT, M.; WARNECKE, D.; ZÄHRINGER, U.; OTT, C.; MÜLLER, F.; HUBE, B.; HEINZ, E. Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants and fungi. *Journal of Biological Chemistry*, 276: p.33621–33629, 2001.

LOPES, R.B.; PAULI, G.; MASCARIN, G.M.; FARIA, M. Protection of fungal conidia afforded by an oil-based formulation against non-compatible fungicides. *Biocontrol Science and Technology*, 21: p.125–137, 2011.

LOUREIRO, E.S.; MOINO JR, A.; ARNOSTI, A.; SOUZA, G.C. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. *Neotropical Entomology*, 31: p.263–269, 2002.

LUZ, C. & FARGUES, J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia*, 138: p.117–125, 1997.

MARTINS, J.F.S.; BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; QUINTELA, E.D. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-do-colmo *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) em lavoura de arroz irrigado. *Ciência Rural*, 34: p.1681-1688, 2004.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E.; TCHUJO, P.T.; MOINO Jr, A. Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com inseticidas nicotínicos. *Neotropical Entomology*, 30: p.263–268, 2001.

QUINTELA, E.D. Synergistic effect of imidacloprid on conidial germination and the pathogenicity of two entomopathogenic fungi to Larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). Ph.D Dissertation, Gainesville: University of Florida, 1996.

RACHAPPA, V.; LINGAPPA, S.; PATIL, R.K. Effect of agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 20: p.410–413, 2007.

RAMPELOTTI, F.T.; FERREIRA, A.; PRANDO, H.F.; GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F.S.; TCACENCO, F.A.; MATTOS, M.L.T. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) em condições de laboratório. *Arquivos do Instituto Biológico*, 74: p.141–148, 2007.

RAMPELOTTI-FERREIRA, F.T.; FERREIRA A.; PRANDO, H.F.; TCACENCO F.A.; GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F.S. Seletividade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado ao fungo *Metarhizium anisopliae*, agente de controle microbiano do *Tibraca limbativentris*. *Ciência Rural*, 40: p.745–751, 2010.

RANGEL, D.E.N.; ALSTON, D.G.; ROBERTS, D.W. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research*, 112: p.1355–1361, 2008.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES S.B.; LOPES, R.B.; SILVEIRA NETO, S.; TANZINI, M.R. Interação de microorganismo com outros agentes de controle de pragas de doenças, in *Controle Microbiano de Pragas na America Latina: Avanços e desafios*, eds.S.B. Alves & R.B. Lopes, Piracicaba, SP: Fealq, pp. 279–302, 2008.

SAS Institute. *SAS/STAT®*, release 9.2 *User's Guide*. Cary, NC: USA, 2008.

SILVA, R.Z.; NEVES, P.M.O.J.; SANTORO, P.H. Técnicas e parâmetros utilizados nos estudos de compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e produtos fitossanitários. *Semina: Ciências Agrárias*, 26: p.305–312, 2005.

TAMAI, M.A.; ALVES; S.B., LOPES, R.B.; FAION, PADULLA, L.F.L. Toxicidade de produtos fitossanitários a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico*, 69: p.89–96, 2002.

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

ZIMMERMANN, G. Über die wirkung systemischer fungizide auf verschiedene insektoathogene fungi imperfecti *in vitro*. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 27: p.113–117, 1975.

# Capítulo 4

**Aumento da patogenicidade de *M. anisopliae* a *T. limbativentris* com doses subletais de inseticidas químicos.**

#### 4.1. INTRODUÇÃO

O percevejo do colmo do arroz, *Tibraca limbativentris* Stal. (Heteroptera: Pentatomidae), é a principal praga do arroz irrigado (*Oryza sativa* L.) no Brasil e outros países da América do Sul (Pantoja, 1997). Este inseto, particularmente o estágio adulto, pode reduzir a produção de arroz entre 10-80% (FERREIRA et al., 1997; COSTA & LINK 1992). Ninfas e adultos se alimentam dos colmos em desenvolvimento desde o início do perfilhamento vegetativo, no entanto, o maior dano ocorre durante o pré-floração e formação da panícula (COSTA E LINK 1992).

O ambiente irrigado é propício tanto para o desenvolvimento de ninfas e adultos do percevejo quanto para fungo entomopatogênico (MARTINS et al., 2004). Na entressafra, o percevejo do colmo hiberna na base de diferentes espécies de plantas junto à superfície do solo onde há alta umidade (LINK et al., 1996). Quando os adultos migram para novos campos de arroz, eles inicialmente infestam a base das plantas, entre os colmos, onde não há água estagnada (BOTTON et al., 1996). Nós temos observado várias epizootias do *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. (Hypocreales: Cordycipitaceae) nas populações de *T. limbativentris* em ambientes de casa de vegetação e também em campos de arroz irrigado nos Estados de Goiás e Mato Grosso. Embora as condições ambientais sejam favoráveis para o uso do fungo para controlar *T. limbativentris*, muitos estudos têm mostrado que o *M. anisopliae* não teve eficiência superior 50-60% no controle deste inseto (MARTINS E LIMA, 1994, MARTINS et al., 1997, MARTINS et al., 2004). Baixa taxa de infecção por fungo entomopatogênico hypocrealean em algumas espécies relatadas de pentatomídeos associados com soja também foram observadas com *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* (SOSA-GÓMEZ et al., 1993). Posteriormente, concluiu-se que alguns compostos químicos produzidos por este inseto foram capazes de reduzir a adesão, germinação e também foram fungistáticos para os conídios do *M. anisopliae* (BORGES et al., 1993; SOSA-GÓMEZ et al., 1997).

Uma abordagem promissora para superar a resistência do *T. limbativentris* a fungos entomopatogênicos envolve a exploração potencial de interações sinérgicas com inseticidas químicos, especialmente da classe 4A

(neonicotinóides), o qual pode ser usado para atingir essa praga (ANDERSON et al., 1996; BOUCIAS et al., 1996; KAAKEH et al., 1997; QUINTELA & MCCOY 1997, 1998a, 1998b; PACHAMUTHU & KAMBLE 2000; HIROMORI & NISHIGAKI, 2001; RUSSEL et al., 2010). Trabalhos anteriores demonstraram que doses subletais de inseticidas podem aumentar o stress e comprometer o sistema imune ou, de outro modo, alterar o comportamento do inseto que leva a um aumento da patogenicidade do fungo (BOUCIAS et al., 1996; QUINTELA E MCCOY, 1998a). Doses subletais de inseticidas misturadas a fungos entomopatogênicos podem aumentar a mortalidade da pragas, assim como reduzir o tempo letal, em comparação com a utilização dos agentes separados (PACHAMUTHU & KAMBLE, 2000; PAULA et al., 2011). Entretanto, os estudos de combinações de fungos entomopatogênicos e inseticidas para controle de percevejos são escassos na literatura.

## **4.2. OBJETIVOS**

### **4.2.1. Objetivos Gerais.**

Testar doses subletais de inseticidas químicos, pertencentes a duas classes (Neocotinódes e Piretródes), combinadas com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, com a intenção de aumentar a virulência do fungo.

### **4.2.2. Objetivos específicos.**

- Determinar a concentração subletal de tiametoxam e  $\lambda$ -cialotrina para os adultos do *T. limbativentris*.
- Comparar a virulência entre duas cepas de *M. anisopliae* contra adultos de *T. limbativentris*.
- Comparar a virulência do *M. anisopliae*, formulado em suspensão oleosa, contra *T. limbativentris*.
- Avaliar, em laboratório, a susceptibilidade de adultos do *T. limbativentris* a diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae* (cepa CG-168) isolada ou combinada com doses subletais de tiametoxam e  $\lambda$ -cialotrina.
- Avaliar a eficácia do tratamento combinado de *M. anisopliae* com doses subletais de tiametoxam em condições de campo de arroz irrigado.

### 4.3. Materiais e Métodos

#### 4.3.1 Colônia de insetos

Os adultos de *T. limbativentris* foram obtidos a partir de uma criação em casa de vegetação no Centro Nacional de Pesquisas Arroz e Feijão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Arroz e Feijão), localizada a 16°28'00" S, 49°17'00" W e 823 m de altitude. Os insetos foram alimentados com plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas em vasos, cultivar BR-IRGA 409. A colônia de inseto foi obtida de uma população de campo originalmente coletada em Santo Antônio de Goiás, Estado de Goiás. Adultos com idade definida depois da emergência foram coletados desta colônia e usados em todos os experimentos.

#### 4.3.2. Fungos e inseticidas

A cepa CG-168 de *M. anisopliae* foi, a princípio, isolada do *T. limbativentris* durante uma epizootia em casa de vegetação na EMBRAPA Arroz e Feijão. Esta cepa foi preservada a -80 °C no Laboratório de Micologia de Invertebrados, na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, Brasil). Recentemente, esta cepa de fungo foi identificada através da aproximação da sequência de multigenes descrita por Bischoff et al. (2009). Uma cepa comercial ESALQ-1037 de *M. anisopliae sensu lato* (Itaforte BioProdutos Ltda., Itapetininga, SP, Brasil), a princípio isolada do *Solenopsis invicta* em Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, foi também usada. O fungo foi cultivado em BDA (200 g de infusão de batata + 5 g de dextrose + 15 g de Ágar com 0,2 g de tetracilina) e incubado de 10–15 dias a 26 ± 1 °C, 70 ± 10% de umidade relativa (U.R.), 12:12 horas de fotoperíodo. A viabilidade dos conídios foi determinada pela contagem dos tubos germinativos produzidos em placas de BDA depois de 20 horas de incubação usando um microscópio de contraste de fase com ampliação de 400x. A viabilidade dos conídios foi superior a 90% em todos os casos.

Os inseticidas químicos sintéticos usados nos experimentos foram Tiametoxam (Actara™ 250 WG [grânulos dispersíveis], 25% [IA], nome técnico 3-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5] xadiazina-4-ilideno-N-nitroamina) e λ-Cialotrina (Karate Zeon™ 50 SC [suspensão de microcápsulas], 5% [IA], nome técnico (S)-a-ciano-3-fenoxibenzil(Z)-(1R,3R)-3-(2-cloro-3, 3, 3-trifluor prop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxila e (R)-a-ciano-3-fenoxibenzil (Z) -(1S,3S)-

3-(2-cloro-3,3,3-trifluorprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxila (Syngenta Crop Protection, Greensboro, NC, EUA). Tiametoxam é uma segunda geração de inseticidas neocotinóides pertencentes à subclasse química do tianicotinil (JESCHKE & NAUEN 2008). O produto piretróide contém a molécula micro-encapsulada  $\lambda$ -Cialotrina que possui um amplo espectro de ação contra diversas pragas de insetos (HE et al., 2008). Estes produtos são atualmente registrados para controle do *T. limbativentris* em culturas de arroz no Brasil (AGROFIT 2012).

#### **4.3.3. Determinação da concentração subletal de inseticidas químicos para adultos de *T. limbativentris*.**

No primeiro experimento, foi realizado um bioensaio com formulação de Tiametoxam (Actara™ 250 WG, Syngenta, Greensboro, NC, EUA) diluída em água destilada estéril (dH<sub>2</sub>O), nas concentrações de 6.25, 3.1, 1.6, 0.77, 0.38, e 0.19 ppm (IA), com aplicação tópica, para determinar a concentração subletal (CL<sub>30</sub>) em adultos do *Tibraca*. Adultos com 15 dias de vida foram anestesiados com CO<sub>2</sub> por 10 segundos. Os indivíduos foram tratados dorsalmente com 10  $\mu$ L de cada concentração usando uma micropipeta. O grupo controle foi tratado com água destilada estéril dH<sub>2</sub>O. Os insetos tratados foram colocados em grupos de cinco dentro de tubos de frascos de vidro (20 x 2,5 cm) e então alimentados com três colmos de arroz (cultivar BR-IRGA 409). As superfícies dos colmos de arroz foram previamente esterilizadas com solução de água sanitária a 1% v/v e lavadas duas vezes com água destilada. A base dos colmos de arroz foi envolta por algodão úmido para manter a turgência do material vegetal. Os tubos foram tampados com uma camada de gaze (malha de 30  $\mu$ m) e presos por um atilho de borracha. Cada tratamento, incluindo o controle, consistiu de seis repetições (tubos) contendo cinco insetos (30 insetos por tratamento). Os tubos foram incubados a 26  $\pm$  1 °C, 70  $\pm$  10% U.R. e 12:12 horas de fotoperíodo dentro de uma incubadora do tipo B.O.D.

No segundo experimento, a formulação de  $\lambda$ -Cialotrina (Karate Zeon™ 50 SC, Syngenta, Greensboro, NC, EUA) foi testada a concentrações de 2.5, 5.0, 7.5, 10, e 12.5 ppm (IA). O protocolo do experimento foi o mesmo usado para o primeiro experimento. O primeiro e o segundo experimentos foram repetidos duas vezes em diferentes ocasiões.

#### **4.3.4. Comparação da virulência entre duas cepas de *M. anisopliae* em adultos de *T. limbativentris***

A virulência dos conídios da cepa experimental (CG-168) aos adultos do *Tibraca* foi comparada com uma formulação comercial de óleo contendo cepas de *M. anisopliae* ESALQ-1037 a  $5 \times 10^7$  conídios/mL. Todas as suspensões de conídios foram preparadas em 0.01% v/v solução aquosa de polioxietileno (80) monoleato de sorbitan (Tween 80) (Vetec<sup>TM</sup> Química Fina Ltda., RJ, Brasil). Uma solução de Tween 80 a 0.01% v/v foi incluída como controle. Os adultos foram inoculados por via tópica, como descrito no item 4.3.3. Todos os tratamentos foram incubados em uma incubadora do tipo B.O.D. a  $27 \pm 2$  °C,  $70 \pm 12\%$  U.R. e 12:12 horas de fotoperíodo. Cada tratamento foi repetido seis vezes e cada repetição continha cinco insetos (30 insetos/tratamento). Os adultos mortos foram registrados diariamente e, em seguida, transferidos para placas de Petri de 90 mm contendo pequenos pedaços de algodão úmido para determinar a infecção por *M. anisopliae*. Este experimento foi repetido duas vezes em ocasiões diferentes.

#### **4.3.5. Interação entre *M. anisopliae* CG-168 e dois inseticidas contra adultos *T. limbativentris*.**

No primeiro bioensaio, Tiametoxam a 0.38 ppm (IA) e fungos a  $5 \times 10^7$  conídios/mL foram testados isoladamente e em combinação. No segundo bioensaio, a suspensão de conídios de *M. anisopliae* a  $5 \times 10^6$  conídios/mL foi testada isolada e em combinação com Tiametoxam a 0.77 ppm (IA). No terceiro bioensaio, o fungo foi testado isoladamente a  $5 \times 10^7$  conídios/mL e em combinação com Tiametoxam a 0.77 ppm (IA). No quarto bioensaio, Tiametoxam a 0.77 ppm (IA) e fungo a  $5 \times 10^8$  conídios/mL foram testados isolados e em conjunto. No quinto bioensaio,  $\lambda$ -Cialotrina foi testado a 9.3 ppm e *M. anisopliae* isolado a  $5 \times 10^7$  conídios/mL e em combinação. A suspensão de conídios e as soluções foram preparadas em Tween 80 0.01% v/v aquoso. Tween 80 a 0.01% foi adicionado como controle em todos os bioensaios. Os tratamentos foram aplicados por via tópica nos adultos do *Tibraca* como descrito no item 4.3.3. Cada tratamento foi repetido seis vezes com cinco adultos por repetição (30 insetos/tratamento). Os tratamentos foram incubados em uma incubadora do tipo B.O.D a  $27 \pm 2$  °C,  $70 \pm 12\%$  U.R. e 12:12 horas de fotoperíodo. Os indivíduos mortos e vivos de percevejos do colmo foram

recolhidos diariamente determinando-se assim, as micoses nos cadáveres. Cada bioensaio foi repetido duas vezes em datas diferentes.

#### **4.3.6. Estudos de campo com *M. anisopliae* e Tiametoxam**

O experimento foi realizado na fazenda Palmital em campos experimentais da EMBRAPA Arroz e Feijão, (Brazabranes, GO, Brasil) localizada a 16°26'13" S e 49°23'46.3" W. Os tratamentos consistiam de: 1) Tiametoxam a 50 g [IA]/ha (dose completa recomendada); 2) Tiametoxam a 12.5 g [IA]/ha (dose subletal); 3) Dispersão de óleo emulsionável de *M. anisopliae* ESALQ-1037 a 1 L/ha ( $1 \times 10^{12}$  conídios viáveis/ha); 4) Combinação de Tiametoxam (12.5 g/ha) e *M. anisopliae* (1 L/ha); 5) Controle (somente água). O arroz cultivar Jaçanã foi semeado (espaçamento de 30 cm) em uma área de 100 x 15 m em 11 de dezembro de 2009. A área experimental foi imediatamente inundada e drenada depois de 46 dias (26/jan/2010), quando foram colocadas gaiolas de nylon de 1m<sup>3</sup> para cada tratamento, em um delineamento em blocos casualizados. A distância entre as gaiolas era de 5 x 2 m. Cada gaiola foi infestada com 20 casais de adultos de *T. limbativentris* com 10 dias de vida após emergência. Um dia após a infestação, os tratamentos foram aplicados com um pulverizador costal de CO<sub>2</sub> equipado com um bico plano operando a 25 lb/pol<sup>2</sup>. Os tratamentos foram pulverizados a uma taxa de 30 mL/m<sup>2</sup> para cada gaiola. A mortalidade de adultos dentro do campo foi verificada em um, sete e 14 dias após a pulverização. Além disso, insetos (10 por gaiola) foram coletados 24 horas e sete dias após a pulverização. Os insetos coletados das gaiolas no campo foram incubados em tubos de vidro contendo colmos de arroz e incubados em incubadora do tipo B.O.D. (25 ± 1 °C, 70 ± 12% U.R. e 12:12 (horas de fotoperíodo), como descrito na seção 4.3.3. para ensaios de laboratório, e a mortalidade foi avaliada diariamente. Além disso, a mortalidade dos adultos dentro das gaiolas no campo foi verificada em um, sete e 14 dias após a pulverização.

#### **4.3.7. Análises estatísticas**

A relação entre a resposta da mortalidade acumulada e a concentração de inseticidas seguiu a distribuição binomial com probabilidade de resposta dada pela equação  $p_i = C + (1 - C) \cdot pi$ , onde  $p_i$  é a probabilidade de mortalidade,  $ci$  é a concentração de inseticida (ppm),

C é a mortalidade natural (segundo plano) no grupo de controle, e  $p_i$  é a probabilidade de mortalidade causada pelos inseticidas (Tiametoxam ou  $\lambda$ -Cialotrina). O melhor ajuste foi estimado pelo modelo probit (PROC PROBIT), dentre outros modelos testados (Gompertz e Logit), baseado no menor desvio (e.g., Pearson  $\chi^2$  / graus de liberdade). Deste modo, as concentrações letais dos inseticidas foram estimadas (ROBERTSON & PREISLER 1992).

A mortalidade acumulada e os testes em laboratório e em campo para micoses de *M. anisopliae* foram sujeitos a uma análise de variância (ANOVA, PROC GLM) com as médias comparadas pelo modelo Fisher's LSD com  $\alpha = 0.05$ . Todas estas análises estatísticas foram rodadas no programa SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2008).

O tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) e as curvas de sobrevivência foram estimados usando o modelo Kaplan-Meier (análise de sobrevivência) com tratamentos separados por um teste Log-Rank (Mantel-Cox) com  $\alpha = 0.05$  (SPSS, 2008). A interação entre fungos e o inseticida foi determinada por método estatístico relatado por Farenhorst et al. (2010), o qual é baseado no teste T-Student ( $\alpha = 0.05$ ), onde compara a porcentagem de mortalidade observada para a mistura (Mfi) e sua porcentagem de mortalidade esperada (Me). A mortalidade esperada foi dada por  $Me = Mf + Mi (1 - Mf/100)$ , onde Mf e Mi foram porcentagens de mortalidade observada causada por fungos e inseticidas isolados, respectivamente. Quando o teste T é significativo e  $Mfi - Me > 0$  (positivo), considera-se sinergismo. Se o teste T é significativo e  $Mfi - Me < 0$  (negativo), então a interação é antagonica. Finalmente, se o teste T não é significativo e a mortalidade observada para tratamentos combinados é maior que cada agente isolado, o efeito pode ser considerado aditivo.

#### **4.4. RESULTADOS**

##### **4.4.1. Concentração subletal de Tiametoxam e $\lambda$ -Cialotrina para os adultos de *T. limbativentris*.**

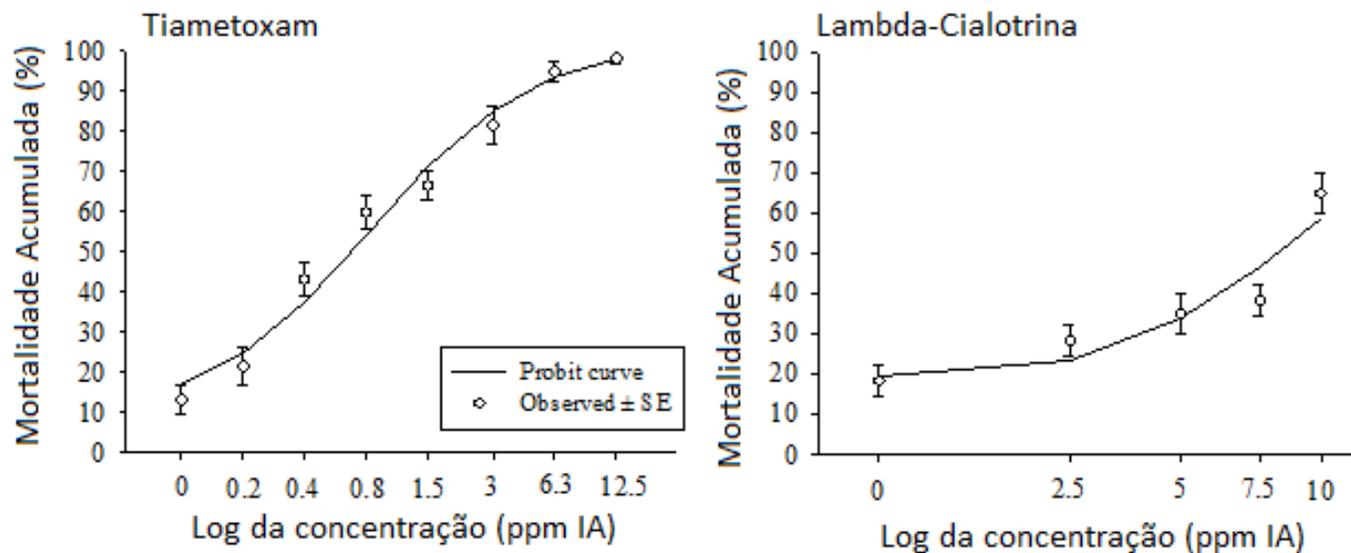
Os adultos de *T. limbativentris* foram mais susceptíveis ao Tiametoxam que ao  $\lambda$ -Cialotrina. A mortalidade acumulada de insetos aumentou com a concentração de ambos inseticidas (Figura 4.1 e Tabela 4.1). Os valores estimados de CL<sub>30</sub> para *T. limbativentris* foram 0.77 ppm (Tiametoxam) e 9.33 ppm ( $\lambda$ -Cialotrina), respectivamente, aos nove dias após a aplicação. A relação

entre a mortalidade de adultos e a concentração de inseticidas (ajustada para controle de mortalidade) foi descrita pelo modelo probit (melhor ajuste:  $\chi^2_{\text{tiametoxam}} = 59.92$ ,  $P = 0.9976$ ;  $\chi^2_{\lambda\text{-cialotrina}} = 33.27$ ,  $P = 0.9963$ ) (Figura 4.1). A mortalidade natural estimada pela equação probit para adultos de *T. limbativentris* foi cerca de 11.5% e 19.5% para os testes com tiametoxam e  $\lambda$ -cialotrina, respectivamente.

**Tabela 4.1.** Determinação das concentrações letais de Tiametoxam e  $\lambda$ -Cialotrina sobre Adultos de *T. limbativentris* usando o modelo Probit, sob condições de laboratório.

Ingrediente Ativo	Nº de insetos utilizados	Equação de Probit <sup>a</sup>	$\chi^2$ ( <i>P</i> valor)	CL <sub>30</sub> (IA ppm) [95% LF] <sup>b</sup>
Tiametoxam	540	$Y=0.1146+(1-0.1146)[\theta(-0.3357+1.6471\log(\text{dose}))]$	59.92 (0.9976 <sup>ns</sup> )	0.77 [0.49-1.08]
$\lambda$ -Cialotrina	360	$Y=0.1946+(1-0.1946)[\theta(-4.4236+4.0214\log(\text{dose}))]$	33.27 (0.9963)	9.32 [1.52-11.11]

<sup>a</sup> Y foi a proporção de mortalidade e  $\theta$  a distribuição normal acumulada. <sup>b</sup> The above lethal concentration (LC) and fiducial limits (95% FL) refer to effects due to the independent variable (e.g. chemical insecticide) and do not include any effect due to the natural threshold. The natural mortality was 11.5% and 19.5% in control groups for thiamethoxam and lambda-cyhalotrin bioassays, respectively.



**Figura 4.1.** Curva de mortalidade acumulada (% ,  $\pm$  SE) de adultos de *Tibraca limbativentris* depois da exposição a diferentes concentrações de tiametoxam e  $\lambda$ -cialotrina, estimados pelo modelo Probit e ajustados pela mortalidade natural. Barras de erros são mostradas para os valores observados (círculos vazios).

#### **4.4.2 Comparação da virulência entre duas cepas de *M. anisopliae* a adultos de *T. limbativentris*.**

A virulência das duas cepas de *M. anisopliae* sobre adultos de *T. limbativentris* foi similar, independente da formulação (Tabela 4.2). A mortalidade de adultos em todos os tratamentos fúngicos foi duas vezes maior quando comparado com o controle ( $F_{[3,44]} = 6.52$ ,  $P < 0.0001$ ) (Tabela 4.2). O número de insetos que apresentou micose foi similar para CG168 e ESALQ-1037, ambos aplicados como solução aquosa de conídios ou como formulação à base de óleo. ( $F_{[2,33]} = 1.15$ ;  $P < 0.3289$ ) (Tabela 4.2).

#### **4.4.3. Interação de *M. anisopliae* com dois inseticidas sobre adultos de *T. limbativentris*.**

A combinação de Tiametoxam a 0.77 ppm com *M. anisopliae* a  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  e  $5 \times 10^8$  conídios/mL causou 50% da mortalidade de adultos com 6-7 dias (Tabela 4.3). Os adultos do percevejo do colmo do arroz expostos a todos os tratamentos combinados de *M. anisopliae* e Tiametoxam apresentaram um significativo crescimento na mortalidade total em relação a cada um dos agentes aplicados isoladamente ( $P < 0.05$ , Tabela 4.3), exceto para os fungos a  $5 \times 10^8$  conídios/mL. Além disso, os adultos tratados com todas as combinações de fungos com Tiametoxam a 0.77 ppm sobreviveram em um período significativamente curto ( $TL_{50} = 6-7$  dias) quando comparados com as aplicações isoladas de *M. anisopliae* e Tiametoxam ( $TL_{50} \geq 15$  dias). O maior valor para  $TL_{50}$  (= 15 dias) foi atingido com a mistura de 0.38 ppm de Tiametoxam e  $5 \times 10^7$  conídios/mL de *M. anisopliae* resultando em uma velocidade de morte duas vezes mais lenta em comparação com as outras combinações fungo/inseticida. Por outro lado, os tratamentos isolados de fungos a  $5 \times 10^6$  ou  $5 \times 10^7$  conídios/mL e Tiametoxam não foram suficientes para causar 50% de mortalidade dos percevejos do colmo, exceto para o fungo a  $5 \times 10^8$  conídios/mL. Estes resultados sugerem que os adultos do percevejo do colmo do arroz exibem uma resistência natural à infecção para este micopatógeno.

As análises de sobrevivência indicaram que os adultos de *T. limbativentris* mostraram um significativo aumento na susceptibilidade quando expostos a baixas taxas de Tiametoxam (0.38 ou 0.77 ppm) combinado com diferentes concentrações de *M. anisopliae* ( $5 \times 10^6$  –  $5 \times 10^8$  conídios/mL) do que com os

tratamentos isolados para cada agente ( $P < 0.05$ ) (Figura 4.2). Tiametoxam a 0.77 ppm retratou da mesma forma a taxa de mortalidade em relação ao tratamento fúngico isolado a  $5 \times 10^6$  ( $\chi^2 = 2.985$ ,  $P = 0.084$ ),  $5 \times 10^7$  ( $\chi^2 = 0.003$ ,  $P = 0.958$ ) e  $5 \times 10^8$  conídios/mL ( $\chi^2 = 0.909$ ,  $P = 0.34$ ). A mesma tendência foi encontrada quando comparado Tiametoxam a 0.38 ppm com fungos a  $5 \times 10^7$  conídios/mL ( $\chi^2 = 0.993$ ,  $P = 0.319$ ).

Concentrações de fungos a  $5 \times 10^6$  e  $5 \times 10^7$  conídios/mL com Tiametoxam a 0.77ppm promoveram uma alta porcentagem de cadáveres infectados pelo fungo do que suas contrapartes isoladas ( $F_{[1,22]} = 55.0$ ,  $P < 0.0001$ ;  $F_{[1,22]} = 16.39$ ,  $P = 0.0005$ , respectivamente), variando de 50 a 57% de insetos infectados pelo fungo (Tabela 4.3). Enquanto a combinação de *M. anisopliae* a  $5 \times 10^7$  conídios/mL com 0.38 ppm de Tiametoxam e *M. anisopliae* a  $5 \times 10^8$  conídios/mL com 0.77 ppm de Tiametoxam não aumentou a porcentagem de micoses em comparação aos fungos isolados ( $F_{[1,22]} = 2.17$ ,  $P = 0.1553$ ;  $F_{[1,22]} = 2.0$ ,  $P = 0.1713$ , respectivamente).

Em relação ao  $\lambda$ -Cialotrina, houve um crescimento significativo na mortalidade dos adultos para os tratamentos combinados dos inseticidas com os fungos quando comparados com os tratamentos isolados ( $F_{[3,44]} = 18.62$ ,  $P < 0.0001$ ) (Tabela 4.4). Os adultos foram igualmente susceptíveis ao fungo e  $\lambda$ -cialotrina aplicados isoladamente de acordo com suas curvas de mortalidade ( $\chi^2 = 365$ ;  $P = 456$ ), com ambos agentes causando 41,7% de mortalidade dos adultos aos 14 dias (Figura 4.3). Conseqüentemente, este inseticida não melhorou a porcentagem de micose pelo *M. anisopliae* nos cadáveres em relação aos fungos isolados ( $F_{[1,22]} = 1.11$ ;  $P = 0.3027$ ) (Tabela 4.4).

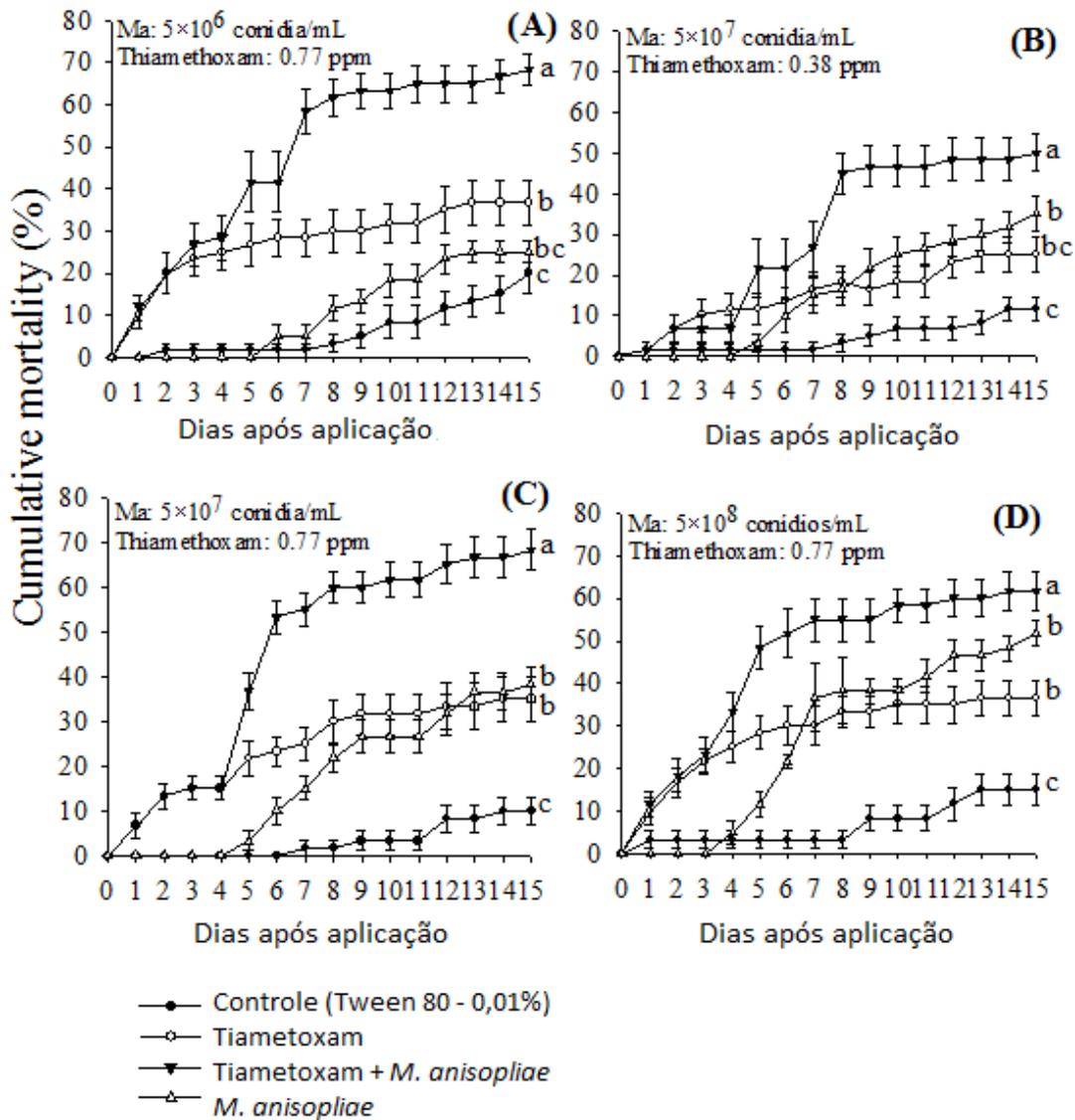
Finalmente, o teste *T* mostrou que combinações de *M. anisopliae* com concentrações subletais de Tiametoxam ou  $\lambda$ -Cialotrina foram classificadas como interações aditivas. Embora o teste *T* não foi significativo, a mortalidade observada nos tratamentos combinados foi maior do que com cada agente isolado (Tabela 4.5).

**Tabela 4.2.** Virulência de duas cepas de *M. anisopliae* sobre adultos *T. limbativentris* sob condições de laboratório.

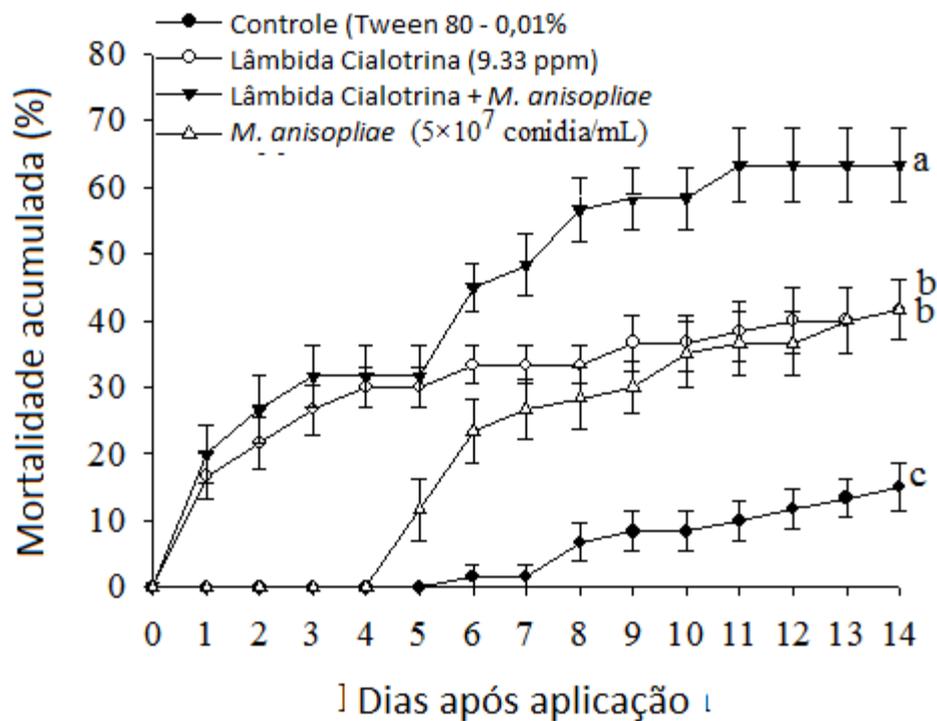
Cepas de <i>M. anisopliae</i> <sup>a</sup>	Tratamento ( $5 \times 10^7$ conídios/mL)	Mortalidade acumulada até	Insetos Infectados (%) <sup>b</sup>
--------------------------------------------	-------------------------------------------	---------------------------	-------------------------------------

		12 dias (%)	
CG-168	Suspensão Aquosa	33.3 ± 4.5 a	31.7 ± 3.9 a
ESALQ-1037	Suspensão Aquosa <sup>2</sup>	31.7 ± 3.9 a	31.7 ± 3.9 a
	Óleo emulsionável	38.3 ± 3.0 a	38.3 ± 3.0 a
Controle	Tween 80 (0.01%)	15.0 ± 4.4 b	–
ANOVA		$F_{[3,44]} = 6.52, P = 0.001$	$F_{[2,33]} = 1.15, P = 0.3289$

<sup>a</sup> Médias (± SE) seguidas pela mesma letra na mesma coluna não difere estatisticamente de acordo com o teste de Fisher LSD ( $P \leq 0.05$ ). <sup>b</sup> Percentual de insetos com *M. anisopliae* esporulado no cadáver a partir do total de insetos mortos.



**Figura 4.2.** - Curvas cumulativas de mortalidade (%  $\pm$  EP) de adultos de *T. limbativentris* após a exposição ao tratamento individual e combinado entre as concentrações de Actara™ (1,5 e 3,1 ppm) e as suspensões de conídios de *M. anisopliae* ( $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$  conídios/mL). As mesmas letras indicam que as curvas de mortalidade não são significativamente diferentes de acordo com teste Log-Rank (Mantel-Cox) ( $P < 0,05$ ). DAA = dias após a aplicação.



**Figura 4.3.** - Curva de mortalidade acumulada (% $\pm$  SE) de adultos de *T. limbativentris* após exposição aos tratamentos com  $\lambda$ -Cialotrina isolada e combinada com *M. anisopliae* CG-168. A mesma letra indica que a curva de mortalidade não apresenta diferença significativa segundo teste de Log-Rank (Mantel-Cox) ( $P \leq 0.05$ ).

**Tabela 4.3.** - Susceptibilidade de adultos de *T. limbativentris* exposto a *M. anisopliae* CG-168 e Tiametoxam aplicado individualmente ou in combinação sob condições de laboratório.

<i>M. anisopliae</i> (conídios/mL) <sup>a</sup>	Tiametoxam (ppm) <sup>1</sup>	TL <sub>50</sub> (dias) <sup>b</sup>	95% LF	Mortalidade acumulada em 15 dias (%)	Insetos infectados (%) <sup>c</sup>
0	0	ND	ND	20.0±4.9 a	–
0	0.77	ND	ND	35.0±4.4 b	–
5x10 <sup>6</sup>	0	ND	ND	35.0±4.4 b	16.7±3.3 a
5x10 <sup>6</sup>	0.77	7.0	5.503 - 8.497	66.7±5.7 c	50.0±3.0 b
ANOVA				$F_{[3,44]} = 16.35, P < 0.0001$	$F_{[1,22]} = 55.0, P < 0.0001$
0	0	ND	ND	21.7±4.6 a	–
0	0.77	ND	ND	35.0±4.4 ab	–
5x10 <sup>7</sup>	0	ND	ND	38.3±5.8 b	31.7±4.6 a
5x10 <sup>7</sup>	0.77	6.0	4.623 - 7.377	71.7±5.2 c	56.7±4.1 b
ANOVA				$F_{[3,44]} = 18.07, P < 0.0001$	$F_{[1,22]} = 16.39, P = 0.0005$
0	0	ND	ND	11.7±2.9 a	–
0	0.38	ND	ND	25.0±4.4 b	–
5x10 <sup>7</sup>	0	ND	ND	35.0±4.5 b	28.3±4.6 a
5x10 <sup>7</sup>	0.38	15.0	ND	50.0±4.6 c	36.7±3.3 a

**Tabela 4.3.** - Susceptibilidade de adultos de *T. limbativentris* exposto a *M. anisopliae* CG-168 e Tiametoxam aplicado individualmente ou in combinação sob condições de laboratório.

ANOVA				$F_{[3,44]} = 15.42, P < 0.0001$	$F_{[1,22]} = 2.17, P = 0.1553$
0	0	ND	ND	18.3±4.6 a	–
0	0.77	ND	ND	41.7±4.6 b	–
5x10 <sup>8</sup>	0	15.0	ND	50.0±4.6 bc	35.0±5.0 a
5x10 <sup>8</sup>	0.77	6.0	4.25 – 7.75	63.3±5.4 c	45.0±5.0 a
ANOVA				$F_{[3,44]} = 15.47, P < 0.0001$	$F_{[1,22]} = 2.0, P = 0.1713$

<sup>a</sup> Médias (± EP) seguidas pela mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa Segundo o teste de Fisher LSD ( $P \leq 0.05$ ). <sup>b</sup> ND = (Curva de mortalidade não determinada) Mortalidade inferior a 50%. <sup>c</sup> Percentual de insetos no qual apresentaram esporulação do *M. anisopliae* em seu cadáver.

**Tabela 4.4.** - Interações entre *M. anisopliae* com os inseticidas Tiametoxam e  $\lambda$ -Cialotrina, com base na mortalidade observada em laboratório comparada com a mortalidade esperada.

Tratamento combinado	% Mortalidade cumulada em 15 dias		Teste T	Valor P
	Observada	Esperada		
Thiamethoxam (0.77 ppm) + <i>M. anisopliae</i> ( $5 \times 10^6$ )	66.7±5.7	57.7±4.3	1.59	0.2212
Thiamethoxam (0.38 ppm) + <i>M. anisopliae</i> ( $5 \times 10^7$ )	50.0±4.6	51.3±4.3	0.05	0.8336
Thiamethoxam (0.77 ppm) + <i>M. anisopliae</i> ( $5 \times 10^7$ )	71.7±5.2	59.0±4.9	3.11	0.0915
Thiamethoxam (0.77 ppm) + <i>M. anisopliae</i> ( $5 \times 10^8$ )	63.3±5.4	71.7±2.3	2.00	0.1714
Lambda-cyhalothrin (9.33 ppm) + <i>M. anisopliae</i> ( $5 \times 10^7$ )	63.3±5.4	66.3±3.6	0.21	0.6499

\* Mortalidade esperada  $Me = Mf + Mi (1 - Mf/100)$ , sendo MF e Mi o percentual mortalidade, causada pelo fungo e pelo inseticida sozinho, respectivamente. Os efeitos sinérgicos entre Actara (tiametoxam) e o fungo *Metarhizium anisopliae* (Ma) em adultos de *Tibraca limbativentris* em laboratório. Os resultados mostram os resultados de pares de amostras T-teste de comparações observadas e esperadas acumulados dia 15. Aas taxas de mortalidade (média ± EP), com sinergia significativa indicadas em negrito.

**Tabela 4.5** Eficácia do *M. anisopliae* (isolado ESALQ-1037), combinada com uma concentração subletal de Actara™ em adultos de *T. limbativentris* coletado com 1 e 7 dias após a aplicação, em parcelas de campo. Fazenda Palmital, município de Brasabrantés, GO, 2010.

Tratamento	TL <sub>50</sub> (dias) [95% CI]	% Mortalidade cumulativa em 12 daa (±EP)	% Insetos com micose (±EP)
<b>Um dia após aplicação<sup>2</sup></b>			
Actara subdose (50 g/ha)	ND	26.0±4.0 cd <sup>1</sup>	-
Actara dose cheia (200 g/ha)	ND	40.0±4.5 b	-
<i>M. anisopliae</i> (1×10 <sup>12</sup> conídios/ha)	ND	32.0±3.7 bc	32.0± b <sup>1</sup>
Actara subdose + <i>M. anisopliae</i>	12.0 [ND]	54.0±4.0 a	44.0± a
Controle	ND	18.0±3.7 d	-
		<i>F</i> = 12.26; <i>gl</i> = 4, 16; <i>P</i> < 0.0001	<i>F</i> = 10.29; <i>gl</i> = 1, 4; <i>P</i> = 0.0327
<b>Sete dias após aplicação<sup>2</sup></b>			
Actara subdose (50 g/ha)	ND	6.0±2.4 c	-
Actara dose cheia (200 g/ha)	ND	0 c	-
<i>M. anisopliae</i> (1×10 <sup>12</sup> conídios/ha)	ND	16.0±2.4 b	16.0±2.4 b
Actara subdose + <i>M. anisopliae</i>	8.0 [ND]	50.0±3.2 a	46.0±2.4 a
Controle	ND	0 c	-
ANOVA		<i>F</i> = 102.05; <i>gl</i> = 4, 16; <i>P</i> < 0.0001	<i>F</i> = 45.0; <i>gl</i> = 1, 4; <i>P</i> = 0.0026

<sup>1</sup> Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não são estatisticamente significativas, segundo o teste de Fisher LSD (*P* > 0,05). ND = não determinado porque a curva de mortalidade não atingiu os 50%. <sup>2</sup> Os adultos vivos foram coletados aleatoriamente em parcelas no campo para todos os tratamentos e a taxa de mortalidade foi avaliada sob condições de laboratório. DAA = dias após a aplicação.

#### 4.4.4. Estudos de campo com *M. anisopliae* e Tiametoxam

As condições meteorológicas durante o experimento (monitoradas por uma estação meteorológica localizada a 16°25'46" S e 49°23'13" W) foram em média de 54.4 a 82.4% U.R., e 19.5 a 29.4 °C. Dez dos 14 dias atingiram 80% de U.R. devido ao período chuvoso do mês de janeiro.

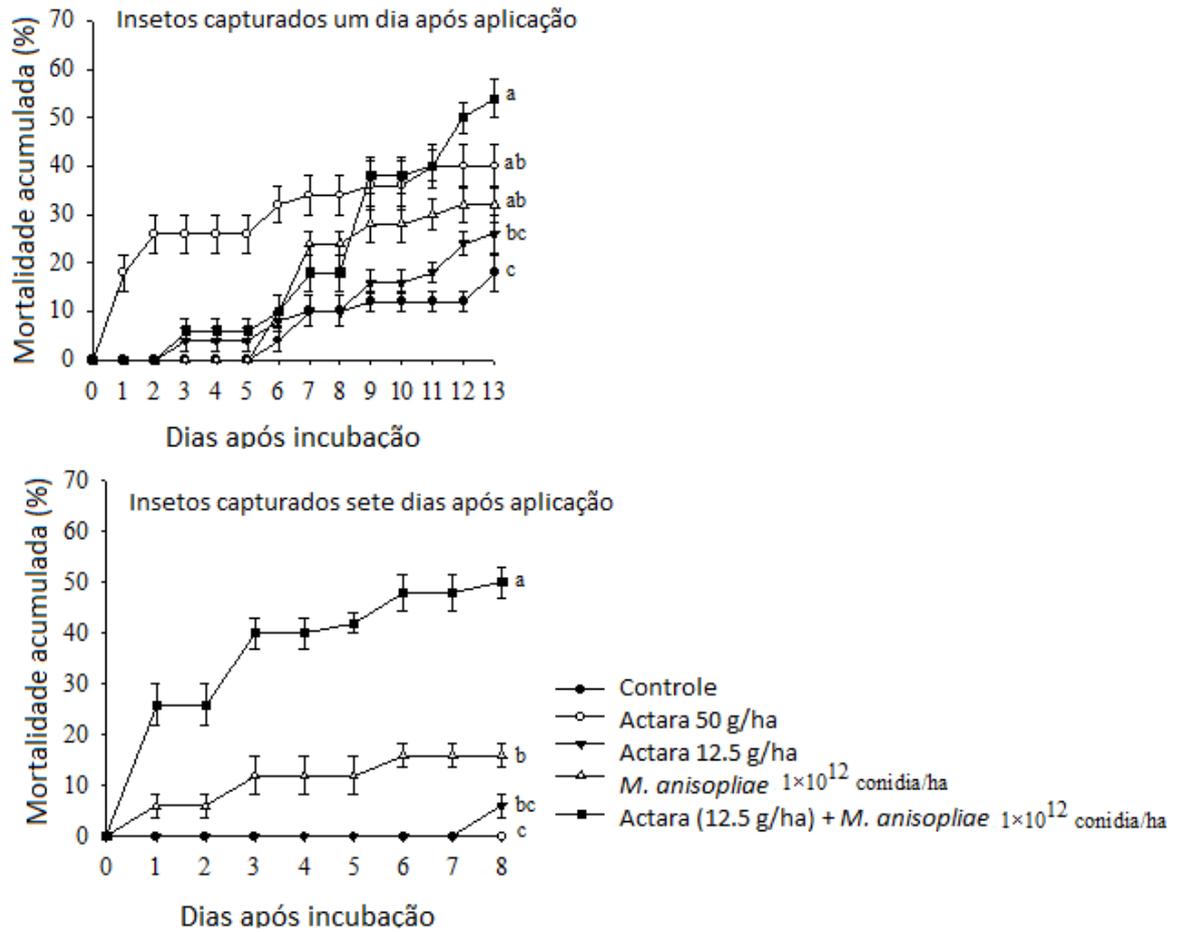
Fêmeas e machos adultos de *T. limbativentris* retrataram a mesma resposta à susceptibilidade para todos os tratamentos, já que suas curvas de mortalidade não foram significativamente diferentes para a primeira coleta (1 dia após a aplicação, daa) ( $\chi^2 = 1.33$ ,  $P = 0.249$ ) bem como para a segunda coleta (7daa) ( $\chi^2 = 0.103$ ,  $P = 0.748$ ) (dados não mostrados). Uma vez que o efeito do sexo não afetou a resposta ao tratamento, este fator não foi considerado na análise de sobrevivência.

Na primeira coleta, a curva de mortalidade de adultos, registrada em condições de laboratório, depois da aplicação de Tiametoxam (12.5 g/ha) + *M. anisopliae* ( $1 \times 10^{12}$  conídios viáveis/ha), não foi significativamente diferente para a aplicação isolada de *M. anisopliae* ou Tiametoxam na dose cheia (50 g/ha) ( $P > 0.05$ ) (Figura 4.4). Por outro lado, a mistura de Tiametoxam + *M. anisopliae* causou elevada taxa de mortalidade em relação ao Tiametoxam com dose subletal (12.5 g/ha) e ao controle ( $\chi^2 = 7.828$ ,  $P = 0.005$  e  $\chi^2 = 18.226$ ,  $P < 0.0001$ , respectivamente). Portanto, a interação fungo/inseticida foi considerada aditiva ( $T = 0.57$ ,  $P = 0.4731$ ). A dose cheia de Tiametoxam (50 g/ha) causou rápida mortalidade dos adultos (18 a 32%) do primeiro ao sexto dia, enquanto os outros tratamentos não superaram o nível de 10% de mortalidade durante este período (Figura 4.4).

Na segunda coleta, a curva de mortalidade de adultos pela aplicação de Tiametoxam + fungo foi consideravelmente maior que os outros tratamentos ( $P < 0.05$ ) mostrando um efeito sinérgico ( $T = 39.67$ ,  $P = 0.0002$ ) (Figura 4.4). A aplicação isolada de *M. anisopliae* obteve maior taxa de mortalidade que o controle ( $\chi^2 = 5.69$ ,  $P = 0.017$ ), enquanto que a dose subletal de Tiametoxam não promoveu um aumento da mortalidade quando comparado ao fungo isolado ( $\chi^2 = 2.79$ ;  $P = 0.095$ ) e ao controle ( $\chi^2 = 1.03$ ,  $P = 0.31$ ). Porém, em relação à mortalidade total aos 12 daa, a mistura de Tiametoxam + fungo resultou em maior mortalidade do que aquela causada

por outros tratamentos para ambas as avaliações de campo (1 daa:  $F_{[1,16]} = 12.26$ ,  $P < 0.0001$ ; 7 daa:  $F_{[4,16]} = 102.05$ ,  $P < 0.0001$ ) (Tabela 4.6). Além disso, o nível de micose em adultos expostos à interação foi maior do que naqueles insetos expostos somente ao fungo, para as duas avaliações (1 daa:  $F_{[1,4]} = 10.29$ ,  $P = 0.0327$ ; 7 daa:  $F_{[1,4]} = 45.0$ ,  $P = 0.0026$ ). Estes resultados indicam que a dose subletal de Tiametoxam melhorou a susceptibilidade dos adultos às micoses pelos fungos (Tabela 4.6). Doses cheias de Tiametoxam mataram somente 40% dos adultos em 1 daa e não causou a mortalidade de insetos após 7 daa (Tabela 4.6), o qual indica que este inseticida na dose recomendada exibiu um efeito subletal similar a  $\frac{1}{4}$  da dose cheia.

Quando os números de adultos mortos nas avaliações de campo e laboratório foram agrupados, a mistura com  $\frac{1}{4}$  da dose de Tiametoxam com *M. anisopliae* foi o mais eficiente tratamento fornecendo significativo aumento no número de adultos mortos/m<sup>2</sup> em comparação com outros tratamentos ( $F_{[4,20]} = 19.02$ ,  $P < 0.0001$ ) (Figura 4.5). Entretanto, a dose cheia de Tiametoxam resultou em maior número de adulto mortos/m<sup>2</sup> do que sua dose subletal e o fungo isolado.

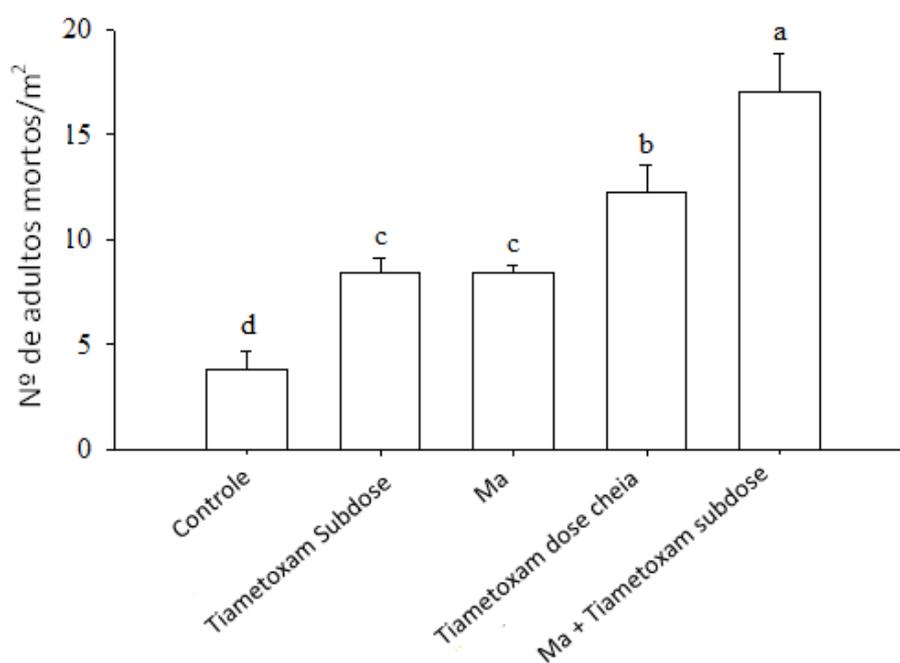


**Figura 4.4.** - Curva de mortalidade acumulada (% , ± EP) de adultos de *T. limbativentris* coletados após um e sete dias da aplicação dos tratamentos com *M. anisopliae* ESALQ-1037, duas doses de Tiametoxam e um tratamento combinando o fungo *M. anisopliae* (1×10<sup>12</sup> conidios/ha) com Tiametoxam (12.5 g/ha) . As mesmas letras indicam que as curvas de mortalidades não diferem estatisticamente Segundo o teste de Log-Rank (Mantel-Cox) ( $P \leq 0.05$ ).

**Tabela 4.6.** - Interação entre *M. anisopliae* à  $1 \times 10^{12}$  conídios viáveis/ha e subdoses de Tiametoxam (12.5 g/ha) com base na mortalidade observada em condições de laboratório a partir de insetos coletados em experimento de campo.

Dias após aplicação	Mortalidade Acumulada (%)		Teste T <sup>b</sup>	P
	Observada	Esperada <sup>a</sup>		
1 daa	54.0±4.0	49.6±4.3	0.57	0.4731
7 daa	50.0±3.2	21.0±3.3	39.67	<b>0.0002</b>

<sup>a</sup>Mortalidade esperada (Me) =  $Mf + Mi (1 - Mf/100)$ , com Mf e Mi sendo o percentual de mortalidades observadas provocadas pelo fungo e o inseticida sozinho, respectivamente. <sup>b</sup>Os resultados constam de uma análise de emparelhamento por teste T fazendo comparações entre a mortalidade observada e esperada cumulada em 13 dias (média ± EP). O sinergismo significativo está indicado a negrito. DAA = dias após a aplicação



**Figura 4.5.** - Efeito de doses subletais de Tiametoxam(12,5 g/ha) e dose cheia (50 g/ha) e *M. anisopliae* ESALQ-1037 (Ma) 1 L na forma de óleo emulsionável ( $1 \times 10^{12}$  conídios viáveis/ha) aplicado isoladamente e combinado com Tiametoxam em dose subletal. Médias (± EP) seguidas pela mesma letra não diferem significativamente segundo teste de Fisher LSD ( $P \leq 0.05$ ). As barras representam as medias computadas pela somatória do total de insetos mortos em campo mais os que foram avaliados a evolução da mortalidade em laboratório.

#### 4.5. DISCUSSÃO

Nossos estudos de laboratório confirmaram conhecimentos anteriores que demonstram a baixa susceptibilidade de adultos do *T. limbativentris* ao *M. anisopliae* CG-168 (MARTINS et al., 1997; MARTINS & LIMA, 1994; RAMPELOTTI et al., 2007). Sob condições de campo, aplicações de *M. anisopliae* CG-168 de 5.0 a  $7.2 \times 10^{13}$  conídios/ha em infestações naturais de percevejos do colmo, em fazendas produtoras de arroz, durante três anos, reduziu a população de percevejos do colmo de 48 para 62% (MARTINS et al., 2004). Entretanto, a infecção confirmada dos insetos pelos fungos foi baixa ( $\leq 20\%$  da taxa de infecção), sugerindo que este inseto possui baixa susceptibilidade a este patógeno. No nosso estudo, quando dos fungos CG-168 foram testados a partir de  $5 \times 10^6$  para  $5 \times 10^8$  conídios/mL, somente a alta concentração foi capaz de causar 50% da mortalidade dos adultos. Nós também mostramos que uma formulação de óleo emulsionável à base de *M. anisopliae* (ESALQ-1037) causou menos de 40% da mortalidade dos adultos, semelhante ao CG-168. Por esta razão, a cepa comercial ESALQ-1037 foi selecionada para ser usada nos experimentos de campo, e já está registrada como um micoinseticida no Brasil (FARIA & WRAIGHT, 2007; AGROFIT 2011).

A fim de melhorar a eficácia do fungo, doses subletais de Tiametoxam e  $\lambda$ -cialotrina foram combinadas com os fungos em uma série de bioensaios. Nós previamente mostramos que o tiametoxam e o  $\lambda$ -cialotrina eram compatíveis com a germinação dos conídios, crescimento vegetativo e esporulação do *M. anisopliae* CG168 (Capítulo 3).

Um efeito aditivo da interação tiametoxam/fungo e  $\lambda$ -cialotrina/fungo foi observado em todos os testes laboratoriais. O tempo letal médio foi reduzido com as interações e as doenças nos insetos aumentaram significativamente. No campo, quando *M. anisopliae* (ESALQ-1037) era combinada com  $\frac{1}{4}$  da dose cheia de Tiametoxam, a eficácia dos fungos durava mais e um efeito sinérgico era observado para esta interação aos 7 daa. Tiametoxam testado na sua dose recomendada (dose cheia) tinha um baixo efeito de contato no inseto após 24 horas de aplicação, promovendo quase 40% de mortalidade. Nós também observamos que esta formulação

não persistia após sua aplicação, já que não houve nenhum inseto morto registrado na avaliação laboratorial a partir dos insetos coletados das gaiolas de campo aos 7 daa (Figura 4.4). Estes resultados demonstram a dificuldade de reduzir a população de *Tibraca* mesmo com inseticidas químicos como controle, provavelmente por estarem localizados na base das plantas de arroz, entre os colmos. Apesar da baixa eficiência deste inseticida para o *Tibraca*, o ingrediente ativo Tiametoxam possui propriedades químicas, como ser um inseticida de aplicação foliar, resultando em excelente controle de muitas pragas de sucção e mastigação (JESCHKE & NAUEN, 2008) e possui um excelente perfil de segurança para mamíferos e para o ambiente (MAIENFISCH et al., 2001). Acrescentando, baseados em nossos resultados, este inseticida aparenta ser um eficiente agente estressante para aumentar a susceptibilidade do percevejo do colmo ao fungo. Portanto, o Tiametoxam é bem apropriado para ser usado em combinação com *M. anisopliae* contra o *T. limbativentris* em programas de controle integrado de pragas. Por outro lado,  $\lambda$ -cialotrina não é apropriada para ser aplicada em combinação com fungos entomopatogênicos devido à sua alta toxicidade aos organismos aquáticos e a outros organismos não alvos (HE et al., 2008; SYNGENTA, 2010).

As condições ambientais na base das plantas de arroz, onde o solo é saturado, é favorável para o *Metarhizium* (por exemplo: alta umidade e baixa radiação solar). Estes fungos são abundantes em solos e são encontrados em um grande número de ecossistemas (BEHIE et al., 2012). Nós temos observado inúmeras epizootias de *M. anisopliae* em populações de *T. limbativentris*, apesar de que epizootias de fungos geralmente não são registradas entre os Pentatomídeos. Por exemplo, levantamentos de campo encontraram baixas micoses em percevejos da soja (< 0.5%) (MOSCARDI et al., 1988). Pesquisas anteriores de campo com aplicações de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em percevejos do colmo engaiolados resultaram em baixo nível de mortalidade (< 40%) (SOSA-GÓMEZ & MOSCARDI, 1998). Como resultado, nenhum relato de epizootias naturais destes dois maiores micopatógenos foi mencionada em populações de percevejo da soja ou outra espécie relatada (SOSA-GÓMEZ et al., 1997).

Percevejos do colmo, principalmente aqueles membros dos Pentatomídeos, podem reduzir ou mesmo prevenir infecções por fungos produzindo compostos antifúngicos, o qual pode ser encontrado impregnado na sua cutícula (BORGES et al., 1993; MORAES et al., 2008). Como relatado anteriormente por Sosa-Gómez et al. (1997), ambas a topografia e a química da cutícula do inseto podem afetar a adesão dos conídios de *M. anisopliae*. Estes autores também expressam que o aldeído (*E*)-2-decenal encontrado na cutícula extraída de *N. viridula* inibiu a germinação do *M. anisopliae*, mas não bloqueou a germinação da *B. bassiana* e *Isaria fumosorosea*. Nossos resultados demonstraram que as doses subletais de tiametoxam aumentaram a susceptibilidade dos adultos do percevejo do colmo ao *M. anisopliae*, o qual é considerado o estágio mais difícil de ser controlado pelos fungos devido à capacidade desse inseto de produzir alta concentração de aldeídos com potencial fungistático ao *M. anisopliae* CG-168 (Capítulo 2).

Há inúmeros estudos mostrando efeitos sinérgicos entre fungos entomopatogênicos e inseticidas químicos sintéticos contra diferentes insetos pragas (ANDERSON et al., 1996; BOUCIAS et al., 1996; Kaakeh et al., 1997; QUINTELA E MCCOY, 1998a, 1998b, 1997; JARAMILLO et al., 2005). Alguns deles identificaram os fatores que influenciam o sinergismo. Por exemplo, baixas concentrações de imidaclopride melhorou a virulência de fungos entomopatogênicos contra o cupim *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Termitidae) (MOINO Jr & ALVES, 1998) e *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) (QUINTELA & MCCOY, 1998a, 1998b) afetando o comportamento de limpeza e impedindo a larva de remover os conídios da cutícula, respectivamente. Além disso, Pachamuthu e Kamble (2000) também demonstraram que os efeitos aditivo e sinérgico podem variar com a concentração e o tipo de inseticida químico usado em combinação com *M. anisopliae* contra a barata *Blatella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae), enquanto que Jaramillo et al. (2005) não observou diferenças significativas na susceptibilidade do *Cyrtomenus bergi* (Hem.: Cydnidae) a diferentes taxas de inóculo de *M. anisopliae* (cepa CIAT) combinadas com baixas concentrações de imidaclopride. De acordo com Paula et al. (2011), a

estratégia de combinar agentes de controle biológico e químico desempenha um papel importante no controle de certas pragas, porque diminui o tempo para matar o alvo, é economicamente viável, e minimiza os impactos ambientais por usar baixas doses de inseticidas químicos, o qual reflete em uma menor abordagem custo-benefício e pode ser mais aceitável por produtores.

O impacto da combinação de fungos e inseticidas químicos em subsequentes micoses é um importante fator que irá influenciar a produção de inóculos e potenciais epizootias secundárias. Em geral, nossos resultados indicam que o número de insetos com micoses é maior quando baixas doses de tiametoxam foram combinadas com *M. anisopliae*, em contraste aos insetos expostos somente ao fungo. Reciprocamente, Russel et al. (2010) verificou que baixas doses de imidaclopride reduziu as micoses juntamente com a produção de conídios por cadáver para *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae), embora eles observaram um efeito sinérgico para os tratamentos combinados de *Metarhizium brunneum* Petch e imidaclopride (a 10 ou 100 ppm).

Nós especulamos que a interação sinérgica entre *M. anisopliae* e Tiametoxam no *T. limbativentris* pode ser causada pela redução da reação imune e pela quantidade do feromônio de alarme produzido pelo inseto. Porém, estudos adicionais estão a caminho em nosso laboratório que irão nos ajudar a identificar como as concentrações subletais de tiametoxam influenciam a susceptibilidade do percevejo do colmo do arroz ao *M. anisopliae* através do seu efeito no sistema imunológico do inseto.

Em síntese, nossos resultados destacam o potencial do uso de concentrações subletais do inseticida neocotinóide Tiametoxam para aumentar a susceptibilidade dos adultos do *T. limbativentris* ao fungo *M. anisopliae*. De fato, esta estratégia consiste em uma abordagem prática efetiva e viável que pode ser implantada para combater o percevejo do colmo do arroz no campo a partir de um ponto de vista integrado e sustentável de manejo de pragas.

#### 4.6. REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Web Page: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>. (Accessed 05-23-12).
- ANDERSON, T.E., HAJEK, A.E., ROBERTS, D.W., PREISLER, H.K., ROBERTSON, J.L., 1989. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. J. Econ. Entomol. 82, 83–89.
- Behie, S.W., Zelisko, P.M., Bidochka, M.J., 2012. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. Science 336(6088), 1576–1577.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia 101, 508–528.
- Borges, M., Leal, S.C., Tigano, M.S., Valadares, M.C.C., 1993. Efeito do feromônio de alarme do percevejo verde, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae), sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. An. Soc. Entomol. Brasil 22, 505–512.
- BOTTON, M., MARTINS, J.F.S., LOECK, A.E., ROSENTHAL, M.DA., 1996. Biologia de *Tibraca limbativentris* Stal sobre plantas de arroz. An. Soc. Entomol. Brasil 25(1), 21–26.
- BOUCIAS, D.G., STOKES, C., STOREY, G., PENDLAND, J.C., 1996. The effect of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. Pflanzenschutz-Nachr. Bayer 49, 103–144.
- COSTA, E.C., LINK, D., 1992. Avaliação de danos de *Tibraca limbativentris* Stal., 1860 (Hemiptera: Pentatomidae) em arroz irrigado. An. Soc. Entomol. Brasil 2(1), 187–195.
- FARENHORST, M., KNOLS, B.G.J., THOMAS, M.B., HOWARD, A.F.V., TAKKEN, W., 2010. Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against west african insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. PLoS ONE 5(8), e12081. doi:10.1371/journal.pone.0012081.
- FARIA, M.R., WRAIGHT, S.P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol. Control 43, 237–256.
- FERREIRA, E., ZIMERMANN, A., SANTOS, B., NEVES, B.P., 1997. O percevejo-do-colmo na cultura do arroz. EMBRAPA-CNPAP, Goiânia, Goiás, Brasil, Documento #75.
- HE, L.M., TROIANO, J., WANG, A., GOH, K., 2008. Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 195: 71-91, doi: 10.1007/978-0-387-77030-7\_3

HIROMORI, H., NISHIGAKI, J., 2001. Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Appl. Entomol. Zool.* 36(2): 231-236.

JARAMILLO, J., BORGGEMEISTER, C., EBSSA, L., GAILGLA., TOBÓN, R., ZIMMERNAMM, G., 2005. Effect of combined application of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain CIAT 224 and different dosages of imidacloprid on the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *Biol. Control* 34,12–20.

JESCHKE, P., NAUEN, R., 2008. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag. Sci.* 64, 1084–1098.

KAAKEH, W., REID, B.L., BOHNERT, T.J., BENNET, W., 1997. Toxicity of imidacloprid in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae), and the synergism between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect fungi: Hyphomycetes). *J. Econ. Entomol.* 90, 473–482.

LINK, D., NAIBO, J. G., PELENTIR, J. P., 1996. Hibernation sites of the rice stalk stink bug *Tibraca limbativentris* in central region of Rio Grande do Sul. *International Rice Research Notes, Manila/Filipinas*, 21, 78–78.

MAIENFISCH, P., ANGST, M., BRANDL, F., FISCHER, W., HOFER, D., KAYSER, H., KOBEL, W., RINDLISBACHER, A., SENN, R., STEINEMANN, A., WIDMER, H. 2001. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest. Manag. Sci.* 57(10), 906–913.

MARTINS, J.F.S., BOTTON, M., CARBONARI, J.J., QUINTELA, E.D., 2004. Efficiency of *Metarhizium anisopliae* on rice stem bug *Tibraca limbativentris* (Heteroptera: Pentatomidae) control in flooded rice field. *Cienc. Rural* 34(6), 1681–1688.

MARTINS, J.F.S., LIMA, M.G., BOTTON, M., CARBONARI, J.J.; QUINTELA, E.D., 1997. Efeito de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o percevejo do colmo do arroz, *Tibraca limbativentris* Stal. *An. Soc. Entomol. Brasil* 26(2), 277–283.

MARTINS, J.F.S., LIMA, M.G.A., 1994. Fungos entomopatogênicos no controle do percevejo-do-colmo do arroz: virulência de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. *An. Soc. Entomol. Brasil* 23(1), 39–44.

MOINO, JR. A., ALVES, S.B., 1998. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *An. Soc. Entomol. Brasil* 27(4), 611–619.

MORAES, M.C.B., PAREJA, M., LAUMANN, R.A., BORGES, M., 2008. The chemical volatiles (semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop. Entomol.* 37(5), 489–505.

MOSCARDI, F., CORREA-FERREIRA, B. S., DINIZ, M. C., BONO, I. L. S., 1988. Incidência estacional de fungos entomógenos sobre populações de percevejos-pragas da soja, in: EMBRAPA, Resultados de Pesquisa de Soja 1986-1987. Centro nacional de Pesquisa de Soja, Londrina.

PACHAMUTHU, P., KAMBLE, S.T., 2000. In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 93(1), 60–70.

PANTOJA, A., 1997. Artrópodos relacionados al arroz en America Latina, in: Pantoja, A., Fischer, A., Correa, F., Sanint, L. R., Ramirez, A. (Eds.), MIP em Arroz. CIAT Publication 292. CAT, Cali, Colombia. pp. 59–98.

PAULA, A.R., CAROLINO, A.T., PAULA, C.O., SAMUELS, R.I., 2011. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors.* 4, 1–8.

QUINTELA, E.D., MCCOY, C.W., 1998a. Synergistic effect of two entomopathogenic fungi and imidacloprid on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. *J. Econ. Entomol.* 91(1), 110–122.

QUINTELA, E.D., MCCOY, C.W., 1998b. Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 220–230.

QUINTELA, E.D., MCCOY, C.W., 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instar of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environ. Entomol.* 26(5), 1173–1182.

RAMPELOTTI, F.T., FERREIRA, A., PRANDO, H.F., GRÜTZMACHER, A.D., MARTINS, J.F.S., TCACENCO, F.A., MATTOS, M.L.T., 2007. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre as fases do desenvolvimento de *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) em Condições de Laboratório. *Arq. Inst. Biol.* 74, 141–148.

ROBERTSON, J.L., PREISLER, H.K., 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC, Boca Raton, FL.

RUSSEL, C.W., UGINE, T.A., HAJEK, A.E., 2010. Interactions between imidacloprid and *Metarhizium brunneum* on adult Asian longhorned beetles (*Anoplophora glabripennis* (Motschulsky)) (Coleoptera: Cerambycidae). J. Invertebr. Pathol. 105(3): 305–311.

SOSA-GÓMEZ, D. R., GAZZONI, D. L., CORRÊA-FERREIRA, B. S., MOSCARDI, F., 1993. Pragas da soja e seu controle, in: Arantes, N. E., Souza, P. I. M. (Eds.), Cultura da Soja nos Cerrados. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, São Paulo, pp. 299–331.

SOSA-GÓMEZ, D.R., BOUCIAS, D.G., NATION, J.L., 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. J. Invertebr. Pathol. 69(1), 31–39.

SOSA-GÓMEZ, D.R., MOSCARDI, F., 1998. Laboratory and field studies on the infection of stink bugs, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii*, and *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Brazil. J. Invertebr. Pathol. 71, 115–120.

SPSS for Windows, Rel. 17.0. 2008. Chicago: SPSS Inc.

Statistical Analysis Systems (SAS) (2008) SAS/STAT<sup>®</sup>, release 9.2 User's Guide. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.

SYNGENTA CROP PROTECTION, 2010. Accessed in 2011: [http://pestgenie.co.nz/msds/syngentanz/KARATE%20WITH%20ZEON\\_24106282.pdf](http://pestgenie.co.nz/msds/syngentanz/KARATE%20WITH%20ZEON_24106282.pdf)