



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

ADRIAN ARTURO ARISPE TORREZ

EFETIVIDADE DOS CONTROLES DE PRAGAS DAS SEMENTES E MUDAS DE *Aniba*
***rosaeodora* DUCKE**

MANAUS
2018

ADRIAN ARTURO ARISPE TORREZ

EFETIVIDADE DOS CONTROLES DE PRAGAS DAS SEMENTES E MUDAS DE *Aniba rosaeodora* DUCKE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio

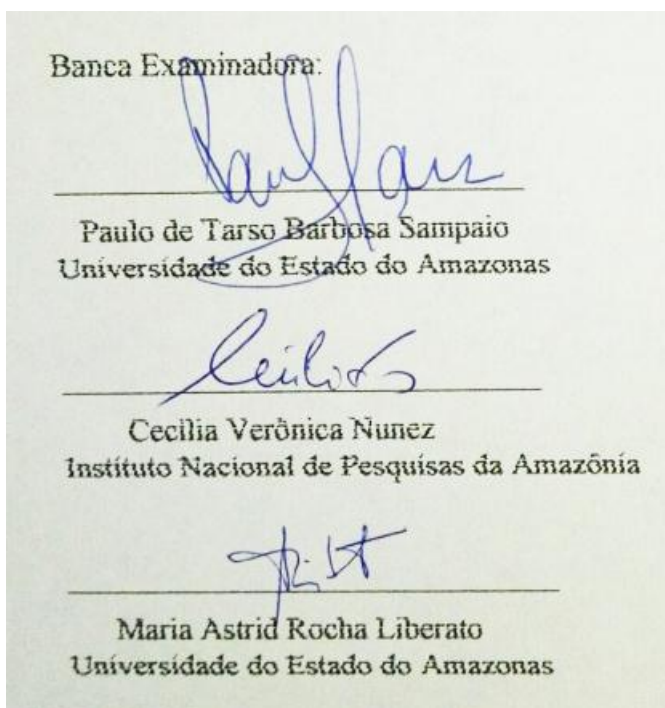
**MANAUS
2018**

ADRIAN ARTURO ARISPE TORREZ

EFETIVIDADE DOS CONTROLES DE PRAGAS DAS SEMENTES E MUDAS DE *Aniba rosaeodora* DUCKE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação: 22/02/2018



**MANAUS
2018**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

T694e	<p>Torrez, Adrian Arturo Arispe Efetividade dos controles de pragas das sementes e mudas de Aniba rosaeodora Ducke / Adrian Arturo Arispe Torrez. Manaus : [s.n], 2018. 67 f.: color.; 21 cm.</p> <p>Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018. Inclui bibliografia Orientador: Paulo de Tarso Barbosa Sampaio</p> <p>1. Beauveria bassiana. 2. Heilipus odoratus. 3. Sementes. 4. Tratamento químico. 5. Viveiros. I. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Efetividade dos controles de pragas das sementes e mudas de Aniba rosaeodora Ducke</p>
-------	---

Dedico

*Todo prêmio por merecimento é ou deve ser tido como uma esponja embebida de estímulo, apoio e confiança. Que este seja o símbolo da dedicação de todos que me ajudaram na realização deste projeto. Especialmente ao meu orientador **Paulo de Tarso Barbosa Sampaio** pela força em todo momento e por guiar meus passos na condição de mestrando. Muito obrigado!*

“Um arqueiro queria caçar a lua. Noite após noite, sem descansar, jogou as setas para a estrela. Os vizinhos começaram a zombar dele. Imutável, ele continuava jogando suas flechas. Ele nunca caçou a lua, mas ele se tornou o melhor arqueiro do mundo”

Alejandro Jodorowsky

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade de viver esta linda experiência no Brasil através da Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB).

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de continuar meus estudos através do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – MBT, especialmente ao senhor coordenador o Dr. Cleiton Fantin Rezende e a Dorothy Ávila, secretária do programa.

A CNPq, pelo auxílio financeiro que foi essencial para desenvolver o presente estudo.

Ao Dr. Paulo de Tarso, pela orientação, compreensão e apoio durante o período do mestrado, por sempre estar disponível para conversar, e por reduzir ao mínimo os problemas que aconteceram durante o desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Larissa Ramos e Dra. Kally Souza pelo apoio técnico no Laboratório de Fungos Comestíveis.

À Dra. Suely Costa pela ajuda e apoio durante as análises estatísticas.

Ao Eng. Flávio Bruno, e ao Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais (LASTED), pela ajuda, disponibilidade dos materiais e pelas instalações de trabalho.

Ao Dr. Jair do Laboratório de Ecologia da UEA, pela disponibilidade dos materiais para análises dos experimentos.

À Dra. Angela Maria Imakawa pelo apoio em todo momento e sugestões que me permitiram continuar no caminho certo.

Aos meus colegas: Andrei, Andrea, Bárbara, Elaine, Jhuan, Perla, Rodrigo Felipe, Rodrigo Maciel, Rossiane, Tayana, especialmente ao Ralyvan Araújo pela força e apoio incondicional em todo momento.

Aos meus amigos da casa do estudante: Alinda, Dirceu, Dioneu, Priscila, Janaina e Pará pelos lindos momentos.

Um agradecimento especial a minha mãe Carmen Torrez, meu irmão Pedro Andres Martinez, meus padrinhos José González e Miriam Mercado e aos meus professores: Alejandro Araújo Murakami e Andrés Coimbra Ovando.

RESUMO

Poucas são as informações referentes às pragas das sementes e mudas do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) disponíveis na literatura científica. Alguns trabalhos indicam que o inseto identificado como *Heilipus odoratus* Vanin & Gaiger (Coleóptera, Curculionidae, Molytinae) tem elevada ocorrência nos plantios experimentais da Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus. No viveiro florestal do Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais (LASTED/INPA) foi observado que 50% das mudas apresentavam danos nos brotos terminais e folhas. A necessidade de aprofundar os estudos dos métodos de controle de pragas na fase do viveiro nos estimulou a formular uma proposta para avaliar os efeitos do tratamento químico e biológico sobre as sementes de *A. rosaeodora* e a influência no desenvolvimento inicial das mudas nos primeiros nove meses de idade, bem como a capacidade de virulência do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre o *H. odoratus* na fase adulta. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Silvicultura e de Cultivo de Fungos Comestíveis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Os resultados demonstram que o tratamento químico foi mais eficiente nas sementes coletadas na copa da árvore em relação às colhidas no chão. O tratamento biológico em sementes aumentou as taxas de germinação fato que possibilitou a produção de maior número de mudas aptas para o plantio. A pulverização com *B. bassiana* sobre os besouros adultos de *H. odoratus*, apresentou capacidade de infestação nas concentrações 1×10^7 conídios.mL. Conclui-se que o controle químico e biológico das pragas que predam as sementes e mudas de pau-rosa foi efetivo, além de representar uma nova fonte de pesquisa para desenvolver estudos posteriores com ênfases na área de Silvicultura e Biotecnologia Vegetal.

Palavras Chave: *Beauveria bassiana*, *Heilipus odoratus*, Tratamento químico, Viveiros.

Abstract

There is very few information referring to pests on seeds and seedlings of rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) available in the scientific literature. Some studies indicate that the insect identified as *Heilipus odoratus* Vanin & Gaiger (Coleoptera, Curculionidae, Molytinae) has a high occurrence in the experimental plantations of the Adolpho Ducke Forest Reserve in Manaus. In the forest nurseries of the Laboratory of Forestry and Digital Technologies (LASTED / INPA), it was observed that 50% of the seedlings presented damages to the terminal shoots and leaves. The need to improve the pest control methods in the nursery stage stimulated us to elaborate a proposal to evaluate the effects of chemical and biological treatment on the seeds of *A. rosaeodora* and their influence on the initial development of the seedlings in the first nine months of age, as well as the virulence capacity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on *H. odoratus* in adulthood. The experiments were carried out at the Laboratories of Silviculture and Mushroom Farming belongs to the National Institute for Amazonian Research. The results demonstrate that the chemical treatment was more efficient in the seeds collected from the tree canopy than those collected on the forest floor. The biological treatment in seeds increased the germination rates, fact that made possible the production of more seedlings suitable for planting. Spraying with *B. bassiana* on adult beetles of *H. odoratus* showed capacity of virulence at concentrations 1×10^7 conidia.mL. It was concluded that the chemical and biological control of the pests that prey on rosewood seeds and seedlings was effective, besides representing a new source of research for developing later studies with emphasis in the area of Silviculture and Plant Biotechnology.

Key Words: *Beauveria bassiana*, *Heilipus odoratus*, Chemical treatment, Plant nursery.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Interação entre tipos de coletas de sementes e os tempos de imersão	32
Tabela 2. Interação entre as sementes com e sem tegumento tratadas com o fungo entomopatogênico <i>Beauveria bassiana</i>	33

CAPÍTULO II

Tabela 1. Altura, diâmetro do colo, número de folhas e coeficiente de variação de plantas jovens de <i>A. rosaeodora</i> originadas de sementes tratadas com inseticida e extrato do fungo entomopatogênico <i>B. bassiana</i>	46
Tabela 2. Massa seca, relação raiz/parte aérea, área foliar e razão da área foliar de plantas jovens de <i>A. rosaeodora</i> , originadas de sementes tratadas com inseticida e extrato do fungo entomopatogênico <i>B. bassiana</i>	47
Tabela 3. Troca de gases e características fotossintéticas nas plântulas de <i>A. rosaeodora</i> de 8 meses de idade, originadas de sementes tratadas com inseticida e extrato do fungo entomopatogênico <i>B. bassiana</i> . Fotossíntese líquida (A), respiração no escuro (R _d) condutância estomática (g _s) transpiração (E) e eficiência no uso de água (EUA). Médias de quatro plântulas (±desvio padrão).	48

CAPÍTULO III

Tabela 1. Resultado do desenvolvimento das sementes atacadas pelo <i>Heilipus odoratus</i>	59
Tabela 2. Efeitos de <i>Beauveria bassiana</i> na mortalidade dos besouros adultos do <i>Heilipus odoratus</i>	61

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Distribuição geográfica de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke.....	13
Figura 2. <i>Heilipus odoratus</i> na fase de adulto.....	16
Figura 3. Ataque de <i>Xylosandrus compactus</i> em mudas de <i>Aniba rosaeodora</i>	17

CAPITULO I

Figura 1. Imagem da placa de raios-X de sementes de <i>Aniba rosaeodora</i> . A) Sementes atacadas pelas larvas do <i>Heilipus odoratus</i> B) Sementes em ótimo estado fitossanitário (sadias).....	28
Figura 2. Percentagem de germinação de sementes de <i>A. rosaeodora</i> , coletadas na copa da árvore e no chão, tratadas com inseticida na concentração de 5mL.L ⁻¹	30

CAPÍTULO II

Figura 1. Viveiro do Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais – INPA.....	40
Figura 2. Avaliação do crescimento das mudas. A) Medição do diâmetro do colo (mm). B) Medição da altura (cm).....	41
Figura 3. Preparação das mudas para digitalização. A) Mudas completas. B) Separação das folhas. C) Separação das raízes.	42
Figura 4. Medição das trocas gasosas das folhas de <i>A. rosaeodora</i> com o medidor fotossintético IRGA.....	43
Figura 5. Análise de pigmentos cloroplastidicos de <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke.....	45
Figura 6. Box-plot do conteúdo de pigmentos de clorofila na base da massa foliar, originadas de sementes tratadas com inseticida e extrato do fungo entomopatogênico <i>Beauveria bassiana</i> (controle; Grupo 1; Grupo 2). Clorofila a (<i>Chl a</i>); clorofila b (<i>Chl b</i>); clorofila total (<i>Chl a + Chl b</i>); carotenoides (C_{x+c}), clorofila a / b (<i>Chl a / Chl b</i>) e clorofila total / carotenoides ($Chl\ total / C_{x+c}$).....	49

CAPÍTULO III

Figura 1. Frutos de <i>Aniba rosaeodora</i> atacados pelo <i>Heilipus odoratus</i>	56
Figura 2. Criação do <i>Heilipus odoratus</i> com folhas de <i>Aniba rosaeodora</i> como fonte de alimentação.	57
Figura 3. Aplicação do fungo entomopatogênico <i>Beauveria bassiana</i> sobre o <i>Heilipus odoratus</i>	58
Figura 4. Germinação de sementes de <i>Aniba rosaeodora</i> , atacadas pelo <i>Heilipus odoratus</i> ...59	
Figura 5. Ciclo completo do desenvolvimento do <i>Heilipus odoratus</i> , dentro das sementes de <i>Aniba rosaeodora</i>	60
Figura 6. Ataques do <i>Heilipus odoratus</i> em mudas de <i>Aniba rosaeodora</i> de três meses de idade (A). Rebrotas lateral (B) e apical (C) em função do ataque.	60
Figura 7. Implicações de colonização do fungo entomopatogênico <i>Beauveria bassiana</i> sobre o <i>Heilipus odoratus</i> . A) Cabeça com indícios de colonização. B) Vista frontal do ataque.	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 <i>ANIBA ROSAEODORA</i> DUCKE VAR. AMAZÔNICA.....	13
2.2 SEMENTES ORTODOXAS E RECALCITRANTES.....	15
2.3 PRINCIPAIS PRAGAS DE <i>ANIBA ROSAEODORA</i> DUCKE.....	15
2.3.1 <i>Heilipus odoratus</i> Vanin & Gaiger (Coleóptera: Curculionidae: Molytinae).....	15
2.3.2 <i>Xylosandrus compactus</i> (Coleóptera: Curculionidae: Scolytidae).....	16
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO	17
2.5 HISTORIA E BIOLÓGIA DE <i>BEAUVERIA BASSIANA</i>	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO I	23
1 INTRODUÇÃO	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 COLETAS DO MATERIAL BIOLÓGICO	27
2.2 BENEFICIAMENTO DAS SEMENTES.....	27
2.3.1 TRATAMENTO QUÍMICO	28
2.4 TRATAMENTO BIOLÓGICO.....	29
2.4.1 <i>Manutenção e ativação de Beauveria bassiana</i>	29
2.4.2 <i>Obtenção de conídios em meio BDA</i>	29
2.4.3 <i>Meio de produção do Beauveria bassiana</i>	29
2.4.4 <i>Montagem do experimento</i>	29
2.4.5 <i>Delineamento</i>	29
2.5 ANÁLISES DE DADOS.....	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1 TRATAMENTO QUIMICO	30
3.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO.....	32
4 CONCLUSÃO.....	33
5 REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO II.....	36
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	40

2.1 SELEÇÃO DE MUDAS	40
2.2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO.....	41
2.3 ANÁLISES DA BIOMASSA	42
2.4 ANÁLISES DE TROCA GASOSAS.....	43
2.5 TEORES DE PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS	44
2.6 ANÁLISES DE DADOS	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 CRESCIMENTO	45
3.2 BIOMASSA	46
3.3 TROCAS GASOSAS	47
3.4 PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS	48
4 CONCLUSÃO.....	50
5 REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO III	53
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 ÁREA DE ESTUDO	55
2.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	57
2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4 CONCLUSÃO.....	62
5 REFERÊNCIAS	63
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
7 ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO

O Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* var. amazônica Ducke) é uma espécie florestal pertencente à família Lauraceae, com elevado valor econômico, devido à presença de óleo essencial rico em linalol, encontrado na madeira, galhos e folhas, utilizado como fixador na indústria da perfumaria fina (VALENCIA; SAMPAIO; SOUZA, 2010).

Apesar da importância econômica do pau-rosa, estudos sobre o controle de pragas das sementes e mudas são escassos, fato que vem limitando a disponibilidade de mudas para plantios comerciais ou conservação genética (SPIRONELLO; SAMPAIO; RONCHI-TELES, 2004). Instituições de pesquisa e ensino vem aprofundando os estudos sobre a biologia dos insetos/pragas que predam mudas e sementes desta espécie.

Estudos sobre a produção e predação de frutos de árvores de *A. rosaeodora* em sistemas de plantios na reserva florestal Ducke (Manaus) indicam que a frutificação não é anual e 54,5% dos frutos foram predados por larvas do *Heilipus odoratus* (SPIRONELLO; SAMPAIO; RONCHI-TELES, 2004).

Em viveiros florestais, uma broca conhecida como *Xileborus compactus* (Coleóptera: Curculionidae: Scolytidae), perfura o caule a uma altura de cinco centímetros acima do solo, causando ressecamento das folhas, quebra do caule e consequente morte das mudas (MORAIS; FIGUEIRA; SAMPAIO, 2009).

O controle dos insetos-pragas utilizando-se organismos predadores, parasitoides e patógenos para diminuir a população de insetos que causam danos nas plantas cultivadas é denominado de controle biológico (GRONVOLD, 1996). Nesse sentido, o laboratório de Silvicultura e Tecnologia Digital do INPA vem desenvolvendo estudos sobre o controle químico e biológico das larvas e insetos do *Heilipus odoratus* e *Xylosandrus compactus* que infestam sementes e mudas do pau-rosa. Entre os fungos que tem a capacidade de infestação contra insetos da ordem Coleóptera, destaca-se *Beauveria bassiana*, que é encontrado naturalmente em algumas plantas e no solo, cujo crescimento é favorecido pelo calor e alta umidade (SILVA, 2001; SOARES et al., 2012). Os esporos dos fungos entomopatogênicos conseguem atingir os insetos, germinam e penetram na sua cutícula, colonizando assim os órgãos internos e levando a sua morte (ALVES, 1998).

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento químico e biológico sobre as sementes de *Aniba rosaeodora* e no desenvolvimento das mudas nos primeiros nove meses no viveiro florestal do INPA V8. Adicionalmente, determinar os índices de ataques nas

sementes e avaliar a capacidade de virulência do fungo entomopatogenico *Beauveria bassiana* sobre a praga *Heilipus odoratus* na fase adulta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Aniba rosaeodora* Ducke var. amazônica

O pau-rosa (*A. rosaeodora*) pertence à família Lauraceae, predominantemente tropical, composta por cerca de 2.750 espécies distribuídas em 52 gêneros (KUBITZKI, RENNER, 1982). É uma planta do gênero *Aniba*, com ampla distribuição (Figura 1), conhecida pelos nomes vulgares de: pau-rosa, pau-rosa-itaúba (Brasil), cara-cara, “rosewood” (Guiana), “bois-de-rose-femelle” (Guiana Francesa), “enclit-rosenhout” (Suriname) (SAMPAIO; FERRAZ; CAMARGO, 2003).

Figura 1. Distribuição geográfica de *Aniba rosaeodora* Ducke.



Manaus, AM: 2016. Crédito da imagem:
Adrian A. Arispe Torrez

Entre as características botânicas é descrita como uma árvore de grande porte que pode atingir até 30 m de altura e 2 m de diâmetro, com um tronco retilíneo e ramificado no ápice, formando uma copa pequena que ocupa o dossel intermédio ou superior da floresta. Possui casca pardo-amarelada ou pardo-avermelhada, que se desprende em grandes placas. Todas as partes dessa árvore são aromáticas (SAMPAIO; VIERA; BARBOSA, 1999).

As folhas são de forma obovada-elíptica ou lanceolada, com uma grande variação em tamanho, geralmente medindo entre 6-25 cm de comprimento por 2,5-8 cm de largura. Base obtusa e imediatamente arredondada, ápice bastante acuminado, com margens planas ou levemente recurvadas. Pecíolo grosso e glabrescente, canaliculado com 0,8 a 1,7 cm de comprimento (SAMPAIO; FERRAZ; CAMARGO, 2003).

Apresenta frutos com forma de baga glabra de coloração violáceo-escura, elipsoide ou subglobosa, com 2,0 a 3,0 cm de comprimento e 1,5 a 2,0 cm de diâmetro; exocarpo fino e polpa carnosa de coloração amarelo-esverdeada; está inserido em uma cúpula espessa de 1,0 cm de comprimento e provido de lenticela lenhosa (ALENCAR; FERNANDES, 1978). Cada fruto tem uma única semente e cerca de 160 a 200 sementes pesam 1 kg (SAMPAIO; VIERA; BARBOSA, 1999).

A forma das sementes é ovoide com tegumento delgado, liso e opaco; de cor marrom clara com estrias longitudinais marrom-escuras. O tegumento quando seco é quebradiço. A semente tem dois cotilédones grandes, convexos, duros, lisos, de cor creme. O eixo embrionário é reto, central, próximo à base, com 3 mm de comprimento, e também de cor creme (SAMPAIO; FERRAZ; CAMARGO, 2003).

Estudos relacionados à fenologia demonstram que a floração e produção de frutos, podem apresentar variabilidades. Um estudo determinou que para árvores de um plantio na Reserva A. Ducke (INPA), a floração ocorre em dois períodos: o primeiro no final de abril e o segundo no final de julho. O período de floração individual entre 45 e 75 dias e o período de frutificação estendeu-se por 3 a 4 meses (MAGALHÃES, ALENCAR, 197).

A germinação das sementes é do tipo hipógea-criptocotiledonar; o processo germinativo está influenciado pelo grau de maturação dos frutos; sementes provenientes de frutos mais maduros apresentam uma maior porcentagem de germinação (ROSA; OHASHI; SILVA, 1999). Entretanto, as sementes não apresentam dormência, apesar de que o tegumento gera certa resistência física à emissão da radícula, porém, a retirada do tegumento reduz à metade os tempos de germinação em relação às sementes intatas (SAMPAIO; FERRAZ; CAMARGO, 2003).

2.2 Sementes Ortodoxas e Recalcitrantes

Ortodoxas: Sementes que apresentam a capacidade de ser armazenadas com um baixo teor de umidade e temperatura, mantendo a viabilidade por um maior período de tempo (VIEIRA et al., 2001). Não só toleram a dessecação, dependem dela para redirecionar os processos metabólicos do desenvolvimento em direção à germinação (GEMAQUE et al., 2005)

Recalcitrantes: Sementes que não sofrem secagem natural na planta mãe e são liberadas com elevado teor de umidade; susceptíveis à perda de água, precisando ser armazenadas com alto grau de umidade (VIEIRA et al., 2001). No caso do pau-rosa, precisam de teor de umidade acima de 40%; teor de água igual ou menor de 20% considera-se letal para a semente, gerando o dessecação e perdas da germinação (SAMPAIO; FERRAZ; CAMARGO, 2003).

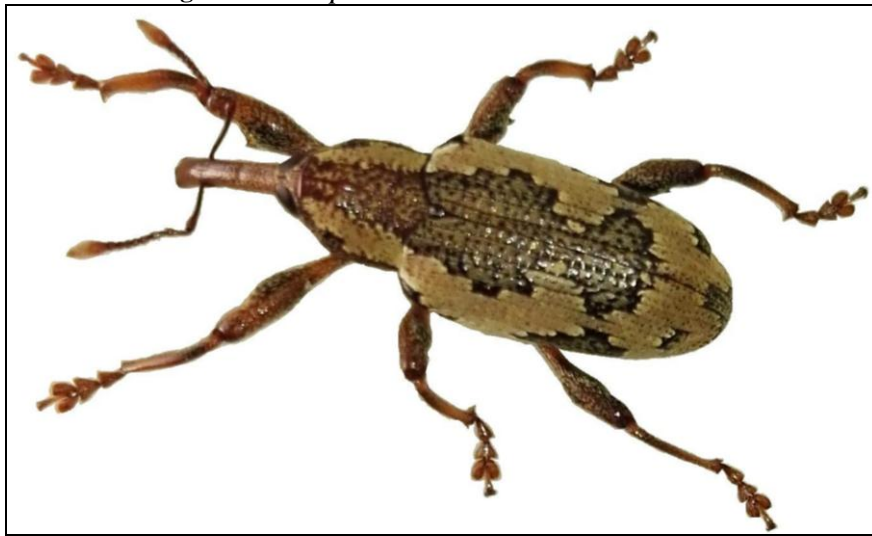
2.3 Principais pragas de *Aniba rosaeodora* Ducke

As pragas identificadas em sementes e mudas do pau-rosa são duas: *Heilipus odoratus* com características espermófaga sendo catalogada como uma praga específica sem registro de ataques em outras espécies, e a segunda é *Xylosandrus compactus* que é xilófaga e altamente conhecida em nível mundial nos Estados Unidos pelos danos ao setor florestal (GRECO; WRIGHT, 2012). As duas estão presentes nas plantações e em viveiros de produção de mudas na Amazônia central.

2.3.1 *Heilipus odoratus* Vanin & Gaiger (Coleóptera: Curculionidae: Molytinae)

Besouro com élitro de duas colorações, sendo duas faixas compostas por escamas de cor amarelada e outra, mais central, de tom marrom avermelhado que é a cor do próprio tegumento (Figura 2). Apresenta dimorfismo sexual pouco evidente, com variações no comprimento da fêmea entre 9,3 a 13,5 mm e o macho 10,7 a 12,1 mm; a parte frontal da cabeça ligeiramente mais longa e mais delgada na fêmea, com pontuações enfraquecidas e o ventrito V como o ápice achatado nos machos e convexos nas fêmeas (VANIN; GAIGER, 2005).

Figura 2. *Heilipus odoratus* na fase de adulto.



Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

2.3.2 *Xylosandrus compactus* (Coleóptera: Curculionidae: Scolytidae)

Pertence à família Scolytinae, cujos membros são xilófagos e vulgarmente conhecidos como besouros de ambrosia (Figura 3A, 3B). São considerados insetos altamente nocivos às florestas e cujo controle é problemático (GRECO; WRIGHT, 2012). O ciclo biológico transcorre dentro da árvore; os adultos sexualmente maduros invadem os tecidos da planta e constroem galerias para se reproduzirem. A oviposição ocorre nas galerias, e o desenvolvimento larval e pupal, em geral, acontecem na mesma galeria ou nos tecidos adjacentes; os adultos voam em busca de um novo hospedeiro (PENNACCHIO; SANTINI; FRANCARDI, 2012).

Os insetos da subfamília Scolytinae possuem corpo esclerosado e cilíndrico, com parte posterior dos élitros truncados ou com declives e possuindo dentes, dentículos ou grânulos, e cor predominante negra a pardo-amarelada. As peças bucais são desenvolvidas e curtas, e as antenas são geniculo-clavadas ou capitosas. Seus olhos grandes e os élitros possuem estrias mais ou menos distintas, com cerdas e escamas de valor taxonômico (OLIVEIRA; FLECHTMANN; FRIZZAS, 2008).

Figura 3. Ataque de *Xylosandrus compactus* em mudas de *Aniba rosaeodora*.



Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

2.4 Controle Biológico

Definido como a regulação espontânea, por organismos vivos, da população de outras espécies de animais sem a necessidade da intervenção humana; sendo um controle que não deve ser subestimado, sendo que populações de muitos protozoários, artrópodes e parasitos podem apresentar crescimento descontrolado na ausência de seus respectivos antagonistas naturais (GRONVOLD, 1996). Com base neste comportamento natural, surgiu o conceito de controle biológico, agora com a intervenção humana, para controlar e/ou combater as chamadas pragas parasitárias, observadas tanto na agricultura quanto em medicina veterinária (PRETTE; MONTEIRO, 2007).

Na procura de alternativas para o controle de insetos, reduzindo a utilização de compostos químicos, surgem estratégias que são estudadas, por exemplo, a utilização de fungos entomopatogênicos (SILVA, 2001). Os fungos mais utilizados no controle de insetos são os dos gêneros *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Metarhizium*, *Verticillum*, *Paecilomyces* e *Hirsutella* (PRETTE; MONTEIRO, 2007).

2.5 Historia e Biologia de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana é um fungo entomopatogênico pertencente à classe Deuteromycetes, de distribuição cosmopolita, amplamente aplicado no controle de pragas

(BELL, HAMELLE, 1970). Apresenta conídios globosos ou sub-globosos com 2,0 a 3,0 x 2,5 micrômetros, com conidióforos formando densos cachos. A germinação dos conídios ocorre, em geral, num período de 12 horas após inoculação. Em insetos o fungo penetra no hospedeiro pelo tegumento devido à ação mecânica de suas hifas e ao efeito de enzimas, em aproximadamente 12 horas. Após 72 horas da inoculação, o hospedeiro se encontra totalmente colonizado, apresentando grande quantidade de conidióforos e conídios característicos da espécie. Caracteriza-se pela alta taxa de crescimento, produção elevada das unidades infectivas, capacidade de sobrevivência no ambiente, facilidade para penetrar pelo tegumento e alcançar a hemolinfa do hospedeiro, reafirmando sua alta patogenicidade (FUXA, 1987).

Os resultados de pesquisas demonstraram a eficácia ao utilizar fungos entomopatogênicos no controle de pragas. Nesse sentido, a aplicação do fungo *B. bassiana* demonstrou virulência no bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Coleóptera: Curculionidae), iniciando a mortalidade no 2º até o 10º dia, obtendo uma efetividade entre 15-83% (SILVA, 2001).

Segundo Santoro (2008), isolados de *B. bassiana* tem grande potencial para serem utilizados em programas de manejo integrado para o controle do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Coleóptera: Tenebrionidae); pelo efeito nocivo em todas as fases do desenvolvimento desta praga, exceto o inseto adulto (SILVA et. al., 2006).

Testes com *B. bassiana* no controle de *Diabrotica speciosa* (Coleóptera: Crysomelidae) causou 70% de mortalidade com virulência em larvas de terceiro instar (CONSOLO; SALERNO, BERONE, 2003). Outro estudo da aplicação do fungo *B. bassiana* para a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Curculionidae) demonstrou que ocorreu elevada virulência, determinando-se o grande potencial de produção de conídios sobre insetos mortos (NEVES, HIROSE, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a efetividade dos controles químico e biológico sobre pragas em sementes e mudas de *Aniba rosaeodora* Ducke.

3.1 Objetivos específicos

-Avaliar a influência do tempo de embebição químico das sementes (com e sem tegumento) sobre o índice de germinação;

-Avaliar o efeito do fungo entomopatogênico *B. bassiana* sobre a germinação de sementes com e sem tegumento coletadas no solo;

-Analisar o desenvolvimento inicial das mudas originadas de tratamento químico e biológico;

- Descrever as características dos ataques nas sementes e o comportamento do *H. odoratus* na fase adulta.

-Avaliar o efeito do fungo entomopatogênico *B. bassiana* na mortalidade do *H. odoratus* na fase adulta.

4 REFERÊNCIAS

ALENCAR, J. C.; FERNANDES, N. P. Desenvolvimento de árvores nativas em ensaios de espécies. **Acta Amazonica**, v. 8, n. 4, p. 523–541, 1978.

BELL, J. V.; HAMELLE, R. J. Three fungi tested for control of the cowpea curculionidae, *Chalcodermus aeneus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.15, p.447-50, 1970.

CONSOLO, V.F.; SALERNO, G.L.; BERON, C.M. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic *hyphomycetous fungi* tested against *Diabrotica speciosa*. **BioControl**, v.48, n. 6, p.705-712, 2003.

CITES. **Notification: Annotations for *Aniba rosaeodora* (Brazilian rosewood), *Bulnesia sarmientoi* (palo santo) and *Euphorbia antisyphilitica* (candelilla)**. Geneva, 19 November 2010: [s.n.]. Disponível em: <<https://cites.org/eng/notif/2010/E036.pdf>>.

FUXA, J. R. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.32, p.225-251, 1987.

GEMAQUE, R.C.R.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; FARIA, J.M.R. Efeito das secagens lenta e rápida em sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Cerne**, v.11, n.4, p.329-335, 2005.

GRECO, E. B.; WRIGHT, M. G. First Report of Exploration of *Coffee Beans* by Black Twig Borer (*Xylosandrus Compactus*) and Tropical Nut Borer (*Hypothenemus obscurus*) (Coleóptera; Curculionidae: Scolytinae) in Hawaii. **Proceeding of the Hawaiian Entomological Society**, v. 44, p. 71–78, 2012.

GRONVOLD, J. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larva, chlamyospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthol**, v.70, p.291-297, 1996.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. Cultura in vitro de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 1, p. 29–33, 2005.

IBAMA. **Portaria N° 37-N, de 3 de abril de 1992**. Brasil, 1992.

Kubitzki, K. & Renner, S. Lauraceae (*Aniba*). In: **Flora Neotropica, Monograph 31**. New York Botanic Garden, New York, 1982.

MAGALHÃES, L. M.; ALENCAR, J. C. Fenologia do pau-rosa (*Aniba duckei* kostermans), Lauraceae, em floresta primária na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 2, p. 227–232, 1979.

MORAIS, J. W.; FIGUEIRA, J. A. M.; SAMPAIO, P. T. . Eficiência de Inseticidas no

Controle de Pragas em Sementes e Mudanças de Pau – rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 533–538, 2009.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, (Ferrari) (Coleóptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v.34 (1), p.77-82, 2005.

OLIVEIRA, C. M.; FLECHTMANN, C. A. H.; FRIZZAS, M. R. First record of *Xylosandrus compactus* (Eichhoff) (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae) on soursop, *Annona muricata* L. (Annonaceae) in Brazil, with a list of host plants. **The Coleopterists Bulletin**, v. 62, n. 1, p. 45–48, 2008.

PENNACCHIO, F.; SANTINI, L.; FRANCARDI, V. Bioecological notes on *Xylosandrus compactus* (Eichhoff) (Coleóptera, Curculionidae, Scolytinae), a species recently recorded into Italy. **Redia**, v. 95, p. 67–77, 2012.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A. C. Avaliação da patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, sobre os diferentes estádios de *Rhipicephalus sanguineus* no cão e no ambiente. Tesis de Doutorado, UNESP, 2007.

ROSA, L. S.; OHASHI, S. T.; SILVA, A. S. Efeito da profundidade de semeadura na germinação de sementes de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 29–36, 1999.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.J.; ALEXANDRE, T.M.; SARTORI, D.; ALVES, L.F.A.; FUNGARO, M.H.P. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.97 (2), p.83-89, 2008.

SAMPAIO, P. T. .; FERRAZ, I. D. .; CAMARGO, J. L. . **Manual de sementes da Amazônia**. Projeto Jacaranda ed. Manaus, Amazonas: INPA, 2003.

SAMPAIO, P. T. .; VIERA, G.; BARBOSA, A. . Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). In: SAMPAIO, P. .; CHARLES, R. (Eds.). . **Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. SEBRAE ed. Manaus, Amazonas: INPA, 1999. v. 11p. 290–297.

SILVA, C.A.D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-doalgodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. (2), p. 243-247, 2001.

SILVA, A.S.; QUINTAL, A.P.N.; MONTEIRO, S.G.; DOYLE, R.L.; SANTURIO, J.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana*, isolado 986, sobre o ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.36 (6), p.1944-1947, 2006.

SOARES, A. L.; GARCIA, E.Q.; LOPES, E.A.; RODRIGUES, K.H.C. Eficiência dos bioinseticidas *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle biológico de *Cosmopolitanism sordidus* (Germar , 1824) (Coleóptera: Curculionidae). **Cerrado Agrociências**, v. 1, n. 3, p. 10–20, 2012.

SPIRONELLO, W. R.; SAMPAIO, P. T.; RONCHI-TELES, B. Produção e predação de frutos em *Aniba rosaeodora* Ducke var . amazonica Ducke (Lauraceae) em sistema de

plântio sob floresta de terra firme na Amazônia Central. **Acta Botanica Brasileira**, v. 18, n. 4, p. 801–807, 2004.

USECHE, F. L.; VALENCIA, W. H.; VIERA, G. Desarrollo inicial de *Aniba rosaeodora* Ducke em claros artificiales de bosque primaria, Amazonia Central Brasileira. **Ingenierías & Amazonia**, v. 4, n. 1, p. 5–18, 2011.

VALENCIA, W. H.; SAMPAIO, P. DE T. B.; SOUZA, L. A. G. Crecimiento inicial de Palo de Rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em distintos ambientes de fertilidad. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 4, p. 693–698, 2010.

VANIN, S. A.; GAIGER, F. A new spermophagous species of *Heilipus Germar* from the Amazonian. **Revista brasileira de Entomologia**, v. 49, n. 2, p. 240–244, 2005.

VIEIRA, A. H.; MARTINS, E.P.; PEQUENO, P.L.; LOCATELLI, M.; SOUZA, M.G. **Técnicas de produção de sementes florestais**. Rondônia, Brasil: Embrapa-CPAF, 2001.

CAPÍTULO I

Tratamento químico e biológico em sementes de *Aniba rosaeodora* Ducke para o controle do *Heilipus odoratus* (Coleóptera, Curculionidae, Molytinae)

Tratamento químico e biológico em sementes de *Aniba rosaeodora* Ducke para o controle do *Heilipus odoratus* (Coleóptera, Curculionidae, Molytinae)

Torrez, A.A.A.¹; Sampaio, P.T.B.²; Souza, K.² & Chevreuil, L.R.²

¹ Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil; ² Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil.

RESUMO

Aniba rosaeodora Ducke é uma espécie com escassez de material biológico, com problemas de frutificação irregular e alto índice de ataque de pragas nas sementes, fator limitante na produção de mudas. O controle de pragas que infestam as sementes e mudas desta espécie se faz necessário para disponibilização de maior número de mudas aptas para plantios comerciais ou conservação genética. Este estudo avaliou os índices de germinação de sementes tratadas com inseticida (Karate Zeon 50 CS) e fungo entomopatogênico (*Beauveria bassiana*) e postas para germinar no viveiro florestal do INPA V8. O trabalho foi dividido em dois experimentos: 1) Sementes coletadas na copa da árvore e no chão, e submersas em solução do inseticida, na diluição de 5 mL.L⁻¹, durante 24, 48 e 72 horas; 2) Sementes coletadas no chão foram embebidas numa concentração de 1x10⁶ conídios.mL⁻¹ do fungo *B. bassiana* e, incubados em agitador orbital durante 3 horas a 180 rpm e 30 °C. Após os tratamentos, as sementes foram postas para germinar em bandejas plásticas contendo vermiculita como substrato, no viveiro florestal do Laboratório de Silvicultura - INPA, dotado de telas de proteção (50%) contra os raios solares e temperatura média de 28 ± 3 °C. Os parâmetros avaliados foram: percentagem de germinação (G%), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de germinação (TMG). Os resultados do primeiro experimento indicam que as maiores percentagens de germinação foram observadas nas sementes coletadas na copa da árvore (86%), diferindo significativamente (F=14,81; P < 0,01) em relação à percentagem de germinação das sementes coletas no chão (63 %). Foi observado que a germinação das sementes coletadas no chão sem nenhum tratamento (controle) apresentou porcentagem de germinação (71,6%) superior à germinação das sementes embebidas em inseticidas. O controle biológico pelo *B. bassiana* das pragas das sementes com e sem tegumento aumentou a porcentagem de germinação (74,78 %) em relação ao controle (60,5 %). Por outro lado, evidenciou-se que o tempo médio de germinação das sementes é influenciado pela presença de tegumento, ao serem retirados, conseguiram reduzi-lo de 35 para 23 dias. Conclui-se que os tratamentos químico e biológico das sementes, contribuem para produção de maior numero de mudas para plantios comerciais ou de conservação genética de uma espécie que atualmente está catalogada em perigo de extinção.

Palavras-chave: Tratamento das sementes, embebição, pragas, germinação.

ABSTRACT

Aniba rosaeodora Ducke is a species with a shortage of biological material, with problems of irregular fruiting and high rate of pest attack in seeds, a limiting factor in the production of seedlings. The control of pests that infest the seeds and seedlings of this species is necessary to provide more seedlings suitable for commercial plantations or genetic conservation. This study evaluated the germination rates of seeds treated with insecticide (Karate Zeon 50 CS) and an entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*) and placed to germinate in the nursery of INPA V8. The study was divided in two experiments: 1) Seeds collected from the tree canopy and on the forest floor, and submerged in insecticide solution, at the concentration of 5 mL.L⁻¹, for 24, 48 and 72 hours; 2) Seeds collected on the forest floor were soaked at concentration of 1x10⁶ conidia.mL⁻¹ of the fungus *B. bassiana* and incubated in an orbital shaker for 3 hours at 180 rpm and 30 ° C. After the treatments, the seeds were placed to germinate in plastic trays containing vermiculite as substrate, in the nursery of the Forestry Laboratory at INPA, under nets of solar protection (shading of 50%) and average temperature of 28 ± 3 °C. The evaluated parameters were: percentage of germination (G %), germination speed index (GSI) and mean germination time (MGT). The results of the first experiment indicated that the highest percentages of germination were observed in the seeds collected from the tree canopy (86%), differing significantly (F = 14.81; P <0.01) in relation to the percentage of germination of the collection on the forest floor (63%). It was observed that the germination of the seeds collected on the forest floor without any treatment (control) presented a percentage of germination (71.6%) higher than the germination of seeds soaked in insecticides. The biological control by *B. bassiana* on seed pests with and without tegument increased the percentage of germination (74.78%) in relation to the control (60.5%). On the other hand, it was evidenced that the average time of germination of the seeds is influenced by the presence of tegument, when they were removed, it could be reduce from 35 to 23 days. It is concluded that the chemical and biological treatments of the seeds contribute to the production of a greater number of seedlings for commercial plantations or genetic conservation of a species which is currently classified as endangered.

Key words: Seed treatment, imbibition, pests, germination.

1 INTRODUÇÃO

Classificada como uma espécie em perigo de extinção, pelo IBAMA e CITES, além de encontrar-se na lista de espécies sob proteção integral (MMA, 443/2014) e, com uma ampla distribuição geográfica na Amazônia, *Aniba rosaeodora* Ducke é uma das espécies mais importantes para a indústria da perfumaria, pela presença de linalol, utilizado como fixador de perfumes (SAMPAIO; FERRAZ; CAMARGO, 2003).

Alguns estudos sobre a ecologia da espécie demonstram problemas de frutificação, a qual é irregular, os frutos são predados por pássaros, e insetos, fato que limita a disponibilidade de mudas para plantios (SPIRONELLO; SAMPAIO; RONCHI-TELES, 2004). A predação dos frutos pelo coleóptero *H. odoratus* inicia-se a partir da oviposição direta nos frutos e, durante o desenvolvimento da larva, a maior parte do endosperma da semente é consumida (VANIN; GAIGER, 2005).

Alguns trabalhos sobre o controle dos danos nas sementes de *A. rosaeodora* causado pelo *H. odoratus* indicam que a aplicação dos inseticidas fipronil e acetamiprid, na forma de sachês na concentração de 0,09 e 0,18 mg/semente, possibilitou a produção de maior número de sementes germinadas (MORAIS; FIGUEIRA; SAMPAIO, 2009).

O tratamento de sementes é considerado o método mais eficiente do uso de inseticidas no controle de pragas incidentes (CASTRO et al., 2008), podendo funcionar como protetor durante o processo de germinação (HORII; McCUE; SHETTY, 2007). É necessária a identificação da frequência da praga, ocorrência e época do ano, para definir estratégias de controle. Experimentos realizados com aplicação de Lambda-cialotrina (Principio ativo do inseticida Karate Zeon 50 CS) ou a mistura de Lambda-cialotrina e Piraclostrobina aumentou a produtividade de soja em 7,5 e 8% (VALICENTE, 2015).

O uso de inseticidas de maneira indiscriminada deve considerar a contaminação do solo e lençol freático indicando a necessidade de procurar alternativas para diminuir o uso de agrotóxicos. O controle biológico surge como uma alternativa ambientalmente aceita pelos ecologistas. A organização da Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio) trabalha na divulgação e comercialização de produtos, na tentativa de impulsionar o mercado, com tendência a promover a regularização da cadeia.

A multiplicação de microrganismos visando ao controle de alguma praga ou doença pode ser feita *in vivo*, sobre o hospedeiro alvo ou alternativo (LOPES, 2009). Os Métodos que apresentam maior potencial para serem utilizados em programa de manejo integrado de

pragas, são os fungos entomopatogênicos, destacando-se entre eles *Beauveria bassiana*, com capacidade de virulência em algumas espécies (Coleóptera: Curculionidae), por exemplo, *Rhynchoporus ferrugineus* que ataca a palmeira vermelha (DEMBILIO, 2010), *Cosmopolites sordius* que danifica os rizomas da bananeira (ALMEIDA et al., 2009) e *Sitophilus zeamais* considerada como uma das pragas mais frequentes nos cultivos de milho (POTRICH et al., 2006).

O presente estudo avaliou a eficiência de controle químico das larvas do *H. odoratus* sobre a germinação das sementes de *A. rosaeodora* coletadas na copa das árvores e no chão e, submersas em solução do inseticida Karate Zeon 50 CS durante 24, 48 e 72 horas, como também, o controle biológico das sementes coletadas no chão e submersas em solução do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coletas do material biológico

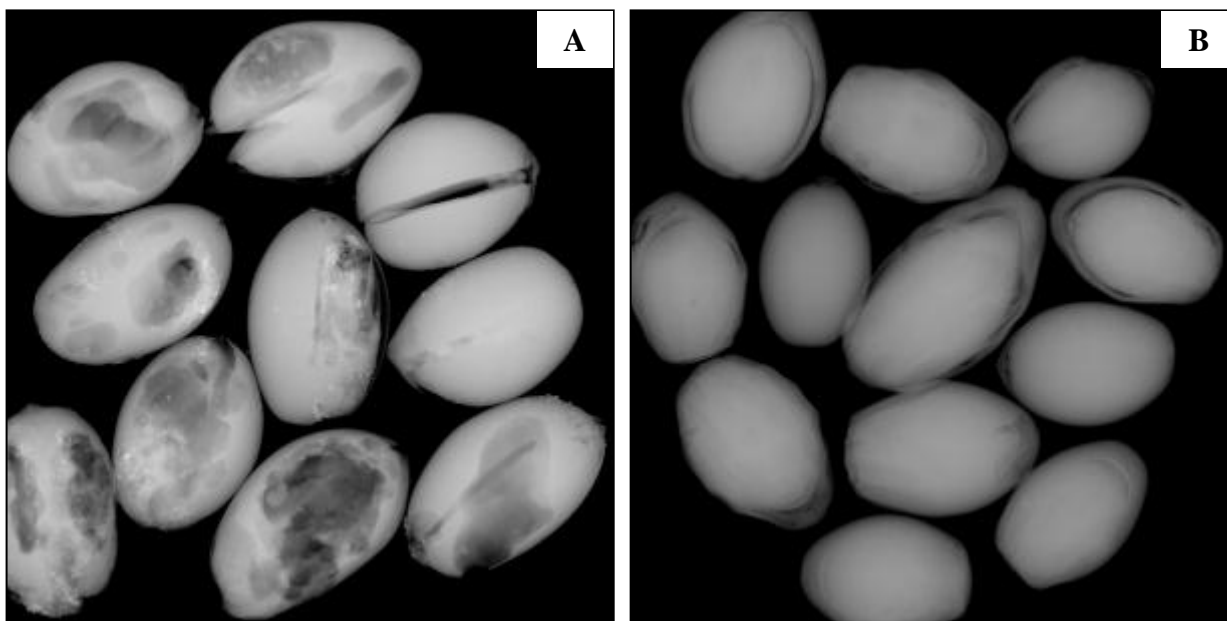
Frutos de *A. rosaeodora* foram coletados entre outubro e novembro de 2016, da copa da árvore e do chão de cinco matrizes do plantio experimental da Reserva Florestal Adolpho Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), situada ao norte de Manaus, no km 27 da rodovia AM 010. Após a coleta, os frutos foram transportados para o Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais (LASTED/INPA) para o beneficiamento das sementes.

2.2 Beneficiamento das sementes

Os frutos imaturos (verdes) foram colocados sobre jornais à temperatura ambiente (27 °C) até atingir a maturação, sendo considerado um fruto maduro quando apresenta cor violáceo-escura (aproximadamente sete dias). Com a finalidade de evitar a desidratação, os frutos foram mantidos submersos em água corrente até a montagem dos experimentos (três dias).

Os frutos foram despolidos manualmente e as sementes foram lavadas em água corrente, sendo retirado o tegumento por meio de abrasividade manual em 50% do total, separando-se as infestadas pelo *Heilipus odoratus* (Figura 1). A continuação os experimentos foram desenvolvidos em base às Regras Brasileiras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

Figura 1. Imagem da placa de raios-X de sementes de *Aniba rosaeodora*. A) Sementes atacadas pelas larvas do *Heilipus odoratus* B) Sementes em ótimo estado fitossanitário (sadias).



Manaus, AM: 2017. INPA
Crédito da imagem: Geangelo Petene Calvi

2.3.1 Tratamento químico

Sementes provenientes da coleta na copa da árvore (400 sementes) e no chão (400 sementes) foram subdivididas em dois grupos: com e sem tegumento (200 CT; 200 ST), inicialmente, submetidas à embebição em Karate Zeon 50 CS (inseticida) na diluição de 5 mL.L⁻¹ durante 24, 48 e 72 horas. Após esse período, aplicou-se um desenho inteiramente casualizado com duas repetições de 25 sementes cada, para serem semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita como substrato, em condições de casa de vegetação (28 ± 3 °C) e a germinação avaliada durante o período de 60 dias. Como controle utilizou-se sementes embebidas apenas em água corrente por, aproximadamente, 72 horas.

Neste experimento foram avaliados os parâmetros de germinação: calculada pela fórmula $G = (N/100) \times 100$ (Unidade: Porcentagem). Índice de velocidade de germinação (IVG): calculado pela fórmula $IVG = \sum (ni / ti)$, em que: ni = número de sementes que germinaram no tempo 'i'; ti = tempo após instalação do teste; $i = 1$. (Unidade: adimensional). Tempo médio de germinação (TMG): calculado pela fórmula $TMG = (\sum ni ti) / \sum ni$, em que: ni = número de sementes germinadas por dia; ti = tempo de imersão; $i = 1$ (Unidade: dias). Tempo médio de Emergencia (TME): calculada pela fórmula $TME = 1/t$ em que: t = tempo médio de germinação (Unidade: dias).

2.4 Tratamento biológico

2.4.1 Manutenção e ativação de *Beauveria bassiana*

A linhagem fúngica foi cedida pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) através da Coleção de Culturas do Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis (LCFC/INPA). O fungo foi mantido em subculturas refrigeradas em ágar dextrose batata (BDA). A ativação de *B. bassiana* para os experimentos de germinação foi em meio BDA.

2.4.2 Obtenção de conídios em meio BDA

Para a obtenção da suspensão de conídios, os tubos de ensaio contendo o fungo previamente ativado foram lavados com 10 mL de solução dispersante de Triton X-100 (0,1%, v/v) estéril. A determinação da concentração de esporos na solução foi realizada através de contagem em microscópico ótico com aumento de 40x e auxílio de câmara de Neubauer.

2.4.3 Meio de produção do *Beauveria bassiana*

Os conídios obtidos na suspensão (10^8 conídios.mL⁻¹) foram inoculados no meio líquido de produção de *B. bassiana*, cuja composição em g.L⁻¹ foi: 20 de glicose e 20 de extrato de levedura. Após a inoculação os meios foram incubados em agitador orbital durante 72 horas a 220 rpm e 30 °C.

2.4.4 Montagem do experimento

Para a montagem do experimento de germinação, as sementes foram submersas no meio contendo o *B. bassiana*. A concentração final de conídios em contato com as sementes foi de 10^6 conídios.mL⁻¹. Em seguida, os frascos (sementes + meio com *B. bassiana*) foram agitados durante 3 horas (180 rpm) a 30 °C. Findo o período de incubação, as sementes foram encaminhadas para a germinação.

2.4.5 Delineamento

Nos testes de germinação com *B. bassiana* foi empregado o delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições de 20 sementes por tratamento. As sementes infestadas foram subdivididas em dois tratamentos com *B. bassiana*: sementes com e sem tegumento. Controles abióticos (sementes em contato com meio líquido sem o fungo) foram conduzidos em condição de controle.

No período de 60 dias, foram avaliadas as variáveis de germinação (G%), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e tempo médio de emergência (TME), de acordo com as fórmulas utilizadas no primeiro ensaio.

2.5 Análises de dados

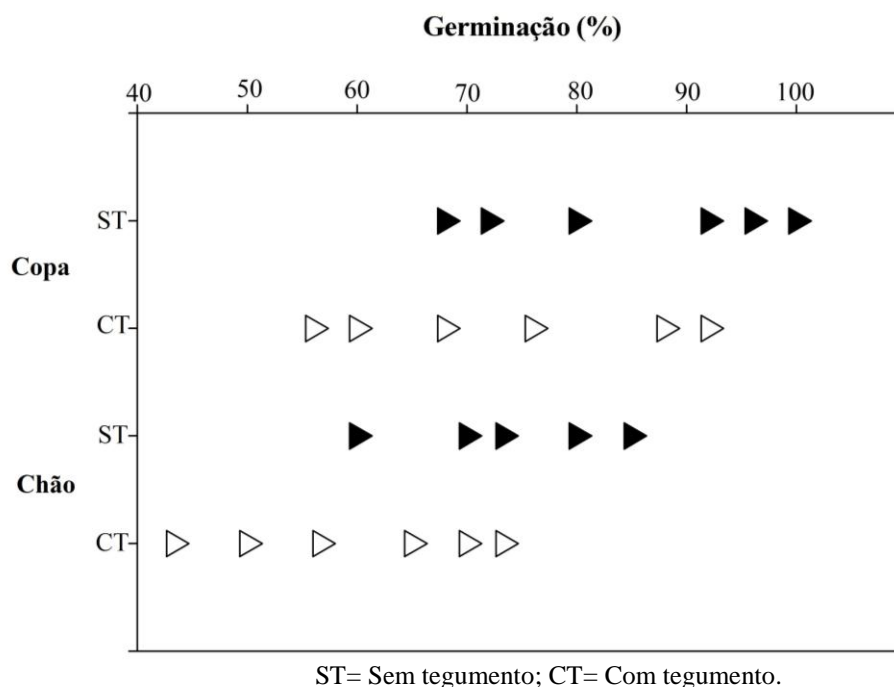
Para os dados de porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$ e submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos com diferenças significativas ($P < 0,05$) foram comparadas pelo teste de Tukey no programa ASSISTAT 7.7 e os gráficos obtidos no programa SigmaPlot 12.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tratamento químico

No viveiro do Laboratório de Silvicultura do INPA, a germinação das sementes começou a partir do 23° e foi avaliada até o 60° dia com temperatura média de 27 °C. Observou-se que sementes coletadas na copa das árvores apresentaram maior índice de germinação médio (78%) e diferem significativamente ($F= 37,78$; $P < 0,01$) em relação às coletadas no chão (63,47%) (Figura 2). Resultados similares aos observados por Sampaio et al., (2003) trabalhando com sementes de *A. roseodora*.

Figura 2. Percentagem de germinação de sementes de *A. rosaeodora*, coletadas na copa da árvore e no chão, tratadas com inseticida na diluição de 5mL.L⁻¹



Neste estudo, a retirada dos tegumentos aumentou a velocidade e a porcentagem germinação ($F= 76,37$; $P < 0,01$) das sementes. Resultado similar foi observado por Sampaio et al. (2003) que observou que a retirada do tegumento das sementes de *A. roseadora* acelera o processo da germinação devido à eliminação da resistência física da emissão radicular.

Observa-se existência de interação significativa ($F= 14,81$; $P < 0,01$) entre o tempo de embebição (Controle, 24; 48 e 72 horas) e métodos de coletas das sementes (copa e chão) (tabela 1). As maiores porcentagens de germinação foram observadas nas sementes coletadas na copa das árvores e embebidas na solução do inseticida Karate Zeon (de 80 a 86%), diferindo significativamente do tratamento controle (63%) (Tabela 1). Sementes coletadas no chão apresentaram as menores porcentagens de germinação, mesmo quando tratadas com inseticidas e com a retirada dos tegumentos (Tabela 1). Esse fato possivelmente está relacionado com a desidratação e tempo que as sementes ficaram expostas no solo da floresta.

As sementes coletadas nas copas das árvores estavam no início do estágio de maturação, com menores danos físicos em relação às coletadas no solo, fato que possivelmente contribuiu para o aumento do poder germinativo. A retirada do tegumento nestas sementes possibilitou o aumento da absorção da solução com inseticida, acelerando os processos da respiração e atividades metabólicas com fornecimento de energia e crescimento do eixo embrionário.

Houve diferenças significativas no tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e Tempo medido de emergência (TME) entre as sementes coletadas na copa das árvores e no chão (Tabela 1). Alguns fatores podem ter contribuído para que o TMG das sementes coletadas no chão (29 dias) fosse menor que aos observados nas sementes coletadas na copa das árvores (36 dias). No momento da coleta das sementes no chão já havia iniciado o processo de germinação de diversas sementes. A mesma tendência foi observada para o índice de velocidade de germinação (IVG) que apresentou diferenças entre os métodos de coletas ($F= 428,61$; $P < 0,01$) e presença ou ausência dos tegumentos nas sementes ($F= 339,89$; $P < 0,01$). As maiores médias do IVG foram observadas nas sementes coletadas na copa da árvore e tratadas com solução do inseticida durante 24 e 48 horas ($F= 61,67$; $P < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas para o IVG entre os tratamentos das sementes coletadas no chão. O tempo medido de emergência (TME) das sementes coletadas no solo foi menor em relação aos observados nas sementes coletadas na copa das árvores ($F= 5,79$; $P < 0,01$) (Tabela 1). Deve-se considerar que as diferenças observadas entre os lotes de sementes deve-se aos métodos de coleta, retirada dos tegumentos e tratamentos com a solução do inseticida. Resultados similares foram observados em

sementes de diferentes espécies florestais tratadas com inseticidas e retirados os tegumentos (DE CASTRO; HILHORST, 2004; RODRIGUES et al., 2006; COSTA et al., 2008).

Tabela 1. Porcentagem de germinação (%), tempo médio de germinação (TMG), Índice de velocidade de germinação (IVG), Tempo médio de emergência (TME) das sementes de *A. rosaeodora* Ducke imersas em solução de inseticida no viveiro florestal do INPA V8.

Parâmetros	Coletas	Tempos de imersão*			
		Controle	24h	48h	72h
Germinação (%)	Copa	63,0 aB	80,0 aA	83,0 aA	86,0 aA
	Chão	71,6 aA	67,0 bA	64,5 bA	50,6 bB
TMG (dias)	Copa	38,7 bB	38,0 bB	34,1 bA	32,0 bA
	Chão	27,3 aA	31,2 aB	29,1 aAB	27,8 aAB
IVG (dias)	Copa	0,46 aC	0,59 aB	0,66 aAB	0,73 aA
	Chão	0,27 bA	0,22 bA	0,24 bA	0,19 bA
TME (dias)	Copa	43,77 bB	43,69 bB	39,09 bA	36,35 bA
	Chão	33,01 aA	36,47 aA	35,16 aA	33,03 aA

*Médias de germinação. Letra minúscula para métodos de coletas das sementes (colunas). Letras maiúsculas para os tempos de embebição das sementes no inseticida (linhas).

3.2 Tratamento biológico

Neste experimento a porcentagem de germinação foi avaliada do 20° até o 60° dia. Observa-se que não houve diferenças significativas para Porcentagem de germinação, Tempo médio de germinação (TMG), Índice de velocidade de germinação (IVG) quando se compararam os grupos de sementes com presença ou ausência do tegumento tratadas com fungos *B. bassiana* (Tabela 2). As sementes tratadas com o fungo apresentaram maior porcentagem de germinação em relação ao tratamento controle. Alguns fungos entomopatogênicos apresentam capacidade de tornar-se endofíticos, podendo apresentar capacidade de virulência contra pragas de insetos, nematoides, parasitos e agentes patogênicos das plantas (VEGA, 2008; VIDAL; JABER, 2015; PARSA; ORTIZ; VEGA, 2013).

Estudos com tratamentos de *B. bassiana* em sementes de tomate e algodão (OWNLEY et al., 2008) confirmaram a capacidade endofítica dos fungos entomopatogênicos, influenciando no aumento significativo da biomassa e uma afetação negativa à sobrevivência da sua praga principal *Heliverpa zea* (CASTILLO; SWORD, 2015). Outros estudos indicam que a colonização endofítica foi positiva nas folhas da uva (RONDOT; REINEKE, 2013), em algumas espécies de palmeiras (GÓMEZ-VIDAL et al., 2006) e pinho branco (GANLEY; NEWCOMBE, 2006).

Observa-se que as sementes sem os tegumentos germinaram mais rápido (23 dias) em relação às sementes com tegumento (35 dias). Resultados similares foram observados por

Sampaio et al., (2003) em estudos de germinação de sementes de *A. rosaeodora* com diferentes tipos de substrato.

Tabela 2. Porcentagem de germinação (%), Tempo médio de germinação (TMG), Índice de velocidade de germinação (IVG), Tempo médio de emergência (TME) das sementes com ou sem tegumento tratadas com fungos entomopatogênico *Beauveria bassiana* no viveiro florestal do INPA V8.

Parâmetros ^{NS}	Sementes*	Controle	Imersão
Germinação (%)	ST	59,99	73,97
	CT	61,00	75,59
TMG (dias)	ST	22,24	23,06
	CT	33,49	35,69
IVG (dias)	ST	0,26	0,23
	CT	0,16	0,15
TME (dias)	ST	27,43	28,27
	CT	39,91	41,22

*NS = Não significativo

4 CONCLUSÃO

Para reduzir o desenvolvimento das larvas do *H. odoratus*, recomenda-se aplicar o tratamento químico de imersão de 24 horas em casas de vegetação com condições controladas, a fim de viabilizar economicamente a produção.

Nesse sentido, o tratamento biológico das sementes do pau-rosa infestadas com larvas do *H. odoratus* com o uso do fungo *Beauveria bassiana* aumentou os índices de germinação das sementes.

As sementes de *A. rosaeodora* devem ser coletadas na copa da árvore, fato que possibilita obtenção de maior número de sementes viáveis.

5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.M.B.; BATISTA-FILHO, A.; TAVARES, F.M.; LEITE, L.G. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de *Cosmopolites sordius* (Germar, 1824) (Coleóptera: curculionidae). **Arquivos Instituto Biológico**, v. 76, p. 489-493, 2009.
- BRASIL, 2009. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV. 1992. 365p.
- CASTILLO, D.; SWORD, G. A. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). **Biological Control**, v. 89, p. 53–60, 2015.
- CASTRO, G. S.; BOGIANI, J.C.; SILVA, M.G.; GAZOLA, E.; ROSOLEM, C.A. Tratamento de sementes de soja com inseticidas e um bioestimulante. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1311–1318, 2008.
- CITES. **Notification: Annotations for *Aniba rosaeodora* (Brazilian rosewood), *Bulnesia sarmientoi* (palo santo) and *Euphorbia antisyphilitica* (candelilla)**. Geneva, 19 November 2010: [s.n.]. Disponível em: <<https://cites.org/eng/notif/2010/E036.pdf>>.
- COSTA, C. J.; VILLELA, F.M.; BERTONCELLO, M.R.; TILLMANN, M.A.; MENEZES, N.M. Pré-hidratação de sementes de ervilha e sua interferência na avaliação do potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 198–207, 2008.
- DE CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149–162.
- DEMBILIO, O.; QUESADA-MORAGA, E.; SANTIAGO-ALVAREZ, C.; JACAS, J.A. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 214–221, 2010.
- GANLEY, R. J.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. **Science direct**, v. IIO, p. 318–327, 2006.
- GÓMEZ-VIDAL, S.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.; SALINAS, J. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. **Science direct**, v. 37, p. 624–632, 2006.
- HORII, A.; McCUE, P.; SHETTY, K. Enhancement of seed vigour following and phenolic elicitor treatment. **Bioresource Technology**, v. 98, n.3, p. 623-632, 2007.
- LOPES, R.B. A indústria no controle Biológico: Produção e Comercialização de Microorganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Jaguariúna, SP: Embrapa, 2009. p. 15-28.

MORAIS, J. W.; FIGUEIRA, J. A. M.; SAMPAIO, P. D. T. B. Eficiência de Inseticidas no Controle de Pragas em Sementes e Mudanças de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), em Viveiros, Manaus, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p. 533–538, 2009.

OWNLEY, B. H.; GRIFFIN, M.R., KLINGEMAN, W.E.; GWINN, K.D.; MOULTON, J.K.; PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 267–270, 2008.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F. E. Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes : Towards Endophytic Biological Control. **Journal of Visualized Experiments**, n. 74, p. 1–5, 2013.

POTRICH, M.; ALVES, L.F.A.; MERTZ, N.R; SILVA, E.R.L. Avaliação de *Beauveria bassiana* (Bals.) vuill. E *Metarhizium anisopliae* (metsch) sorok para controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Bioassay**, v1, P. 1-9, 2006.

RODRIGUES, M. B. C.; VILLELA, F.A.; TILLMANN, M.A.A.; CARVALHO, R. Pré-hidratação em sementes de soja e eficiência do teste de condutividade elétrica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 168–181, 2006.

RONDOT, Y.; REINEKE, A. **Potential of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana as an endophyte in grapevine Vitis vinifera Beauveria bassiana Hochschule GEISENHEIM University**, 2013.

SAMPAIO, P. T. B.; FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C. Manual de sementes da Amazônia: Pau-rosa, *Aniba roseodora* Ducke. **Projeto Jacaranda/INPA**, v. 3, p. 6, 2003.

SPIRONELLO, W. R.; SAMPAIO, P. T.; RONCHI-TELES, B. Produção e predação de frutos em *Aniba rosaeodora* Ducke var . amazonica Ducke (Lauraceae) em sistema de plantio sob floresta de terra firme na Amazônia Central. **Acta Botanica Brasileira**, v. 18, n. 4, p. 801–807, 2004.

VALICENTE, F. H. Manejo Integrado de pragas na Cultura do milho. **Curricular Técnica-Embrapa**, v. 208, p. 1–13, 2015.

VANIN, S. A.; GAIGER, F. A new spermophagous species of *Heilipus Germar* from the Amazonian Region (Coleoptera, Curculionidae, Molytinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, n. 2, p. 240–244, 2005.

VEGA, F.E. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 277-279, 2008.

VIDAL, S.; JABER, L. R. Entomopathogenic fungi as endophytes : plant – endophyte – herbivore interactions and prospects for use in biological control. **Current Science**, v. 109, n. 1, p. 46–54, 2015.

CAPÍTULO II

**Análise do crescimento de mudas (*Aniba rosaeodora* Ducke)
originadas de sementes tratadas com inseticida e fungo
entomopagênico**

Análise do desenvolvimento de mudas (*Aniba rosaeodora* Ducke) originadas de sementes tratadas com inseticida e fungo entomopagênico

Torrez, A.A.A.¹; Sampaio, P.T.B.²; Souza, K.² & Chevreuil, L.R.²; Bruno, F.M.²

¹ *Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil;* ² *Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Manaus, Brasil.*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento de mudas de pau-rosa originadas de sementes tratadas com inseticida (Karate Zeon 50 CS) e com controle biológico (fungo *Beauveria bassiana*) em condições de viveiro com tela de proteção contra os raios solares (50%) e sistema de nebulização. Após 120 dias da germinação foram selecionadas 150 mudas com altura média de 13 cm e instalados o experimento num delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e 5 repetições com 10 indivíduos cada. Durante 150 dias foram realizadas às análises de crescimento (altura, diâmetro do colo e número de folhas), biomassa (raiz, caule e folhas), e teores de pigmentos cloroplastídicos e trocas gasosas foliares. Os resultados revelaram que aos 270 dias as mudas atingiram altura média entre 32 e 35 cm. Os parâmetros altura total, diâmetro do colo, como também, a produção de biomassa foi aumentando proporcionalmente, entretanto, ao analisar-se a razão da área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e relação raiz/parte aérea não houve diferença significativa. No entanto, a fotossíntese líquida e transpiração do tratamento químico (3,70; 0,78) foi menor estatisticamente, em relação ao controle (6,25; 2,07) e ao tratamento biológico (5,31; 1,71). Por outro lado, a análise dos teores de pigmentos cloroplastídicos não apresentaram diferenças, inclusive, mantiveram um padrão similar. Em termos gerais, pode-se concluir que a fisiologia das mudas apresentam condições similares comparadas com a testemunha, e estão aptas para serem destinadas às áreas de plantios florestais.

Palavras claves: Crescimento, Características morfofuncionais, trocas gasosas, pigmentos cloroplastídicos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the growth of rosewood seedlings from seeds treated with insecticide (Karate Zeon 50 CS) and with biological control (*Beauveria bassiana* fungus) under nursery conditions with a sun protection net (50%) and fogging system. After 120 days of germination, 150 seedlings with an average height of 13 cm were selected and the experiment was installed in a completely randomized design with two treatments and 5 replicates with 10 seedlings. During 150 days, it was analyzed the growth (height, diameter of the stem and number of leaves), biomass (root, stem and leaves), and chloroplastidic pigments content and leaf gas exchange. The results showed that at 270 days the seedlings reached average height between 32 and 35 cm. The parameters total height, lap diameter, as well as biomass production increased proportionally, however, when analyzing the leaf area ratio (LAR), specific leaf area (SLA) and root/shoot ratio, there was no significant difference. However, the liquid photosynthesis and transpiration of the chemical treatment (3.70; 0.78) was statistically lower than the control (6.25; 2.07) and the biological treatment (5.31; 1.71). On the other hand, the analysis of the content of chloroplastidic pigments did not show differences, even, they maintained a similar pattern. In general terms, it can be concluded that the physiology of the seedlings present similar conditions compared to the control, and are suitable for using in the forest plantation areas.

Key words: Growth, Morphofunctional characteristics, gas exchange, Chloroplastidic pigments.

1 INTRODUÇÃO

Aniba rosaeodora Ducke é uma espécie florestal pertencente à família Lauraceae, altamente conhecida pela produção de óleo essencial, extraído da madeira, galhos e folhas, utilizado comercialmente como fixador pela indústria da perfumaria (SAMPAIO; FERRAZ, CAMARGO, 2003). Esta espécie sofreu intensa exploração seletiva no século XX sem a reposição exigida por lei, fato que resultou no desaparecimento das populações naturais de *A. rosaeodora* nos estados do Pará e Amazonas, motivando sua inclusão na lista de espécies ameaçadas de extinção no apêndice II da Convenção Internacional de Espécies Ameaçadas de Extinção (CITES, 2010).

Para atender a crescente demanda por mudas de boa qualidade fisiológica e nutricional aptas para os plantios comerciais é necessário aprofundar os estudos sobre o controle de pragas das sementes e mudas do pau-rosa. O uso de inseticidas para controle das pragas é um dos métodos mais eficientes (CASTRO et al., 2008; JUNIOR; SALES; MARTINS, 2009). Entretanto, o uso intensivo desses produtos para o controle de pragas, podem gerar consequências nocivas relacionadas ao meio ambiente, como contaminação do solo, da água e a resistência de patógenos e pragas, a certos princípios ativos dos inseticidas (LEITE et al., 2006). Nesse sentido, existe a necessidade de procurar outras opções para produção agrícola e florestal, menos dependente do uso de agroquímicos. Dentre as opções, destaca-se o controle biológico, no sentido de inimigos naturais ou através da introdução de um agente com capacidade de virulência às pragas (MORANDI; BETTIOL, 2009). Assim, o potencial dos fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*), vem sendo estudados como uma alternativa para o combate de pragas (ERLER; ATES, 2015).

Além disso, estudos indicam que através da aplicação dos fungos entomopatogênicos, no caso de *Beauveria bassiana*, podem se tornar fungos endofíticos e, influenciar significativamente no crescimento das plantas através da colonização nas raízes ou na parte aérea (GREENFIELD et al., 2016). Entretanto, a aplicação do inseticida adequado, pode melhorar a saúde das plantas, aumentar o crescimento, mesmo assim, na ausência da pressão de pragas significativas, reduzindo o número de doenças relacionadas à patogênese e, conseguindo uma mitigação do estresse. Nesse sentido, podem manter a produção de energia em relação à fotossíntese, condutância estomática e taxas de transpiração, com a finalidade de aumentar os rendimentos (ELBERT et al., 2008; HENRY et al., 2011).

Apesar da grande visibilidade de *A. rosaeodora* pela indústria, é necessário aprofundar os estudos sobre o controle de pragas nas sementes e mudas, fator limitante para o aumento

das áreas de plantios comerciais. Nesse contexto, as sementes de *A. rosaeodora* foram tratadas com inseticida químico e extrato do fungo entomopatogênico *B. bassiana*, conseguindo aumentar os índices de germinação (dados não publicados), nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do tratamento de sementes sobre o desenvolvimento inicial das mudas, em condições de viveiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais (LASTED/INPA), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Figura 1), Manaus, Amazonas, Brasil. O clima é equatorial úmido com média de precipitação anual de 2.286 mm, temperatura média de 27,7 °C e umidade relativa média do ar de 72,69% (INMET, 2017).

Figura 1. Viveiro do Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais – INPA.



Manaus, AM: 2018. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

2.1 Seleção de mudas

Para tanto, foram selecionadas mudas de *Aniba rosaeodora* (50 mudas por tratamento), procedentes de um experimento anterior de germinação, onde as sementes foram divididas em três grupos, consistindo de tratamento de imersão em água durante 24, 48 e 72 horas (Grupo controle); imersão em inseticida Karate Zeon 50 CS (lambda-cialotrina) a 5 mL.L⁻¹ durante 24 e 72 horas (Grupo 1) e, imersas em solução contendo o fungo entomopatogênico *B. bassiana* na concentração de 1 x 10⁶ conídios.mL⁻¹ sob agitação a 180 rpm durante 3 horas a 30 °C (Grupo 2). Após aplicação dos distintos tratamentos, as sementes

foram semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita como substrato (28 ± 3 °C) com acompanhamento diário de germinação.

Aos 90 dias, as mudas foram transplantadas para sacos plásticos de 1 kg contendo terra preta como substrato e submetidas à aclimação durante 30 dias. Posteriormente, as mudas com altura entre 10 – 15 cm foram separadas por tratamento (controle, grupo 1 e grupo 2), conforme experimento de germinação citado acima, e submetidas à análise de crescimento no período de 150, 210 e 270 dias, e trocas gasosas e quantificação de pigmentos cloroplastídicos ao final do experimento (270 dias).

2.2 Análise do crescimento

As análises biométricas foram realizadas a partir de 50 mudas por tratamento (controle, grupo 1 e grupo 2), aos 150, 210 e 270 dias, tomando-se medidas de altura e diâmetro, com auxílio de uma fita métrica graduada em centímetros e um paquímetro digital (Mitutoyo) respectivamente (Figura 2). Adicionalmente, para cada período de avaliação do crescimento (150, 210 e 270 dias), foram selecionadas cinco mudas por tratamento (controle, grupo 1= Químico, grupo 2= Biológico), as quais foram divididas em folhas, caules e raízes (Figura 3) e submetidas à digitalização por meio do programa TinyScanner (Appxy 1.2.6). De posse das imagens, estas foram analisadas por meio do programa Imagej (National Institutes of Health / Java 1.50i) para a determinação da área foliar.

Figura 2. Avaliação do crescimento das mudas. A) Medição do diâmetro do colo (mm). B) Medição da altura (cm).

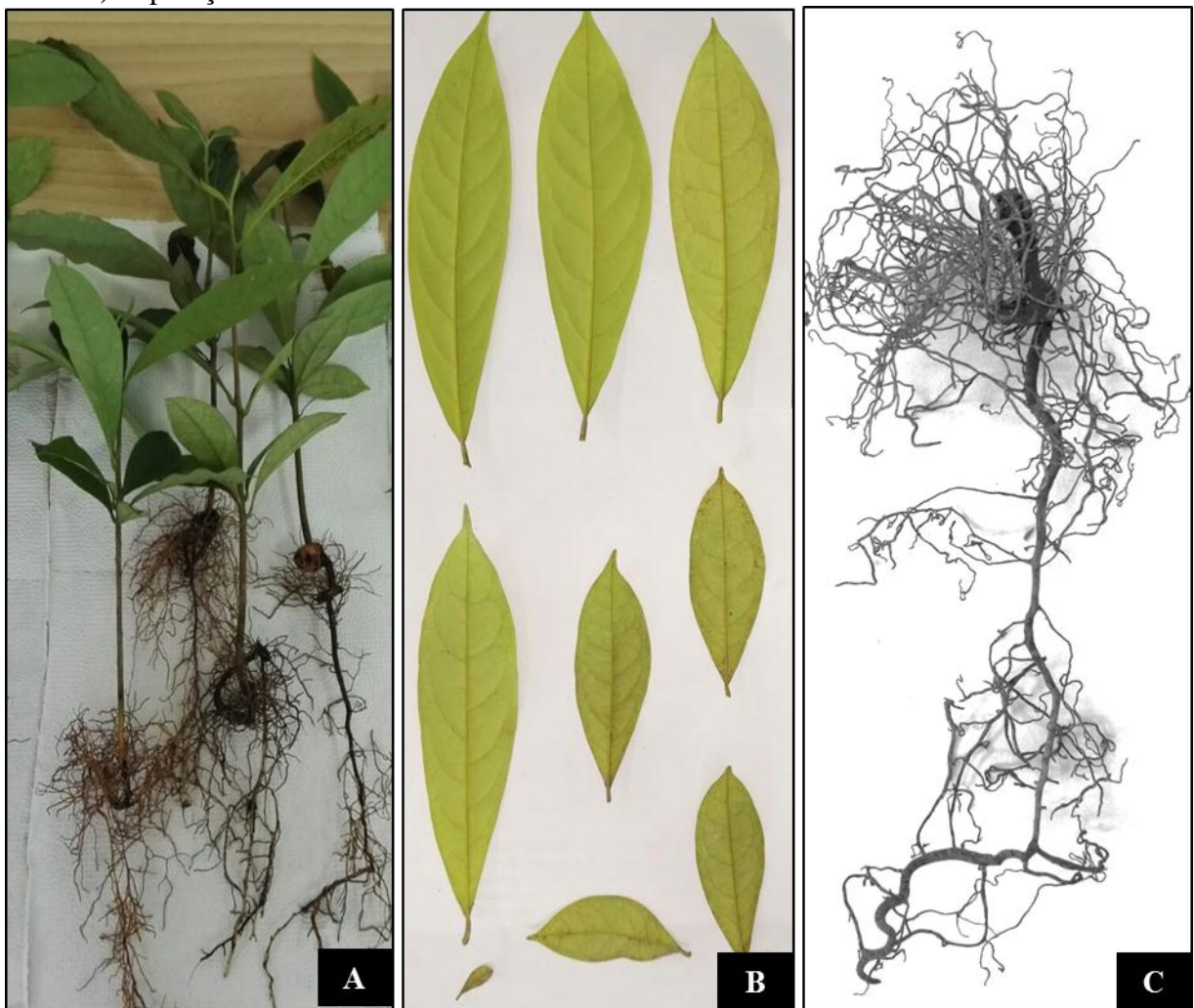


Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

2.3 Análises da biomassa

Para obtenção da biomassa, as folhas, caules e raízes foram submetidos à secagem em uma estufa (Tecnal TE-394/3) com temperatura de 63 ± 3 °C durante 72 horas. Posteriormente, foi obtido o peso seco das amostras e, então, determinada a área foliar específica (AFE) que foi calculada dividindo a área foliar (cm^2) entre a massa seca das folhas (g) de cada plântula. A razão de área foliar foi calculada dividindo a área total das folhas entre a massa seca da plântula. (GREEN; NEWBERY, 2001). A razão de área foliar (RAF) foi determinada entre os valores da área foliar total e massa seca total, obtidos em cada amostragem.

Figura 3. Preparação das mudas para digitalização. A) Mudras completas. B) Separação das folhas. C) Separação das raízes.



Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

2.4 Análises de troca gasosas

As trocas gasosas foram avaliadas tomando-se as medidas de fotossíntese líquida (a), respiração no escuro (R_d), transpiração (E) e a condutância estomática (g_s) em folhas completamente expandidas e em estado fitossanitário adequado a partir de um analisador de gás infravermelho (IRGA) portátil de sistema aberto, modelo LI 6400 (Li-Cor, USA), conforme metodologia para espécies Amazônicas (MARENCO; GONÇALVES; VIEIRA, 2001). Os dados foram coletados entre 9:00 e 12:00 horas de forma aleatória, sendo as leituras realizadas em quatro mudas por tratamento (controle, grupo 1 e grupo 2). Os valores pontuais de trocas gasosas foram obtidos à densidade de fluxo de fótons saturante de $1.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. O IRGA foi ajustado sob concentração de $400 \pm 10 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , temperatura de $31 \pm 1^\circ\text{C}$ e vapor de H_2O de $23 \pm 1 \text{ mmol mol}^{-1}$. A respiração no escuro (R_d) foi determinada após o período de adaptação de 10 minutos, com a câmara ajustada para irradiação de $0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A eficiência no uso da água (EUA $\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) foi calculada pela relação fotossíntese / transpiração (Figura 4).

Figura 4. Medição das trocas gasosas das folhas de *A. rosaeodora* com o medidor fotossintético IRGA.



Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

2.5 Teores de pigmentos cloroplastídicos

Os teores de pigmentos cloroplastídicos foram determinados a partir de folhas completamente expandidas e em bom estado fitossanitário, de 10 mudas de cada tratamento. Inicialmente, foram realizadas leituras com o medidor de clorofila SPAD-502, em cinco pontos no terço médio das folhas, tomando-se o cuidado de posicionar o medidor entre as nervuras das folhas (Figura 5A). Posteriormente, as folhas foram coletadas e acondicionadas em recipiente contendo água destilada, visando evitar a desidratação foliar e, então submetida à determinação do conteúdo de clorofila *a*, *b* e carotenoides. Para tanto, retirou-se 10 discos de 6 mm de diâmetro (Figura 5B, 5C), prosseguindo-se a extração dos pigmentos cloroplastídicos de acordo com o método de Arnon (1949), utilizando-se acetona 80% (10 mL.amostra⁻¹), quartzo (10 mL.amostra⁻¹) e MgCO₃ (10 mg.amostra) (Figura 5D). O material foliar foi macerado (Figura 5E) e filtrado em papel quantitativo (125 mm) (Figura 5F, 5G) e submetido às leituras espectrofotométricas a 663 nm (clorofila *a*), 645 nm (clorofila *b*) e 480 nm (carotenoides) (Figura 5H). As concentrações dos pigmentos cloroplastídicos foram determinadas a partir das equações descritas por Hendry e Price (1993):

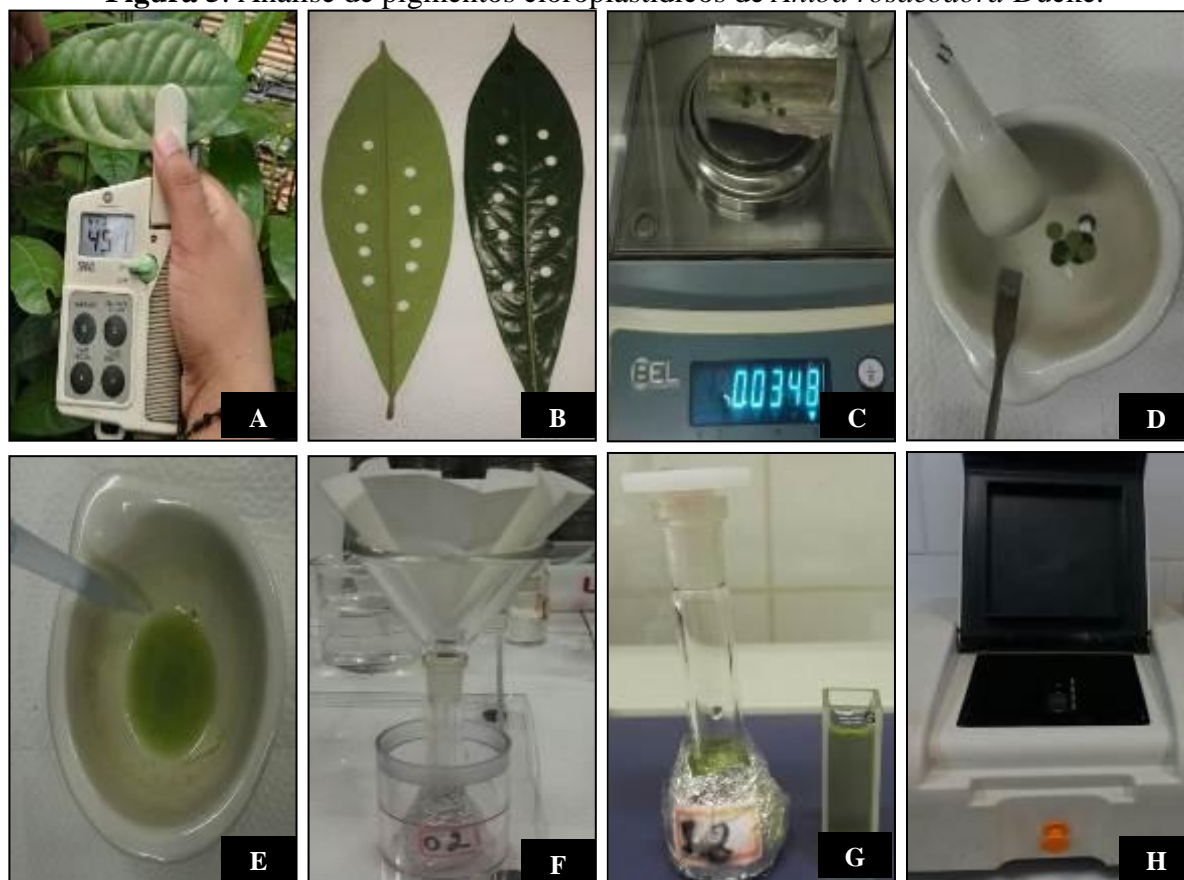
$$\text{Chl } a = \frac{(12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645}) * 1,119 * \text{Volume}}{1000 * \text{peso (g)}}$$

$$\text{Chl } b = \frac{(22,9 * A_{645} - 4,68 * A_{663}) * 1,102 * \text{Volume}}{1000 * \text{peso (g)}}$$

$$C_{x+c} = \frac{(A_{480} + 0,114 * A_{663} - 0,638 * A_{645}) * \text{Volume} * 1000}{112,5 * \text{peso (g)}}$$

A partir das concentrações de clorofila e carotenoides foram calculadas as concentrações de clorofila total (Chl *a* + Chl *b*), a razão da clorofila *a* / clorofila *b* (Chl *a/b*) e clorofila total / carotenoides (Chl total/C_{x+c}).

Figura 5. Análise de pigmentos cloroplastídicos de *Aniba rosaeodora* Ducke.



Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

2.6 Análises de dados

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se os programas Assistat 7.7 e SigmaPlot 12.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento

O crescimento das espécies vegetais é um processo complexo, porém, é uma técnica precisa para avaliar o desenvolvimento e a contribuição fisiológica, que vai depender da idade, partes da planta e, da interação com os fatores ambientais (CAMPOS et al., 2011). Nesse sentido, a análise de crescimento das plântulas de *A. rosaeodora* foi proporcional nos períodos de medição. Aos 270 dias atingiram entre 32 e 35 cm de altura, no entanto, as médias dos dados, determinaram que as plântulas mantem uniformidade em relação ao controle (Tabela 1). Um estudo de proteção externa das sementes de *A. rosaeodora*,

determinou que o crescimento aos 180 dias de idade teve entre 11 e 12 cm de altura, neste estudo, com 150 dias de idade, as plântulas atingiram entre 19 e 20 cm, fator que poderia estar relacionado aos tratamentos de imersão das sementes que aceleram o processo de germinação. De acordo com Ferreira e Borguetti (2004) os líquidos são absorvidos pelas sementes e começam a hidratar os tecidos e influenciar no crescimento do embrião.

Tabela 1. Altura, diâmetro do colo, número de folhas e coeficiente de variação de plantas jovens de *A. rosaeodora* originadas de sementes tratadas com inseticida e extrato do fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

Idade (meses)	Tratamento	Altura		Diâmetro do colo		Folhas	
		(cm)	CV (%)	(mm)	CV (%)	#	CV (%)
5 (Março/2017)	Controle	20,66a		3,46a		9a	
	Químico	19,30a	7,16	3,33a	5,49	9a	7,77
	Biológico	20,21a		3,49a		10a	
7 (Maio/2017)	Controle	27,02a		4,33a		11a	
	Químico	25,42a	9,24	3,99a	5,57	12a	9,03
	Biológico	28,12a		4,33a		12a	
9 (Julho/2017)	Controle	35,00a		4,77ab		13a	
	Químico	32,20a	10,39	4,41b	5,91	14a	7,88
	Biológico	35,038a		4,93a		13a	

Médias seguidas da mesma letra na coluna, dentro de cada idade, não diferem entre si ao nível 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.2 Biomassa

De acordo às avaliações de biomassa (Tabela 2), a massa seca das raízes e da parte aérea foi estatisticamente igual, pelo que não houve efeito significativo do tratamento de sementes sobre a quantidade de matéria retida nas folhas em relação à quantidade de matéria seca acumulada em toda a planta. Enquanto à razão da raiz e a parte aérea, resultados similares foram obtidos por USECHE; VALENCIA; VIERA (2011) com avaliação *in situ* após 240 dias. Por outra parte, a área foliar foi incrementando nas medições, o que permitiu observar um desenvolvimento ótimo, em relação ao controle que aos 150 dias apresentavam 157,70 cm² e atingiu os 479,05 cm² aos 270 dias de avaliação, no entanto, não houve diferença alguma entre as medições.

Tabela 2. Massa seca, relação raiz/parte aérea, área foliar e razão da área foliar de plantas jovens de *A. rosaeodora*, originadas de sementes tratadas com inseticida e extrato do fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

Idade (meses)	Tratamento	Massa seca				Relação raiz/parte aérea (g g ⁻¹)	Área foliar (cm ²)	RAF (cm ² g ⁻¹)	AFE (cm ²)
		Raiz	Folha	Colo	Total				
5 (Março/2017)	Controle	0,55a	1,03a	0,50a	2,07a	0,35a	157,70a	78,74ab	156,00ab
	Químico	0,63a	1,26a	0,63a	2,51a	0,33a	149,62a	59,33b	126,11b
	Biológico	0,43a	0,46a	1,98a	3,53a	0,27a	197,30a	99,88a	169,06a
7 (Maio/2017)	Controle	1,75a	2,28a	1,20a	5,22a	0,57a	325,83a	64,91a	144,04a
	Químico	1,33a	2,60a	1,33a	5,26a	0,37a	383,92a	73,02a	147,80a
	Biológico	1,47a	2,91a	1,42a	5,79a	0,36a	347,55a	60,61a	136,04a
9 (Julho/2017)	Controle	1,61a	2,78a	1,28a	5,67a	1,40a	479,05a	85,44a	172,17a
	Químico	1,53a	2,92a	1,35a	5,80a	1,36a	474,79a	83,62a	162,53a
	Biológico	1,71a	2,82a	1,59a	6,11a	1,39a	454,75a	76,12a	163,4a

Médias seguidas da mesma letra na coluna, dentro de cada idade, não diferem ao 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

3.3 Trocas gasosas

Segundo Henry et al. (2011) a aplicação de inseticidas podem alterar a fisiologia das plantas, podendo resultar da inibição de transporte de elétrons no foto sistema, influenciando nas taxas líquidas de fotossíntese ou prejudicando a condutância estomática. Os resultados da troca de gases para as plântulas de *A. rosaeodora* apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3). Os valores da fotossíntese líquida e transpiração entre o controle e o grupo 2 (biológico) não apresentam diferenças, entretanto, ao serem comparadas com as plântulas do grupo 1 (químico), houve diferenças significativas, pelo motivo de que a fotossíntese e valor da transpiração foi menor ($3,70 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; $0,78 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) nas duas variáveis. Os valores de respiração no escuro são iguais entre os tratamentos, embora disso, a condutância estomática e a eficiência no uso da água apresentaram variações. Nas duas situações o grupo químico e o controle foram iguais, diferenciando-se do tratamento biológico.

Tabela 3. Troca de gases e características fotossintéticas nas plântulas de *A. rosaeodora* de 8 meses de idade, originadas de sementes tratadas com inseticida e extrato do fungo entomopatogênico *B. bassiana*. Fotossíntese líquida (A), respiração no escuro (R_d) condutância estomática (g_s) transpiração (E) e eficiência no uso de água (EUA). Médias de quatro plântulas (\pm desvio padrão).

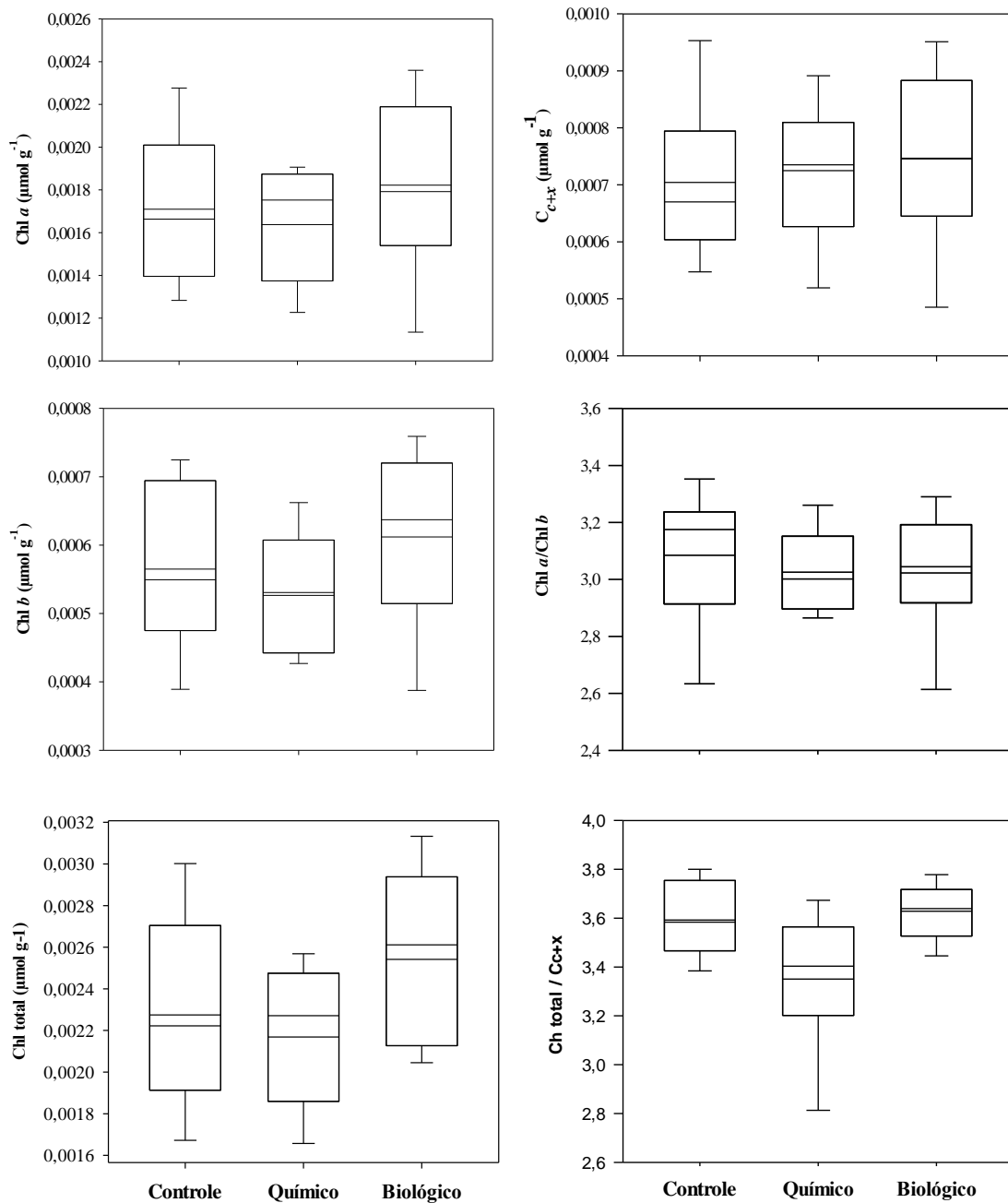
Variáveis	Controle	Químico	Biológico
A [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	6,25 \pm 0,83 a	5,31 \pm 1,18 ab	3,70 \pm 1,44b
R_d [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	0,35 \pm 0,33 a	0,71 \pm 0,24 a	0,44 \pm 0,17a
g_s [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	0,11 \pm 0,02 a	0,09 \pm 0,04 b	0,04 \pm 0,02b
E [$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]	2,07 \pm 0,23 a	1,71 \pm 0,59 a	0,78 \pm 0,46b
EUA[$\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$]	3,02 \pm 0,18 b	3,34 \pm 0,76 b	4,74 \pm 0,89a

Valores médios seguidos pelas mesmas letras entre os tratamentos não diferem ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

3.4 Pigmentos cloroplastídicos

Os parâmetros de pigmentos de clorofila e carotenoides que foram analisados nos tratamentos apresentam um padrão similar que pode estar relacionado às condições no seu desenvolvimento (Figura 6), nesse sentido, resultados similares foram observados em um experimento com plantas jovens de *A. rosaeodora* submetidas a tratamentos de luminosidade, indicando que não apresentam diferenças para clorofila *a*, *b* e carotenoides (GOMES, 2012). Dessa forma, pode-se indicar que a espécie apresenta baixa capacidade para alterar seu sistema de produção de pigmentos de clorofila em relação ao tratamento de sementes, afirmando que não existe influencia no seu desenvolvimento inicial.

Figura 6. Box-plot do conteúdo de pigmentos de clorofila na base da massa foliar, originadas de sementes tratadas com inseticida e extrato do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (controle; Grupo 1; Grupo 2). Clorofila *a* (Chl *a*); clorofila *b* (Chl *b*); clorofila total (Chl *a* + Chl *b*); carotenoides (C_{x+c}), clorofila *a* / *b* (Chl *a* / Chl *b*) e clorofila total / carotenoides (Chl total / C_{x+c}).



Valores médios seguidos pela mesma letra entre os tratamentos não tem diferença ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (n=10).

4 CONCLUSÃO

A análise completa das características morfofuncionais de *A. rosaeodora* em relação ao crescimento e biomassa, indica que o desenvolvimento inicial não foi influenciado pelo tratamento das sementes aplicado para o controle de pragas. Os parâmetros fisiológicos observados neste estudo indicam que as plântulas de *Aniba rosaeodora* originadas de sementes com tratamento químico e biológico apresentaram crescimento vigoroso em condições de viveiro.

5 REFERÊNCIAS

- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1949.
- CAMPOS, M. F.; ONO, E.O.; BOARO, C.S.F.; RODRIGUES, J.D.. Análise de crescimento em plantas de soja tratadas com substâncias reguladoras. **Biotemas**, v. 21, n. 3, p. 53–63, 2011.
- CASTRO, G. S.; BOGIANI, J.C.; SILVA, M.G.; GAZOLA, E.; ROSOLEM, C.A. Tratamento de sementes de soja com inseticidas e um bioestimulante. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1311–1318, 2008.
- CITES. Notification: Annotations for *Aniba rosaeodora* (Brazilian rosewood), *Bulnesia sarmientoi* (palo santo) and *Euphorbia antisyphilitica* (candelilla) Geneva, 2010.
- ELBERT A, M HAAS, B SPRINGER, W THIELERT, R NAUEN. 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, v.64, n.11, p. 1099-1105.
- ERLER F, AO ATES. 2011. Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Coleoptera: Scarabaeidae), as biological control agentes against the June beetle. **Journal of insect Science**, v.15, n.1, p. 1-5.
- GOMES, E. S. Influência de níveis de sombreamento no desenvolvimento de plantio juvenil de paurosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), no oeste do Pará. Dissertação de mestrado: Universidade Federal do Oeste do Pará, 2012.
- FERREIRA, A G; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- GREEN, J. J.; NEWBERY, D. M. Light and seed size affect establishment of grove-forming ectomycorrhizal rain forest tree species. **New Phytologist**, v. 151, p. 271–289, 2001.
- GREENFIELD, M.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, M.I.; ORTIZ, V.; VEJA, F.E.; KRAMER, M.; PARSA, S. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. **Biological Control**, v. 95, p. 40–48, 2016.
- HENDRY, G. A. F.; PRICE, A. H. Strees indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G. A. F.; GRIME, J. P. (Eds.). *Methods in Comparative Plant Ecology*. London: [s.n.]. p. 148–152, 1993.
- HENRY R.S.; JOHNSON, W.G.; WISE, K.A. 2011. The impact of a fungicide and na insecticide on soybean growth, yield, and profitability. **Crop Protection**, v.30, p. 1629-1634.
- INMET. 2017. Instituto Nacional de Metereologia- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Consultado 5 dic. 2017. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=clima>
- JÚNIOR, MAIL T. S.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Revista**

Biotemas, v. 22, n. 3, p. 77–83, 2009.

LEITE, L. G. et al. Nematoides entomopatogênicos no controle de pragas. In: PINTO, A. S. et al. (Eds.) . Controle Biológico na Prática. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006. p. 45–53.

MARENCO, R. A.; GONÇALVES, J. F.; VIEIRA, G. Leaf gas exchange and carbohydrates in tropical trees differing in successional status in two light environments in central Amazonia. **The physiology**, v. 21, p. 1311–1318, 2001.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle Biológico: Produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds). Doenças de Plantas: Uso e perspectivas. Jaguariúna, SP, 2009. p. 7-14.

SAMPAIO, P. T.; FERRAZ, I. D.; CAMARGO, J. L. Manual de sementes da Amazônia. Projeto Jacarandá ed. Manaus, Amazonas: INPA, 2003.

USECHE, F. L.; VALENCIA, W. H.; VIERA, G. **Ingenierías & Amazonia**, 4(1), 2011. **Ingenierías & Amazonia**, v. 4, n. 1, p. 5–18, 2011.

CAPÍTULO III

Ocorrência do *Heilipus odoratus* durante a produção de mudas de *Aniba rosaeodora* Ducke, em Viveiros, Manaus, Amazonas

**Ocorrência do *Heilipus odoratus* durante a produção de mudas de *Aniba rosaeodora*
Ducke, em Viveiros, Manaus, Amazonas**

Torrez, A.A.A.¹; Souza, K.²; Chevreuil, L.R.² & Sampaio, P.T.B.²

¹ Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil; ²Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Manaus, Brasil

RESUMO

O objetivo do trabalho foi descrever os danos do *Heilipus odoratus* em sementes e mudas de *Aniba rosaeodora*, bem como avaliar os efeitos do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre os besouros adultos. Foram utilizadas duas concentrações de 10^5 e 10^7 conídios.mL⁻¹ e aspergidos diretamente sobre os besouros, posteriormente colocados em recipientes plásticos de 180 mL e monitorados diariamente durante 20 dias. Os resultados determinaram que a alimentação do *H. odoratus* na fase adulta está baseada em folhas e caule de mudas de *A. rosaeodora*, ocasionando dano severo direto e indiretamente. A aplicação de *B. bassiana* na concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹ proporcionou 96,87% de mortalidade nos insetos, o que evidência uma nova alternativa de controle.

Palavras-chave: *Aniba rosaeodora*, *Heilipus odoratus*, Produção de mudas, Manejo.

ABSTRACT

The objective of this work was to describe the *Heilipus odoratus* damage in seeds and seedlings of *Aniba rosaeodora*, as well as to assess the effects of the *Beauveria bassiana* fungus on the adult beetles. We used two concentrations of 10^5 and 10^7 conidia.mL⁻¹ and sprayed them directly on the beetles, then, the beetles were placed in plastic containers of 180 mL and daily monitored during 20 days. The results determined that the feeding of *H. odoratus* in adulthood is based on leaves and stems of seedlings of *A. rosaeodora*, causing severe damage both directly and indirectly. The application of *B. bassiana* in a concentration of 10^7 conidia.mL⁻¹ provided a 96.87% mortality of the insects, which evidenced a new alternative control.

Key words: *Aniba rosaeodora*, *Heilipus odoratus*, Seedling production, Handling.

1 INTRODUÇÃO

Aniba rosaeodora Ducke, destaca-se dentre as espécies aromáticas de alto valor econômico, pela presença de linalol, utilizado pela indústria dermo-cosmética como fixador de perfumes (KRAINOVIC et al., 2017). Atualmente é, considerada em perigo de extinção pelo IBAMA e CITES, afrontando problemas de frutificação irregular e alto índice de ataque de insetos nos frutos, gerando perdas de até 59,5% (SPIRONELLO et al., 2004).

A praga principal identificada chama-se: *Heilipus odoratus* Vanin & Gaiger e inicia o ataque com as fêmeas adultas, ovipositando nos frutos, depois, as larvas passam pela fase de pupa até completar a metamorfose dentro da semente. Posteriormente, o besouro abandona a semente, fazendo um furo circular com ajuda das mandíbulas (VANIN; GAIGER, 2005). O gênero *Heilipus* tem registro de 52 espécies para América do Sul, sendo 36 com presença no Brasil (WIBMER; O'BRIEN, 1986), entretanto, a identificação do *H. odoratus* em 2005, acrescenta o listado original a 37 espécies, indicando relação específica com plantas das famílias Lauraceae e Annonaceae (SILVA et al., 1968; CASTANEDA-VILDOZOLA et al., 2007).

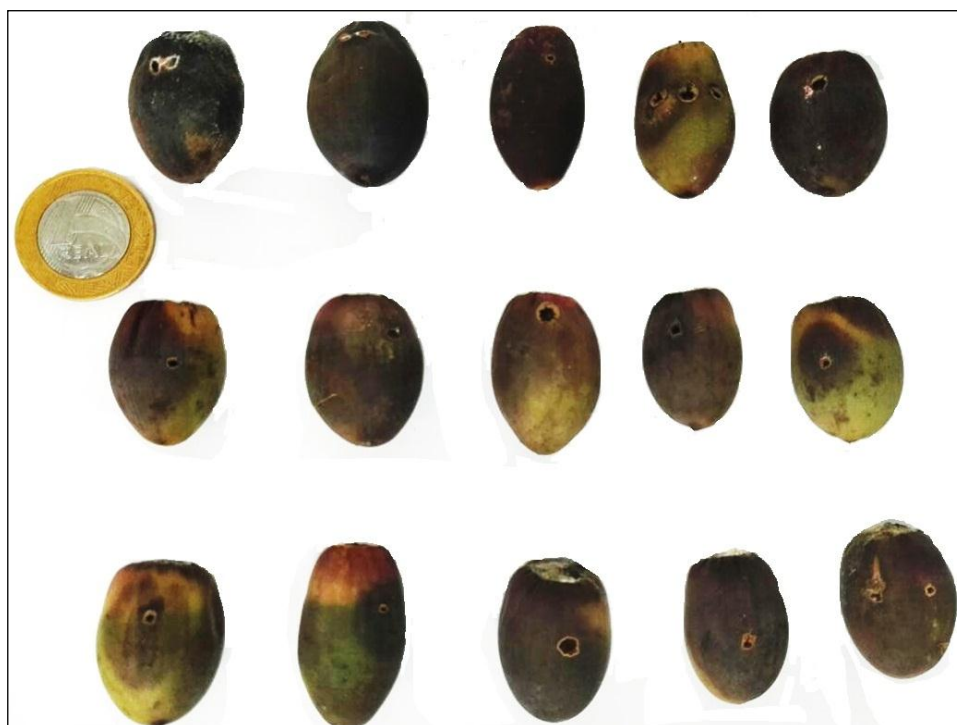
Atualmente não existem registros da biologia predatória desta praga e seu comportamento na fase adulta. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi descrever os danos de *H. odoratus* em sementes e mudas, além de avaliar, os efeitos do fungo entomopatogêno *Beauveria bassiana* sobre os besouros adultos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

As coletas dos frutos foram realizadas nos meses de Julho e Agosto de 2017, na Reserva Florestal Adolpho Ducke, selecionando-se quatro matrizes de plantios experimentais de *A. rosaeodora*. Posteriormente trasladado ao Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais (LASTED) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foram imediatamente selecionados todos os frutos com indícios de ataques (Figura 1).

Figura 1. Frutos de *Aniba rosaeodora* atacados pelo *Heilipus odoratus*.



Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

2.2 Semeadura das sementes atacadas

Os lotes das coletas apresentaram altos índices de infestação, 28,4% (n= 847) em Julho e 27,3% (n=678) em Agosto. Imediatamente 425 sementes infestadas, foram colocadas para germinar em cinco bandejas plásticas com substrato vermiculita (28 ± 3 °C), coberto com tecido de proteção (1 mm), evitando que os besouros possam fugir, coletando-os facilmente. Após 90 dias, foi registrada a porcentagem de germinação, porcentagem de sementes que não germinaram e porcentagem de larvas que atingiram a fase adulta.

2.3 Criação do *Heilipus odoratus*

Os besouros adultos foram coletados nas bandejas e mantidos em um recipiente plástico de 40 x 30 cm, com furos laterais para permitir o ingresso de ar, sendo alimentados diariamente com folhas de *A. rosaeodora* (Figura 2). Posteriormente, os besouros adultos foram transportados ao Laboratório de Cultivos de Fungos Comestíveis.

Figura 2. Criação do *Heilipus odoratus* com folhas de *Aniba rosaeodora* como fonte de alimentação.

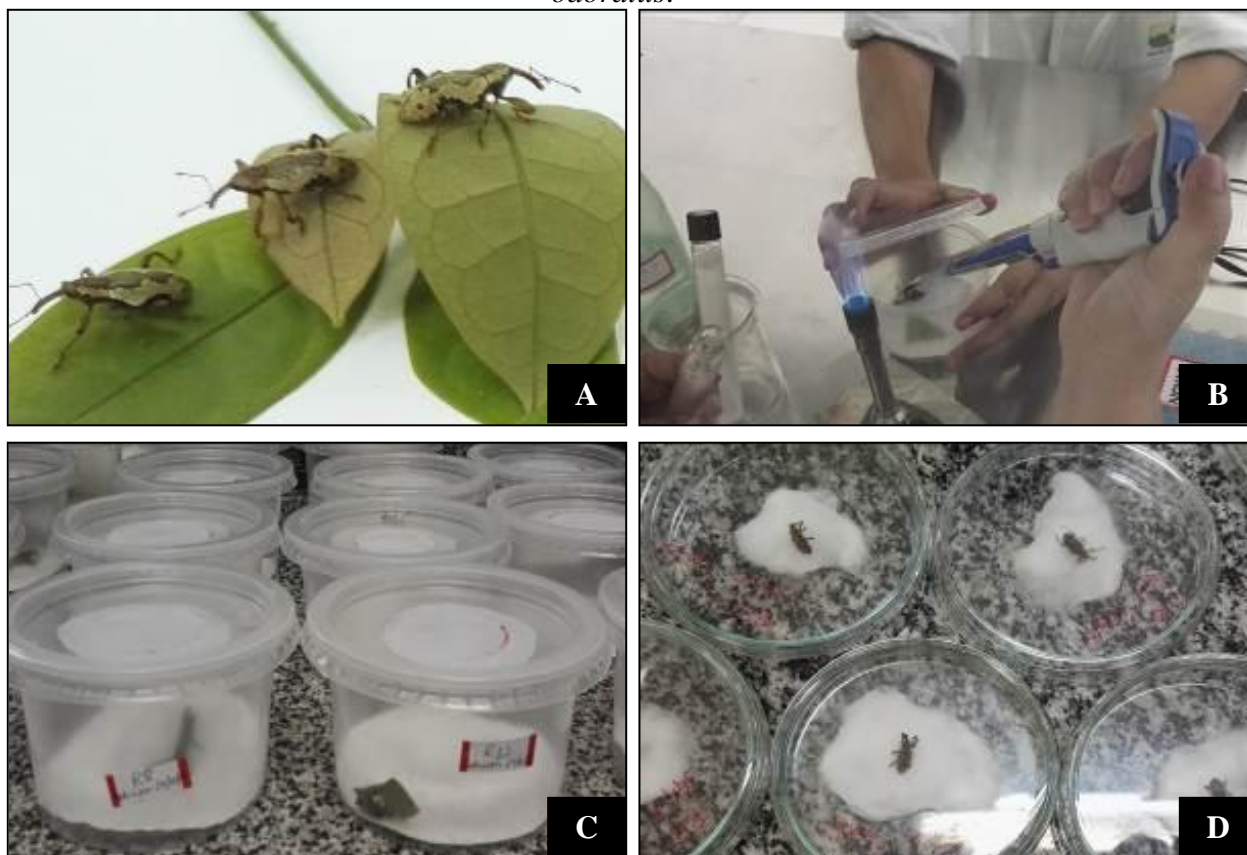


Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

2.3 Instalação e condução do experimento

Foram obtidas suspensões do fungo entomopatogênico *B. bassiana* nas concentrações de 10^5 e 10^7 conídios.mL⁻¹ quantificados em câmara de Neubauer e aspergidos com 1µL diretamente sobre os insetos adultos (Figura 3A, 3B). Posteriormente, os insetos foram colocados em recipientes plásticos de 180 mL com base de papel filtro, contendo folhas jovens de *A. rosaeodora* como dieta alimentar e colocados em temperatura 28 ± 3 °C (Figura 3C). A avaliação da mortalidade foi observada diariamente até por 20 dias, após a morte, os insetos foram transferidos para placas de petri forradas com algodão umedecido com água destilada e mantido em BOD para validação da infestação fungica (Figura 3D). Os ensaios foram conduzidos em desenho inteiramente casualizado, composto por quatro repetições contendo oito insetos e como grupo controle, foi aspergida uma solução dispersante de Triton X-100 (0,1%, v/v) estéril (sem conídios).

Figura 3. Aplicação do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre o *Heilipus odoratus*.



Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

2.4 Análises estatísticas

Os dados da mortalidade foram corrigidos pela fórmula de ABBOT (1925) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. O tempo letal (TL₅₀; TL₉₀) foi determinado pelo teste de sobrevivência de Kaplan – Meier.

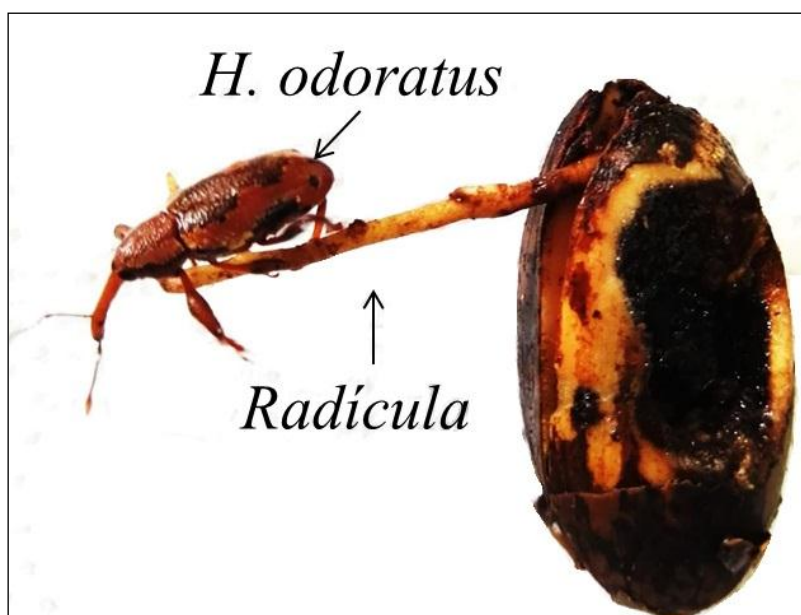
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo determinou o alto índice de sementes que não conseguem germinar (52,63%), entretanto, só o 26,97% conseguiram emitir parte aérea (Tabela 1), resultados baixos em comparação com Spironello et al., (2004), considerando, que mesmo atacadas, cerca do 35% das sementes conseguiram germinar (Figura 4). Por outro lado, 20,39% (n=425) das larvas completaram o ciclo de metamorfose, conseguindo atingir a fase adulta (Figura 5).

Tabela 1. Análise do desenvolvimento das sementes infestadas pelo *Heilipus odoratus* (n= 425).

Sementes	Bandejas com sementes infestadas					
	B1	B2	B3	B4	B5	Média (%)
Germinação (%)	34,48	40,00	24,14	22,50	13,75	26,97
Sem Germinar (%)	45,98	45,56	52,87	58,75	60,00	52,63
Ciclo completo (%)	19,54	14,44	22,99	18,75	26,25	20,39
Total (%)	100	100	100	100	100	100

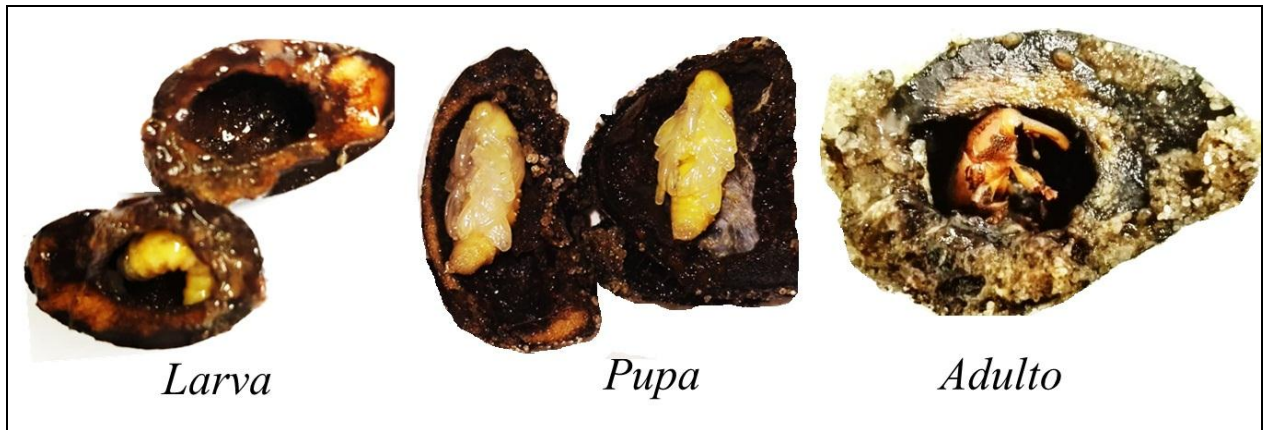
Figura 4. Germinação de sementes de *Aniba rosaeodora*, atacadas pelo *Heilipus odoratus*.



Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

Nesse processo, as larvas conseguem alimentar-se das reservas dos cotilédones, inclusive danificando o eixo embrionário (VANIN; GAIGER, 2005), contudo, quando as sementes são abandonadas, ficam totalmente destruídas, similar características de ataque foram registradas pelo *H. lauris* em frutos e sementes de *Persea americana* (GRISALES et al., 2017), como também em *Ocotea porosa* (todas da família Lauraceae) pelo *Heilipus* sp. (CUARANHUA, 2010).

Figura 5. Ciclo completo do desenvolvimento do *Heilipus odoratus*, dentro das sementes de *Aniba rosaeodora*.



Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

Na fase adulta, *H. odoratus* avança caminhando pelos galhos, fazendo voos de curta distancia, e começa alimentar-se do caule e ápice, além das folhas novas das mudas de *A. rosaeodora* (Figura 6A). Nesse sentido, os danos causados no desenvolvimento inicial, força as mudas a ativar mecanismos de sobrevivência através da rebrota das gemas laterais e apicais (Figura 6B, 6C). Entretanto, quando *H. odoratus* está sentindo-se ameaçado, imediatamente deixa-se cair ao chão, permanecendo imóvel, camuflado no substrato, podendo ser um mecanismo de defesa na espécie. Outras das características do *H. odoratus* é a capacidade de estridulação dos machos, possivelmente relacionado à comunicação química por feromônios (NUNES; RONCHI TELES; SPIRONELLO, 2009).

Figura 6. Ataques do *Heilipus odoratus* em mudas de *Aniba rosaeodora* de três meses de idade (A). Rebrotas lateral (B) e apical (C) em função do ataque.



Manaus, AM: 2017. Viveiro – LASTED/INPA
Crédito da imagem: Adrian A. Arispe Torrez

Por outro lado, o tratamento biológico determinou a capacidade de infestação do fungo entomopatogênico *B.bassiana* sobre os insetos adultos do *H. odoratus* (Figura 7), sendo efetiva na concentração maior (10^7 conídios.L⁻¹), assim também, o TL₅₀ indica mortalidade de 54,8% após 192 horas de iniciada a pulverização nos besouros (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos de *Beauveria bassiana* na mortalidade dos besouros adultos do *Heilipus odoratus*.

	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ % (192 h)	TL ₉₀ % (245 h)
Controle	12,5b	12,5b	-	-
10 ⁵ conídios.mL ⁻¹	0	0	-	-
10 ⁷ conídios.mL ⁻¹	96,87a	96,47a	54,8	0,81

TL₅₀; TL₉₀= Tempo Letal ao 50% e 90% de mortalidade dos insetos pela aplicação de *B. bassiana*. Letras diferentes para colunas indicam diferenças significativas pelo Teste de Tukey ao 5%.

De acordo com a função dos fungos entomopatogênicos, após inicio do contato com o hospedeiro, o fungo começa a penetrar o sistema dos insetos, colonizando e produzindo micélios, finalmente, consegue a morte por dano nas estruturas internas (Figura 7), adicionalmente, começa a esporulação e dispersão de esporos de acordo com as condições ambientais do microorganismo (ALVES, 1998; GUARIN, 2007).

As vantagens da utilização dos fungos entomopatogênicos são altas, prioriotariamente em função do baixo impacto ambiental, nenhuma toxicidade aos humanos e animais e, custo reduzido ao produtor (OROZCO, 2011). Além disso, os insetos ficam à deriva da resistência desenvolvida, já que o fungo pode reproduzir-se rapidamente produzindo cepas mais eficientes, o que torna as pesquisas relacionadas ao controle dos fungos entomopatogênos uma nova alternativa e de prioridade para o agronegócio Brasileiro.

Figura 7. Implicações de colonização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre o *Heilipus odoratus*. A) Cabeça com indícios de colonização. B) Vista frontal do ataque.



Manaus, AM: 2017. Laboratório de Cultivos de Fungos Comestíveis – LFCC/INPA
Crédito da imagem: Larissa Ramos Chevreuil

4 CONCLUSÃO

As larvas do inseto *H. odoratus* consomem totalmente o endosperma das sementes de *A. rosaeodora*, reduzindo consideravelmente os índices de germinação, por outro lado, *H. odoratus* na fase adulta é um predador específico das mudas de *A. rosaeodora*, afetando o desenvolvimento inicial. Nesse sentido, a capacidade de virulência do fungo entomopatogênico *B. bassiana*, reflete uma alternativa de controle biológico para reduzir os ataques desta praga, sem contaminar ao meio ambiente.

5 REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p. 265-266, 1995.
- ALVES, S B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: Alves, S.B. (Eds). Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba: ESALQ/USP, 1998. p. 21-37.
- CASTANEDA-VILDOZOLA, A.; VALDEZ-CARRASCO, J.; EQUIHUA-MARTÍNEZ, A.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H., ROMERO-NÁPOLES, J.; SOLÍS-AGUILAR, J.F.; RAMÍREZ-ALARCÓN, S.. Genitalia of three species of *Heilipus Germar* (Coleóptera: Curculionidae) that damage avocado fruits (*Persea americana* Mill.) in Mexico and Costa Rica. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 6, p. 914–918, 2007.
- CUARANHUA, C. J. Frutificação, dispersão e predação por insetos de frutos / sementes de imbuia (*Ocotea porosa*). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2010.
- GRISALES, V. D.; VALLEJO, A. M. C.; MUÑOZ, A. C. Ciclo de vida y descripción Morfológica de *Heilipus Lauri* Boheman (Coleóptera: Curculionidae) en Colombia. *Acta Zoológica Mexicana*, v. 33, n. 2, p. 231–242, 2017.
- GUARÍN, J H. 2007. Efeito do controle microbiano em insetos sugadores em tres sistemas de manejo de pragas de citros. Tesis de doutorado. Universidad de São Paulo, 2007.
- IBAMA. **Portaria N° 37-N, de 3 de abril de 1992**. Brasil, 1992.
- KRAINOVIC, P.; ALMEIDA, D.; SAMPAIO, P. New allometric equations to support sustainable plantation management of rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) in the Central Amazon. **Forests**, v. 8, n. 9, p. 327.
- NUNES, A. B.; RONCHI-TELES, B.; SPIRONELLO, W. Comportamento de estridulação em *Heilipus odoratus* Vanin & Gaiger (Coleóptera, Curculionidae, Molytinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 3, p. 334–336, 2009.
- OROZCO, S. C. Susceptibilidad de *Compsus* n.sp A *Beaveria bassiana* (Bals.) Vuill y *Metarhizium* (Metsh) sorokin. Dissertação de Mestrado. Universidad Nacional de Colombia, 2011.
- SILVA, A.G.D.; Gonçalves, C.R, Galvão, D.M.; Gonçalves, A.J.L.; Gomes, J.; Silva, M.N.; Simoni, L.. 1968. Família Curculionidae, subfamília Hylobiinae. In: Lima, A.M. (Ed.). **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil; seus parasitos e predadores**. V.2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rio de Janeiro, p.510-514.
- SPIRONELLO, W. R.; SAMPAIO, P. T. .; RONCHI-TELES, B. Produção e predação de frutos em *Aniba rosaeodora* Ducke var . *amazonica* Ducke (Lauraceae) em sistema de plantio sob floresta de terra firme na Amazônia Central. **Acta Botanica Brasileira**, v. 18, n. 4, p. 801–807, 2004.
- VANIN, S. A.; GAIGER, F. A new spermophagous species of *Heilipus Germar* from the Amazonian. **Revista brasileira de Entomologia**, v. 49, n. 2, p. 240–244, 2005.

WIBMER, G.J.; O'BRIEN, CH.W. Annotated check list of the weevils (Curculionidae sensu lato) of South America (Coleoptera:Curculionidae). **American Entomological Institute**. v.39, p.1-563, 1986.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante os resultados apresentados, pode-se concluir que o tratamento químico das sementes consegue inibir o desenvolvimento das larvas *H. odoratus*, aumentando o número de plântulas germinadas.

Este trabalho estabelece técnicas alternativas para o controle das pragas de sementes e mudas do pau-rosa. É necessário aprofundar os estudos sobre a biologia do *H. odoratus*, visando estabelecer os tratamentos mais eficientes em função dos tempos de transição de cada fase (larva, pupa, adulta).

A capacidade de infestação de *B. bassiana* representa uma nova fonte de pesquisa para estes estudos e poderá se constituir uma estratégia no controle de pragas sem afetar a fisiologia da planta, nem contaminar ao meio ambiente.

7 Anexos

Capítulo III

Tabela de sobrevivência do *H. odoratus* infestados com *Beauveria bassiana*

	Hora	Status	Proporção cumulativa sobrevivendo ao tempo		N de eventos cumulativos	N de casos restantes
			Estimativas	Modelo padrão		
1	24,000	,00	.	.	0	31
2	48,000	1,00	,968	,032	1	30
3	96,000	1,00	,935	,044	2	29
4	144,000	1,00	.	.	3	28
5	144,000	1,00	.	.	4	27
6	144,000	1,00	.	.	5	26
7	144,000	1,00	.	.	6	25
8	144,000	1,00	,774	,075	7	24
9	168,000	1,00	.	.	8	23
10	168,000	1,00	.	.	9	22
11	168,000	1,00	.	.	10	21
12	168,000	1,00	.	.	11	20
13	168,000	1,00	,613	,087	12	19
14	192,000	1,00	.	.	13	18
15	192,000	1,00	.	.	14	17
16	192,000	1,00	.	.	15	16
17	192,000	1,00	.	.	16	15
18	192,000	1,00	,452	,089	17	14
19	216,000	1,00	.	.	18	13
20	216,000	1,00	.	.	19	12
21	216,000	1,00	.	.	20	11
22	216,000	1,00	.	.	21	10
23	216,000	1,00	.	.	22	9
24	216,000	1,00	,258	,079	23	8
25	240,000	1,00	.	.	24	7
26	240,000	1,00	,194	,071	25	6
27	264,000	1,00	.	.	26	5
28	264,000	1,00	,129	,060	27	4
29	288,000	1,00	,097	,053	28	3
30	360,000	1,00	,065	,044	29	2
31	384,000	1,00	.	.	30	1
32	384,000	1,00	,000	,000	31	0

Médias e medianas para tempo de sobrevivência

Média ^a			Mediana	
Estimativas	Modelo padrão	Intervalo de confiança de 95%	Estimativas	Modelo padrão

		Limite inferior	Limite superior		
205,935	13,438	179,598	232,273	192,000	12,091

