

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CAMPUS DE DOURADOS

Controle microbiano do percevejo-castanho-das-raízes *Scaptocoris carvalhoi*, Becker 1966
(Hemiptera: Cydnidae) com os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria*
bassiana (Bals.) Vuill.

Luciane Modenez Saldivar Xavier

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CAMPUS DE DOURADOS

Controle microbiano do percevejo-castanho-das-raízes *Scaptocoris carvalhoi*, Becker 1966 (Hemiptera: Cydnidae) com os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

Luciane Modenez Saldivar Xavier

BIÓLOGA

ORIENTADOR: Dr. Crébio José Ávila

CO-ORIENTADOR: Dr. Wedson Desidério Fernandes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, *Campus* de Dourados, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zoologia.

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2004

Xavier, Luciane Modenez Saldivar

Controle microbiano do percevejo-castanho-das-raízes *Scaptocoris carvalhoi*, Becker 1966 (Hemiptera: Cydnidae) com os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill / Luciane Modenez Saldivar Xavier. Dourados,MS : UFMS, Campus de Dourados, 2004.

60 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Dourados, 2004

Orientador: Crébio José Ávila.

1. Controle Microbiano. 2. Controle Biológico. 3. Fungo entomopatogênico. 4. Biocontrole. 5. Mortalidade. I. Título

CDD 632.96

Ficha catalográfica elaborada pelo setor de Biblioteca NCA/UFMS

Ofereço
A DEUS,

Dedico
Ao meu esposo Roberto,
a minha filha Tamires
e aos meus pais Jerônimo e Ana Lúcia.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ser autor de nossas vidas e por ser meu companheiro.

Ao Dr. Crébio José Ávila, pela amizade, orientação, disponibilidade, interesse, e compreensão.

A todos os funcionários da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária *Embrapa Agropecuária Oeste*, pelo apoio e incentivo através da disponibilidade de toda a estrutura necessária à realização desse trabalho.

À CAPES, pela concessão de bolsa para o autor.

Ao FUNDECT, pelo financiamento do projeto.

Ao Prof. Dr. Honório Roberto dos Santos, pela disponibilidade na busca de recursos financeiros junto ao FUNDECT.

À *Embrapa-Soja* (Londrina, PR) pela contribuição com isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nessa pesquisa e especialmente ao Dr. Daniel R. Sosa Gómez e ao técnico do laboratório de Entomologia José Jairo da Silva, pelo treinamento laboratorial para execução do projeto.

À Jocélia Grazia da UFRGS/Porto Alegre, RS, pela identificação dos insetos estudados.

Aos meus pais Jerônimo Saldivar Velasque e Ana Lúcia Modenez Velasque, pela compreensão e amparo familiar.

Ao Pesquisador Dr. Fernando de Assis Paiva, pela confecção do abstract.

Ao Técnico do Laboratório de Entomologia da *Embrapa Agropecuária Oeste*, Narcizo Câmara, pela coleta dos *espécimens* para realização dessa pesquisa e pelo apoio técnico-laboratorial.

Às estagiárias Darque Ratier Bitencourt e Evanir da Silva Martins Carvalho, pelo apoio e colaboração na execução dessa pesquisa.

Ao Pesquisador Dr. Augusto César Pereira Goulart pela disponibilidade do Laboratório de Fitopatologia da *Embrapa Agropecuária Oeste*, e ao técnico Sadoc Aleixo e Sales, pela colaboração na execução desse projeto.

Às amigas Angela Canesin e Vilma da Silva Lins, pelo amparo em todos os momentos.

Ao meu esposo Roberto Xavier da Silva, pelo incentivo, apoio e paciência nessa etapa da minha vida.

BIOGRAFIA

Luciane Modenez Saldivar Xavier, filha de Jerônimo Saldivar Velasque e Ana Lúcia Modenez Velasque, nasceu em Dourados – MS, aos 29 de Maio de 1972.

Em 1996, colou grau, como licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Em 2002, ingressou-se no Curso de Pós-graduação em Zoologia, *Stricto sensu*, Área de Concentração – Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	01
LISTA DE TABELAS	02
RESUMO	03
ABSTRACT	05
1. INTRODUÇÃO	07
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	09
2.1. Posição Sistemática.....	09
2.2. Distribuição Geográfica.....	09
2.3. Importância como Praga e Plantas Hospedeiras.....	10
2.4. Aspectos Bioecológicos.....	11
2.5. Estratégias de Controle.....	12
2.5.1. Controle Químico.....	12
2.5.2. Controle Cultural.....	13
2.5.3. Controle Físico.....	13
2.5.4. Controle Biológico.....	13
2.5.4.1. Controle Microbiano.....	14
2.5.4.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorok. e <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. (Deuteromycete: Moniliaceae) como agentes de controle de insetos.....	15
3. CAPÍTULO 1	
Seleção de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorok. e de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. para o controle de <i>Scaptocoris carvalhoi</i> Becker, 1966 (Hemiptera: Cydnidae)	
3.1. Abstract.....	17
3.2. Resumo.....	18
3.3. Introdução.....	19
3.4. Material e Métodos.....	22

3.5. Resultados e Discussão.....	26
4. CAPÍTULO 2	
Patogenicidade de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorok. ao percevejo castanho das raízes <i>Scaptocoris carvalhoi</i> Becker, 1966 (Hemiptera: Cydnidae) em laboratório e casa de vegetação	
4.1. Abstract.....	33
4.2. Resumo.....	35
4.3. Introdução.....	36
4.4. Material e Métodos.....	38
4.5. Resultados e Discussão.....	43
5. CONCLUSÕES.....	53
6. LITERATURA CITADA.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figuras.....Páginas

Capítulo 1

1. Tubo de ensaio contendo suspensão de *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/ml.....23
2. Aplicação de suspensão fúngica em adultos de *Scaptocoris carvalhoi*.....23
3. Placa de Petri e papel filtro esterilizados contendo recipiente com algodão umedecido (A) e *Scaptocoris carvalhoi* em placa de Petri para confirmação de causa *mortis* (B).....24
4. Desenvolvimento micelial de *Metarhizium anisopliae* em *Scaptocoris carvalhoi* (A) e conidiogênese (B).....26
5. *Scaptocoris carvalhoi* infectados pelo fungo *Beauveria bassiana*.....26

Capítulo 2

1. Tubos de ensaios contendo suspensões de conídios de *Metarhizium anisopliae*.....39
2. Aplicação de suspensão fúngica em adultos de *Scaptocoris carvalhoi*.....40
3. Placa de Petri e papel filtro esterilizados contendo recipiente com algodão umedecido e *Scaptocoris carvalhoi* para confirmação de causa *mortis*.....40
4. Vasos contendo *Scaptocoris carvalhoi* (ninfas e adultos) e o fungo *Metarhizium anisopliae* (Ma69). (Experimento em casa de vegetação).....41
5. Experimento instalado em casa de vegetação.....42
6. Micélios e conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em *Scaptocoris carvalhoi*.....43

LISTA DE TABELAS

Tabelas.....	Páginas
Capítulo 1	
1. Isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> e de <i>Beauveria bassiana</i> utilizados nos bioensaios com <i>Scaptocoris carvalhoi</i> em Dourados, MS/2003.....	29
2. Mortalidade de <i>Scaptocoris carvalhoi</i> sobre o efeito de diferentes isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> na concentração 10^8 conídios/ml e tempo letal (TL ₅₀) (n= 75). Dourados, MS/2003.....	30
3. Mortalidade de <i>Scaptocoris carvalhoi</i> sobre o efeito de diferentes isolados de <i>Beauveria bassiana</i> na concentração 10^8 conídios/ml. Dourados, MS.....	31
4. Mortalidade de ninfas e adultos de <i>Scaptocoris carvalhoi</i> sobre o efeito de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma69) em laboratório.....	32
Capítulo 2	
1. Isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizados nos bioensaios com <i>Scaptocoris carvalhoi</i> , em Dourados, MS/2003.....	48
2. Mortalidade de <i>Scaptocoris carvalhoi</i> sobre o efeito de diferentes doses de <i>Metarhizium anisopliae</i> e DL ₅₀ (n= 60) em Dourados, MS/2003.....	49
3. Mortalidade de <i>Scaptocoris carvalhoi</i> sobre o efeito de <i>Metarhizium anisopliae</i> . na dose de 500.000 conídios/inseto e tempo letal TL ₅₀ (n= 60) em Dourados, MS/2003.....	50
4. Mortalidade de <i>Scaptocoris carvalhoi</i> sobre o efeito de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma69) em casa de vegetação em Dourados, MS/2003.....	51
5. Mortalidade de ninfas e adultos de <i>Scaptocoris carvalhoi</i> sobre o efeito de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma69) em casa de vegetação em Dourados, MS/2003.....	52

Controle microbiano do percevejo-castanho-das-raízes *Scaptocoris carvalhoi*, Becker 1966 (Hemiptera: Cydnidae) com os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

RESUMO – A seleção de isolados de fungos entomopatogênicos é de fundamental importância para a implementação do controle microbiano de pragas em agroecossistemas. A pesquisa teve como objetivo avaliar a eficiência de isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* como agentes de mortalidade do percevejo-castanho *Scaptocoris carvalhoi* (Becker 1966). Os experimentos foram conduzidos na *Embrapa Agropecuária Oeste*, em Dourados, MS, onde foram realizados ensaios em laboratório e em casa de vegetação. Dez isolados de *M. anisopliae* e onze de *B. bassiana*, foram aplicados topicamente no percevejo inoculando-se 5µl da suspensão de 10^8 conídios/ml em cada inseto. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com onze tratamentos para o ensaio com *M. anisopliae*, doze tratamentos com *B. bassiana*, tendo ambos cinco repetições. Cada parcela foi constituída por quinze insetos (10 adultos e 5 ninfas grandes), mantidos em caixa plástica gerbox, acondicionadas em B.O.D. regulada para $26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR 85%, sem fotofase. Em outro experimento, a patogenicidade de *M. anisopliae* (Ma69) foi avaliada para ninfas e adultos separadamente. Através da análise de variância, foi constatado efeito significativo de tratamento ($p < 0,001$) com relação à mortalidade causada aos percevejos pelos isolados testados. Os níveis de mortalidade do percevejo foram maiores com *M. anisopliae* que variou de 73,3% a 94,7% contra 10,7% a 78,7% para *B. bassiana*. Dentre os 21 isolados testados, sete de *M. anisopliae* causaram mortalidade superior a 80%, enquanto que os isolados de *B. bassiana* apresentaram, de um modo geral, baixa eficiência no controle de *S. carvalhoi*. Quando ninfas e adultos foram avaliados separadamente não houve diferença significativa com relação à mortalidade. Os altos níveis de mortalidade observados com os isolados de *M. anisopliae* indicam a possibilidade do desenvolvimento desse fungo visando o controle de *S. carvalhoi* em condições de campo. Numa outra etapa também desenvolvida em laboratório foi avaliada a virulência de isolados selecionados do fungo *M. anisopliae* (Ma7, Ma69, Ma283 e Ma342) em *S. carvalhoi* e determinadas a Dose Letal (DL_{50}) e o Tempo Letal (TL_{50}) desses isolados. Em casa de vegetação avaliou-se também a patogenicidade de um isolado de *M. anisopliae* (Ma69) em ninfas e adultos de *S. carvalhoi*. A Dose Letal (DL_{50}) foi determinada preparando concentrações de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml e inoculadas topicamente sobre *S. carvalhoi* correspondendo, respectivamente, a dose de 50, 500, 5.000, 50.000 e 500.000 conídios/percevejo. O Tempo Letal (TL_{50}) foi calculado utilizando-se a dose de 500.000 conídios/inseto. Após inoculação, os insetos (10 adultos e cinco ninfas) foram

acondicionados em caixas plásticas do tipo gerbox (parcela) e mantidas em câmaras climatizadas regulada para $26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR 85%, sem fotofase. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Na dose de 500.000 conídios/inseto foram observadas mortalidades variando de 56,7 a 96,7%, sendo os menores valores da Dose Letal (DL_{50}) observados com os isolados Ma69 e Ma7 e o maior com Ma283. Os valores de TL_{50} variaram de 0,32 a 5,84 dias, sendo o menor valor constatado para o isolado Ma7 e o maior para Ma283, embora não diferissem estatisticamente, entre si. Em casa de vegetação avaliou-se a patogenicidade do isolados Ma69 aplicando-se o fungo diretamente ao solo, em vasos. Utilizou-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado contendo dois tratamentos (com fungo e sem fungo) em doze repetições, sendo a parcela constituída por quinze insetos (10 adultos e 5 ninfas). Em outro bioensaio, conduzido também em casa de vegetação, avaliou-se a patogenicidade do fungo em adultos e ninfas de *S. carvalhoi*, separadamente. Para cada fase do inseto (adulto/ninfa) tratada com fungo, houve uma testemunha (sem tratamento), totalizando 4 tratamentos. Nesse ensaio utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo a parcela constituída de 15 insetos/vaso. Nos vasos contendo o fungo Ma69, a percentagem de mortalidade de adultos + ninfas de *S. carvalhoi* foi de 57,3%, sendo estatisticamente superior à mortalidade verificada nos vasos não tratados. Quando ninfas e adultos foram submetidos à presença do fungo, separadamente, o índice de mortalidade foi significativamente maior para ninfas (80,8%) do que para adultos (32,2%). Através dos resultados obtidos podem inferir que o isolado Ma69 é altamente patogênico para *S. carvalhoi* tanto em laboratório quanto em casa de vegetação, constituindo em uma alternativa promissora para sua utilização, como inseticida microbiano, visando o controle dessa praga em condições de campo.

PALAVRAS CHAVE: Insecta, DL_{50} , fungo entomopatogênico, biocontrole.

Microbial control of the brown root stinkbug *Scaptocoris carvalhoi*, Becker 1966 (Hemiptera: Cydnidae) with the fungi *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

ABSTRACT – The selection of entomopathogenic fungi isolates is of fundamental meaning for the implementation of microbial pests control in agricultural ecosystems. The research had the objective to evaluate the efficiency of isolates of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* as mortality agents for the brown stinkbug *Scaptocoris carvalhoi* (Becker 1966). The experiments were carried out at Embrapa Western Agriculture in Dourados, MS, Brazil, under laboratory and greenhouse conditions. Ten isolates of *M. anisopliae* and eleven isolates of *B. bassiana* were applied topically on the stinkbug, at the dosage of 5 µl of a 10⁸ conidia/ml to each specimen. The experimental design was completely randomized with eleven treatments for the assay with *M. anisopliae*, twelve treatments with *B. bassiana*, both replicated five times. Each plot was constituted by 15 specimens (10 adults and 5 nymphs), kept in plastic boxes (gerbox type), in growth chamber at 26±1°C and 85% relative humidity, under complete darkness. In other experiment, the pathogenicity of the Ma69 isolate of *M. anisopliae* was evaluated for nymphs and adults separately. The variance analysis showed that there was a significant effect on the mortality caused by the isolates ($p < 0.001$). The percentages of stinkbug mortality were higher with *M. anisopliae*, ranging from 73.3% to 94.7% than with *B. bassiana*, which ranged from 10.7% to 78.7%. From the 21 evaluated isolates, seven *M. anisopliae* isolates yielded mortalities higher than 80%, whereas the *B. bassiana* isolates yielded, in general, low efficiency on controlling *S. carvalhoi*. When nymphs and adults were evaluated separately, there was no significant difference in the mortality levels. The high levels of mortality observed with *M. anisopliae* isolates indicate the possibility of developing this fungus for controlling *S. carvalhoi* under field conditions. In other assay, the virulence of *M. anisopliae* isolates (Ma7, Ma69, Ma283, and Ma342) on *S. carvalhoi* was evaluated, and the Lethal Dose (LD₅₀) and the Lethal Time (LT₅₀) for these isolates were determined. In greenhouse conditions, the virulence of the *M. anisopliae* Ma69 isolate was evaluated on nymphs and adults of *S. carvalhoi*. The Lethal Dose (LD₅₀) was determined by making suspensions at 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ and 10⁸ conidia/ml. After inoculation, the insects (10 adults and five nymphs) were placed in plastic boxes (plot) and kept in growth chambers at 26±1°C and 85% relative humidity, under complete darkness. The experimental design was completely randomized, and replicated for times. At the 10⁸ conidia/ml, the mortality ranged from 56.7% to 83.3%. The least LD₅₀ were observed with the Ma7 and the Ma69 and the highest with the Ma283 isolate. The

LT₅₀ ranged from 0.32 to 5.84 days, with the lowest value was observed with the Ma7 isolate and the highest with the Ma283 isolate, but without significant differences among them. Under greenhouse conditions, the efficiency of the Ma69 isolate was evaluated, by applying the fungus to the soil in pots. The experimental design was complete randomized, with two treatments (with and without the fungus), replicated 12 times, with the plot constituted by 15 insect specimens (10 adults and five nymphs). For each insect stage (adult/nymph) treated with the fungus, there was a control (with no treatment), making then the total of four treatments. The experimental design was completely randomized, replicated five times, with the plots constituted by 15 insect specimens/pot. In the pot with the Ma69 isolate, the mortality percentage of *S. carvalhoi* adults + nymphs was 49.8%, which was significantly higher than the observed with the untreated controls. When nymphs and adults were placed separately in the presence of the fungus, the mortality index was significantly higher for nymphs (71.4%) than for adults (31.2%). By the observed results, one can conclude that the Ma69 is highly pathogenic to *S. carvalhoi*, both in the lab and under greenhouse conditions, being a promising option for use as a microbial insecticide for the control of this pest under field conditions.

KEY WORDS: Insecta, LD₅₀, entomopathogenic fungus, biocontrol.

1. INTRODUÇÃO

O desmatamento realizado para implantação de monoculturas, o uso deliberado de inseticidas químicos no solo, bem como o desenvolvimento de resistência da praga a inseticidas são fatores que têm contribuído fortemente para o desequilíbrio ecológico nos agroecossistemas. Com isso as espécies adquirem “status” de praga devido a destruição de inimigos e do habitat natural, sendo constatado uma maior competição por recursos alocados na sobrevivência, manutenção e perpetuação da espécie. Isso provavelmente ocorre com os percevejos-castanhos-das-raízes *Scaptocoris castanea* (Perty 1830) e *S. carvalhoi* (Becker 1966), espécies essas constatadas no Brasil desde a década de 40 (Andrade & Puzzi 1953), mas que começaram a ter maior distribuição e abundância a partir da década de 80, sendo atualmente observadas causando prejuízos em extensas áreas de pastagem e lavouras de soja, algodão e milho.

Os percevejos castanhos pertencem a família Cydnidae e a subfamília Scaptocorinae (Becker 1967), a qual contem as principais espécies de importância econômica que ocorrem no Brasil. *S. castanea* e *S. carvalhoi*, têm causado danos econômicos, pois possuem hábito subterrâneo e são polípagos. Tanto os adultos quanto ninfas sugam a seiva das raízes das plantas, causando seu amarelecimento, subdesenvolvimento e até mesmo sua morte, sendo observado com maior frequências em lavouras instaladas no sistema de plantio direto, especialmente na região do Cerrado.

Várias tentativas de redução populacional do percevejo-castanho em lavouras e pastagens têm sido investigadas nos últimos anos, sendo que o controle químico é a prática predominantemente investigada. Os efeitos deletérios dos pesticidas químicos sobre organismos não alvos, os problemas de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, bem como os riscos de contaminação de pessoas e de alimentos, têm incentivado para a implantação de uma legislação cada vez mais restrita ao uso desses produtos, incentivando o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de pragas nos agroecossistemas.

A inclusão do controle biológico como estratégia de manejo dos insetos-praga garante a seletividade para a fauna benéfica e não deixa resíduos no produto colhido, além de proporcionar vantagens econômicas e ambientais. Nesse sentido, o uso de fungos dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* para o controle de pragas se destaca por sua eficácia e características favoráveis do ponto

de vista econômico, social e ambiental. Todavia, é importante desenvolver estudos básicos com esses entomopatógenos a fim de que se possa fornecer subsídios visando a implementação do manejo do percevejo castanho, com o objetivo de manter as populações dessa praga em níveis não prejudiciais tanto em lavouras como nas pastagens.

A pesquisa proposta objetivou avaliar a eficiência de isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. como agentes de mortalidade do percevejo-castanho *S. carvalhoi* através de bioensaios realizados em laboratório e casa de vegetação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Posição Sistemática

Os percevejos-castanhos-das-raízes *Scaptocoris castanea* (Perty 1830) e *Scaptocoris carvalhoi* (Becker 1966) (sinomímia *Atarsocoris brachiariae* Becker 1996) pertencem à ordem Hemiptera, infra-ordem: Pentatomorpha, superfamília: Pentatomoidea, família Cydnidae e subfamília Scaptocorinae (Becker 1967, Borges *et al.* 1999 e Sales Jr. & Medeiros 2001).

A família Cydnidae é constituída por percevejos que possuem hábito subterrâneo, sendo representada por mais de 500 espécies, em que as dimensões do corpo não ultrapassam 2,0 cm de comprimento (Nakano & Telles 1997) e apresentam como característica geral as pernas dianteiras fossoriais. A subfamília Scaptocorinae foi estabelecida por Froeschner (1960) para incluir os gêneros *Scaptocoris* Perty, 1833, com espécies neotropicais e o gênero *Stibaropus* Dallas, 1851, da região Oriental. De acordo com Froeschner (1960) *Apud* Becker (1967), os Scaptocorinae apresentariam um passado evolutivo definitivo, o qual os distinguiria dos outros conhecidos dentro dos Cydnidae, sendo caracterizado pela estrutura peculiar das tíbias e pela forma globosa, fortemente convexa do corpo. O gênero *Scaptocoris* foi estabelecido por Perty (1833) a fim de incluir a espécie *castanea*, procedente do Estado do Piauí, no Brasil (Becker 1967).

2.2. Distribuição geográfica

A Subfamília Scaptocorinae ocorre nas regiões Oriental e Neotropical. *Scaptocoris castanea* também ocorre nos Estados Unidos (Froeschner & Steiner Jr 1983). Na região neotropical é representada pelos gêneros *Scaptocoris* Perty, 1833, e *Atarsocoris*, gen. n. (Becker 1967).

Segundo Nakano & Telles (1997), o percevejo castanho foi constatado inicialmente na Argentina em 1934 e posteriormente, a partir da década de 40 foi registrada em várias regiões do Brasil (Andrade & Puzzi 1953). Até o início da década de 90, a ocorrência dessa praga era esporádica, em várias regiões e culturas, sendo observado alguns surtos nas décadas de 40, 60 e 80.

Todavia a partir da década de 80 a ocorrência desses insetos no Brasil passou a ser intensa (Oliveira 1999).

2.3. Importância como Pragas e Plantas Hospedeiras

Dentre os percevejos Scaptocorinae, duas espécies *Scaptocoris castanea* e *S. carvalhoi* vem causando grandes danos em plantas cultivadas (Oliveira 1999). Ambas as espécies possuem hábito subterrâneo e representam grande interesse biológico e agrônômico pois são potencialmente aptos a causarem danos em diversas culturas, pois não apresentam especificidade de hospedeiro (Becker 1967), sendo considerado insetos polípagos (Camargo & Amábile 2000). Essas duas espécies são caracterizadas como semelhantes (Oliveira *et al.* 2000b).

A ocorrência de danos econômicos em lavouras e pastagens, tem sido freqüente nas regiões de Cerrado e em solos arenosos, embora foram observadas também em solos argilosos (Oliveira *et al.* 2000a). O solo arenoso facilita sua locomoção, sendo seus danos registrados tanto em sistema de semeadura direta, quanto de manejo convencional (Silva 1999). No sistema de “plantio direto” o inseto encontra microclima mais adequado (ex. umidade) e alimento para se reproduzir no período de entressafra (Nakano 2001). É possível que essa praga venha a se tornar mais problemática devido à extensão de áreas com esse tipo de plantio, pois não ocorre aração e o revolvimento do solo, práticas essas que afetam a sobrevivência das pragas que vivem no solo.

O ataque do percevejo castanho ocorre em reboleiras ou distribuídos irregularmente na área infestada, na qual ninfas de diferentes estádios e adultos atacam as raízes (Embrapa-Soja 2003) e apresentam preferência para se alimentarem em raízes novas devido ao alto conteúdo de água, nutrientes e facilidade mecânica para sugar (Sales Jr. & Medeiros 2001). Uma vez que possuem peças bucais estiliformes (Silva 1999). Segundo Oliveira *et al.* (2000b), em lavouras de soja, o diâmetro médio de cada foco de infestação pode variar de poucos metros até vários hectares.

A partir da década de 80 os problemas com percevejos castanhos em culturas anuais começaram a ser mais freqüente, e nos últimos anos, tem-se constatado grandes prejuízos especialmente em lavouras de soja e algodão, pertencentes aos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, São Paulo e Minas Gerais (Oliveira 1999). Os percevejos castanhos já foram registrados em alfafa, amendoim, arroz, banana, batata, beldroega, cana-de-açúcar, café, coqueiro, eucalipto, ervilha, feijoeiro, fumo, girassol, mandiocal, milho, pimenteira, sorgo, tomateiro, pastagens, colônia e diversas plantas daninhas (Araújo e Silva *et al.* 1968, Raga & Siloto 1999, Amaral & Villar 1999 e Nakano 2004).

Os ataques nem sempre ocorrem na mesma área, todos os anos, sendo os fatores que causam essa situação ainda indeterminados. Na cultura de soja o prejuízo pode ser total, pois as colhedoras não conseguem colher as plantas de pequeno porte (Rosa *et al.* 2002).

Nas áreas infestadas, os sintomas incluem murchamento e amarelecimento das folhas logo após o ataque, com posterior seca e morte da planta. Em ataque registrado em um bananal, região litorânea de São Paulo, as plantas apresentavam deficiência nutricional e hídrica (Brisolla *et al.* 1985). Dentro das reboleiras, foi observada redução da população das plantas e redução do crescimento das plantas quando o ataque foi mais tardio. Os percevejos castanhos causam danos não somente pela retirada de seiva das raízes, mas também pela injeção de saliva tóxica causando enfraquecimento e morte das plantas (Fernandes *et al.* 1999, Rizzo 1979). Além disso, há possibilidade de introdução de fungos através das picadas produzidas por ocasião de sua alimentação (Nakano & Telles 1997).

2.4. Aspectos Bioecológicos

Sales Jr. & Medeiros (2001) estudando a bioecologia de *Atarsocoris brachiariae* descreveram que o período de ovo a adulto é de aproximadamente 5 a 6 meses, sendo o período ninfal provavelmente constituído de cinco instares. Os adultos vivem em torno de cinco meses, ambiente no qual ninfas e adultos permanecem sugando as raízes. O período de pré-oviposição é em média 18 dias e o de oviposição 84 dias. O acasalamento processa-se no interior do solo após a revoada, sendo freqüente a presença de casais em cópula dentro do solo.

A oviposição ocorre no solo (Gassen 1989); os ovos apresentam coloração branca e forma oval (Silva 1999). Segundo Nakano & Telles (1997) os percevejos apresentam no máximo três gerações anuais, sendo as ninfas de coloração branca (Milles *et al.* 1996) e, especialmente, no último ínstar, apresentam as tecas alares, de coloração amarelada bem visíveis. Elas não entram em contato com o meio exterior, e quando retiradas do solo são susceptíveis à exposição dos raios solares.

Esses percevejos realizam vôos de dispersão principalmente nos períodos chuvosos (Oliveira *et al.* 2000b) durante dias quentes, que ao caírem penetram no solo com facilidade (Gassen 1989), onde constroem câmaras e ninfas e adultos ficam alojados (Santos 2001).

Os adultos possuem coloração geral castanha, pernas anteriores escavatórias (Ávila *et al.* 1997) e posteriores com fêmures engrossadas e tíbias reforçadas, adaptadas para empurrar (Corrêa-Ferreira & Panizzi 1999), características que os possibilitam a enterrar e formar galerias subterrâneas quando ocorre um período de seca.

As características diferenciais entre *S. castanea* e *A. brachiariae* referem-se a aspectos morfológicos como: coloração, tamanho, presença de cerdas na face dorsal das tíbias medianas e estrutura do clipeo. *S. castanea* possui coloração mais castanha, 8mm de comprimento, ausência dessas cerdas e o clipeo não se alarga em direção ao ápice e tem bordo arredondado. Já *A. brachiariae* é menor (5,2 a 6mm), de cor âmbar amarelada, clipeo alargado em direção ao ápice e presença de cerdas na face dorsal da tíbia (Becker 1996).

Os percevejos castanhos podem ser encontrados sob pedras ou materiais que lhes servem de abrigo (Nakano & Telles 1997). Distribui-se no perfil do solo em profundidades que variam de 0,0 a 100 cm (Fernandes *et al.* 1999), sendo mais facilmente encontradas em camadas entre 5 a 40 cm de profundidade, podendo passar longos períodos sem se alimentar (Fundação MT 1999a). Nas épocas mais secas, aprofundam-se no solo e durante as chuvas retornam a superfície (Silva 1999 e Nakano 2004). Nos períodos de estiagem prolongada podem atingir de 1,8 a 4,0m de profundidade (Fundação MT 1999b) e emitem forte odor quando o solo é removido.

2.5. Estratégias de Controle

2.5.1. Controle Químico

Nos últimos anos, algumas experiências foram realizadas com o objetivo de indicar inseticidas eficientes no controle do percevejo castanho, mas os resultados obtidos até então são de baixa eficácia e inconsistentes. De acordo com Embrapa-Soja (2003) e Nakano (2004) o controle químico é de difícil efeito, pois deve ser aplicado logo após as chuvas. Havendo seca é impossível atingi-los, além disso provocam desequilíbrio ecológico e riscos à saúde humana. Esse método de controle é baseado no tratamento preventivo (Santos 2001) e praticamente não há inseticidas com efeito residual suficientes para assegurar redução populacional a longo prazo (Nakano & Telles 1997).

Em resultados de pesquisa a Fundação MT (1999a) identificou alguns inseticidas químicos que funcionam como repelentes.

2.5.2. Controle Cultural

A eliminação do hospedeiro intermediário, principalmente na entressafra, contribui para diminuir a população de pragas de solo (Ferreira Lima 1993). Nesse sentido, Oliveira *et al.* (2003) avaliaram a associação entre a planta invasora maria-mole (*Senecio brasiliensis* Less) e *Atarsocoris* sp., e observaram uma correlação entre essas espécies, o que permite sugerir a inclusão da maria-mole como bioindicadora desse inseto nas áreas testadas.

Fundação MT (1999b) também constatou que o preparo do solo e a correção da acidez do solo com calcário são práticas culturais usadas para o manejo do percevejo castanho.

2.5.3. Controle Físico

O revolvimento do solo com aração é considerado um bom meio para reduzir as infestações das pragas que vivem no solo (Nakano 2001). Para Viana *et al.* (2001) essa prática causa exposição dos insetos aos predadores e causa morte de ninfas e adultos por esmagamento. Malaguido *et al.* (1999) avaliaram a influencia dos nutrientes enxofre e nitrogênio na sobrevivência do percevejo castanho em soja e constataram efeito direto do adubo na mortalidade do percevejo. Em outro trabalho desenvolvido por Oliveira & Sales Jr. (2002) a adição de matéria orgânica contribuiu para a redução da população do percevejo castanho *A. brachariae*.

Nakano & Telles (1997) relataram que o percevejo-castanho-das-raízes possui atração pela cor branca. Segundo esses autores é possível montar armadilhas com inseticidas ou fungos entomopatogênicos utilizando-se barreiras, com essa cor, para contaminar os adultos.

2.5.4. Controle Biológico

A conservação e a exploração ambiental garantindo equilíbrio ecológico e desenvolvimento sustentável, são alvos de pesquisas em todo o mundo. O estudo da dinâmica populacional, do comportamento, da distribuição e abundância, do potencial de reprodução, das condições e recursos alocados no desenvolvimento, crescimento e reprodução e os inimigos naturais são conhecimentos importantes para que as comunidades permaneçam em equilíbrio, pois qualquer alteração induzida pelo homem, para promover estabilidade, somente terá sucesso após extensivos estudos básicos nos ecossistemas. Dentre as medidas usadas para garantir o equilíbrio ecológico destacam-se o controle

biológico. Segundo Bellotti (1992) o controle biológico é uma proteção fitossanitária sustentável devido ao aparecimento de pragas resistentes a inseticidas; aumento no número de pragas e nos casos de contaminação de alimentos e água; envenenamento do homem e de animais domésticos.

Atualmente, mais de 500 espécies de insetos tem sido alvos em cerca de 1200 programas de introduções de controle biológico no mundo (Driesche & Bellows 1996). Com o rápido desenvolvimento de pesquisas entomológicas, nos últimos anos, e a necessidade de se encontrar novas alternativas para o controle de pragas, o controle microbiano vem se destacando. Os microrganismos entomopatogênicos fungos, bactérias, vírus, nematóides e protozoários têm sido pesquisados com sucesso produzindo bioinseticidas eficazes para os inseto-pragas (Berti Filho & Ciociola. 2002).

2.5.4.1. Controle Microbiano

Alves (1998a) relata que o controle microbiano é um componente indispensável de qualquer programa de manejo integrado, pois para a maioria dos insetos de interesse econômico há sempre um patógeno capaz de regular sua população. Dentre os microrganismos entomopatogênicos os fungos são os mais freqüentemente encontrados em associações com insetos Silva (2001), sendo conhecidas atualmente mais de 700 espécies entomopatogênicas (Moino *et al.* 1998), em que cerca de 80% dessas doenças em artrópodes são provocadas por fungos (Luz *et al.* 2002).

No Brasil, a patologia e o controle microbiano de insetos tiveram grande desenvolvimento nos últimos vinte anos, sendo que 50% dos trabalhos de patologia e controle microbiano publicados referem-se a fungos entomopatogênicos (Alves 1998b), uma vez que são os microrganismos mais encontrados associados com insetos (Gazzoni *et al.* 1994).

Os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* são os mais usados no controle microbiano de mais de 300 espécies de insetos (Moino *et al.* 1998). Esses patógenos são mundialmente conhecidos e utilizados como agentes biocontroladores de várias pragas agrícolas (Alves *et al.* 1985 e Figueirêdo *et al.* 2002), apresentando potencial para utilização contra diversas ordens de insetos (Alves 1992) incluindo os hemípteros pragas, como o percevejo-de-renda da mandioca (Oliveira *et al.* 2001), cigarrinha-das-pastagens e cigarrinha-da-cana-de-açúcar (Alves 1998b) e o percevejo castanho (Nakano 2004).

O grau de especificidade de fungos entomófagos é bastante variável (Huffaker & Messenger 1976) podendo insetos de uma mesma família apresentar respostas diferentes a patogenicidade de um determinado fungo (Sosa-Gómez & Moscardi 1992). Muitos parâmetros são considerados

mediante aplicação eficaz do controle microbiano com fungos. A partir do estudo da epizootiologia é possível realizar controle eficiente, pois é considerada uma ciência aplicada ao controle microbiano a qual estuda a dinâmica das doenças nas populações de insetos, enfatizando as interações e os padrões de comportamento resultantes do sistema inseto-patógeno-ambiente (Sosa-Gómez & Moscardi 1992). A viabilidade e atividade biológica de fungos entomopatogênicos são altamente influenciadas pelas condições ambientais como temperatura (Cooke 1979), umidade, substrato e radiação ultra-violeta (Marques *et al.* 2000).

2.5.4.2. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycete: Moniliaceae) como agentes de controle de insetos

Os primeiros testes com fungos entomopatogênicos foram desenvolvidos no final do século XIX pelo russo Ilya Metschnikoff em 1879 ao avaliar o potencial de *M. anisopliae* para controle de larvas de coleópteros (Alves 1998b). Posteriormente, surgiram os primeiros resultados práticos, sendo atualmente disponíveis vários inseticidas a base desse patógeno em muitos países (Faria & Magalhães 2001).

Os fungos entomopatogênicos têm sido utilizados para o controle de pragas desde a década de 70. A partir das décadas de 80 e 90 os programas de controle de insetos em grandes áreas se incrementaram em países como Brasil, Colômbia, China e Filipinas (Sosa-Gómez 1999). No Brasil, existem diversas empresas produtoras de fungos, produzindo patógenos como *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* (Quintela *et al.* 1994) que são utilizados no controle da cigarrinha-das-pastagens e da cana-de-açúcar, broca dos citros e térmitas. Alguns isolados desses fungos são altamente infectivos a *Cornitermes cumulans* em laboratório e a campo apresentando, assim, grande potencial para utilização como inseticida microbiano (Fernandes & Alves 1992). Faria & Magalhães (2001) relataram que a produção massal desses patógenos no Brasil é realizada utilizando-se arroz cozido como substrato.

O fungo *B. bassiana* é o mais estudado, sendo produzido com o nome de Boverin e utilizado contra diversas espécies de insetos na Rússia (Alves *et al.* 1985), bem como nos Estados Unidos e México. No Brasil esse patógeno tem sido comercializado para o controle da broca-do-café, cochonilha em citros, cupins e mosca branca.

Os fungos apresentam vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos, pois a maioria desses é altamente especializada na penetração pelos espiráculos e particularmente pela superfície do tegumento dos insetos, além de seus conídios possuírem alta capacidade de

disseminação horizontal (Moscardi 2003). Podem infectar independente da atividade alimentar do hospedeiro, pois penetram não somente pelo intestino (Hajek & Leger 1994). Quando o fungo entra na hemolinfa, reproduz rapidamente e geralmente causa a morte do hospedeiro, pois produzem toxinas que enfraquecem suas respostas imunes (Driesche & Bellows 1996). De acordo com Sosa-Gómez & Alves (2000) as seguintes fases ocorrem na colonização de um fungo deuteromiceto entomopatogênico: 1) conidiogênese; 2) liberação de conídios; 3) disseminação; 4) adesão ao tegumento do hospedeiro; 5) indução da germinação; 6) diferenciação do tubo germinativo; 7) penetração; 8) crescimento interno; 9) extrusão e nova conidiogênese

Diante do potencial de emprego de fungos entomopatogênicos a seleção de isolados que promovam doenças em populações de insetos-praga é de extrema relevância, principalmente para aquelas espécies de difícil controle, como são os insetos de solo. O biocontrole desses insetos através de fungos patogênicos pode representar uma alternativa viável, na qual há necessidade de determinar o potencial desses agentes biológicos sobre o inseto.

Devido ao comportamento, distribuição e danos causados em várias culturas, o percevejo castanho-da-raiz *S. carvalhoi* desperta grande interesse. Vários fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Paecilomyces* já foram isolados desse inseto, os quais apresentam potencial para controle da praga (Oliveira *et al.* 2000a).

Trabalhos realizados com o fungo *M. anisopliae* demonstraram a possibilidade de utilização desse microrganismo no controle do percevejo-castanho-das-raízes. O potencial de controle biológico de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* foi testada sobre *S. castanea* em laboratório, resultando na mortalidade de 50% de ninfas e adultos (Batista *et al.* 1996). Amaral *et al.* (1999) constataram que *Metarhizium anisopliae* proporcionou eficiência entre 30 e 80 % de controle de *A. brachiariae*, sendo a eficiência maior quando em associação com a matéria orgânica. O efeito de inseticidas associados a uma linhagem *M. anisopliae*, isolado do próprio *A. brachiariae*, também foi testado, demonstrando que essa associação proporcionou controle de sua população e menor agressão ao meio ambiente (Amaral *et al.* 2002). Fundação MT (1999a), Viana *et al.* (2001), Viana *et al.* (2003) e Nakano (2004) também descreveram que *M. anisopliae* é um agente de controle biológico que pode ser empregado contra *S. castanea*.

Outros agentes de controle microbiano têm sido testados sobre o percevejo castanho, como foi demonstrado por Sartori *et al.* (2002) que avaliaram a suscetibilidade de ninfas e adultos de *S. castanea* ao nematóide *Steinernema carpocapsae* em laboratório, resultando em 100% de eficiência. O índice de mortalidade de adultos de *S. castanea* também foi testado por Rosa *et al.* (2002) pelo mesmo patógeno.

3. CAPÍTULO 1

Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o controle *Scaptocoris carvalhoi* Becker, 1966 (Hemiptera: Cydnidae)

Selection of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolates for the control of *Scaptocoris carvalhoi* Becker, 1966 (Hemiptera: Cydnidae).

3.1. ABSTRACT – The aim of this work was to evaluate the virulence in vitro of isolates of the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on nymphs and adults of *Scaptocoris carvalhoi*. The experiments were carried out at Embrapa Western Agriculture in Dourados, MS, Brazil. Ten isolates of *M. anisopliae* and eleven of *B. bassiana* were evaluated by topic application onto the stinkbugs of 5 µl of a suspension with 10⁸ conidia/ml. The experiments were conducted in a completely randomized design, with eleven treatments for *M. anisopliae* and twelve for *B. bassiana*, both replicated five times (10 adults and five nymphs per plot). In other experiment, the *M. anisopliae* (Ma69) pathogenicity of was evaluated for nymphs and adults, separately. Each plot had 15 specimens, kept in plastic boxes (11x11x3,5cm), in growth chamber at 26±1°C and 85% relative humidity, under continuous darkness. Data of insect mortality was analyzed with ANOVA ($p < 0.001$). The levels of stinkbugs mortality were higher for *M. anisopliae* (73.3% to 94.7%) than for *B. bassiana* (10.7% to 78.7%). Among the fungal isolates, seven *M. anisopliae* caused mortality of over 80%. In general, the *B. bassiana* isolates showed low efficiency for the control of *S. carvalhoi*. When nymphs and adults were evaluated separately, there was no significant differences in mortality. The virulence was high for most of the *M. anisopliae* isolates. These results indicate that this fungus could be used to develop a formulation aiming the controll of *S. carvalhoi* in the field.

KEY WORDS: Insecta, microbial control, entomopathogenic fungus, mortality

RESUMO – Objetivou-se nesse trabalho avaliar a patogenicidade de isolados dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em ninfas e adultos de *Scaptocoris carvalhoi*, em laboratório. Os experimentos foram conduzidos na *Embrapa Agropecuária Oeste*, em Dourados, MS. Foram avaliados dez isolados de *M. anisopliae* e onze de *B. bassiana*, sendo os conídios inoculados no percevejo através de aplicação tópica com 5µl da suspensão de 10⁸ conídios/ml. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com onze tratamentos para o ensaio com *M. anisopliae*, doze tratamentos com *B. bassiana*, tendo ambos cinco repetições (10 adultos/5ninfas por parcela). Em outro experimento a patogenicidade de *M. anisopliae* (Ma69) foi avaliada para ninfas e adultos separadamente. Cada parcela foi constituída por quinze insetos, mantidos em caixa plástica gerbox, condicionadas em B.O.D. regulada para 26±1°C, UR 85% sem fotofase. Através da análise de variância, foi constatado efeito significativo de tratamento ($p < 0,001$) com relação à mortalidade causada aos percevejos pelos isolados dos fungos testados. Os níveis de mortalidade do percevejo foram maiores para *M. anisopliae* que variou de 73,3% a 94,7% contra 10,7% a 78,7% de *B. bassiana*. Dentre os 21 isolados testados, sete de *M. anisopliae* causaram mortalidade superior a 80%. Os isolados de *B. bassiana* apresentaram, de um modo geral, baixa eficiência no controle de *S. carvalhoi*. Quando ninfas e adultos foram avaliados separadamente não houve diferença significativa com relação à mortalidade. A virulência foi elevada para a maioria dos isolados de *M. anisopliae*, resultados esses que fornecem subsídios para o desenvolvimento do fungo visando o controle de *S. carvalhoi* em condições de campo.

PALAVRAS CHAVE: Insecta, controle microbiano, fungo entomopatogênico, mortalidade.

3.3 Introdução

O percevejo-castanho-da-raiz, um inseto de hábito subterrâneo, pertence a família Cydnidae (Nakano & Telles 1997), subfamília Scaptocorinae (Borges *et al.* 1999). Essa subfamília ocorre nas regiões Oriental e Neotropical (Becker 1967). Na região neotropical é representado pelos gêneros *Scaptocoris* e *Atarsocoris* (Becker 1967), sendo que a partir da década de 40 foi registrado em várias regiões do Brasil (Andrade & Puzzi 1953). Todavia, somente a partir da década de 80 a ocorrência desses insetos passou a ser intensa no Brasil, causando prejuízos em lavouras e pastagens (Oliveira 1999).

Os adultos possuem coloração geral castanha, pernas anteriores escavadoras (Ávila *et al.* 1997) e posteriores com fêmures engrossados e tíbias reforçadas, adaptadas para empurrar (Corrêa-Ferreira & Panizzi 1999) característica essa que os possibilitam a enterrar e formar galerias subterrâneas especialmente em períodos de seca, podendo ser encontrados em profundidades que variam de 0,0 a 100 cm (Fernandes *et al.* 1999) onde podem passar longos períodos sem se alimentarem (Silva 1999; Sales Jr & Medeiros 2001), voltando à superfície quando as chuvas retornam (Nakano 2004). As ninfas são brancas (Milles *et al.* 1996) e, especialmente, no último ínstar, as tecas alares, de coloração amarelada, são bem visíveis (Oliveira *et al.* 2000b).

Dentre os percevejos Scaptocorinae duas espécies *Scaptocoris carvalhoi* (sinonímia *Atarsocoris brachiariae*) e *Scaptocoris castanea*, vêm causando grandes danos a agropecuária, principalmente em pastagens, soja e algodão. No Brasil, o percevejo castanho ocorre de Norte a Sul, mas o registro de danos econômicos tem sido freqüente na região do Cerrado (Oliveira *et al.* 2000b), especialmente em solos arenosos (Oliveira *et al.* 2000a). O percevejo castanho, considerado um inseto polífago (Camargo & Amábile 2000), também já foi registrado em ervilha, pimenteira, sorgo, tomateiro, tremoço, pastagens, colônia e diversas plantas daninhas (Nakano & Telles 1997), alfafa, amendoim, arroz, beldroega, café, cana-de-açúcar, capim-açu, capim-gordura, capim-marmelada, coqueiro, eucalipto, girassol, milho, sorgo, bananal, feijoeiro, batata, fumo, mandioca (Corrêa-Ferreira & Panizzi 1999; Nakano 2004). Podem ocorrer tanto em sistemas de semeadura direta como de convencional (Silva 1999), com o ataque ocorrendo em reboleiras, na qual ninfas e adultos atacam as raízes das plantas (Embrapa-Soja 2003). Nas áreas infestadas, os sintomas

incluem murchamento e amarelecimento das folhas após o ataque, com posterior seca e morte da planta. Dentro das reboleiras, pode ser observada redução da população ou do crescimento das plantas dependendo de quando o ataque ocorre. Causam danos pela retirada de seiva das raízes, pela injeção de saliva tóxica, o que provoca o enfraquecimento e morte das plantas (Fernandes *et al.* 1999; Rizzo 1979), bem como pela possibilidade de introdução de fungos nos hospedeiros através das picadas produzidas por ocasião de sua alimentação (Nakano & Telles 1997).

Diante da peculiar biologia e comportamento que o percevejo castanho possui, é necessário intensificação de métodos de controle para manter sua população em níveis não prejudiciais às culturas. O controle químico, além de provocar desequilíbrio ecológico e riscos à saúde humana e ao meio ambiente é de modo geral ineficaz e os resultados obtidos até então são inconsistentes (Embrapa-Soja 2003; Nakano 2004). O controle biológico do percevejo castanho tem sido registrado como um método promissor. Sartori *et al.* (2002) avaliou a suscetibilidade de ninfas e adultos de *S. castanea* ao nematóide *Steinernema carpocapsae* em laboratório, resultando em 100% de eficiência. O índice de mortalidade de adultos de *Scaptocoris castanea* também foi testado por Rosa *et al.* (2002) pelo mesmo patógeno, apresentando mortalidade de 100%. Fungos entomopatogênicos, dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Paecilomyces* também já foram isolados do percevejo castanho (Malaguido *et al.* 2000).

No Brasil, programas de controle microbiano de insetos tiveram grandes avanços na última década, com destaque para os fungos entomopatogênicos (Alves 1998b). Os fungos *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae* são mundialmente conhecidos e utilizados como agentes de controle de inúmeras espécies de pragas de importância econômica. Pesquisas com fungos que apresentam potencial de uso no controle biológico, como aqueles dos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* que, segundo Moino *et al.* (1998) atacam mais de 300 espécies de insetos, necessitam ser intensificadas.

O potencial de controle biológico de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., foi testado sobre *S. castanea* em laboratório, resultando na mortalidade de 50% sobre ninfas e adultos (Batista Filho *et al.* 1996). Amaral *et al.* (1999) constataram que *M. anisopliae* proporcionou eficiência entre 30 e 80 % no controle de *Atarsocoris brachiariae*, sendo a eficiência maior quando em associação com a matéria orgânica. O efeito de inseticidas associados a uma linhagem *M. anisopliae*, isolado do próprio *A. brachiariae*, também foi testado, o qual demonstrou que essa associação proporcionou controle do percevejo e menor agressão ao meio ambiente (Amaral *et al.* 2002). Viana *et al.* (2003) também descreveram *M. anisopliae* como um agente de controle de *S. castanea*. A relação patógeno-hospedeiro também foi testada por Malaguido *et al.* (2000), em laboratório, quando verificaram potencial de infectividade de um isolado de *M. anisopliae* sobre adultos de *S. castanea*.

A seleção de isolados de entomopatógenos poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle, principalmente para espécies de difícil manejo como os insetos de solo. A presente pesquisa teve por objetivo avaliar a patogenicidade de isolados dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* em ninfas e adultos de *S. carvalhoi*, em condições de laboratório.

3.4. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da *Embrapa Agropecuária Oeste*, em Dourados, MS. Ninfas e adultos de *S. carvalhoi* foram coletados de lavoura de soja do município de São Gabriel do Oeste, MS (19° 23' 42'' S e 54° 33' 57'' W) e transportados em solo úmido mantido em caixas de isopor. No laboratório os insetos foram acondicionados em caixas de isopor contendo solo e raízes de algodoeiro, como alimento.

Para a avaliação da relação patógeno-hospedeiro foram avaliados dez isolados de *M. anisopliae* (Ma) e onze de *B. bassiana* (Bb). Os testes de patogenicidade foram realizados através de bioensaios conduzidos em laboratório, em três etapas: no ensaio 1 foram avaliados os isolados de *M. anisopliae*, no ensaio 2 os isolados de *B. bassiana* e no ensaio 3 ninfas e adultos foram submetidos à ação do isolado Ma69 para comparar a suscetibilidade desses dois estágios de desenvolvimento. Os isolados testados, pertencem à coleção de fungos entomopatogênicos da *Embrapa Soja* (Sosa-Gómez & Silva 2002), os quais foram obtidos a partir de diversos hospedeiros e localidades (Tabela 1). Os isolados foram colocados em tubos de vidro contendo meio de cultura Batata–Dextrose-Agar (BDA) + antibiótico sulfato de streptomina e armazenados em freezer. Posteriormente, os isolados foram repicados utilizando placas de Petri contendo BDA e o antibiótico tetraciclina. Para germinação e esporulação dos isolados, as placas foram mantidas durante dez dias em estufa incubadora (B.O.D.) a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12h. Após isso, cada isolado foi condicionado em um tubo de vidro contendo sílica gel e leite desnatado (agente protetor) e armazenados em freezer (-12°C) (Smith and Onion 1983).

Para instalação dos bioensaios, os isolados foram multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA + antibiótico tetraciclina e mantidas em estufa incubadora nas mesmas condições ambientais descritas previamente. Suspensões fúngicas foram preparadas com 4 ml de espalhante adesivo (Tween 80 a 0,01 % em água destilada) e adicionadas às placas contendo os isolados multiplicados em meio de cultura. Os conídios foram raspados do meio de cultura com auxílio de uma espátula, sendo o material fúngico filtrado utilizando-se tecido não tramado de viscosa. Para homogeneizar, as suspensões foram agitadas em aparelho rotativo tipo vortex (Q-MED). Após isso, foram realizadas quantificações utilizando-se câmara de Neubauer e efetuada diluições para ajustar 10^8 conídios/ml de solução (Fig. 1). Os conídios foram aplicados topicamente

sobre os insetos, com auxílio de uma micropipeta inoculando-se 5µl da suspensão na região ventral e entre as coxas do percevejo (Fig. 2). Após a inoculação, os insetos foram condicionados em caixas plásticas do tipo gerbox (11x11x3,5cm), contendo 180 gramas de solo esterilizado e umedecido com 30 ml de água destilada e autoclavada. Raízes de algodoeiro tratadas com hipoclorito de sódio a 0,1% foram oferecidas aos insetos como alimento. Essas caixas foram mantidas em câmaras climatizadas (B.O.D.) reguladas para $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, UR 85%, sem fotofase.

Figura 1. Tubo de ensaio contendo suspensão de *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^8 conídios/ml.

Figura 2. Aplicação de suspensão fúngica em adultos de *Scaptocoris carvalhoi*.

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, tendo o ensaio 1 onze tratamentos (10 isolados de *M. anisopliae* e uma testemunha) com cinco repetições, o ensaio 2 doze tratamentos (11 isolados de *B. bassiana* e uma testemunha) com cinco repetições e no ensaio 3 para

cada fase do inseto (ninfá/adulto) tratada com fungo houve uma testemunha (sem tratamento) com cinco repetições, totalizando quatro tratamentos. No ensaio 1 e 2 cada parcela foi constituída por quinze insetos (10 adultos e 5 ninfas). No ensaio 3 cada parcela continha 15 ninfas ou 15 adultos tanto para os tratamentos com fungos quanto na testemunha (sem fungo).

A viabilidade dos conídios foi avaliada para cada isolado, utilizando-se quatro lâminas, contendo o meio BDA+antibiótico tetraciclina, mantidas em gerbox, sendo a suspensão pulverizada, com aparelho nebulizador. Duas dessas lâminas foram visualizadas, com auxílio do microscópio óptico com aumento de 400x, para verificar a quantidade de conídios. Havendo número suficiente de conídios, essas lâminas foram mantidas em B.O.D. a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotofase 12h e, posteriormente, realizadas as contagens de conídios viáveis.

Avaliou-se a mortalidade dos insetos aos 5, 8, 12, e 15 dias após a inoculação dos fungos, efetuando-se a troca do alimento e repondo a umidade do solo no gerbox quando necessário. Para a confirmação da causa *mortis* os insetos foram colocados em placas de Petri contendo papel filtro esterilizado e um recipiente com algodão umedecido em água destilada e autoclavada, ambiente esse favorável ao desenvolvimento do patógeno (Fig. 3). As placas foram vedadas com parafilm e mantidas em B.O.D. a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, sem fotofase.

Figura 3. Placa de Petri e papel filtro esterilizados contendo recipiente com algodão umedecido (A) e *Scaptocoris carvalhoi* em placa de Petri para confirmação de causa *mortis* (B).

Todo procedimento em laboratório, como preparo do meio de cultura, preparo das suspensões e viabilidade dos conídios, foi realizado em capela de fluxo laminar visando proporcionar biosegurança e assepsia na condução dos experimentos.

A patogenicidade dos isolados foi avaliada considerando os valores de mortalidade (x) do percevejo, os quais foram transformados para $\arcsen \sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos do ensaio um e dois comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No ensaio três as médias foram comparadas pelo teste T a 5% de probabilidade. No

ensaio 1 a infectividade dos isolados de *M. anisopliae* também foi avaliada com base no cálculo do Tempo Letal (TL_{50}), submetendo-se os valores de mortalidade acumulada à Análise de Probit, através do programa MOBAE (Haddad *et al.* 1995).

3.5. Resultados e Discussão

Os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, testados nessa pesquisa, apresentaram viabilidade média de 97% e 99%, respectivamente, por ocasião da instalação dos bioensaios. A infectividade devido aos isolados testados sobre ninfas e adultos de *Scaptocoris carvalhoi* foi comprovada quando os insetos apresentavam corpo endurecido devido ao desenvolvimento do micélio, onde se verificava a formação de conídios de coloração verde e branca, respectivamente, para *M. anisopliae* (Fig. 4) e *B. bassiana* (Fig 5). Na qual, utilizando-se microscópio óptico com aumento de 400x, os conídios de *B. bassiana* apresentaram forma globosa ou subglobosa com conidióforos contendo fiálides com a parte basal dilatada terminando em ziguezague e os conídios de *M. anisopliae* cilíndricos e estreitos no meio, sendo dispostos em cadeia sobre os conidióforos.

Figura 4. Desenvolvimento micelial de *Metarhizium anisopliae* em *Scaptocoris carvalhoi* (A) e conidiogênese (B).

Figura 5. *Scaptocoris carvalhoi* infectados pelo fungo *Beauveria bassiana*.

Através da análise de variância, foi constatado efeito significativo de tratamento ($p < 0,001$) com relação à mortalidade causada aos percevejos pelos isolados dos fungos para ambos os ensaios conduzidos em laboratório (Tabela 2 e 3).

No ensaio 1, em que dez isolados de *M. anisopliae* foram testados, o Ma352 apresentou maior índice de mortalidade sobre *S. carvalhoi* (94,7%), embora fosse significativamente superior apenas em relação ao isolado Ma12 (Tabela 2). Todavia, os demais isolados de *M. anisopliae* apresentaram mortalidade do percevejo significativamente superior à testemunha. No ensaio com *B. bassiana*, a mortalidade do percevejo foi superior com o isolado Bb14. Esse efeito foi significativamente superior em relação a todos os demais isolados de *B. bassiana*, exceto para Bb161 e Bb16, cujos níveis de mortalidade não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3). Nesse ensaio houve maior variação dos níveis de mortalidade entre os isolados, sendo que Bb14, Bb161 e Bb16 diferiram estatisticamente de Bb159 e Bb357, o mesmo ocorrendo entre os isolados Bb37 e Bb357. No ensaio 3 não houve diferença significativa na percentagem de mortalidade para ninfas e adultos do inseto, sendo que diferiram apenas da testemunha (Tabela 4) demonstrando igual suscetibilidade desses dois estádios de desenvolvimento ao isolado Ma69.

Dentre os 21 isolados de fungos testados, somente sete de *M. anisopliae* causaram mortalidade em ninfas e adultos de *S. carvalhoi* superior a 80%, nível satisfatório de controle para que um inseticida possa ser considerado eficiente do ponto de vista agrônomo. De um modo geral, os níveis de mortalidade do percevejo foram maiores para os isolados de *M. anisopliae* que variou de 73,3% a 94,7% contra 10,7% a 78,7% de *B. bassiana* (Tabela 2 e 3). Batista Filho & Ramiro (1996) obtiveram 50% de mortalidade para adultos e ninfas de *Scaptocoris castanea* quando um isolado do fungo *M. anisopliae* foi pulverizado sobre o inseto na concentração de $0,4 \times 10^9$ conídios/ml. Esse resultado é inferior aos obtidos com os isolados de *M. anisopliae*, desse trabalho. A infectividade de isolados de *M. anisopliae* e de *B. bassiana* sobre o percevejo castanho da raiz também foi testada, em laboratório, por Malaguido *et al.* (2000), com aplicação tópica de 5 μ l/percevejo (30.000 conídios/inseto), na qual, obtiveram mortalidades de 31% e 38%, respectivamente, para esses dois fungos. Quando esses mesmos autores submetem os mesmos isolados a maior concentração, mediante mistura com caulim, a eficiência de *M. anisopliae* foi mais acentuada, atingindo 63%, enquanto que para *B. bassiana* permaneceu com 37% de eficiência. Mesmo assim, os índices de mortalidade obtidos por esses autores foram inferiores aos encontrados nessa pesquisa.

Os valores de TL₅₀ apresentaram grande variação sendo os maiores valores observados com os isolados Ma98 e Ma12 e os menores com Ma136 e Ma283. Os dados de mortalidade devido ao

isolado Ma136 não se ajustaram à análise de Probit para a determinação do Tempo Letal (TL_{50}) (Tabela 2).

Os isolados de *B. bassiana* apresentaram baixa eficiência, representando índices insuficientes para o controle de *S. carvalhoi* em laboratório o que provavelmente ocorrerá a campo. Porém, o efeito virulento foi elevado para a maioria dos isolados de *M. anisopliae*, resultados esses que fornecem subsídios visando viabilizar o emprego desse patógeno para o controle de *S. carvalhoi* em condições de campo.

Tabela 1. Isolados¹ de *Metarhizium anisopliae* e de *Beauveria bassiana* utilizados nos bioensaios com *Scaptocoris carvalhoi* em Dourados, MS/2003.

Isolado	Hospedeiro	Coleções de Culturas
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma)		
Ma 6	Solo	Embrapa-Soja, PR
Ma 7	Solo	Embrapa-Soja, PR
Ma 12	Solo	Embrapa-Soja, PR
Ma 69	<i>Phyllophaga cuyabana</i>	Embrapa-Soja, PR
Ma 98	<i>Sternechus subsignatus</i>	Embrapa-Soja, PR
Ma 136	folíolo da soja	Embrapa-Soja, PR
Ma 283	<i>Scaptocoris castanea</i>	Embrapa-Soja, PR
Ma 352	<i>Deois</i> sp.	CP 225 CG491
Ma 356	<i>Piezodorus guildinii</i>	CP 30 CG 144
Ma 358	<i>Ornithacris cavroisi</i>	IMI 330189 ARSEF 3341 CG366
<i>Beauveria bassiana</i> (Bb)		
Bb 8	<i>Nezara viridula</i>	Embrapa-Soja, PR
Bb 14	Pentatomidae	ESALQ - 353
Bb 15	<i>Euschistus heros</i>	ESALQ - 457
Bb 16	<i>Piezodorus guildinii</i>	ESALQ - 458
Bb 20	<i>Nezara viridula</i>	ESALQ – 500 CG78
Bb 37	<i>Nezara viridula</i>	ESALQ – 620 ARSEF 1474
Bb 56	<i>Nezara viridula</i>	ARSEF 3954 or ARSEF 39367
Bb 159	<i>Nezara viridula</i>	Embrapa-Soja, PR
Bb 161	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Embrapa-Soja, PR
Bb 354	<i>Oryzophagus oryzae</i>	Embrapa-Soja, PR
Bb 357	<i>Diabrotica</i> sp.	CG61

¹Catálogo de fungos entomopatogênicos (Sosa-Gómez e Silva 2002)

Tabela 2. Mortalidade de *Scaptocoris carvalhoi* sobre o efeito de diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* na concentração 10^8 conídios/ml e tempo letal (TL₅₀) (n= 75). Dourados, MS/2003.

Isolado	Mortalidade (%)	TL ₅₀ e IC (dias) ^a	Equação da reta	^b X ² Calculado
Ma 352	94,7 ± 3,27 a	0,40 (0,07 – 2,28)	Y= 5,41483 + 1,02931 logx	0,02 ns
Ma 69	92,0 ± 4,90 ab	0,99 (0,30 – 3,22)	Y= 5,00502 + 1,15593 logx	0,03 ns
Ma 7	89,3 ± 5,81 ab	0,31 (0,24 – 0,41)	Y= 5,37477 + 0,74184 logx	0,00 ns
Ma 283	90,7 ± 2,67 ab	0,07 (0,00 – 7,26)	Y= 5,66487 + 0,58976 logx	0,02 ns
Ma 6	84,0 ± 4,00 ab	1,48 (0,18 – 12,03)	Y= 4,82002 + 1,06288 logx	0,16 ns
Ma 356	81,3 ± 9,04 ab	0,59 (0,21 – 1,67)	Y= 5,14558 + 0,64351 logx	0,01 ns
Ma 136	82,7 ± 4,00 ab	*	*	*
Ma 358	78,7 ± 2,49 ab	1,35 (0,45 – 3,99)	Y= 4,90615 + 0,72779 logx	0,02 ns
Ma 98	77,3 ± 3,40 ab	4,57 (2,09 – 10,03)	Y= 3,89857 + 1,66790 logx	0,34 ns
Ma 12	73,3 ± 4,71 b	5,72 (4,97 – 6,58)	Y= 3,91239 + 1,43585 logx	0,01 ns
Testemunha	0,0 ± 0,00 c	-	-	-

^aTL₅₀= Tempo letal / IC = Intervalo de Confiança a 5% de probabilidade

Médias (± EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^bX² = Teste X² - (**ns**) não significativo

(*) Dados não se ajustaram à Análise de Probit

Tabela 3. Mortalidade de *Scaptocoris carvalhoi* sobre o efeito de diferentes isolados de *Beauveria bassiana* na concentração 10^8 conídios/ml. Dourados, MS.

Isolado	Mortalidade (%)
Bb 14	78,7 ± 4,42 a
Bb 161	62,7 ± 5,42 ab
Bb 16	58,7 ± 3,89 ab
Bb 354	48,0 ± 11,23 b
Bb 8	41,3 ± 5,73 b
Bb 15	37,3 ± 4,99 b
Bb 37	35,3 ± 2,84 bc
Bb 20	33,3 ± 4,71 bcd
Bb 56	32,0 ± 3,27 bcd
Bb 159	13,3 ± 5,58 cd
Bb 357	10,7 ± 3,40 de
Testemunha	0,0 ± 0,00 e

Médias (± EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Mortalidade de ninfas e adultos de *Scaptocoris carvalhoi* sobre o efeito de *Metarhizium anisopliae* (Ma69) em laboratório.

Bioensaio	Mortalidade (%)
Ninfas tratadas	89,3 ± 3,40 a
Ninfas não tratadas	4,0 ± 2,67 b
Adultos tratados	90,7 ± 4,52 a
Adultos não tratados	0,0 ± 0,00 c

Médias (± EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade.

4. CAPÍTULO 2

Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. ao percevejo castanho das raízes *Scaptocoris carvalhoi* Becker, 1966 (Hemiptera: Cydnidae) em laboratório e casa de vegetação.

Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. isolates on the roots brown stinkbug, *Scaptocoris carvalhoi* Becker, 1966 (Hemiptera: Cydnidae), under lab and greenhouse conditions.

4.1. ABSTRACT - The aim of this work was to evaluate the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* isolates on *Scaptocoris carvalhoi* Becker, 1966, under lab and greenhouse conditions and to determine the Lethal Dose (LD₅₀) and the Lethal Time (LT₅₀) for these isolates, under lab conditions. For the Lethal Dose (LD₅₀) and the Lethal Time (LT₅₀) determination, suspensions of four *M. anisopliae* isolates (Ma7, Ma69, Ma283, and Ma 342) were made at 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ e 10⁸ conidia/ml and inoculated topically on *S. carvalhoi*. After inoculation, the insects (ten adults and five nymphs) were placed into plastic boxes (gerbox type) and kept in growth chambers at 26±1°C and 85% relative humidity, under darkness conditions. The experiments were conducted at Embrapa Western Agriculture in Dourados, MS, Brazil, in a completely randomized design, replicated four times. At the 10⁸ conidia/ml concentration, the observed mortalities ranged from 56.7% to 83.3%, with the least values was with the Ma7 and Ma 69 and the highest with the Ma283 isolate. The TL₅₀ values ranged from 0.32 to 5.84 days, with the least value observed with the Ma7 isolate and the highest with the Ma283 isolate, but without significant differences among them. The evaluation of *M. anisopliae* isolates efficiency under greenhouse conditions were conducted after the experiments under lab conditions, where the selection of the Ma69 isolate was made. In the greenhouse the conidia were added to the soil in pots. The experimental design was a completely randomized, with two treatments (with and without the fungus), replicated 12 times, and with 15 specimens (10 adults and 5 nymphs) in each plot. In other bioassay, also in the greenhouse, the fungus pathogenicity to nymphs and adults was evaluated separately. There was a control (without treatment) for the adults and other for the nymphs, with the total of four treatments. In this assay, the design was completely

randomized, replicated five times with the plot constituted of one pot with 15 specimens. In the pots with the Ma69 isolate of the fungus, the mortality percentage of *S. carvalhoi* adults and of nymphs was 49.8%, which was significantly higher than the mortality observed in the pots without the fungus. When nymphs and adults were put in presence of the fungus, separately, the mortality index was significantly higher for nymphs (71.4%) than for adults (31.2%). Based on these results, we conclude that the Ma69 isolate was highly pathogenic to *S. carvalhoi*, both in the lab and under greenhouse conditions, constituting an option in the developing of a microbial insecticide for use in the field.

KEY WORDS: Insecta, LD₅₀, entomopathogenic fungus, biocontrol.

4.2. RESUMO – Objetivou-se nesse trabalho avaliar a patogenicidade de isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* em *Scaptocoris carvalhoi* (Becker 1966) em laboratório e casa-de-vegetação e determinar a Dose Letal (DL₅₀) e o Tempo Letal (TL₅₀) desses isolados. Para determinação da DL₅₀ e TL₅₀, suspensões de quatro isolados de *M. anisopliae* (Ma7, Ma69, Ma283 e Ma342) foram preparadas nas concentrações 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ e 10⁸ conídios/ml e inoculadas topicamente sobre *S. carvalhoi* correspondendo, respectivamente, a 50, 500, 5.000, 50.000 e 500.000 conídios/percevejo. Após inoculação, os insetos (10 adultos e cinco ninfas) foram condicionados em caixas plásticas do tipo gerbox (parcela) e mantidas em câmaras climatizadas regulada para 26±1°C, UR 85%, sem fotofase. Os experimentos foram conduzidos na *Embrapa Agropecuária Oeste* em Dourados, MS utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Na maior dose testada (500.000 conídios/inseto) foram observadas mortalidades variando de 56,7 a 96,7%, sendo os menores valores da Dose Letal (DL₅₀) observados com os isolados Ma69 e Ma7 e o maior com Ma283. Os valores de TL₅₀ variaram de 0,32 a 5,84 dias, sendo o menor valor constatado para o isolado Ma7 e o maior para Ma283, embora não diferissem estatisticamente, entre si. A avaliação da patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* em casa de vegetação foi realizada após a condução dos ensaios em laboratório, onde ocorreu seleção do isolado Ma 69. Nesse ambiente os conídios foram adicionados ao solo dos vasos, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado contendo dois tratamentos (com fungo e sem fungo) em doze repetições, sendo a parcela constituída por quinze insetos (10 adultos e 5 ninfas). Em outro bioensaio, conduzido também em casa de vegetação avaliou-se a patogenicidade do fungo em adultos e ninfas de *S. carvalhoi* separadamente. Para cada fase do inseto (adulto/ninfa) tratada com fungo, houve uma testemunha (sem tratamento), totalizando 4 tratamentos. Nesse ensaio utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo a parcela constituída de 15 insetos/vaso. Nos vasos contendo o fungo Ma69, a percentagem de mortalidade de adultos e ninfas de *S. carvalhoi* foi de 57,3%, sendo estatisticamente superior à mortalidade verificada nos vasos não tratados. Quando o fungo foi aplicado em ninfas e adultos, separadamente, o índice de mortalidade foi significativamente maior para ninfas (80,8%) do que para os adultos (32,2%). Com base nos resultados obtidos, o isolado Ma69 foi altamente patogênico para *S. carvalhoi* tanto em laboratório quanto em casa de vegetação, constituindo em uma alternativa promissora para utilização como inseticida microbiano em condições de campo.

PALAVRAS CHAVE: Insecta, DL₅₀, fungo entomopatogênico, biocontrole.

4.3. Introdução

Em pastagens e lavouras como soja, algodão e milho têm se constatado reduções de produtividade devido à ação de pragas de solo como os percevejos-castanhos-das-raízes *Scaptocoris castanea* (Perty 1830) e *Scaptocoris carvalhoi* (Becker 1966) (sinonímia *Atarsocoris brachiariae* Becker 1996). Essas espécies distribuem-se por todo Brasil, apresentando preferência por solos arenosos, sendo consideradas de grande importância econômica especialmente na região do Cerrado. Pertence a família: Cydnidae e subfamília Scaptocorinae (Becker 1967) e, segundo Oliveira (1999) há mais seis espécies dessa subfamília ocorrendo no Brasil, sendo *S. castanea* e *S. carvalhoi* as mais importantes.

Os percevejos castanhos possuem hábito subterrâneo (Borges *et al.* 1999) e são polívoros (Camargo & Amabile 2000) sendo já registrados em ervilha, pimenteira, sorgo, tomateiro, tremoço, pastagens, colônia e diversas plantas daninhas (Nakano & Telles 1997), alfafa, amendoim, arroz, beldroega, café, cana-de-açúcar, capim-açu, capim-gordura, capim-marmelada, coqueiro, eucalipto, girassol, milho, sorgo, bananal, feijoeiro, batata, fumo, mandioca (Corrêa-Ferreira & Panizzi 1999; Nakano 2004). As ninfas e os adultos sugam a seiva das raízes das plantas (Embrapa-Soja 2003), causando amarelecimento, subdesenvolvimento e até a morte da planta. Os danos também ocorrem devido a injeção de saliva tóxica causando enfraquecimento e morte do hospedeiro (Fernandes *et al.* 1999, Rizzo 1979), além da possibilidade de introdução de fitopatógenos através das picadas produzidas durante a alimentação (Nakano & Telles 1997). Segundo esses autores, o percevejo castanho foi constatado inicialmente na Argentina em 1934 e nas décadas de 40 e 60 foi registrada em várias regiões e culturas no Brasil (Andrade & Puzzi 1953). A partir da década de 80 a ocorrência desses insetos passou a ser mais intensa (Oliveira 1999).

O ataque do percevejo castanho ocorre geralmente em reboleiras ou em manchas distribuídas irregularmente, sendo constatado tanto em sistemas de semeadura direta como convencional (Silva 1999). Segundo Oliveira *et al.* (2000b), em lavouras de soja, o diâmetro médio de cada foco pode variar de poucos metros até vários hectares onde dentro das reboleiras, pode ser observada redução da população de plantas.

Devido a seu comportamento e biologia, o controle do percevejo castanho tem sido difícil, sendo o controle químico a prática mais estudada. O uso indiscriminado dos inseticidas químicos e

os prejuízos que esses produtos causam ao meio ambiente e ao homem têm contribuído na busca de técnicas alternativas de controle. Dentre essas técnicas, muitos bioinseticidas foram desenvolvidos nos últimos anos, na qual os fungos entomopatogênicos se destacam por sua eficiência e características ecológicas favoráveis. Os fungos entomopatogênicos, dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Paecilomyces* já foram isolados do percevejo-castanho (Malaguido *et al.* 2000) e o potencial de controle microbiano utilizando-se isolados desses entomopatógenos tem sido avaliado por vários pesquisadores. Batista Filho *et al.* (1996) estudando a patogenicidade de um isolado de *M. anisopliae* em *S. castanea*, em laboratório, constataram mortalidade de 50% de ninfas e adultos. Em outro trabalho Amaral *et al.* (1999) verificaram que *M. anisopliae* proporcionou eficiência entre 30 e 80 % de controle de *A. brachiariae*, sendo observado maior eficiência de controle do fungo quando utilizado em associação com a matéria orgânica. Malaguido *et al.* (2000) avaliaram a patogenicidade de um isolado de *M. anisopliae* em adultos do percevejo-castanho, enquanto que Amaral *et al.* (2002) demonstraram que alguns inseticidas químicos podem ser usados em associados com *M. anisopliae* proporcionando bons níveis de controle do percevejo castanho.

A presente pesquisa teve por objetivo avaliar a patogenicidade de isolados do fungo *M. anisopliae* em *S. carvalhoi*, determinar a Dose Letal (DL₅₀) e Tempo Letal (TL₅₀) para esses isolados, bem como avaliar a patogenicidade de *M. anisopliae* em ninfas e adultos de *S. carvalhoi*, em casa de vegetação.

4.4. Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Entomologia e em casa de vegetação da *Embrapa Agropecuária Oeste*, em Dourados, MS. Ninfas e adultos de *Scaptocoris carvalhoi* foram coletados de lavoura de soja do município de São Gabriel do Oeste, MS (19° 23' 42'' S e 54° 33' 57'' W). Os insetos foram transportados até o laboratório em caixas de isopor contendo terra úmida, onde foram triados e fornecidas raízes de algodoeiro, como alimento. Em laboratório e casa de vegetação foram realizados bioensaios de patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* em ninfas e adultos de *S. carvalhoi*.

Obtenção e multiplicação dos isolados. Os isolados testados pertencem à coleção de fungos entomopatogênicos da *Embrapa Soja* (Sosa-Gómez & Silva 2002), os quais foram obtidos a partir de diversos hospedeiros e localidades (Tabela 1). Os isolados foram colocados em tubos de vidro contendo meio de cultura Batata–Dextrose-Agar acrescido do antibiótico streptomomicina (BDA+A) e armazenados em freezer (-12°C). Para germinação e esporulação, os isolados foram repicados em placas de Petri contendo BDA+antibiótico tetraciclina mantidas durante dez dias em estufa incubadora (B.O.D.) a 26±1°C e fotofase de 12h. Posteriormente, os patógenos foram, individualmente, condicionados em tubos de vidro contendo sílica gel e leite desnatado (agente protetor) e armazenados em freezer (-12°C) (Smith and Onion 1983).

Os isolados foram multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA+antibiótico e condicionados em estufa incubadora nas mesmas condições ambientais descritas anteriormente. Suspensões fúngicas foram preparadas com 4 ml de espalhante adesivo (Tween 80 0,01 %) que foram adicionados às placas contendo os isolados multiplicados em meio de cultura. Os conídios foram raspados do meio de cultura com uma espátula e o material fúngico filtrado utilizando-se tecido não tramado de viscosa. Para homogeneizar, as suspensões foram agitadas em aparelho agitador rotativo tipo vortex (Q-MED). Após isso, foram realizadas quantificações utilizando-se câmara de Neubauer e efetuadas diluições para ajustar as diferentes concentrações utilizadas nos bioensaios da Dose Letal (DL₅₀).

Determinação da Dose Letal (DL₅₀) e Tempo Letal (TL₅₀). Suspensões de quatro isolados de *M. anisopliae* (Ma7, Ma69, Ma283 e Ma342) foram preparadas nas concentrações 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ e 10⁸ conídios/ml (Fig. 1) e inoculadas topicamente sobre *S. carvalhoi* para determinação das Doses letais (DL₅₀), para cada isolado.

Figura 1. Tubos de ensaios contendo suspensões de conídios de *Metarhizium anisopliae*

A inoculação dos isolados sobre os insetos foi realizada utilizando-se uma micropipeta, inoculando-se 5µl de suspensões nas concentrações 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ e 10⁸ conídios/ml de cada isolado na região ventral entre as coxas do percevejo, correspondendo, respectivamente, em doses de 50, 500, 5.000, 50.000, 500.000 conídios/inseto (Fig. 2). Após a inoculação, os insetos foram colocados em caixas plásticas do tipo gerbox (11x11x3,5cm) e acondicionadas em câmaras climatizadas (B.O.D.) regulada para 26±1°C, UR 85%, sem fotofase. Cada gerbox continha 180 gramas de terra esterilizada e umedecida com 30 ml de água destilada e autoclavada e raízes de algodoeiro tratadas com hipoclorito de sódio a 0,1%, fornecidas como alimento. Em cada gerbox foram colocados quinze insetos (10 adultos e cinco ninfas), representando a unidade experimental (parcela) dos bioensaios. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições.

Figura 2. Aplicação de suspensão fúngica em adultos de *Scaptocoris carvalhoi*.

A viabilidade dos conídios foi avaliada para cada isolado, utilizando-se quatro lâminas com meio BDA+antibiótico tetraciclina mantidas em gerbox, sendo a suspensão pulverizada com aparelho nebulizador. As lâminas foram mantidas em B.O.D. $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ com fotofase 12h e, posteriormente, realizadas as contagens de conídios viáveis.

Avaliou-se a mortalidade dos insetos aos 5, 8, 12, e 15 dias após a inoculação do fungo, efetuando-se a troca de alimento e repondo a umidade do solo no gerbox, quando necessário. Para a confirmação da causa *mortis*, os insetos foram colocados, em placas de Petri contendo papel filtro esterilizado e um recipiente com algodão umedecido em água destilada e autoclavada (Fig.3). As placas foram vedadas com parafilm e mantidas em B.O.D. a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, sem fotofase.

Figura 3. Placa de Petri e papel filtro esterilizados contendo recipiente com algodão umedecido e *Scaptocoris carvalhoi* para confirmação de causa *mortis*.

Os valores de mortalidade do percevejo (x) obtidos para cada isolado, nas cinco concentrações, foram transformados para $\arcsen \sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores de mortalidade das diferentes doses de cada isolado, foram submetidas à Análise de Probit, utilizando o programa MOBAE (Haddad *et al.* 1995), para determinar a Dose Letal (DL_{50}). O TL_{50} também foi determinado, para os quatro isolados testados, empregando a dose de 500.000 conídios/inseto.

Patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* em casa de vegetação. Os bioensaios em casa de vegetação foram realizados após avaliação da patogenicidade dos isolados em laboratório, onde realizou-se a seleção de dois isolados mais infectivos. Esses isolados foram multiplicados na *Embrapa Soja*, sendo a produção de conídios realizada utilizando arroz cozido, como meio de cultura, conforme metodologia de Leite *et al.* (2003).

Para instalação dos bioensaios, o número de conídios por mg do material formulado foi quantificado. Para isso, adicionou-se em um tubo de ensaio 10 mg do isolado e acrescentou-se 7ml de espalhante adesivo (Tween 80 0,01%). Após isso, a suspensão foi homogeneizada com aparelho vortex e realizada diluição com fator de 10. Essa suspensão foi homogeneizada novamente e o número de conídios determinado através da câmara de Neubauer, sendo esse processo repetido três vezes. Com isso, foi possível determinar a dose de conídios a ser aplicada por vaso considerando-se a equivalência de 10^{13} conídios viáveis/ha. A viabilidade dos conídios foi determinada antes da montagem dos bioensaios, sendo empregada à mesma metodologia utilizada no laboratório.

As parcelas foram constituídas por vasos de 5 litros, contendo quatro quilos de terra peneirada, retirada do mesmo local em que os insetos foram coletados. A terra foi umedecida com 400ml de água destilada e acrescentadas quatro raízes de algodoeiro e oito sementes dessa cultura em cada vaso. Em cerca de 5cm de profundidade da terra do vaso, foram adicionados 0,17g de conídios do fungo e, sobre esses, os insetos (Fig. 4 e 5).

Figura 4. Vasos contendo *Scaptocoris carvalhoi* (ninfas e adultos) e o fungo *Metarhizium anisopliae* (Ma69). (Experimento em casa de vegetação).

Figura 5. Experimento instalado em casa de vegetação.

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado contendo dois tratamentos (com fungo e sem fungo) em doze repetições, sendo cada parcela constituída por quinze insetos (10 adultos e 5 ninfas). Em outro bioensaio, avaliou-se a patogenicidade de *M. anisopliae* para adultos e ninfas de *S. carvalhoi*. Para cada fase do inseto (adulto/ninfa) tratada com fungo, houve uma testemunha (sem tratamento), totalizando 4 tratamentos. O bioensaio foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo a parcela constituída de 15 insetos/vaso.

A mortalidade, em ambos bioensaios, foi avaliada aos 12 dias após a instalação do experimento, sendo a temperatura e umidade relativa do ar registradas durante o período experimental. Para a determinação da causa *mortis* foi utilizada mesma metodologia empregada nos bioensaios de laboratório.

Os valores de mortalidade do percevejo (x) foram transformados para $\arcsen \sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de T a 5% de probabilidade.

4.5. Resultados e Discussão

A infectividade dos isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre ninfas e adultos de *Scaptocoris carvalhoi* foi verificada quando os insetos apresentavam corpo endurecido e a conidiogênese comprovada pelo desenvolvimento da massa micelial (coloração branca) e produção de conídios (coloração verde). Esses conídios foram observados utilizando-se microscópio óptico com aumento de 400x e apresentaram estrutura cilíndrica e estreita no meio, com conidióforos contendo conídios dispostos em cadeia (Fig.6).

Figura 6. Micélios e conídios do fungo *Metarhizium anisopliae* em *Scaptocoris carvalhoi*

Dose Letal (DL₅₀) e Tempo Letal (TL₅₀): Os isolados de *M. anisopliae* utilizados nos bioensaios da DL₅₀ apresentaram viabilidade média de 99 %.

Os valores de mortalidade devido aos isolados Ma7, Ma69, Ma283 e Ma352, nas diferentes concentrações testadas, bem como os respectivos valores da Dose Letal (DL₅₀) estão representados na Tabela 2. De um modo geral, para todos os isolados de *M. anisopliae* testados observou-se um incremento significativo na percentagem de mortalidade do percevejo com o aumento da dose do fungo, fato esse também já constatado por outros autores estudando esses mesmos fungos para outras espécies de insetos (Alves *et al.* 1985; Vilas Boas & Alves 1988 e Silva *et al.* 2003). Segundo Fernandes & Alves (1992), quanto mais conídios penetram, mais toxinas ou enzimas são liberadas, acelerando a mortalidade do inseto. Sosa-Gómez & Moscardi (1992) também destacaram que a velocidade de ação do fungo depende, além da dosagem, das espécies hospedeiras envolvidas.

O isolado Ma7, em todas as doses, ocasionou mortalidade de *S. carvalhoi* superiores à testemunha, embora a menor dose proporcionasse apenas 11,67% de mortalidade. As mortalidades de *S. carvalhoi* obtidas com os isolados Ma69 e Ma352 na dose de 50 conídios/inseto não diferiram da mortalidade obtida na testemunha, enquanto que no isolado Ma283 esse fato foi observado nas doses de 50 e 500 conídios/inseto.

Os maiores valores de mortalidade foram observados nas doses de 50.000 e 500.000 conídios/inseto, nas quais as mortalidades diferiram significativamente entre si dentro de um mesmo isolado somente para Ma69. Na dose de 5.000 conídios/inseto foram observados valores de mortalidade variando de 26,8 a 51,7%. Na dose de 500.000 conídios/inseto foram observadas mortalidades variando de 56,7 a 96,7%, sendo a maior percentagem de mortalidade apresentada pelo isolado Ma69, diferindo estatisticamente dos isolados Ma283 e Ma352 (Tabela 3).

Os resultados dessa pesquisa são promissores quando comparados com os obtidos por Batista Filho *et al.* (1996) ao constatarem que um isolado de *M. anisopliae*, inoculado através de pulverização na concentração de $0,4 \times 10^9$, causou mortalidade de apenas 50% em ninfas e adultos de *Scaptocoris castanea*, em laboratório. A infectividade de isolados de *M. anisopliae* sobre o percevejo castanho da raiz também foi testada, em laboratório, por Malaguido *et al.* (2000), utilizando metodologia similar com aplicação tópica de 30.000 conídios/inseto, obtendo mortalidade de 31%, sendo que nesta pesquisa na dose de 5.000 conídios/inseto a percentagem de mortalidade variou de 26,8 a 51,7%. Quando esses mesmos autores submeteram o isolado a uma maior concentração, mediante mistura com caulim, a eficiência de *M. anisopliae* foi mais acentuada, atingindo 63%. Mesmo assim, os índices na mortalidade obtidos por esses autores foram inferiores aos encontrados nessa pesquisa.

Verifica-se através da Tabela 2, que os menores valores da Dose Letal (DL_{50}) foram observados com os isolados Ma69 (5.423,75) e o Ma7 (7.658,42) e o maior valor com Ma283 (163.341,95), enquanto que o Ma352 apresentou valor intermediário (45.051,56). Esses resultados evidenciam que os isolados Ma69 e Ma7 apresentaram, significativamente, maior virulência e patogenicidade para *S. carvalhoi* do que o isolado Ma283. A determinação da Dose Letal (DL_{50}) é importante, pois revela qual isolado é mais eficiente para o controle do inseto. No entanto, Silva *et al.* (2003) argumentaram que a percentagem de mortalidade final constitui um parâmetro mais adequado para avaliar a virulência de fungos para os insetos, do que a rapidez com que essa mortalidade se processa. O TL pode ser empregado como informação complementar para avaliação da patogenicidade de um determinado fungo. Com base nos resultados obtidos verifica-se que os isolados Ma69 e Ma7 de *M. anisopliae* têm potenciais para serem empregados visando o controle de *S. carvalhoi*, pois foram eficazes na mortalidade e proporcionaram menores valores de DL_{50} e TL_{50} .

Resultados obtidos em laboratório, em condições ambientais favoráveis, são relevantes, pois permitem a seleção de fungos entomopatogênicos para serem testadas em condições de campo.

A determinação do Tempo Letal (TL₅₀) foi realizada com base na infectividade de *M. anisopliae* para o percevejo, ao longo do tempo, a qual variou de 56,7 a 96,7% entre os isolados testados (Tabela 3). Os valores de TL₅₀ variaram de 0,32 a 5,84 dias, sendo o menor valor constatado para o isolado Ma7 e o maior para Ma283, embora não diferissem estatisticamente, entre si, com base nos intervalos de confiança dos mesmos (Tabela 3). De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que os isolados de *M. anisopliae* testados não diferiram quanto à toxicidade para *S. carvalhoi*, embora o Ma7 apresentasse TL₅₀ cerca de 18 vezes inferior ao valor de TL₅₀ para Ma283.

Patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* em casa de vegetação: Com base nos resultados da DL₅₀ e TL₅₀ obtidos em laboratório, os isolados Ma69 e Ma7 foram selecionados para produção de conídios visando a condução dos bioensaios em casa de vegetação. Todavia, a insuficiente esporulação do isolado Ma7, não permitiu multiplicar esse isolado em quantidade suficiente para os testes, sendo utilizado apenas o isolado Ma69 nessa etapa.

Nos vasos contendo o fungo Ma69, a percentagem de mortalidade de adultos e ninfas de *S. carvalhoi* foi de 57,3%, enquanto nos vasos sem fungo a mortalidade do percevejo foi de 7,5% (Tabela 4). Quando ninfas e adultos foram submetidos à presença do fungo separadamente, o índice de mortalidade foi significativamente maior para ninfas (80,8%) do que para adultos (32,2%), sendo em níveis de mortalidade significativamente diferentes com relação a testemunha (Tabela 5). Esses resultados diferem daqueles obtidos, em laboratório, quando não houve diferença estatística na mortalidade do isolado Ma69 testado separadamente em ninfas e adultos de *S. carvalhoi*. A diferença na toxicidade entre essas fases no laboratório e em casa de vegetação, pode estar relacionada ao modo de inoculação do patógeno, uma vez que no laboratório o fungo foi aplicado diretamente sobre o corpo do inseto, enquanto que em casa de vegetação o mesmo foi colocado no solo. Por outro lado, as ninfas possuem exoesqueleto menos quitinizado que os adultos, sendo, provavelmente, mais suscetíveis às ações físicas e químicas de fungos, tornando intrínsecas as relações patógeno-hospedeiro.

Pesquisas que demonstram qual a fase do inseto é mais vulnerável a ação de fungos podem auxiliar na determinação do momento em que o fungo deve ser aplicado a campo de modo a maximizar a eficácia de controle. Os resultados encontrados nesta pesquisa vêm de encontro aos obtidos por Alves (1998b), quando descreveram que a aplicação a campo de um isolado de *M. anisopliae* tende a proporcionar maior índice de controle sobre gerações mais populosas de ninfas

das cigarrinhas-das-pastagens dos gêneros *Mahanarva*, *Deois* e *Zulia*. O mesmo ocorre com as cigarrinhas da cana-de-açúcar *Mahanarva posticata* (Stal) e *Mahanarva fimbriolata* (Stal), que segundo esses autores, as ninfas foram mais suscetíveis ao fungo, fase essa que proporciona maior oportunidade de contaminação.

Várias pesquisas têm verificado o efeito da patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* em percevejo castanho. Amaral *et al.* (1999) pesquisando o potencial de *M. anisopliae* sobre *Atarsocoris brachiariae* constataram eficiência entre 30 e 80%, sendo que esses valores estavam relacionados com a época de revoada, cobertura vegetal e umidade do solo e incorporação de matéria orgânica. Malaguido *et al.* (2000) avaliaram a patogenicidade de isolados de *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces* sp. ao percevejo castanho, constatando que o fungo com maior infectividade em adultos de *S. castanea* foi *M. anisopliae*. A utilização de *M. anisopliae* poderá constituir uma alternativa viável para controle do percevejo-castanho-das-raízes, principalmente quando associado a inseticidas químicos (Amaral *et al.* 2002). Todavia Alves (1986) argumentaram que fungos entomopatogênicos podem ser inibidos por agrotóxicos, comprometendo o manejo integrado. Dessa forma, deve-se utilizar defensivos agrícolas seletivos a esses fungos em programa de manejo integrado (Alves *et al.* 1998; Moino & Alves 1998 e Mourão *et al.* 2003). Na tentativa de controlar o percevejo-castanho-das-raízes Amaral *et al.* (2002) avaliaram inseticidas químicos que podem ser compatíveis com o fungo *M. anisopliae* e obtiveram resultados positivos. Esses autores destacaram que outros isolados de *M. anisopliae* podem ser testados com vários princípios ativos a fim de avaliar a associação entre eles, auxiliando, assim, no manejo integrado dessas pragas.

Os resultados obtidos nessa pesquisa em casa de vegetação fornecem suporte para o controle microbiano de *S. carvalhoi* através de isolados de *M. anisopliae*, uma vez que foi observado controle de até 80,8% de ninfas dessa espécie. Mesmo com níveis de mortalidade de 57,3%, o isolado Ma69 pode ser considerado importante como agente de controle, pois quando em associação com outras táticas poderá alcançar índices satisfatórios de redução populacional da praga (Tabela 4 e 5). Resultados semelhantes foram apresentados por Alves (1998b) que ao aplicar sobre a cigarrinha-das-pastagens um isolado do fungo *M. anisopliae*, na forma de pó molhável na dosagem mínima de 5×10^{12} , obtiveram mortalidade entre 10 e 60%. Segundo esse autor tais resultados são excelentes pois a eficiência do fungo, em regiões favoráveis, pode até superar o efeito dos inseticidas químicos.

Com base nos resultados encontrados nessa pesquisa conclui-se que o isolado Ma69 é altamente infectivo para *S. carvalhoi* em laboratório e casa de vegetação. Esses resultados são representativos e indicam potencial para utilização desse fungo como inseticida microbiano em condições de campo. Outras pesquisas devem ser desenvolvidas a campo para determinar condições

ambientais que favoreçam a epizootia do fungo, bem como o desenvolvimento de tecnologia para sua formulação visando seu emprego no controle desse inseto de solo, oferecendo, assim, uma excelente alternativa de manejo.

Tabela 1. Isolados¹ de *Metarhizium anisopliae* utilizados nos bioensaios com *Scaptocoris carvalhoi*, em Dourados, MS/2003.

Isolado	Hospedeiro	Coleções de Culturas
Ma 7	solo	Embrapa-Soja, PR
Ma 69	<i>Phyllophaga cuyabana</i>	Embrapa-Soja, PR
Ma 283	<i>Scaptocoris castanea</i>	Embrapa-Soja, PR
Ma 352	<i>Deois</i> sp.	CP 225 CG491

¹Catálogo de fungos entomopatogênicos (Sosa-Gómez e Silva 2002)

Tabela 2. Mortalidade de *Scaptocoris carvalhoi* sobre o efeito de diferentes doses de *Metarhizium anisopliae* e DL₅₀ (n= 60) em Dourados, MS/2003.

Isolados	Concentração (conídios/ ml)	Dose (conídios /5ul)	Mortalidade (%)	DL ₅₀ (IC) ^a	Equação da reta	X ² ^b
Ma7	10 ⁴	50	11,7 ± 3,19 d	7.658,42 (5.719,94 – 10.253,86)	Y= 2,96617 + 0,52363 logx	0,20 ns
	10 ⁵	500	28,3 ± 4,19 cd			
	10 ⁶	5.000	45,9 ± 4,77 bc			
	10 ⁷	50.000	65,0 ± 5,69 ab			
	10 ⁸	500.000	83,3 ± 5,77 a			
Testemunha		-	0,0 ± 0,00 e			
Ma69	10 ⁴	50	3,3 ± 1,92 d	5.423,75 (2.810,40 – 10.467,24)	Y= 1,90204 + 0,82960 logx	2,06 ns
	10 ⁵	500	21,7 ± 6,87 c			
	10 ⁶	5.000	51,7 ± 4,19 b			
	10 ⁷	50.000	73,3 ± 2,72 b			
	10 ⁸	500.000	96,7 ± 1,92 a			
Testemunha		-	0,0 ± 0,00 d			
Ma283	10 ⁴	50	6,7 ± 0,00 bc	163.341,95 (80.155,15– 332.861,87)	Y= 2,72633 + 0,43615 log	0,46 ns
	10 ⁵	500	11,7 ± 5,00 bc			
	10 ⁶	5.000	26,8 ± 7,09 ab			
	10 ⁷	50.000	43,3 ± 6,94 a			
	10 ⁸	500.000	56,7 ± 7,93 a			
Testemunha		-	0,0 ± 0,00 c			
Ma352	10 ⁴	50	1,7 ± 1,67 d	45.051,56 (8.990,55 – 225.752,86)	Y= 2,55339 + 0,52573 logx	4,84 ns
	10 ⁵	500	16,7 ± 1,92 c			
	10 ⁶	5.000	38,3 ± 4,19 b			
	10 ⁷	50.000	53,3 ± 4,71 ab			
	10 ⁸	500.000	65,0 ± 7,39 a			
Testemunha		-	0,0 ± 0,00 d			

^aCL₅₀= Concentração letal / IC = Intervalo de Confiança a 5% de probabilidade

^b X² = Teste X²- (**ns**) não significativo

Médias (± EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Mortalidade de *Scaptocoris carvalhoi* sobre o efeito de *Metarhizium anisopliae* na dose de 500.000 conídios/inseto e tempo letal TL₅₀ (n= 60) em Dourados, MS/2003.

Isolados	Mortalidade (%)	TL ₅₀ e IC (dias) ¹	Equação da reta	Calculado X ²²
Ma69	96,7 ± 1,92 a	1,42 (0,24 – 8,30)	Y= 4,74991 + 1,64865 logx	0,19 ns
Ma7	83,3 ± 5,77 ab	0,32 (0,00 - 154,29)	Y= 5,30532 + 0,60891 logx	0,13 ns
Ma283	56,7 ± 7,93 b	5,84 (4,03 - 8,45)	Y= 4,67560 + 0,42337 logx	0,01 ns
Ma352	65,0 ± 7,39 b	4,47 (2,73 – 7,31)	Y= 4,56201 + 0,67396 logx	0,02 ns

¹TL₅₀= Concentração letal / IC = Intervalo de Confiança a 5% de probabilidade

²X² = Teste X² - (**ns**) não significativo

Médias (± EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Mortalidade de *Scaptocoris carvalhoi* sobre o efeito de *Metarhizium anisopliae*. (Ma69) em casa de vegetação em Dourados, MS/2003.

Bioensaio	Mortalidade (%)
Percevejos tratados	57,3 ± 4,93 a
Percevejos não tratados	7,5 ± 1,99 b

Médias (± EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste T a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Mortalidade de ninfas e adultos de *Scaptocoris carvalhoi* sobre o efeito de *Metarhizium anisopliae* (Ma69) em casa de vegetação em Dourados, MS/2003.

Bioensaio	Mortalidade (%)
Ninfas tratadas	80,8 ± 3,94 a
Ninfas não tratadas	7,0 ± 3,00 c
Adultos tratados	32,2 ± 3,60 b
Adultos não tratados	1,1 ± 1,11 d

Médias (± EP) seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste T a de 5% de probabilidade.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que:

1. Os isolados de *Metarhizium anisopliae* apresentaram maior patogenicidade em *Scaptocoris carvalhoi* do que os isolados de *Beauveria bassiana*;
2. Ninfas e adultos de *S. carvalhoi* não diferiram quanto a suscetibilidade a *M. anisopliae* (Ma 69) quando esse fungo foi aplicado diretamente sobre os insetos. Todavia, as ninfas foram mais suscetíveis do que os adultos nos bioensaios de casa de vegetação, quando esse mesmo fungo foi aplicado sobre o solo;
3. Os isolados de *M. anisopliae* Ma 69 e Ma 7 foram os mais patogênicos em *S. carvalhoi*, os quais também apresentaram os menores valores da Dose Letal (DL_{50}) e de Tempo Letal (TL_{50});
4. O isolado de *M. anisopliae* Ma 69 foi altamente patogênico em *S. carvalhoi* tanto em laboratório quanto em casa de vegetação, constituindo em uma alternativa promissora para sua utilização, como inseticida microbiano, visando o controle dessa praga em condições de campo.

6. LITERATURA CITADA

- Alves, S.B., L.E.M. Pádua, E.M.V.M. Azevedo & L.C. Almeida. 1985.** Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. *Pesq. Agropec. Bras.* 20: 403-406.
- Alves, S.B. 1986.** Fungos entomopatogênicos, p. 73-126. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 407p.
- Alves, S.B. 1992.** Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 27: 77-86
- Alves, S.B., A. Moino Jr. & J.E.M. Almeida. 1998.** Produtos fitossanitários e entomopatógenos, p. 217-238. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B. 1998a.** Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens, p. 21-37. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B. 1998b.** Fungos entomopatogênicos, p. 289-2381. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Amaral, J.L., M.O. Medeiros, V. Borges & J.R. Souza. 1999.** Efeito da associação da matéria orgânica e do fungo *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo-castanho-das-raízes *Atarsocoris brachiariae*. In: *Workshop sobre percevejo castanho da raiz.. Ata e Resumos*. Londrina: Embrapa Soja. Documentos 127. p.51-52.
- Amaral, J.L. & V. Villar. 1999.** Avaliação das perdas do valor nutritivo e da resistência de quatro gramíneas, quanto à ação do percevejo castanho das raízes (*Scaptocoris castanea* Perty, 1830). In: *Workshop sobre o percevejo castanho da raiz. Ata e Resumos*. Londrina: Embrapa-Soja. Documentos 127. p.48-49.
- Amaral, J.L., D.C. Souza, R.L.C. Souza, L.R.B. Correa, S.L. Maidana, L.M.S. Fernandes & R.A. Castro, 2002.** Associação de subdosagens de inseticidas sistêmicos e não sistêmicos com o fungo *Metarhizium anisopliae* no controle do percevejo castanho das raízes em pastagens. *Biodiversidade (UFMT), Rondonópolis, MT.* 1:4-11
- Andrade, A.C. & A.D. Puzzi. 1953.** Experiências com inseticidas orgânicos para controlar o “percevejo castanho” (*Scaptocoris castaneus*) em cana-de-açúcar. *O Biológico* 19:187-189.
- Araújo e Silva A.G., C.R. Gonçalves, D.M. Galvão, A.J.L. Gonçalves, M.N. Silva & L. Simoni. 1968.** Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil seus parasitos e predadores.

- Parte II – 1º Tomo – Insetos, hospedeiros e inimigos naturais. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro, RJ. p.56-57.
- Ávila, C. J.; P. E. Degrande. & S. A. Gomez, 1997.** Insetos-praga: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: Embrapa Centro de Pesquisa Agropecuária Oeste (Dourados, MS). Milho: Informações técnicas. p.162-63.
- Batista-Filho A., C. Lamas & Z.A Ramiro. 1996.** Eficiência de *Metarhizium anisopliae* sobre *Scaptocoris castanea*, em condições de laboratório. Simpósio de controle biológico, 5. Foz do Iguaçu. Anais: Sessão de Posters: p.5.
- Becker, M. 1967.** Estudos sobre a subfamília Scaptocorinae na região neotropical (Hemiptera: Cydnidae). Arquivos de Zoologia, 15: 291-325.
- Becker, M. 1996.** Uma nova espécie de percevejo-castanho (Hemiptera: Cydnidae: Scaptocorinae) praga de pastagens do Centro-Oeste do Brasil. An. Soc. Entomol. 25: 95-102.
- Bellotti, A.C. 1992.** Controle biológico no contexto da agricultura sustentável. III Simpósio de controle biológico. Anais. Águas de Lindóia, SP. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA. p.2-5.
- Berti Filho, E. & A.I. Ciociola. 2002.** Parasitóides ou Predadores? Vantagens e Desvantagens. In: Parra, J.R., P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds). Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores. São Paulo: Manole. p.29-41.
- Borges, V.E., J.L. Amaral & M. Adamowicz. 1999.** Efeito de inseticidas no controle de “percevejo castanho” em soja. In: Reunião sul brasileira sobre pragas de solo, 7. Piracicaba, SP. p.139-140.
- Brisolla, A.D., E.L. Furtado, M.C.F. Cardim & O.S. Kawamoto. 1985.** Ocorrência do percevejo castanho *Scaptocoris castanea* Perty, 1830 – em bananal na região litorânea do estado de São Paulo. Biológico, São Paulo. 51: 135-137.
- Camargo, A.A. & R.F. Amabile. 2000.** Pragas crescem com o girassol. Cultivar, Pelotas, 14:30-31.
- Cooke, W.B. 1979.** The ecology of fungi. CRC Press. United States. p.47.
- Corrêa-Ferreira, B.S. & A.R. Panizzi. 1999.** Percevejos da soja e seu manejo. Londrina: Embrapa-CNPSO. Circular Técnica. 24: 18-19.
- Driesche, R.G. & T.S. Jr Bellows, 1996.** Biological control. New York: Chapman & Hall. p.539.
- Embrapa Soja: Embrapa Agropecuária Oeste: Embrapa Cerrados. Fundação Triângulo. 2003.** Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2004. p.177-178.
- Faria, M.R. & B.P. Magalhães. 2001.** O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 22:18-21.

- Fernandes, P. M. & S.B. Alves. 1992.** Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para o controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera-Termitidae). An. Soc. Entomol. Bras. 21:319-328.
- Fernandes, P. M., R. O. Cruvinel, K. Kobus, C. Czepak & V. R. S. Veloso. 1999.** O percevejo castanho em áreas agrícolas do bioma cerrado. In: V Reunião Sul Brasileira sobre pragas de solo, 7. Piracicaba, SP: USP-ESALQ, Anais. p.49-56.
- Ferreira Lima L.C.S. 1993.** Controle de pragas subterrâneas. São Paulo, SP. Rev. Defesa Vegetal. 36: 24.
- Figueiredo, N.F., E.J. Marques, R.O.R. Lima & J.V. Oliveira. 2002.** Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae). Neotrop. Entomol. 31:397-403.
- Froeschner, R.C. & W.E. Steiner Jr. 1983.** Second record of south American burrowing bug, *Scaptocoris castaneus* Perty (Hemiptera: Cydnidae) in the United States. Entomological News, 94: 176.
- Fundação MT. 1999a.** Percevejo castanho das raízes: pesquisa busca soluções para enfrentar a praga. Cuiabá, MT. Rev. Produtor Rural. 80: 28-30.
- Fundação MT (Rondonópolis, MT) 1999b.** Pesquisas e tecnologia a serviço do produtor. Rondonópolis Fundação MT/Londrina: Embrapa-Soja. p.14-15.
- Gassen, D.N. 1989.** Insetos subterrâneos prejudiciais às culturas no sul do Brasil. Passo Fundo, EMBRAPA-CNPT. p.34-35.
- Gazzoni, D.L., D.R. Sosa-Gómez, F. Moscardi, C.B. Hoffmann-Campo, B.S. Corrêa-Ferreira, L.J. Oliveira & I.C. Corso. 1994.** Insects. In: EMBRAPA-CNPSO (ed) Tropical soybean:improvement and production. Roma: FAO. p.81-108.
- Haddad, M.L., R.C.B. Moraes & J.R.P. Parra. 1995.** MOBAE, Modelos bioestatísticos aplicados à entomologia. Manual. ESALQ/USP. 44p.
- Hajek, A.E. & R.J.S. Leger 1994.** Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review of Entomology. Palo Alto. 39:293-322.
- Huffaker, C.B. & P.S. Messenger. 1976.** Theory and practice of biological control. University of California. Academic Press. p.169-185.
- Leite, L.G., A. Batista Filho, J.E.M. Almeida & S.B. Alves. 2003.** Produção de fungos entomopatogênicos. Ribeirão Preto, SP. ESALQ/USP. 92p.

- Luz, C., L.F.N. Rocha, R.O. Silva, M. Unterseher & N.R. Silva. 2002.** Isolados *in vivo* de fungos entomopatogênicos em amostras de solos. 19^o Congresso Brasileiro de Entomologia, Manaus-AM. p.54.
- Malaguido, A.B., L.J. Oliveira & A.F. Lantmann. 1999.** Efeito da adubação química n população do percevejo castanho, *Scaptocoris castanea* Perty (Cydnidae). VII Reunião Sul Brasileira sobre pragas de solo. Piracicaba, SP. p.100-101.
- Malaguido, A.B., L.O. Oliveira & D.R. Sosa-Gómez. 2000.** Efeito de fungos entomopatogênicos sobre o percevejo-castanho-da-raiz. In: Efeito de inseticidas químicos e de fungos entomopatogênicos sobre o percevejo-castanho-da-raiz: resultados da safra 1999/2000. Londrina: Embrapa-Soja. Documentos 150. p.32-36.
- Marques, E.J., S.B. Alves & I.M.R. Marques. 2000.** Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) após armazenamento de conídios em baixa temperatura. An. Soc. Entomol. Bras. 29:303-397.
- Milles, J.W., B.L. Maass & C.B. Valle. 1996.** Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement. Cali: CIAT / Brasília: Embrapa-CNPCCG. p.93.
- Moino Jr., A. & Alves. 1998.** Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). An. Soc. Entomol. Bras. 27: 611-620.
- Moino Jr., A., A.N. Ferraz Filho, A.E. Piedrabuena, C.L. Messias, D.M.F. Capalbo, E. A. B. Nardo, I.S. Melo, J.L. Azevedo, J.R.S. Lopes, L.F.A. Alves, L.D.P. Meirelles, M.C.C.V. Inglis, M.T. Souza, R.R.H.R. Destefeno, S.B. Alves, S.C.M. Mello, V.L.C.C. Rodrigues, W. Shiler & Z.M.A. Ribeiro. 1998.** Controle biológico. V.1. Embrapa, Jaguariúna-SP. p.264.
- Moscardi, F. 2003.** Situação atual e perspectivas do uso de Entomopatogênicos (Vírus, Fungos e Bactérias). <http://www.ferobio.ufv.br/relatorio/situaent.htm>. Acesso em 15/12/2003.
- Mourão, S.A., E.F. Vilela, J.C. Zanuncio, L. Zambolim & E.S. Tuelher. 2003.** Seletividade de defensivos agrícolas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Neotropical Entomology 32: 103-106.
- Nakano, O. & L.H.A.Q. Telles. 1997.** Percevejos do solo: danos, hábitos e controle. Anais da Reunião sul-brasileira sobre pragas de solo, 6. Santa Maria-RS. p.84-89.
- Nakano, O. 2001.** Oscilações do controle de pragas do algodoeiro no Brasil. III Congresso Brasileiro de algodão, 27 a 31 de agosto, Campo Grande-MS. p.30-34.
- Nakano, O. 2004.** Ainda ameaçador. Cultivar, Pelotas. 58:18-21.

- Oliveira, L.J. 1999.** Diagnóstico e informações gerais sobre o percevejo castanho. In: Workshop sobre percevejo castanho da raiz. Ata e Resumos. Londrina: Embrapa Soja. Documentos 127. p.16-17.
- Oliveira, L.J., A.B. Malaguido, I.C. Corso, J. Nunes Jr., C.R. de Souza & S. de Angelis. 2000a.** Manejo do percevejo castanho da raiz: resultados de pesquisa. Anais do Congresso de tecnologia e competitividade da soja no mercado global. Cuiabá, MT. Fundação MT. p.171-175.
- Oliveira, L. J., A.B. Malaguido, J. Nunes Jr, I.C. Corso, S. de Angelis, L.C. Faria, C.B. Hoffmann-Campo & A.F. Lantmann. 2000b.** Percevejo-castanho-da-raiz em sistemas de produção de soja. Londrina: Embrapa Soja. Circular Técnica 28. 44p.
- Oliveira, M.A.S., R.T. Alves, J.F. Fialho & N.T.V. Junqueira. 2001.** Patogenicidade de fungos entomógenos sobre o percevejo-de-renda da mandioca no Distrito Federal. Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico. Brasília, DF. p.1-2.
- Oliveira, C. & O. Sales Junior. 2002.** Utilização de diferentes técnicas para o manejo do percevejo castanho *Atarsocoris brachiariae* Becker, 1996. Biodiversidade/Departamento de Ciências Biológicas – Instituto de Ciências Exatas e naturais – UFMT – Rondonópolis, MT. p.110-115.
- Oliveira, E.D.M., A. Pasini & I.C.B. Fonseca. 2003.** Association of the soil bug *Atarsocoris* sp. (Hemiptera: Cydnidae) with the weed *Senecio brasiliensis* Less. Neotrop. Entomol. 32:155-158.
- Quintela, E.D., Yokoyama, L.P. & Roberts, D.W. 1994.** Metodologia e custo de produção de *Metarhizium anisopliae* em quirera de arroz. Embrapa CNPA, Brasília. 20p.
- Raga, A. & R.C. Siloto. 1999.** Histórico e situação atual do percevejo castanho (Hemíptera: Cydnidae) no estado de São Paulo. In: Workshop sobre o percevejo castanho da raiz. Ata e resumos. Londrina: Embrapa-Soja. Documentos 127. p.41-42.
- Rizzo, H.F. 1979.** Hemípteros de interés agrícola: Chinchas perjudiciales y chinchas benéficas para los cultivos. Bueno Aires – Argentina. editorial Hemisferio Sur S.A. p.32
- Rosa, J.M.O., S.R.S. Wilcken, J.E. Sartori & S. de Angelis. 2002.** Avaliação da eficácia do nematóide entomopatogênico (*Steinernema carpocapsae*) no controle do percevejo castanho da raiz (*Scaptocoris castanea*) em solo. In IX Reunião científica de Ciências Agrárias de Lageado. UNESP. <http://www.fca.unesp.br/rcl2002/pdf/a05r04.pdf> . Acesso em 05/01/04.
- Sales Jr, O. & M.O. Medeiros. 2001.** Percevejo castanho da raiz em pastagens. In: Anais da Reunião Sul-Brasileira sobre pragas de solo, 8. p.71-79.

- Santos W.J. 2001.** Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In Algodão: tecnologia de produção. *Embrapa Agropecuária Oeste*: Embrapa Algodão. Dourados, MS. p.210-211.
- Sartori, J.E., S.R.S. Wilcken, J.M.O. Rosa & S. de Angelis. 2002.** Comportamento de *Steinernema carpocapsae* nos diversos estágios de desenvolvimento do percevejo castanho da raiz (*Scaptocoris castanea*). In IX Reunião científica de Ciências Agrárias de Lageado. UNESP. <http://www.fca.unesp.br/rcl2002/pdf/a05r03.pdf>. Acesso em 05/01/04.
- Silva, C.A.D. 1999.** Percevejo castanho: ou ele ou o algodão. Cultivar, Pelota, RS, 1:16-17.
- Silva, C.A.D. 2001.** Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília. 36:243-247.
- Silva, V.C.A., R. Barros, E.J. Marques & J.B. Torres. 2003.** Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Neotrop. Entomol.* 32:653-658.
- Smith, D & A.H.S. Onion. 1983.** The Preservation and Maintenance of living fungi. Commonwealth Mycological Institute.
- Sosa-Gómez, D.R. & F. Moscardi. 1992.** Epizootiologia: chave dos problemas para o controle microbiano com fungos. Anais. Águas de Lindóia, SP. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA. p.64-69.
- Sosa-Gómez, D.R. 1999.** Control Microbiano de Insectos con Hongos – Estado actual del control biológico de plagas agrícolas con hongos entomopatógenos. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 58:295-300.
- Sosa-Gómez, D.R. & S.B. Alves. 2000.** Temperature and Relative Humidity Requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). *An. Soc. Entomol. Bras.* 29:515-521.
- Sosa-Gómez, D.R. & J.J. Silva. 2002.** Fungos entomopatogênicos: Catálogo de fungos. Londrina: Embrapa Soja. Documentos 188. 32p.
- Viana, P.A., I.Cruz, L.J. Oliveira & B.S. Corrêa-Ferreira. 2001.** Manejo de pragas em agroecossistemas sob plantio direto. Belo Horizonte, MG. Informe agropecuário. 22:63-72.
- Viana, P.A., I. Cruz & J.M. Waquil. 2003.** Pragas que atacam sementes e raízes. <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/prsementes.htm>. Acesso em 15/12/03.
- Vilas Bôas, A.M. & S.B. Alves. 1988.** Patogenicidade de *Beauveria bassiana* sp. e seu efeito associado ao inseticida monocrotofós sobre *Castnia licus* (Drury, 1770) (Lepidoptera: Castniidae). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 17: 305-332.