

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

JAQUELINE SUELEN LOEBLEIN

ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DE *Beauveria bassiana* (Hypocreales:
Cordycipitaceae) VISANDO AO CONTROLE DE *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer &
Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae)

CASCAVEL-PR
Novembro - 2019

JAQUELINE SUELEN LOEBLEIN

ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DE *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) VISANDO AO CONTROLE DE *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Orientador: Dr. Luis Francisco Angeli Alves

Área de Concentração: Ciências Ambientais

CASCADEL-PR

Novembro – 2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Loeblein, Jaqueline Suelen

Estratégias de utilização de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) visando ao controle de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae) / Jaqueline Suelen Loeblein; orientador(a), Luis Francisco Angeli Alves; coorientador(a), Miryan Denise Araujo Coracini, 2019. 105 f.

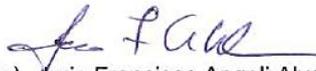
Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, 2019.

1. Controle biológico. 2. Fungos entomopatogênicos. I. Alves, Luis Francisco Angeli. II. Coracini, Miryan Denise Araujo. III. Título.

JAQUELINE SUELEN LOEBLEIN

Estratégias de Utilização de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) visando ao controle *Gyropsylla spegazziniana* (LIZER & TRELLES) (Hemiptera: Aphalaridae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biologia Aplicada e Indicadores de Qualidade No Ambiente Terrestre, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Luis Francisco Angeli Alves

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



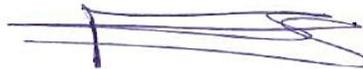
Fabiana Gisele da Silva Pinto

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Daian Guilherme Pinto de Oliveira

Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR - Campus de Santa Helena (UTFPR)



Maria Elena Schapovaloff

Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária – Argentina (INTA)

Cascavel, 8 de novembro de 2019

Aos meus pais, irmãos e ao meu namorado, pelo amor, constante incentivo e compreensão nos momentos que estive ausente, com muita gratidão

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de dar mais este passo e por ter me concedido força e disposição para superar as dificuldades.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, ao Programa de Conservação e Manejo de Recursos Naturais e corpo docente pela oportunidade, por me desafiar e por dispor todas as ferramentas que permitiram chegar hoje ao final desse ciclo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof^o Dr^o Luis Francisco Angeli Alves, pela confiança, liberdade para conduzir a pesquisa e atuação em todas as etapas desta investigação.

A minha família, pela vida de dedicação, apoio e incentivo a dar continuidade aos estudos e a lutar pelos meus objetivos. A certeza de tê-los comigo é o que me dá segurança para seguir.

A Leonardo A. P. Verdério, grande incentivador, pelo companheirismo constante, amor e paciência durante o período de dedicação ao mestrado, minha sincera gratidão.

A Prof.^a Dr^a Ana Tereza Bittencourt, por todas as vezes que se dispôs a me auxiliar na análise estatística dos resultados da qualificação e desta dissertação.

A Mayara Silva Santana, Andreia Bonini e Marina Martins por me acolherem, pelos ensinamentos e por todas as vezes que precisei de auxílio e estiveram dispostas a me ajudar.

Aos meus dedicados auxiliares de coletas e bioensaios, Isabela Fetter, Ana Luisa Moro e Gabriel Araújo, que voluntariamente participaram deste projeto, ao comprometimento e amizade demonstrado, meu muito obrigada.

Em especial, a Priscila de Andrade Rode e Cristina Bordin, pela amizade construída durante estes meses em que compartilhamos sentimentos e expectativas, por toda a ajuda e apoio, meu sincero agradecimento.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para que este trabalho se concretizasse, agradeço.

“Que todos os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistas daquilo que parecia impossível.”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Erva-mate.....	18
2.2 Ampola-da-erva-mate.....	20
2.3 Controle da ampola da erva-mate.....	22
2.4 Fungos entomopatogênicos.....	25
2.5 Formulações do fungo <i>Beauveria bassiana</i> e adjuvantes.....	27
2.6 Autoinoculação/autodisseminação de fungos entomopatogênicos.....	28
REFERÊNCIAS	30
3. ATIVIDADE DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill (Hypocreales: Cordycipitaceae) CONTRA ADULTOS DE <i>Gyropsylla spegazziniana</i> (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae) EM SUSPENSÃO LÍQUIDA	39
Resumo	39
Abstract	39
3.1 Introdução.....	40
3.2 Material e métodos.....	41
3.3 Resultados.....	51
3.4 Discussão.....	54
3.5 Considerações finais.....	59
REFERÊNCIAS	59
4. ESTRATÉGIA ATRAI-E-INFECTA PARA DISSEMINAÇÃO DE <i>Beauveria bassiana</i> VISANDO AO CONTROLE DE <i>Gyropsylla spegazziniana</i> (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae)	64
Resumo	64
Abstract	64
4.1 Introdução.....	65
4.2 Material e métodos.....	66
4.3 Resultados.....	82
4.4 Discussão.....	95
4.5 Considerações finais.....	100
REFERÊNCIAS	101

RESUMO

ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DE *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) VISANDO AO CONTROLE DE *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae)

Gyropsylla spegazziniana é considerada uma das principais pragas da cultura da erva-mate, apresentando aspectos bioecológicos que resultam em perdas que já foram estimadas em até 54%. Durante seu desenvolvimento na planta, os danos causados durante a fase ninfal resultam na redução da área foliar, aumento do número de partícula de insetos na matéria-prima e redução da qualidade do produto final. Atualmente, o controle se limita à catação manual, poda e destruição dos ramos infestados, sendo proibido o emprego de inseticidas químicos por ser um produto consumido praticamente “*in natura*”. Em razão da ausência de produtos químicos registrados para o controle deste inseto torna-se necessária a exploração de métodos mais sustentáveis e que possam vir a ser utilizados para o controle desta praga. Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar estratégias de uso do fungo *Beauveria bassiana* isolado Unioeste 44, visando ao manejo de *G. spegazziniana*, por meio da pulverização aquosa com adjuvantes e dispositivos de atração-e-infecção. A eficácia dos adjuvantes com o fungo variou com o método de inoculação utilizado, sendo eles contato direto e residual. A pulverização direta resultou nas maiores mortalidades, variando de 43-57% para aplicação isolada dos produtos Assist[®] e Áureo[®] e 65-74% em aplicação com o fungo, enquanto o efeito do contato residual resultou em mortalidades reduzidas, 6-31% para aplicação apenas dos adjuvantes e 16-48% para a aplicação com *B. bassiana*. A análise de compatibilidade indicou que os adjuvantes avaliados foram compatíveis com o fungo *B. bassiana*. Quatro dispositivos de autoinoculação foram comparados em condições de laboratório utilizando diferentes preparações de *B. bassiana* e terra de diatomáceas. Testes preliminares comprovaram o potencial de atração da cor amarela para adultos de *G. spegazziniana*, assim como a contaminação dos insetos com superfície impregnada com o patógeno. A confirmação de morte pelo fungo foi significativa apenas no dispositivo fabricado de armadilhas comerciais Colortrap[®]. Observou-se transmissão horizontal da infecção fúngica tanto com cadáveres esporulados quanto com vivos contaminados. Utilizando os dispositivos de atração-e-infecção foi constatada até 94% de mortalidade dos insetos na ausência de SPLAT[®] e 90% na presença da cera, não havendo acréscimo de mortalidade quando foi utilizada a cera emulsionada SPLAT[®]. Observou-se redução na viabilidade do patógeno nas armadilhas em função do tempo de armazenamento, porém a mortalidade de *G. spegazziniana* expostos ao fungo manteve-se acima de 50%, mesmo após 21 dias de armazenamento. Em bioensaios com gaiolas teladas constatou-se mortalidade de 88% da população. Estes resultados indicam que o fungo *Beauveria bassiana* é promissor para a utilização no controle de *G. spegazziniana*, assim com para a continuidade dos estudos em condições de semi-campo e em campo.

Palavras-chave: Autoinoculação. Controle microbiano. *Ilex paraguariensis*. Ampolada-erva-mate. Pulverização.

ABSTRACT

STRATEGIES FOR USING *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) AIMING AT THE CONTROL OF *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae)

Gyropsylla spegazziniana is considered one of the main pests of yerba mate crop, presenting bioecological aspects that result in losses that have been estimated up to 54%. During its development in the plant, damage during the nymphal phase results in reduced leaf area, increased number of insect particles in the raw material and reduced quality of the final product. Currently, the control is limited to manual collection, pruning and destruction of the infested branches, being prohibited the use of chemical insecticides because it is a product consumed practically “*in natura*”. Due to the absence of registered chemicals for the control of this insect, it is necessary to explore more sustainable methods that may be used to control this pest. Thus, this study aimed to evaluate strategies for the use of the fungus *Beauveria bassiana* isolated Unioeste 44, aiming at the management of *G. spegazziniana* through aqueous spraying with adjuvants and attraction-and-infection devices. The efficacy of the adjuvants with the fungus varied with the inoculation method used, being direct and residual contact. Direct spraying resulted in the highest mortality, ranging from 43-57% for isolated application of Assist[®] and Áureo[®] products and 65-74% for application with fungus, while the effect of residual contact resulted in reduced mortality, 6-31%. for application of adjuvants only and 16-48% for application with *B. bassiana*. Compatibility analysis indicated that the adjuvants evaluated were compatible with the *B. bassiana* fungus. Four autoinoculation devices were compared under laboratory conditions using different preparations of *B. bassiana* and diatomaceous earth. Preliminary tests proved the potential for attracting the yellow color of *G. spegazziniana* to adults, as well as the contamination of insects with surface impregnated with the pathogen. Confirmation of death by the fungus was significant only in the Colortrap[®] commercially manufactured trap device. Horizontal transmission of fungal infection was observed with both sporulated and living contaminated corpses. Using attraction-and-infection devices, up to 94% of insect mortality in the absence of SPLAT[®] and 90% in the presence of wax were found, with no increase in mortality when the emulsified SPLAT[®] wax was used. Pathogen viability was reduced in traps as a function of storage time, but mortality of *G. spegazziniana* exposed to the fungus remained above 50%, even after 21 days of storage. Bioassays with screened cages showed mortality of 88% of the population. These results indicate that the fungus *Beauveria bassiana* is promising for use in the control of *G. spegazziniana*, as well as for the continuity of studies under semi-field and field conditions.

Keywords: Autoinoculation. Microbial control. *Ilex paraguariensis*. Paraguay tea ampul. Pulverization

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Adjuvantes utilizados nos ensaios de compatibilidade com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* para o controle de *Gyropsylla spegazziniana*..... **46**
- Tabela 2.** Concentrações dos adjuvantes utilizadas para os bioensaios de contato direto e residual em associação ou não a suspensão do fungo *Beauveria bassiana*..... **46**
- Tabela 3.** Mortalidade total de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* submetidos aos tratamentos de suspensão de conídios do fungo *Beauveria bassiana* Unioeste 44 associado a adjuvantes e adjuvantes aplicados isoladamente, por meio de contato direto e residual, em diferentes concentrações..... **52**
- Tabela 4.** Mortalidade confirmada de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* submetidos aos tratamentos de suspensão de conídios do fungo *Beauveria bassiana* Unioeste 44 associado a adjuvantes, por meio de contato direto e residual, em diferentes concentrações..... **53**
- Tabela 5.** Efeito de adjuvantes sobre crescimento, esporulação, viabilidade e compatibilidade com *Beauveria bassiana* Unioeste 44 e respectivo índice biológico..... **54**
- Tabela 6.** Caracterização dos tratamentos e dispositivos de autoinoculação avaliados nos bioensaios de contaminação com superfície tratada, atração-e-infecção e atividade do fungo no tempo de armazenamento..... **68**
- Tabela 7.** Média de conídios do fungo *B. bassiana* por formulação do inóculo e quantidade de conídios ancorados nos diferentes dispositivos de autoinoculação..... **82**
- Tabela 8.** Mortalidade de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* pelo contato de superfícies com o fungo *Beauveria bassiana* Unioeste 44..... **83**
- Tabela 9.** Porcentagem média de captura de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* em diferentes dispositivos de autoinoculação revestidos com cola entomológica Colly® em condições de laboratório..... **84**
- Tabela 10.** Mortalidade total e confirmada de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* em dispositivos de autoinoculação revestidos com diferentes tipos de cola entomológica em condições de laboratório..... **86**
- Tabela 11.** Mortalidade total de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* após contato com dispositivos de autoinoculação, contendo diferentes proporções de conídios de *Beauveria bassiana* Unioeste 44 e terra de diatomáceas, na ausência ou presença da cera emulsionada SPLAT® em condições de laboratório..... **87**

Tabela 12. Mortalidade confirmada de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* após contato com dispositivos de autoinoculação, contendo diferentes proporções de conídios de *Beauveria bassiana* Unioeste 44 e terra de diatomáceas, na ausência ou presença da cera emulsionada SPLAT® em condições de laboratório..... **88**

Tabela 13. Mortalidade de adultos de *G. spegazziniana* após contato com fonte de inóculo do fungo a introdução da fonte de inóculo nas gaiolas para teste de transmissão em condições de laboratório..... **89**

Tabela 14. Viabilidade (%) de conídios de *Beauveria bassiana* Unioeste 44 em dispositivos de autoinoculação de papel micro-ondulado em diferentes preparações, armazenadas a 26 °C em laboratório..... **91**

Tabela 15. Porcentagem de mortalidade total e confirmada de *Gyropsylla spegazziniana* *Beauveria bassiana* Unioeste 44 em dispositivos de autoinoculação de papel micro-ondulado com e sem SPLAT® armazenados a 26 °C em laboratório..... **92**

Tabela 16. Mortalidade total e confirmada de *Gyropsylla spegazziniana* por *Beauveria bassiana* Unioeste 44 em dispositivos de auto inoculação de papel micro-ondulado com e sem SPLAT® em gaiola telada..... **94**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ampolas contendo ninfas de 4^o e 5^o ínstar (A), tamanho médio de um adulto (B), macho (C) e fêmea (D) de *Gyropsylla spegazziniana*..... **21**
- Figura 2.** Erval onde foram realizadas as coletas (A), ramo contendo ampolas nas brotações (B), ampola selecionada durante a triagem do material (C), recipiente plástico utilizado para acomodar as ampolas selecionadas (D) e detalhe da quantidade de material acomodado no recipiente até a emergência dos adultos (E)..... **42**
- Figura 3.** Mudanças compradas em viveiro comercial (A), recipientes plásticos (B) e substrato (C) utilizados para o plantio (D). Ambiente protegido para acomodação das plantas (E) e mudas padronizadas para os bioensaios (F)..... **43**
- Figura 4.** Câmara B.O.D. para armazenamento e crescimento do fungo (A), placa de Petri contendo o isolado Unioeste 44 após o crescimento (B), pré-secagem (7 dias) em dessecador de sílica gel (C), peneira granulométrica utilizada para a separação dos conídios (D) e secagem do fungo (3 dias) (E)..... **44**
- Figura 5.** Material utilizado para a diluição do fungo (A) e determinação da concentração (B) através da diluição seriada do fungo *B. bassiana* isolado Unioeste 44. Avaliação da viabilidade através da contagem de conídios germinados e não germinados (D)..... **45**
- Figura 6.** Recipientes plásticos (A) utilizados para a acomodar os insetos (B). Tratamentos (C) e aerógrafo (D) utilizados para a pulverização dos insetos (E) no bioensaio de contato direto e mudas no bioensaio de contato residual (F). Gaiolas contendo os tratamentos acomodadas em sala climatizada (G)..... **48**
- Figura 7.** Placa inoculada com o isolado Unioeste 44 em três pontos equidistantes (A) e pulverização dos tratamentos utilizando um aerógrafo (B). Colônias do fungo após sete dias de incubação (C) e recorte após a estimativa do diâmetro (D) para avaliação da produção de conídios (E)..... **50**
- Figura 8.** Meio de produção de conídios (M.E.) acondicionado em recipientes plásticos (A) e colônia produzida após sete dias de incubação (B). Transferência dos insetos para os recipientes contendo as colônias (C) e manutenção dos contatos por um período de 30 minutos (D)..... **68**
- Figura 9.** Mudanças padronizadas para os bioensaios (A) inseridas em placas de Petri contendo papel filtro no interior (B) e também na base (C). Mudanças inseridas em gaiolas (D) e posteriormente mantidas em sala climatizada (26 ± 2 °C; $60 \pm 10\%$ U.R.; 12 h fotofase) (E)..... **70**
- Figura 10.** Escova (A) utilizada para a aplicação da cera Splat® (B) em recipientes plásticos (C) para aumentar a aderência dos tratamentos. Manutenção dos insetos nos recipientes em contato com os tratamentos por 30 minutos (D)..... **71**

- Figura 11.** Espátula de madeira (A) utilizada para aplicação da cola entomológica (B) nos dispositivos de autoinoculação (C). Insetos acomodados em recipientes plásticos (D) para transferência em gaiolas contendo as mudas e os dispositivos (E)..... **72**
- Figura 12.** Dispositivos de autoinoculação fabricados a partir de papel comercial Colortrap® (A) e papel micro-ondulado (B) para inserção e avaliação em gaiolas (C)..... **73**
- Figura 13.** Escova (A) utilizada para a aplicação da cera Splat® (B) nos dispositivos de autoinoculação (C, D). Dispositivos anexados em gaiolas para infestação (E) e manutenção dos insetos em sala climatizada (F)..... **74**
- Figura 14.** Cadáveres (A, B) obtidos através dos bioensaios de contato direto armazenado em placas de Petri (C) a -10 C. Papel filtro e alfinete entomológico (D) utilizados para anexar os cadáveres nas mudas de erva-mate (E, F)..... **76**
- Figura 15.** Material utilizado para a diluição dos tratamentos (A) e inoculação em placas e Petri (B, C). Recorte das alíquotas após 20 horas de incubação (D) para avaliação em microscópio óptico (E) e determinação da viabilidade (F)..... **78**
- Figura 16.** Dispositivos de autoinoculação contendo os tratamentos (A, B) retirados de frascos de vidro (C) mantidos em B.O.D (D) a cada avaliação. Manutenção dos insetos em contato com os dispositivos por um período de 30 minutos (E, F)..... **79**
- Figura 17.** Gaiolas teladas (A, B) contendo mudas de erva-mate (C) e um dispositivo de autoinoculação com o respectivo tratamento (D). Gaiolas pequenas contendo os insetos após uma semana de contato com o dispositivo em gaiolas teladas (E)..... **80**
- Figura 18.** Diferença da quantidade de formulação aderida nos dispositivos de autoinoculação sem Splat® (A) e com Splat® (B)..... **83**
- Figura 19.** Adultos de *G. spegazziniana* contendo o fungo nas regiões dorsal e ventral após o contato com superfície tratada com as formulações (A) e colônia (B)..... **84**
- Figura 20.** Dispositivos de autoinoculação cilíndrico (A), quadrado (B) e retângular (C) retirados das gaiolas ao final da avaliação contendo insetos aderidos em sua superfície..... **85**
- Figura 21.** Dispositivo de papel Colortrap® (A) contendo cadáveres esporulados após o período de confirmação em câmara úmida e dispositivo de papel micro-ondulado (B) contendo cadáveres ausentes de crescimento do fungo após o período de confirmação..... **86**

1. INTRODUÇÃO

A cultura da erva-mate, *Ilex paraguariensis* (St Hil, 1822) (Magnoliophyta: Aquifoliaceae), retrata um dos sistemas agroflorestais mais antigos da região sul do Brasil, representando significativa importância socioeconômica ao país. Em 2011, a erva-mate foi responsável por uma receita de R\$ 180 milhões, ou seja, 80% do total dos produtos florestais não madeireiros (SEAB-DERAL, 2013). Recentemente a produção nacional de erva-mate foi de 346,9 mil toneladas, sendo o estado do Paraná responsável por 86,4% deste total (IBGE, 2016). Além disso, em 2017, a cultura da erva-mate contribuiu com uma receita de R\$ 252,76 milhões do faturamento bruto da produção de folha verde no Paraná (FUNDOMATE, 2019).

Sua exploração atual como monocultura, necessária em função da sua escassez no mercado, favoreceu o desenvolvimento de elevadas populações de insetos fitófagos e reduziu o número de inimigos naturais, elevando assim várias espécies ao *status* de praga (IEDE e MACHADO, 1989; CHIARADIA et al., 2002; DANIEL, 2009).

Gyropsylla spegazziniana (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae), conhecido como ampola-da-erva-mate é um inseto específico da cultura e pode ser encontrado em ervais nativos, adensados ou viveiros de produção de mudas, sendo considerada uma das principais pragas da cultura. Seus danos estão relacionados à deformação das brotações, reduzindo a área foliar da planta e conseqüentemente sua produtividade. Além disso, grandes infestações contribuem com o aumento da quantidade de partículas de insetos no produto final, depreciando sua qualidade, com perdas já estimadas na ordem de 54% (IEDE e MACHADO, 1989; PENTEADO, 1995; CHIARADIA et al., 2000; CHIARADIA et al., 2002; LEITE, 2002).

No Brasil, não é permitido o uso de agrotóxicos para o controle de pragas da erva-mate, por ser um produto consumido praticamente “*in natura*” (AGROFIT, 2019). Assim, o manejo de *G. spegazziniana* se dá por meio do controle cultural, limitando-se ao emprego de mão-de-obra manual para catação, poda e destruição dos ramos infestados (PENTEADO, 1995; RIBEIRO, 2005). Diante deste cenário, há a necessidade de explorar métodos de controle que venham a se tornar uma alternativa para a supressão de populações deste inseto.

Nesse sentido, o controle biológico por entomopatógenos, em especial os fungos entomopatogênicos representam uma possibilidade com grande potencial para a erva-mate, sendo já utilizados no controle da broca-da-erva-mate, por meio de um produto

comercial à base de conídios do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) (AGROFIT, 2019).

Em relação à ampola-da-erva-mate, Alves et al. (2013) comprovaram sua suscetibilidade aos fungos entomopatogênicos e Formentini et al. (2015) verificaram que o isolado Unioeste 44 de *B. bassiana* apresentou a maior atividade no inseto, com mortalidade média acima de 80% para ninfas de quinto instar, o que indicou o potencial desse isolado para continuidade dos estudos visando ao controle da praga.

Baseando-se nos experimentos de Formentini et al. (2015), e em bioensaios preliminares de pulverização aquosa do fungo *B. bassiana* sobre adultos de *G. spegazziniana* (LOEBLEIN, dados não publicados), observou-se que o controle satisfatório só seria possível em altas concentrações de conídios, o que pode inviabilizar o uso em função do custo de controle. Assim, mesmo com o potencial do fungo *B. bassiana* para o controle de *G. spegazziniana*, ainda há a necessidade de avaliar alguns parâmetros, visto que não é viável economicamente a aplicação de elevadas quantidades de fungo para o controle de pragas.

Portanto, torna-se necessária a adição de produtos na suspensão a ser pulverizada visando a aumentar os índices de: deposição, espalhamento, molhamento, adesão, retenção e toxicidade sobre o inseto alvo (COSTA et al., 2003). Uma forma de aumentar a eficiência do patógeno para o controle de *G. spegazziniana* pode ser através da adição de adjuvantes à calda da suspensão, como demonstrado para outras pragas, como *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae), *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908) (Hemiptera: Liviidae) e ninfas de *Bemisia tabaci* (Bellows & Perring, 1994) (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B (AUSIQUE, 2014; MASCARIN et al., 2014; MOTA, 2017).

Além da pulverização aquosa como mecanismo de liberação do fungo *B. bassiana* em campo, existem outros métodos que apresentam potencial para o manejo de *G. spegazziniana*, como a autoinoculação/autodisseminação do fungo. Esta estratégia é definida, segundo Ignoffo (1978) como o uso de insetos para a introdução e expansão de entomopatógenos no ambiente. Esta técnica se fundamenta no estabelecimento da infecção dependendo da sobrevivência do inseto para a disseminação do patógeno, atingindo sua população em grande escala (VAIL et al., 1993). Conforme já evidenciado para outras pragas como *D. citri* e *H. hampei* (PATT et al., 2015; MOTA, 2017).

Assim, outras formas de utilização do fungo *B. bassiana* devem ser compreendidas, buscando uma utilização eficiente do controle microbiano para o manejo da ampola-da-erva-mate. Nessa perspectiva, esta pesquisa teve por objetivo avaliar em condições de laboratório, duas estratégias para utilização do fungo *B. bassiana* visando ao controle de *G. spgazziniana*, sendo: pulverização de conídios com adjuvantes em contato direto e residual. E, também através de dispositivos de autoinoculação, visando avaliar a infecção e transmissão horizontal fúngica, bem como a viabilidade e atividade do fungo sob diferentes tempos de armazenamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Erva-mate

2.1.1 Biologia da espécie, manejo e cultivo

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (St Hil, 1822) (Magnoliophyta: Aquifoliaceae) é uma planta nativa da América do Sul e ocorre predominantemente na região sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), ocorrendo ainda em parte do Centro-Oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e parte do Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) (CORRÊA et al., 1999; CARVALHO, 2003; GROppo, 2013).

A planta adulta apresenta porte arbóreo, semelhante à laranjeira, podendo atingir até 15 m de altura em locais de mata fechada, porém, quando submetida à poda, não ultrapassa os 7 m (BRAGAGNOLO et al., 1980). Na cultura da erva-mate, as folhas e ramos são colhidos sucessivamente a cada 18 ou 24 meses, utilizando-se tesouras, facões e foice, de forma manual, sendo recomendado quando possível, cortar apenas os ramos maduros, pois brotam melhor e produzem um bom material de corte (MUNARETO, 1992; FLEIG et al., 2003). Estas brotações ocorrem com maior frequência no mês de outubro, no final da safra, período este em que se registram maiores índices populacionais de *G. spegazziniana* nos ervais (REISSMANN et al., 1985; OLIVA et al., 2014).

As folhas e ramos da erva-mate podem ser beneficiados dão origem à matéria-prima para a produção de bebidas, como chimarrão, chá-mate, tereré, bebidas energéticas, entre outros (MAZUCHOWSKI e RUCKER, 1993). Além disso, podem ser extraídos princípios ativos empregados na indústria farmacêutica para fabricação de medicamentos e cosméticos, dentre outros produtos. Estudos recentes indicam a presença de componentes na erva-mate com potencial de atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus, incluindo patógenos de origem alimentar (BURRIS et al., 2012; COSTA et al., 2017). Além disso, pesquisas científicas comprovam a ação das propriedades das folhas sobre o organismo humano, atuando como diurético, antioxidante, colerético, entre outros (MACCARI Jr. e MAZUCHOWSKI, 2000; SCHINELLA et al., 2000; EFING, 2008).

Em relação ao seu manejo, Andrade (2002) afirma que existem três tipos: o extrativista, o sistema tecnificado e o sistema não tecnificado. O sistema extrativista

consiste na produção mais rudimentar, utilizando mão-de-obra manual para o manejo da cultura. O sistema tecnificado se caracteriza pela compra de mudas, adubação química, eventualmente o emprego de herbicidas para o controle da vegetação e uso de instrumentos para a poda. Já o manejo não tecnificado constitui-se da mescla dos dois primeiros manejos, utilizando mudas provenientes de compra ou produção própria, replantio de falhas, coveamento e poda manual.

De qualquer forma, a erva-mate, antes obtida a partir da atividade extrativista caracterizou-se inicialmente pela extração de árvores nativas desprovida de técnicas silviculturais apropriadas. A partir de 1970, com a expansão das áreas de cultivo de trigo e soja, grande parte dos ervais foi eliminada (LEITE, 2002). Conseqüentemente houve diminuição da matéria-prima no mercado e aumento da demanda de produtos formulados a partir da erva-mate nos anos seguintes. Tal fato impulsionou o cultivo dos ervais em sistema de monocultura, que facilitam o manejo e aumentam a produtividade, porém favorecem o ataque de doenças e pragas (DÍAZ, 1997; SOARES e IEDE, 1997).

2.1.2 Importância econômica

A produção de erva-mate no Brasil concentra-se em áreas com extensão territorial inferior a 50 hectares, correspondendo estes a 83,9% dos estabelecimentos agropecuários de produção (IBGE, 2006). Os dados mais atuais disponíveis apontam que a exploração econômica da erva-mate é realizada em aproximadamente 596 municípios compreendendo cerca de 750 indústrias e um total de 700 mil empregos diretos e indiretos (MEDRADO e VILCAHUAMAN, 2014).

A produção de erva-mate no Brasil, em 2016 foi estimada em 346,9 mil toneladas, sendo o estado do Paraná o principal produtor, com participação de 86,4% (IBGE, 2016). Além disso, em 2017, a cultura da erva-mate foi responsável por uma receita de R\$ 252,76 milhões do faturamento bruto da produção de folha verde no estado do Paraná (FUNDOMATE, 2019).

2.1.3 Suscetibilidade a pragas

No ambiente natural, há uma diversidade de plantas que asseguram a existência de uma gama de artrópodes associados, porém, o adensamento no sistema de

monocultivo alterou as características do ecossistema, favorecendo algumas espécies da artropodofauna associada à cultura da erva-mate em detrimento de seus inimigos naturais (PENTEADO, 1995; DIAZ, 1997). Segundo Borges e Lazzari (2008), a erva-mate é uma espécie ombrófila, quando cultivada em locais abertos está sujeita ao estresse fisiológico, fato que a predispõe ao ataque de pragas e ocorrência de doenças.

No Brasil, há 30 anos registrou-se a ocorrência de uma centena de insetos associados à erva-mate, dos quais 86 espécies de insetos são citadas alimentando-se de diferentes partes da planta (IEDE e MACHADO, 1989).

Entre as espécies que alcançam o *status* de pragas que atacam a cultura da erva-mate, destacam-se a broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae), a lagarta da erva-mate, *Thelosia camina* (Schaus, 1920) (Lepidoptera: Eupterotidae), *Hylesia* spp. (Hubner, 1820) (Lepidoptera: Saturniidae) conhecidas como lagarta-do-cartucho, um complexo de espécies de ácaros, em especial o ácaro-do-bronzeado *Dichopelmus notus* (Keifer, 1959) (Acari: Eriophyidae) e a ampola-da-erva-mate, *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae), sendo essa uma das espécies que causa maiores danos à cultura (PENTEADO, 1995; IEDE et al., 2000; DANIEL, 2009).

2.2 Ampola-da-erva-mate

2.2.1 Bioecologia da espécie

Gyropsylla spegazziniana (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae), popularmente conhecida como ampola-da-erva-mate, é uma espécie monófaga específica da cultura, sendo encontrada tanto em ervais nativos, implantados ou em viveiros de produção de mudas (IEDE e MACHADO, 1989; DE COLL e SAINI, 1992).

Seus ovos são elípticos e de coloração amarelada medindo aproximadamente 0,36 mm de comprimento. As ninfas apresentam coloração amarelada entre o primeiro e terceiro instar e coloração esverdeada do quarto ao quinto instar (CHIARADIA et. al., 2000). Os adultos de *G. spegazziniana* apresentam coloração verde amarelado, apresentando dois pares de asas membranosas, antenas tão compridas quanto o corpo e pernas posteriores adaptadas para saltar. A fêmea é diferenciada do macho pelo aparelho ovipositor (localizado na parte final do abdome) e por serem

ligeiramente maiores que os machos (aproximadamente 2,9 e 2,6 mm de comprimento, respectivamente) (Figura 1) (DE COLL e SAINI, 1992; LEITE, 2002).

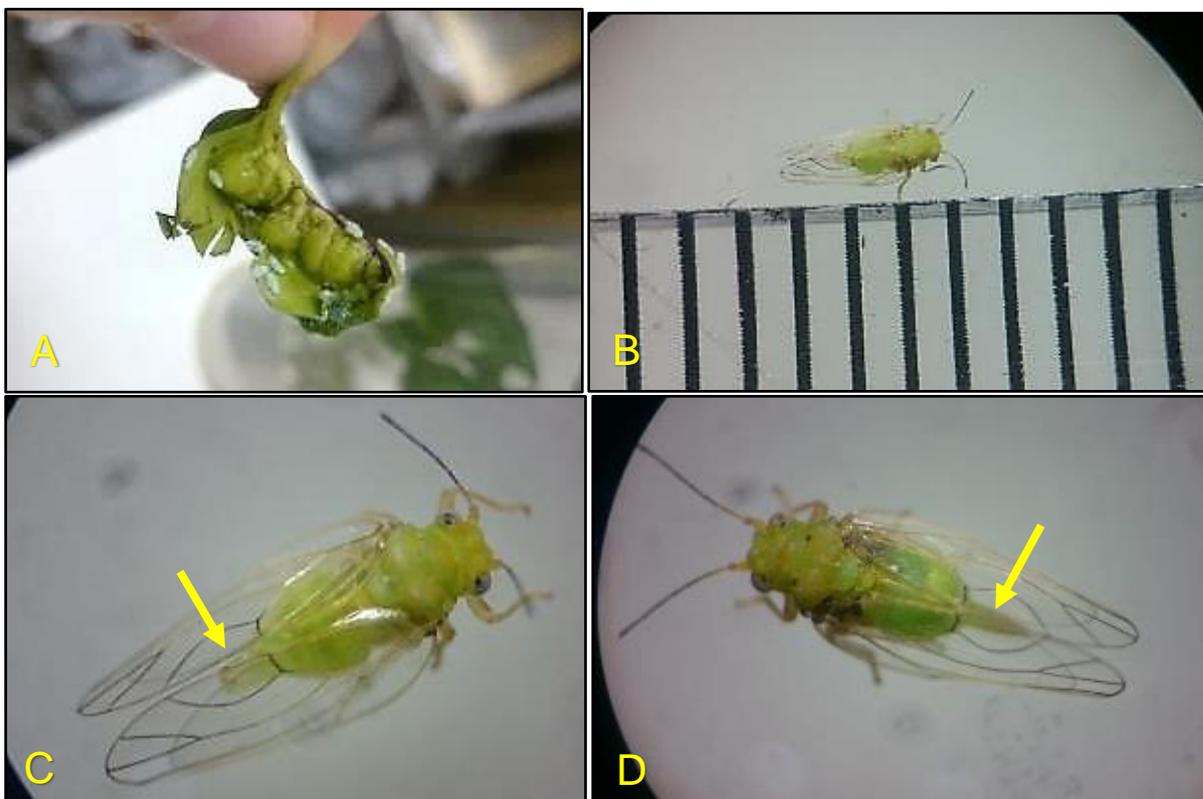


Figura 1. Ampolas contendo ninfas de 4^o e 5^o ínstar (A), tamanho médio de um adulto (B), macho (C) e fêmea (D) de *Gyropsylla spegazziniana* (Fonte: arquivo pessoal).

O desenvolvimento ovo a adulto dura em média 38,7 dias, totalizando cinco instares ninfais, com longevidade média de 15,2 dias para as fêmeas e 43,7 dias para os machos (LEITE e ZANOL, 2001). As fêmeas ovipositam nas brotações da erva-mate e inoculam saliva nas folhas, que sendo tóxica para as plantas, causa hipertrofia nos tecidos e formação de uma galha (ampola), onde se desenvolvem as ninfas (PENTEADO, 1995). Tanto as ninfas quanto os adultos sugam a seiva dos ramos, principalmente das brotações jovens (PEDROSA-MACEDO et al., 1993).

Em relação à flutuação populacional da praga, o auge ocorre entre os meses de novembro e fevereiro, sendo que a temperatura ideal para a atividade de indivíduos adultos está entre 20 e 25°C (DE COLL e SAINI, 1992; BORGES et al., 2003).

2.2.2 Importância e danos

G. spegazziniana é considerada uma das pragas-chave da cultura da erva-mate, acometendo desde mudas até plantas adultas, podendo desenvolver grandes populações nos ervais (CHIARADIA et al., 2002).

A partir da inoculação da saliva as folhas deformadas se desenvolvem irregularmente formando uma galha globosa ou ampola, que geralmente caem após a saída dos insetos, ocorrendo redução da área foliar. Com isso, a planta consome grande quantidade de reservas nutricionais para emitir novas brotações, comprometendo o crescimento e formação de folhas saudáveis (IEDE e MACHADO, 1989; PENTEADO, 1995; CHIARADIA et al., 2002).

Leite (2002) verificou que mudas recém-transplantadas quando infestadas apresentam retardamento em seu desenvolvimento e, obviamente, as infestações em viveiros acarretam mudas de qualidade inferior. Além de reduzir a produtividade dos ervais, intensas infestações ainda contribuem para o aumento da quantidade de partículas de insetos no produto final, reduzindo a qualidade e o preço do mesmo (PENTEADO et al., 2000).

Com isso, estimam-se que as perdas no Brasil causadas por *G. spegazziniana* sejam da ordem de 54% (CHIARADIA et al., 2002; LEITE, 2002) e na Argentina, estimaram-se as perdas em até 35% na produção (DIAZ, 1997).

2.3 Controle da ampola-da-erva-mate

2.3.1 Métodos Preventivos

São recomendados a escolha e cultivo adequados de mudas, cuidados com o solo, menor densidade de plantas e a diversificação dos ervais com outras espécies vegetais favorecendo a resistência de plantas a pragas (PENTEADO, 1995; GRIGOLETTI JR. et al., 1997).

Também, incluem as podas e colheita, sendo desencorajadas as colheitas de verão como forma de se evitar a elevação populacional do inseto, pois com a poda formam-se novas brotações favorecendo assim a sua reprodução. Fatores ambientais também podem ser considerados como fatores naturais de mortalidade e controle,

sendo os principais a precipitação e as temperaturas baixas (CHIARADIA et al., 2002; BORGES et al., 2003).

2.3.2 Controle Químico

No Brasil, não existem registros de inseticidas para o controle de *G. spegazziniana*, por ser um produto consumido praticamente “*in natura*” (AGROFIT, 2019). Assim, são necessárias medidas efetivas e sustentáveis, que incluam a prevenção da infestação e o controle.

Ainda que proibido no Brasil, a pulverização com calda sulfocálcica e Parathion (inseticida organofosforado) foi citada como uma provável recomendação para controle da ampola (BORGES e LAZZARI, 2008). Além disso, o controle químico de *G. spegazziniana* foi registrado na Argentina, com a orientação de uso de Dimetoato (100 a 150 mL/100 L de água) (PRAT KRICUN, 1993; BURTNIK, 2003).

2.3.3 Controle Biológico

O controle biológico de adultos e ninfas de *G. spegazziniana* se dá naturalmente por meio de insetos predadores e microrganismos entomopatogênicos. Há relatos da ocorrência do parasitoide *Halictophagus* sp. (Kogan, 1959) (Strepsiptera: Halictophagidae), os predadores coccinelídeos (Mulsant, 1850) (Coleoptera: Coccinellidae), *Curinus coeruleus*; *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763); *Azya luteipes* (Mulsant, 1850); *Scymnus argentinicus* (Weise, 1906); *Hyperaspis* sp., *Olla abdominalis* (Lima, 1951) e *Exochomus jourdani* (Mulsant, 1853). Crisopídeos do gênero *Chrysoperla* sp. (Steinman, 1964) (Neuroptera: Chrysopidae), os sirfídeos *Ocyrtamus norina* (Curran, 1941) (Diptera: Syrphidae); *O. caldus* (Walker, 1849); *O. amplus* (Fluke); *O. antiphates* (Walker) e *Toxomerus* sp, a formiga *Pseudomyrma gracilis* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera: Formicidae), além de ácaros predadores (Arachnida: Acari) (SAINI e DE COLL, 1993; SOARES, 1994; DIAZ, 1997).

As larvas de Syrphidae são relatadas como importantes predadoras de ninfas no interior das ampolas (CHIARADIA et al., 2000; BORGES e LAZZARI, 2008). Também, Leite et al. (2007), ao realizarem um estudo em São Mateus do Sul, PR, verificaram maior frequência de ocorrência de Hemerobiidae, Chrysopidae e *Cycloneda* sp., além

de larvas de sirfídeos, tripes predadores, strepsípteros, aranhas e ácaros com o período de maior incidência de *G. spegazziniana*.

2.3.4 Controle Comportamental

Atualmente, os feromônios sexuais são utilizados em armadilhas para monitoramento de pragas, coleta massal e confusão sexual como método de interrupção do acasalamento, impedindo os insetos de localizarem o respectivo parceiro. Tal ferramenta constitui-se uma estratégia de controle promissora, pois os feromônios não acumulam resíduos no ambiente, alimentos e não apresentam efeito nocivo para outras espécies (ZARBIN et al., 2009; ESPINOZA et al., 2012).

Especificamente em relação à ampola-da-erva-mate, foi comprovado que durante o comportamento sexual ocorre a liberação de voláteis pela fêmea precedendo a cópula, como mecanismo de atração do parceiro (WALERIUS, 2017). Além disso, no mesmo trabalho, o componente 2-nonadecanona foi identificado apenas nos extratos das fêmeas da espécie, propiciando a possibilidade para futuramente ser testado para avaliar sua atividade na atração sexual de machos e fêmeas, assim como sua ação em sinergia a outros compostos oriundos de *I. paraguariensis*.

2.3.5 Outros métodos de controle

Recomenda-se como forma de se controlar populações de *G. spegazziniana*, a poda e queima dos brotos com sintomas de ataque. Também, há recomendação do óleo de sementes de nim (BORGES e LAZZARI, 2008).

Também, o óleo de nim foi avaliado em diferentes concentrações, levando a mortalidade de 53% da população da praga, em condições de campo e quando avaliado como tática de controle da ampola em mudas, alcançou-se 80% de mortalidade, comprovando o potencial inseticida contra o inseto (HAAS et al., 2011; FORMENTINI et al., 2016).

2.4 Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são considerados agentes de biocontrole promissores em função da sua capacidade de atingir populações de insetos e ácaros, contando com um amplo espectro de hospedeiros, além da capacidade de cultivo e formulação em laboratório (LEITE et al., 2003). Estes patógenos são frequentemente isolados de aleirodídeos (Homoptera: Aleyrodidae) e pertencem a mais de 20 espécies, incluindo *Aschersonia aleyrodis* (Webber, 1897), *Lecanicillium* sp. (Zimm.) (Gams & Zare), *Isaria* sp. (Wize, 1904) (Hypocreales: Clavicipitaceae) e *B. bassiana* (RAMOS, 2004).

Segundo Putzke e Putzke (2002), existem aproximadamente 85 gêneros e mais de 750 espécies de fungos patogênicos a invertebrados. Porém, a maioria dos trabalhos menciona principalmente o uso dos fungos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Hypocreales: Clavicipitaceae). Como por exemplo, o controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar nas décadas de 60 e 70 e de outras pragas como *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908) (Hemiptera: Liviidae), a mosca-negra-do-citrus *Aleurocanthus woglumi* (Ashby, 1915) (Hemiptera: Aleyrodidae), o cascudinho de aviário *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) e o psílideo que ataca culturas de goiabeiras *Triozoida limbata* (Enderlein, 1928) (Hemiptera: Psyllidae) (ZIMMERMANN, 1986; ALVES e FARIA, 2005; GASSEN, 2006; ALVES et al., 2015; MEDEIROS, 2016; AUSIQUE et al., 2017).

Os fungos entomopatogênicos podem ser dispersos no ambiente através da ação do vento e da chuva. Além disso, essa dispersão também pode ocorrer mediante hospedeiros infectados que se locomovem para locais diferentes do qual se infectou (MEYLING e EILENBERG, 2007). Além disso, podem causar epizootias naturais e infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros (ALVES, 1998).

A utilização de fungos entomopatogênicos vem sendo estudada há mais de um século, e nos últimos anos tem aumentado o interesse pelo desenvolvimento comercial destes organismos em função de problemas com produtos químicos, como resistência a pesticidas, aumento do custo de produção e danos ambientais (WRAIGHT e BRADLEY, 1996). Devido ao modo de infecção multifatorial característico dos fungos, a probabilidade dos insetos terem a seleção da resistência é menor ou mais lenta do que no caso dos agrotóxicos (JUNGES, 2010).

Em ambientes de clima tropical, epizootias naturais de *Aschersonia* spp., *Isaria* spp., *Lecanicillium* spp., *Hirsutella* spp., *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson, 1883), *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Cordyceps* spp., e de muitas espécies de fungos da ordem Entomophthorales são frequentes. É provável que na América Latina, para cada praga, haja no mínimo um patógeno capaz de exercer o seu controle sustentável (ALVES et al., 2008 a; b).

Em relação à associação de fungos em populações da ampola, foi registrada a ocorrência do fungo *Zoophthora radicans* (Brefeld) (Entomophthorales: Entomophthoraceae) na Argentina e Brasil, sendo relatada mortalidade superior a 90% dos indivíduos coletados (SÓSA-GOMEZ et al., 1994; ALVES et al., 2009).

2.4.1 Modo de ação dos fungos entomopatogênicos

O mecanismo de infecção dos fungos entomopatogênicos geralmente ocorre via tegumento iniciando com a adesão dos conídios a cutícula dos hospedeiros, germinando entre 12 e 18 horas, dependendo da presença de nutrientes, oxigênio, pH e temperatura. A penetração na cutícula ocorre pela ação degradativa de enzimas aliada a pressão exercida pelo tubo germinativo e apressório (FERRON et al., 1991; STARNES e JOKLIK, 1983).

A penetração no corpo do hospedeiro é favorecida pela produção de proteases, quitinases e lipases, ocorrendo a penetração direta da cutícula. Após isso, o fungo se espalha pela hemocele, produzindo elevadas quantidades de compostos tóxicos, causando paralisia e morte nos insetos (FLEXNER et al., 1986). Com o hospedeiro morto, o fungo coloniza o corpo totalmente e hifas emergem dos espiráculos e da cutícula, esporulando na superfície, podendo infectar outros hospedeiros suscetíveis através da disseminação no ambiente pela água, vento e animais (WHITTEN; OAKESHOTT, 1991; ALVES, 1998).

2.4.2 O fungo *Beauveria bassiana*

Dentre os fungos entomopatogênicos que promovem epizootias, *B. bassiana* é o mais comumente encontrado em insetos mortos no ambiente natural, podendo ocorrer de forma enzoótica ou epizoótica em diferentes espécies de insetos praga. Além disso, este fungo é amplamente estudado como agente de controle biológico,

possuindo ocorrência generalizada em muitos países, sendo mais frequente sua ocorrência sobre insetos e em amostras de solo (SAMSINAKOVA, 1966; ALVES, 1998; PIRES, 2002).

B. bassiana é um dos fungos entomopatogênicos mais pesquisados pela capacidade de atuar em uma maior gama de hospedeiros e possuir maior exigência nutricional, podendo ser facilmente cultivados em meio de cultura (LEITE et al., 2003). Dentre seus hospedeiros incluem-se lepidópteros, coleópteros, hemípteros, dípteros, himenópteros e ortópteros. Já havendo sido constatado em mais de 200 espécies de insetos agrupados em nove ordens. Seus conídios possuem a capacidade de penetrar em qualquer parte da cutícula do inseto, ou até mesmo através do aparelho respiratório e digestório (IGNOFFO, 2009; ALVES, 1998).

O mecanismo de defesa dos insetos é incapaz de detectar os primeiros eventos que caracterizam a infecção deste patógeno, resultando em baixa especificidade para os artrópodes (SILVA et al., 2006; JIN et al., 2008). Segundo Faria e Wraight (2007), as formulações a base de *B. bassiana* compreendiam na época, 33,9% do total de micoinseticidas desenvolvidos em nível mundial para o controle de insetos de diferentes ordens. A associação deste fungo a diferentes compostos para obtenção de formulações, aliada à capacidade de produção, tornou este patógeno um dos mais comercializados no mundo (SILVA et al., 2006; JIN et al., 2008).

Em relação a *G. spgazziniana*, Alves et al. (2013) observaram em laboratório a suscetibilidade da ampola-da-erva-mate a alguns isolados do fungo *B. bassiana*. Em outro estudo mais recente de seleção de isolados, observou-se 81% de mortalidade de ninfas deste inseto ocasionada pelo isolado Unioeste 44 deste fungo (FORMENTINI et al., 2015).

2.5 Formulações do fungo *Beauveria bassiana* e adjuvantes

Os adjuvantes consistem em produtos que quando adicionados aos agroquímicos aumentam o desempenho da solução, sendo definidos também como materiais adicionados ao tanque de mistura com o objetivo de modificar a ação química e as propriedades físicas da calda (STICKER, 1992). Além disso, os produtos adjuvantes têm a capacidade de reduzir a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis, proporcionando a formação de uma emulsão de um líquido em outro, como

por exemplo, óleo em água, através da combinação de grupos polares com apolares (FLECK, 1993).

Os adjuvantes são conhecidos e amplamente utilizados por melhorar a eficiência e desempenho dos agroquímicos, reduzir a evaporação, espuma, volatilização e deriva. Além de proporcionar um melhor ganho operacional de uso de maquinários. Estes componentes são utilizados para potencializar o efeito do ingrediente ativo e promover a melhora das características do produto formulado, proporcionando entre outras propriedades o aumento das funções foto protetora, fago estimulante e antievaporante (GREEN e BEESTMAN, 2007).

Os adjuvantes formulados a partir de óleos vegetais ou minerais são classificados como ativadores, sendo produtos que tem como principal objetivo melhorar diretamente a atividade do agroquímico, principalmente aumentando a taxa de absorção resultando em maior eficiência (PENNER, 2000; OLIVEIRA, 2006).

A adição de adjuvantes em caldas de pulverização contribui para a formação de filmes líquidos sobre as superfícies foliares, devido ao processo de coalescência das gotas. Além disso, uma menor tensão superficial permite também a transposição de obstáculos, como pelos foliares, aumentando a quantidade de princípio ativo que atinge as áreas de absorção (CUNHA et al., 2010).

Os micoinseticidas provem do uso de um agente fúngico como bioinseticida e um produto inerte, como por exemplo, pós, talcos, óleos, entre outros. A formulação correta resulta em um controle mais eficiente do inseto alvo, além de facilitar a homogeneidade da distribuição de microrganismo, fornecendo maior proteção contra os efeitos da radiação solar e outras intempéries ambientais (BATISTA FILHO et al., 1998).

Alguns produtos quando associados aos entomopatógenos podem melhorar as suas características e, assim, garantir um aumento na estabilidade, eficiência e virulência do fungo. Sabe-se que alguns produtos podem influenciar de maneira positiva a germinação do fungo, aumentando sua agressividade infecciosa, promovendo também o aumento na produção de conídios, o que favorece sua utilização conjunta com o fungo para o manejo de pragas (RHODES, 1993).

2.6 Autoinoculação/autodisseminação de fungos entomopatogênicos

A utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de populações de insetos pragas através da autoinoculação/autodisseminação é também conhecida como estratégia atraí-e-infecta. Para este mecanismo, os insetos são atraídos para armadilhas contendo o patógeno com o objetivo de induzir epizootias, técnica eficiente e utilizada para diferentes espécies, em que o próprio inseto realiza o transporte de propágulos infectivos após o contato com patógeno (JACKSON et al., 1992; PELL et al., 1993; LACEY et al., 1994).

Esta técnica se fundamenta na dependência da sobrevivência do inseto para a disseminação do patógeno visando atingir maior quantidade de indivíduos no campo (VAIL et al., 1993). Para Ignoff (1978) e Furlong et al. (1995), o uso desta técnica é definido como sendo o uso de insetos para a introdução e expansão de entomopatógenos nos ecossistemas, sendo imprescindível conhecer o comportamento do inseto para o emprego eficaz desta técnica como tática de controle.

Como exemplos, Yasuda (1999) utilizou armadilhas contendo feromônio e atrativo alimentar para atrair o gorgulho-da-batata-doce, *Cylas formicarius* (Fabricius, 1798) (Coleoptera: Brentidae), em sistemas de autoinoculação do fungo *B. bassiana*. Também, diferentes estudos foram conduzidos utilizando fibra de tecido inoculados com fungos entomopatogênicos e colocados em troncos de árvores para o controle de diferentes espécies de insetos praga (HIGUCHI et al., 1997; DUBOIS et al., 2004; LIU e BAUER, 2008; SHAPIRO-ILAN et al., 2009).

O uso de armadilhas de autoinoculação para o controle de *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard, 1926) (Diptera: Agromyzidae) utilizando conídios puros de *B. bassiana* espalhados sobre um tecido colocado na região central de uma armadilha foram estudados por Migiro et al. (2010), resultando em até 100% de mortalidade para os insetos atraídos pela cor amarela.

Moran et al. (2011) estudaram a autoinoculação e disseminação do fungo *Isaria fumorosea* (Wize) (Hypocreales: Cordycipitaceae) para o controle de *D. citri* (Kuwayama, 1908) (Hemiptera: Liviidae), utilizando cartões amarelos revestidos com blastósporos do fungo, verificando que o uso de voláteis cítricos como atrativos aumentou em 35% a eficiência do controle da população do inseto.

Posteriormente, Patt et al. (2015) desenvolveram um dispositivo autodisseminador utilizando a cor amarela como atrativo e conídios do fungo *I.*

fumoso para contaminação de adultos de *D. citri*. Foi verificado que, mesmo com a redução da viabilidade do fungo, a concentração de conídios que aderiu ao corpo do inseto foi suficiente para causar altos índices de mortalidade de adultos, resultando em transmissão horizontal e secundária do patógeno para ninfas.

Mais recentemente, Chow et al. (2018) avaliaram a eficiência da autodisseminação de *I. fumoso* em condições de campo para o controle de *D. citri* em diferentes períodos do ano. Os resultados indicaram que o controle das populações do inseto foi igualmente eficaz nos diferentes períodos de avaliação, reduzindo a reprodução em 90% e a intensidade média de ataque de adultos em 76%.

Para a ampola-da-erva-mate, não existem registros do emprego de armadilhas de autoinoculação para seu controle, constituindo assim uma possibilidade do emprego do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* para o manejo deste inseto.

REFERÊNCIAS

AGROFIT – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Consulta Aberta (Acesso Livre)**. [S.l.]. dez. 2016. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 30 abr. 2018.

AGROFIT – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Consulta Aberta (Acesso Livre)**. [S.l.]. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 06 out. 2019.

ALVES, L.F.A. et al. Beauveria Bassiana Applied to Broiler Chicken Houses as Biocontrol of *Alphitobius Diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae), an Avian Pathogens Vector. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, n. 4, p. 459-466, 2015.

ALVES, L.F.A. et al. Susceptibility of *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 363-366, Sept. 2013.

ALVES, L.F.A.; LEITE, L.G.; OLIVEIRA, D.G.P. Primeiro Registro de *Zoophthora radicans* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) em Adultos da Ampola-da-Erva-Mate, *Gyropsylla spegazziniana* Lizer & Trelles (Hemiptera: Psyllidae), no Brasil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 5, p. 697-698, out. 2009.

ALVES, S.B. et al. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, p. 69-110, 2008a.

ALVES, S.B. et al. O controle microbiano na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, p.21-48, 2008b.

- ALVES, S.B. Fungos Entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. Ed., Piracicaba: FEALQ, p.289-382, 1998.
- ALVES, R.T.; FARIA, M.R. **Situação atual do uso de fungos entomopatogênicos no Brasil**. Jan. 2005.
- ANDRADE, F.M. Exploração, manejo e potencial socioeconômico da erva-mate. In: SIMOES, L.L.; LINO, F.C. **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: SENAC, 2002, p. 19-34.
- AUSIQUE, J.J.S. Efficacy of entomopathogenic fungi against adult *Diaphorina citri* from laboratory to field applications. *Journal of Pest Science*, v. 90, n. 3, p. 947-960, June 2017.
- BATISTA FILHO, A. et al. Formulação de entomopatógenos. IN: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, p. 915-967, 1998.
- BORGES, L.R.; LAZZARI, S.M.N. Flutuação populacional de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) em dois sistemas de cultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae). **Floresta**, Curitiba, v. 38, n. 2, p. 325-330, jun. 2008.
- BORGES, L.R.; LÁZZARI, S.M.N.; LÁZZARI, F.A. Comparação dos sistemas de cultivo nativo e adensado de erva mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., quanto à ocorrência e flutuação populacional de insetos. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 563-568, dez. 2003.
- BRAGAGNOLO, N.; PAN, W.; KLOSOVSKI FILHO, L. **Manual técnico de erva-mate**. Curitiba: ACARPA/EMATER, 1980. 40p.
- BURRIS, K.P. et al. Composicion and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St-Hil.): A review. **Chilean Journal of Agricultural Research**. Zivanovic, Svetlana, v. 72, n. 2, p. 268-274, June 2012.
- BURTNIK, O.J. **Manual del pequeño yerbatero correntino**. Santo Tomé, Corrientes, Argentina: INTA, ERA, 2003. 58 p.
- CARVALHO, P.H.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.
- CHIARADIA, L. A., MILANEZ, J.M.; SABEDOT, S.M., 2000. Caracterização e danos da ampola-da-erva-mate. **Revista Agropecuária Catarinense**, [S.l.], vol. 13, n. 1, p. 50-53, mar. - maio 2000.
- CHIARADIA, L.A.; MILANEZ, J.M.; ZIDKO, A. Estimativa das gerações anuais de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer, 1917) em função de sua exigência térmica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 385-391, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n3/a04v32n3.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2018.
- CHOW, A. et al. Field Efficacy of Autodissemination and Foliar Sprays of an Entomopathogenic Fungus, *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae), for Control of Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), on Residential Citrus. **Biological and Microbial Control**, v. 20, n. 10, p. 1-12, Oct. 2018.
- CORRÊA, S.; KIST, B. B.; QUINTANA, A. **Anuário Brasileiro da Erva-Mate**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Grupo de Comunicações, 1999, 79 p.

COSTA, D. E. M.; RACANICCI, A. M. C.; SANTANA, A. P. Atividade antimicrobiana da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contra microrganismos isolados da carne de frango. **Ciência Animal Brasileira**, Gioânia. v. 18, p.1-7, jun. 2017.

COSTA, E.A.D. et al. Compatibilidade de adjuvantes no desenvolvimento “*in vitro*” dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **STAB**, v. 22, n. 2, p. 38-40, 2003.

CUNHA, J.P.A.R.; ALVES, G.S.; REIS, E.F. Efeito da temperatura nas características físico-químicas de soluções aquosas com adjuvantes de uso agrícola. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 665-672, 2010.

DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. 1. ed. Dourados, MS: UFGD; UEMS, 2009. 288 p.

DE COLL, O.R., SAINI, E.D. **Insetos y ácaros perjudiciales al cultivo de la yerba mate en la Republica Argentina**. Montecarlo, Argentina: INTA, E.E.A., 1992, 48 p.

DIAZ, D.Y.F. Perspectivas del manejo integrado de plagas em yerba mate. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1ª REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVAMATE, 2. 1997, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA, 1997. p. 371-390.

DUBOIS, T. et al. Evaluating the efficiency of entomopathogenic fungi against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae), by using cages in the field. **Environmental Entomology**, v. 33, n. 1, p. 62-74, 2004.

EFING, L.M.A.C. **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil)**. 2008. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

ESPINOZA, G.; GAMBETTA, J.; ROJAS, R. Identificación de una Potencial Feromona Sexual de Copitarsia corruda por Cromatografía de Gases y Electroantenoграфия, con miras al manejo integrado de plagas del espárrago. **Revista de la Sociedad Química del Perú**. Lima, v. 78, n. 4, p. 225-233, oct. 2012.

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

FERRON, P.; FARGUES, J.; RIBA. Fungi as microbial insecticides against pest. In: ARORA, D.K.; AJELLO, I.; MUKERJI, K.G. (Ed.) **Handbook of applied mycology**. New York: Marcel Dekker, 1991. v. 2. Humans, animals and insects, p. 665-706.

FLECK, N.G. **Controle químico de plantas daninhas**. Porto Alegre: UFRGS, 1993. 132 p.

FLEIG, F.D.; SCHNEIDER, P.R.; FINGER, C.A.G. Influência do Espaçamento e Idade da Brotação na Morfometria de Povoamentos de *Ilex paraguariensis* St. Hill. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 73-88, jun. 2003. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/1725/994>>. Acesso em: 15 maio 2018.

FLEXNER, J.; LIGHTERT, B.; CROFT, B.A. The effect of microbial pesticides to non-target, beneficial arthropods. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 16, n. 3, p. 203-254, July 1986.

FORMENTINI, M.A.; ALVES, L.F.A.; SCHAPOVALOFF, M.E. Insecticidal activity of neem oil against *Gyropsylla spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) nymphs on Paraguay tea seedlings. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, n. 4, p. 951-954, Nov. 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjb/v76n4/1519-6984-bjb-1519-698404915.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2018.

FORMENTINI, M. A. et al. Characterization and activity of entomopathogenic fungi isolates against “Paraguay tea ampul” (*Gyropsylla spegazziniana*) (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 6, p. 3553-3566, Nov./Dec. 2015.

FUNDO DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO DA CADEIA PRODUTIVA DE ERVA-MATE - FUNDOMATE. **INFORMATIVO DO FUNDOMATE**. Estrela - RS: jun. 2019, n. 49, p. 3.

FURLONG, M.J. et al. Field and laboratory evaluation of a sex pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogenic *Zoopthora radicans* (Entomophthorales) by the diamond-back moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 85, p. 331-337, 1995.

GASSEN, M.H. **Patogenicidade de fungos entomopatogênicos para o psílideo da goiabeira *Triozoida* sp. (Hemiptera: psyllidae) e compatibilidade de agrotóxicos utilizados na cultura da goiaba sobre estes agentes de controle biológico**. 2006. 110 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, 2006.

GRIGOLETTI JR, A.J.; SANTOS, A.F.; AUER, C.G. Doenças da erva mate no Brasil. In: CONGRESSO SUL AMERICANO DA ERVA-MATE, 1ª, REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2ª, 1997, Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA, 1997. p. 359-370.

GROPPO, M. Aquifoliaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB50>>. Acesso em: 30 abr. 2018.

HAAS, J. et al. Efeito de óleo de sementes de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) sobre *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles), na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, n. 2, p. 194-199, mar. 2011.

HIGUCHI, T. et al. Development of biorational pest control formulation against longicorn beetles using a fungus, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 3, p. 236-243, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Agência de Notícias - Pevs: **produção da silvicultura e da extração vegetal alcança R\$ 18,5 bilhões**. [S.I.], 2016. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/16981-pevs-2016-producao-da-silvicultura-e-da-extracao-vegetal-alcanca-r-18-5-bilhoes.html>>. Acesso em: 29 abr. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo agropecuário**. [S.I.], 2006. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/816>>. Acesso em: 30 abr. 2018.

- IEDE, E.T. et al. **Manual de identificação de pragas e doenças da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Colombo: Embrapa/CNPF, 2000, 24 p.
- IEDE, E.T.; MACHADO, D.C. **Pragas da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e seu controle**. Colombo: EMBRAPA/ CNPF (Boletim de Pesquisa Florestal 18/19), 1989, p. 51-60.
- IGNOFF, C.M. Entomopathogens as insecticides. **Environmental Letters**, v. 8, n. 1, p. 23-40, Sep. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1080/00139307509435834>.
- IGNOFF, C.M. Strategies to increase the use of entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 31, p. 1-3, 1978.
- GREEN, J.M.; BEESTMAN, G.B. Recently patented and commercialized formulation and adjuvante technology. **Crop Protection**, v. 26, n. 3, p. 320-327, 2007.
- JACKSON, D.M. et al. Autodissemination of a baculovirus for management of *Tabacco budworms* (Lepidoptera: Noctuidae) on tobacco. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 710-719, 1992.
- JIN, X. et al. Application of hydrophilic-lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, v. 46, n. 2, p. 226-233, Aug. 2008.
- JUNGES, A. ***Metarhizium anisopliae*: expressão de proteína tóxica de origem vegetal e análise genômica e quitinases**. 145 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- LACEY, L.A. et al. The influence of climatic factors on the flight activity of the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae): Implications for use of a microbial control agent. **Biological Control**, v. 4, p. 298-303, 1994.
- LEITE, L.G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2003. 92 p.
- LEITE, M.S.P. **Biologia e determinação do dano de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles, 1919) (Hemiptera, Psyllidae) na cultura da erva mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hilare)**. 2002. 84 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.
- LEITE, M.S.P. et al. Flutuação populacional de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera, Psyllidae) e de seus inimigos naturais em erva-mate no município de São Mateus do Sul, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, n. 4, p. 520-523, dez. 2007.
- LEITE, M.S.P.; ZANOL, K.M.R. Biologia e morfologia de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera, Psyllidae). **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 19-34, jan./dez. 2001.
- LIU, H.; BAUER, L.S. Microbial controlo f emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) with *Beauveria bassiana* strain GHA: Greenhouse and field trials. **Biological Control**, v. 45, p. 124-132, 2008.
- MACCARI JUNIOR, A.; MAZUCHOWSKI, J.Z. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate; MCT; CNPq; Projeto PADCT Erva-Mate, 2000. 176 p.

MASCARIN, G.M. et al. Toxicity of non-ionic surfactantes and interactions with fungal entomopathogens toward *Bemisia tabaci* biotype B. **BioControl**, v. 59, n. 1, p. 111-123, 2014. DOI: [10.1007/s10526-013-9543-x](https://doi.org/10.1007/s10526-013-9543-x).

MAZUCHOWSKI, J.Z.; RUCKER, N.G.A. **Diagnóstico e alternativas para a erva-mate *Ilex paraguariensis* St. Hil.** Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 1993. 141 p.

MEDEIROS, F.R. Patogenicidade de fungos a mosca-negra-dos-citros e compatibilidade entre agrotóxicos e *Purpureocillium lilacinum*. 2016. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2016.

MEDRADO, M. J.S.; VILCAHUAMAN, L. J. M. **Cultivo da Erva-Mate: Importância Socioeconômica e Ambiental.** [S.l.]: 2° ed. Embrapa/Florestas, abr. 2014. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/HTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate/01_importancia_socioec.htm>. Acesso em: 30 abr. 2018.

MEYLING, N.V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for Conservation biological control. **Biological Control**, 43, n. 2, p. 140-155, Nov. 2007.

MIGIRO, L.N. et al. Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) Isolates to the Adult Pea Leafminer (Diptera: Agromyzidae) and Prospects of an Autoinoculation Device for Infection in the Field. **Environmental Entomology**, v. 39, n. 2, p. 468-475, 2010.

MORAN, J.P. et al. Localized Autinoculation and Dissemination of *Isaria fumosorosea* for Control of the Asian Citrus Psyllid in South Texas. **Subtropical Plant Science**, v. 63, p. 23-35, Jan. 2011.

MOTA, L.H.C. **Estratégias de utilização de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) para o manejo de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae).** 2017. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017. doi:10.11606/T.11.2017.tde-17082017-151031.

MUNARETTO, N. Manejo de planta. In: CURSO DE CAPACITACION EN PRODUCCION DE YERBA MATE, 1., 1992, Cerro Azul. **Anais...** Cerro Azul: INTA, Centro Regional Sul, Estacion Experimental Agropecuária Cerro Azul, 1992. p. 35-36.

OLIVA, E.V. et al. Composição Nutricional de Procedências e Progenies de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) Cultivadas em Latossolo Vermelho Distrófico. **Ciência Florestal**, Santa Maria. v. 24, n. 4, p. 793-805, out. - dez. 2014. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/115157/1/2014-API-Gaiad-CF-Composicao.pdf>> Acesso em: 29 maio 2018.

OLIVEIRA, M.A.P. **Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre parâmetros biológicos e fisiológicos de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae).** 57 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

PATT, J.M. et al. Efficacy of an autodisseminator of an entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea*, to suppress Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, under greenhouse conditions. **Biological Control**, [S.l.], v. 88, p. 37-45, Sept. 2015.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.014>> Acesso em: 24 jun. 2018.

PEDROSA-MACEDO, J.H. **Manual de pragas florestais: pragas florestais do sul do Brasil**. [S.l.]: IPEF/SIF. 1993. 112 p.

PELL, J.K.; MACAULAY, E.D.M.; WILDING, N.A. A pheromone trap for dispersal of the pathogen *Zoophthora radicans* Brefeld. (Zygomycetes: Entomophthorales) amongst populations of the diamondback moth, *Putella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, p. 315-320, 1993.

PENNER, D. Ativador adjuvants. **Weed Technology**, v. 14, n. 4, p. 785-791, Dec. 2000.

PENTEADO, S.R.C.; IEDE, E.T.; LEITE, M.S.P. Pragas da erva mate: perspectivas de controle. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2º; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA MATE, 3ª, 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: EMBRAPA, 2000. p. 27-38.

PENTEADO, S.R.C. Principais pragas da erva-mate e medidas alternativas para seu controle. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C. (Ed). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone sul**. Porto Alegre: Editora Universidade/UFRGS, 1995. p.109-120.

PIRES, A.P.D. **Diversidade genética e caracterização molecular em linhagens de *Beauveria bassiana***. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

PRAT KRICUN, S.D. **Yerba mate: técnicas actualizadas de cultivo**. Cerro Azul, Misiones: INTA. E.E.A., 1993. 14 p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2002.

RAMOS, E.Q. et al. Seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo B. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, n. 73, p. 21-28, 2004.

REISSMANN, C.B. et al. Avaliação da exportação de macronutrientes pela exploração da erva-mate In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, X SILVICULTURA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1985, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA, CNPF, 1985. p. 128-139.

RIBEIRO, M.M. **Influência da adubação nitrogenada na incidência de *Gyropsylla spegazziniana* (Hemiptera: Psyllidae) praga da erva-mate cultivada**. 2005. 98 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

RHODES, D.J. (Ed.). **Exploitation of microorganisms**. London: Chapman & Hall, p.411- 430, 1993.

SAINI, E.D.; DE COLL, O.R. **Enemigos naturales de los insectos y ácaros perjudiciales al cultivo de la yerba mate en la Argentina**. Montecarlo: INTA. E. E. A. 1993. 32 p.

SAMSINAKOVA, A. Growth and sporulation of submersed cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 8, n. 3, p. 395-400, Sep. 1966.

SCHINELLA, G.R. et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 269, n. 2, p. 357-360, Mar. 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X00922939?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 maio 2018.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO – SEAB; DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL - DERAL. **Produtos Florestais – Erva-mate**. [S.l.]: fev. 2013, 8 p. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/erva_mate_2012_13.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2018.

SILVA, R.Z. et al. Efeito de agroquímicos à base de óleo mineral e vegetal sobre a viabilidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. **BioAssay**, v. 1, n. 1, p.1-5, 2006.

SHAPIRO-ILAN, D.I. et al. Efficacy of Entomopathogenic Fungi in Suppressing Pecan Weevil, *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae), in Commercial Pecan Orchards. **Southwestern Entomologist**, v. 34, n. 2, p. 111-120, 2009.

SOARES, C.M.S.; IEDE, E.T. Perspectiva para o controle da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Col.: Cerambycidae). In: CONGRESSO SUL AMERICANO DA ERVA-MATE, 1; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2, 1997, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA, 1997. p. 391-400.

SOARES, C.M.S. Ocorrência de *Halictophagus* sp. (Strepsiptera: Halictophagidae), parasitóide de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* (Homoptera: Psyllidae). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., 1994, Gramado. **Anais...** Gramado: EMBRAPA, 1994. CPACT, 237.

SOSA-GOMES, D.R.; KITAJIMA, E.W.; ROLON, M.E. First records of entomopathogenic diseases in the Paraguay tea agroecosystem in Argentina. **The Florida Entomologist**, v. 77, n. 3, p. 378-382, Sept. 1994.

STARNES, M.C.; JOKLIK, W.K. Reovirus protein lambda 3 is a poly (C) dependente poly (G) polymerase. **Virology**, v. 193, n. 1, p. 356-366, Mar. 1993.

STICKER, W.E. The importance of adjuvants to the agricultural chemical industry. In: FOY, Chester L. **Adjuvants for agrichemicals**. New York, p. 247-249, 1992.

TANZINI, M.R. **Controle do percevejo de renda da seringueira (*Leptopharsa heveae*) com fungos entomopatogênicos**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Entomologia, Piracicaba, 140 p, 2002.

VAIL, P.V.; HOFFMANN, D.F.; STEVEN TEBBETS, J. Autodissemination of *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) granulosis vírus by healthy adults. **Journal of Stored Products Research**, v. 29, n. 1, p. 71-74, Mar. 1993.

WALERIUS, A.H. **Comportamento de acasalamento e atratividade ao ferômonio sexual de *Gyropsylla spegazziniana* Lizer & Trelles (HEMIPTERA: PSYLLIDAE)**. 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017.

WHITTEN, M.J.; OAKESHOTT, J.G. Opportunities for modern biotechnology in control of insect pest and weeds, with special reference to developing countries. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 39, n. 4, p. 155-181, 1991.

WRAIGHT, S.P.; BRADLEY, C.A. Production, formulation and application technologies for use of entomopathogenic fungi to control field crop pests. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz de Iguaçu: Universidade Federal de Lavras, 1996. p. 170-177.

YASUDA, K. Auto-infestation system for the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae) with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* using a modified Sex pheromone trap in the field. **Applied Entomology and Zoology**, v. 34, n. 4, p. 501-505, 1999.

ZARBIN, P.H.G.; RODRIGUES, A.C.M.; LIMA, E.R. Feromônios de Insetos: Tecnologia e Desafios para uma Agricultura Competitiva no Brasil. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 3, 722-731, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n3/a16v32n3.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2018.

ZIMMERMANN, G. Insect pathogenic fungi as pest control agents. In: FRANZ, G. ed., **Biological plant and health protection**. Springer: Stuttgart, p. 215-231, 1986.

3. ATIVIDADE DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Hypocreales: Cordycipitaceae) CONTRA ADULTOS DE *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae) EM SUSPENSÃO LÍQUIDA

Resumo

Gyropsylla spegazziniana, também conhecida como ampola-da-erva-mate é considerada uma das principais pragas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), comprometendo o desenvolvimento e produção desta cultura. A principal forma de controle deste inseto se limita ao emprego de mão-de-obra manual devido à ausência de produtos registrados para uso nos ervais. Estudos anteriores mostraram o potencial do fungo *Beauveria bassiana* isolado Unioeste 44 para o controle deste inseto, porém quando utilizado em altas concentrações de conídios. A incorporação de adjuvantes na calda de aplicação pode trazer benefícios e assim, objetivou-se com este trabalho avaliar em laboratório o efeito de dois desses produtos adicionados a suspensão de conídios de *B. bassiana* na mortalidade de *G. spegazziniana* em pulverização direta ou contato residual. A pulverização direta de suspensão de conídios do fungo com o adjuvante Tween 80[®] resultou em menor mortalidade dos insetos do que suspensões com os demais produtos testados em laboratório. A eficiência do fungo variou de acordo com o método de aplicação e adjuvantes. As pulverizações diretas sobre os insetos resultaram nas maiores mortalidades, variando de 12-57% para a aplicação isolada dos adjuvantes Assist[®] e Áureo[®] e 47-74% para a aplicação associada ao fungo. O contato residual resultou nos menores valores de mortalidade, sendo 4-31% para a aplicação isolada dos produtos e 8-48% para a aplicação conjunta com o fungo. A aplicação isolada dos adjuvantes apresentou atividade inseticida e a aplicação dos produtos Assist[®] e Áureo[®] em associação com o fungo resultaram em melhor desempenho quando comparado a aplicação do adjuvante Tween 80[®], indicando um provável efeito aditivo dos adjuvantes no desempenho do fungo.

Palavras-chave: Adjuvantes. Fungos entomopatogênicos. Ampola-da-erva-mate.

Abstract

Gyropsylla spegazziniana, also known as Paraguay tea ampul is considered one of the main pests of mate (*Ilex paraguariensis*), compromising the development and production of this crop. The main form of control of this insect is limited to the use of manual labor due to the absence of products registered for use in herbs. Previous studies have shown the potential of the fungus *Beauveria bassiana* isolated Unioeste 44 to control this insect, but when used in high concentrations of conidia. The incorporation of adjuvants in the spray application can bring benefits and thus, this work aimed to evaluate in laboratory the effect of two of these products added to the *B. bassiana* conidia suspension on the mortality of *G. spegazziniana* in direct spray or residual contact. Direct spraying of fungal conidia suspension with Tween 80[®]

adjuvant resulted in lower insect mortality than suspensions with other laboratory tested products. Fungus efficiency varied according to application method and adjuvants. Direct spraying on insects resulted in the highest mortality rates, ranging from 12-57% for Assist[®] and Áureo[®] adjuvants alone and 47-74% for fungal-associated application. Residual contact resulted in the lowest mortality values, being 4-31% for application alone and 8-48% for joint application with the fungus. The application of the adjuvants alone showed insecticidal activity and the application of Assist[®] and Áureo[®] products in association with the fungus resulted in better performance compared to the application of the Tween 80[®] adjuvant, indicating a probable additive effect of the adjuvants on the fungus performance.

Keywords: Adjuvants. Entomopathogenic fungi. Paraguay tea ampul.

3.1 Introdução

Gyropsylla spegazziniana (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae), popularmente conhecida como ampola-da-erva-mate, durante sua fase imatura se desenvolve no interior de “galhas” ou “ampolas” formadas nas brotações de plantas de erva-mate, *Ilex paraguariensis* (St Hil, 1822) (Magnoliophyta: Aquifoliaceae), como resultado da alimentação. Esse aspecto da espécie resulta em prejuízos econômicos devido à redução de produtividade e qualidade do produto final (IEDE e MACHADO, 1989; PENTEADO, 1995; CHIARADIA et al., 2000).

Atualmente, a busca por métodos de controle desta praga tem se intensificado, principalmente por ser um produto consumido praticamente “*in natura*”. Recentemente, comprovou-se a atividade do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Hypocreales: Cordycipitaceae) isolado Unioeste 44, considerado promissor para o controle da praga, causando mortalidade superior a 80% de ninfas em bioensaios de laboratório (ALVES et al., 2013; FORMENTINI et al., 2015). Contudo, em estudos preliminares com adultos foi observada a necessidade de utilização de concentrações acima de 1×10^9 conídios/mL para se alcançar mortalidade acima de 50%.

Geralmente, o uso de fungos entomopatogênicos ocorre via pulverização aquosa, sendo dificultada em função da natureza hidrofóbica da superfície conidial (BOUCIAS et al., 1988). Desta forma, existe a necessidade de adicionar diferentes produtos à calda de pulverização, a fim de aumentar a deposição, espalhamento, molhamento, adesão e retenção sobre o inseto-praga (COSTA et al., 2003). Os óleos emulsionáveis são considerados bons adjuvantes na calda de pulverização, melhorando a distribuição e mistura dos conídios na água, além de possibilitar o aumento da infectividade do fungo (ALVES et al., 1998; ALVES et al., 2000).

Diferentes trabalhos já comprovaram a efetividade do uso de fungos entomopatogênicos associados a óleos com função adjuvante em formulações contra diferentes pragas (ALVES et al., 2002; CONSOLO et al., 2003; LUZ et al., 2004; NANKINGA et al., 2010).

Com base nas informações apresentadas e buscando-se estratégias eficientes para o manejo da ampola-da-erva-mate, o presente estudo teve por objetivo avaliar em condições de laboratório o efeito de duas formulações a base de óleo vegetal e mineral sobre *B. bassiana* e sua atividade contra *G. spegazziniana*, por diferentes métodos de aplicação.

3.2 Material e métodos

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Agrícola da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, *Campus* de Cascavel sob condições controladas ($26 \pm 1^\circ\text{C}$; 12 h de fotofase e U.R. $60 \pm 10\%$).

3.2.1 Insetos

Os insetos adultos utilizados nos bioensaios foram obtidos a partir de ramos de plantas adultas de erva-mate infestadas em um erval comercial em Cascavel, PR ($24^\circ58'02''\text{S}$; $53^\circ24'22''\text{W}$; 746 m de altitude). No laboratório, as ampolas presentes nos ramos foram parcialmente abertas e armazenadas em recipientes plásticos com tampa telada, contendo papel toalha em seu interior para absorver o excesso de umidade, sendo agrupadas conforme o ínstar de desenvolvimento das ninfas contidas em seu interior. Foram utilizadas ampolas contendo ninfas de 4^o e 5^o ínstars, apenas. Posteriormente, os recipientes foram mantidos em sala climatizada ($26 \pm 1^\circ\text{C}$; 12 h de fotofase e U.R. $60 \pm 10\%$) até a emergência dos adultos (Figura 2).

Nos bioensaios foram utilizados insetos adultos com pelo menos 24 horas de vida pós-emergência nessa fase.



Figura 2. Erval onde foram realizadas as coletas (A), ramo contendo ampolas nas brotações (B), ampola selecionada durante a triagem do material (C), recipiente plástico utilizado para acomodar as ampolas selecionadas (D) e detalhe da quantidade de material acomodado no recipiente até a emergência dos adultos (E) (Fonte: arquivo pessoal).

3.2.2 Mudanças

Para os bioensaios, mudas de erva-mate foram obtidas de um produtor comercial e cultivadas em recipientes plásticos com 700 mL capacidade, com composto orgânico Húmiterra® (25 Kg), composta por húmus de minhoca com terra, carvão vegetal e casca de pinus moída. As mudas foram mantidas em um ambiente protegido com tela de polipropileno 50% e a cada dois dias eram irrigadas com 30 mL de água. Foram selecionadas plantas com tamanho homogêneo (aproximadamente 20 cm). As mudas utilizadas durante o desenvolvimento dos bioensaios em laboratório receberam 20 mL de água destilada a cada dois dias para a sua manutenção (Figura 3).



Figura 3. Mudas compradas em viveiro comercial (A), recipientes plásticos (B) e substrato (C) utilizados para o plantio (D). Ambiente protegido para acomodação das plantas (E) e mudas padronizadas para os bioensaios (F) (Fonte: arquivo pessoal).

3.2.3 Produção do fungo

O isolado de *Beauveria bassiana* Unioeste 44, previamente selecionado como virulento para *G. spegazziniana*, foi identificado pelo sequenciamento da região rDNA-ITS (FORMENTINI et al., 2015).

O fungo foi cultivado em meio para produção de conídios (KH_2PO_4 0,36 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,60 g, KCL 1,00 g, glucose 10,0 g, NaNO_3 1,58 g, extrato de levedura 5,00 g, ágar 20,0 g, água destilada 1000,0 ml) e incubado em condições controladas ($26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$; 12 h fotofase) durante 7 a 10 dias.

Os conídios foram coletados raspando-se a superfície do meio de cultura com uma espátula, submetidos ao processo de secagem em dessecador com sílica gel, por sete dias durante a pré-secagem e posteriormente fez-se a separação dos conídios com o auxílio de uma peneira granulométrica com malha 200 mesh. Os conídios foram novamente expostos ao dessecante por mais três dias a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ em

recipientes herméticos. Em seguida, material foi analisado (viabilidade mínima de 90% e $1,1 \times 10^{11}$ conídios/g) e armazenado em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de sua utilização (Figura 4).

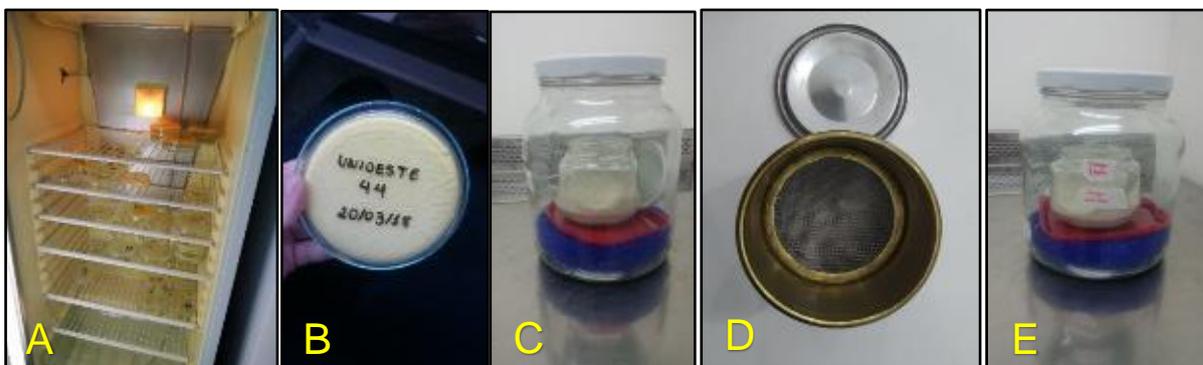


Figura 4. Câmara B.O.D. para armazenamento e crescimento do fungo (A), placa de Petri contendo o isolado Unioeste 44 após o crescimento (B), pré-secagem (7 dias) em dessecador de sílica gel (C), peneira granulométrica utilizada para a separação dos conídios (D) e secagem do fungo (3 dias) (E) (Fonte: arquivo pessoal).

3.2.4 Determinação da Concentração e da viabilidade dos conídios

Para determinar a concentração do fungo, 0,5 g de conídios foram transferidos para um tubo de vidro estéril, adicionado 10 mL de água destilada com espalhante adesivo Tween 80[®] a 0,01% e vedado com Parafilm[®]. Os conídios foram separados por agitação mecânica em vortex por dois minutos. A concentração de conídios/mL foi determinada em câmara de Neubauer, sendo ajustada em 1×10^9 conídios/mL.

Para determinar a viabilidade dos conídios, 250 μL de uma suspensão na concentração 1×10^7 conídios/mL foi plaqueada em placas do tipo RODAC[®] contendo 3 mL de meio Batata Dextrose Ágar (BDA) + 5 mg/L de antibiótico (Agrosil 5 Mega[®]) (OLIVEIRA et al., 2015). As placas foram incubadas em $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; 12 h fotofase por 20 horas e a viabilidade foi avaliada em microscópio óptico (400x) pela porcentagem de conídios germinados e não germinados nos quatro quadrantes centrais, sendo preparadas quatro repetições (Figura 5).

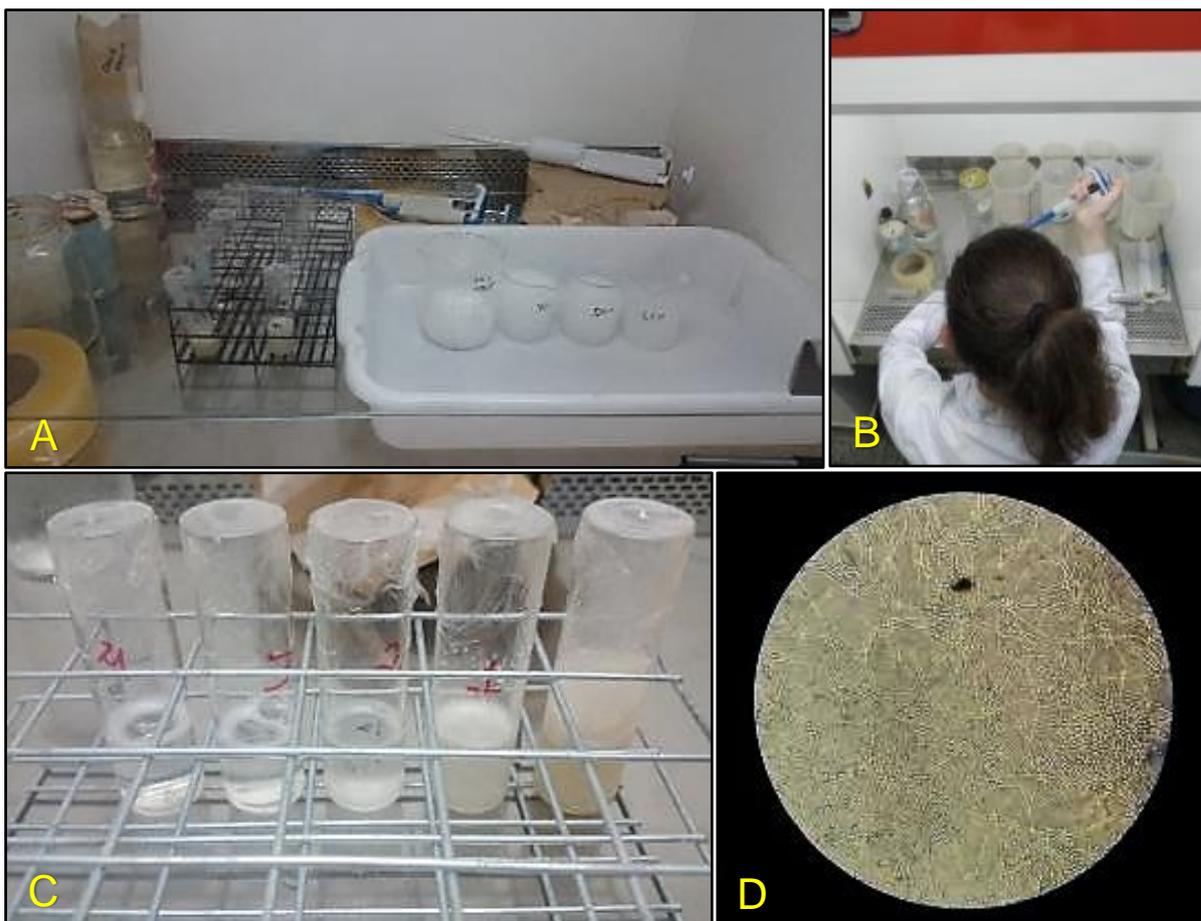


Figura 5. Material utilizado para a diluição do fungo (A) e determinação da concentração (B) através da diluição seriada do fungo *B. bassiana* isolado Unioeste 44. Avaliação da viabilidade através da contagem de conídios germinados e não germinados (D) (Fonte: arquivo pessoal).

3.2.5 Tratamentos

Foram realizados dois bioensaios para determinar o efeito dos diferentes adjuvantes (Tabela 1) sobre o fungo contra *G. spegazziniana* utilizando duas estratégias de aplicação: pulverização direta sobre os insetos e o efeito do contato residual.

Os produtos foram diluídos de forma a se obter quatro concentrações diferentes, considerando-se um tratamento cada, sendo testados em associação ou não com *B. bassiana* Unioeste 44 utilizado na concentração de 1×10^9 conídios/mL (Tabela 2). Além dos tratamentos com adjuvantes, foi utilizada água destilada como controle negativo e o tratamento com o adjuvante Tween 80[®] como padrão de comparação, uma vez que é comumente utilizado em bioensaios com suspensões de fungos entomopatogênicos.

Tabela 1. Adjuvantes utilizados nos ensaios de compatibilidade com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* para o controle de *Gyropsylla spegazziniana*.

Produto	Ingrediente ativo	Grupo químico	Classificação Agronômica	Formulação	Concentração I.A.	Dose (%)
Assist®	Óleo mineral	Hidrocarbonetos alifáticos	Acaricida, adjuvante e inseticida	Concentrado emulsionável	756 g/L	1
Áureo®	Óleo vegetal	Éster metílico de óleo de soja	Espalhante adesivo	Concentrado emulsionável	720g/L	0,25
Tween 80®	Polissobato	Ésteres de sorbitan etoxilados	Surfactante não iônico	-	-	0,01

I.A. Concentração de ingrediente ativo.

Os produtos foram diluídos de forma a se obter quatro concentrações diferentes, considerando-se um tratamento cada, sendo testados em associação ou não com *B. bassiana* Unioeste 44 utilizado na concentração de 1×10^9 conídios/mL (Tabela 2). Além dos tratamentos com adjuvantes, foi utilizada água destilada como controle negativo e o tratamento com o adjuvante Tween 80® como padrão de comparação, uma vez que é comumente utilizado em bioensaios com suspensões de fungos entomopatogênicos.

Tabela 2. Concentrações dos adjuvantes utilizadas para os bioensaios de contato direto e residual em associação ou não a suspensão do fungo *Beauveria bassiana*.

Tratamentos (% da dose recomendada utilizada)	Assist® (10 mL/L)	Áureo® (2,5 mL/L)
100%	10 mL/L	2,5 mL/L
75%	7,5 mL/L	1,8 mL/L
50%	5,0 mL/L	1,2 mL/L
25%	2,5 mL/L	0,6 mL/L

3.2.6 Atividade inseticida sobre *Gyropsylla spegazziniana*

Para a estratégia de pulverização direta utilizou-se a metodologia desenvolvida por Loeblein et al. (2019), preparando-se grupos de 20 adultos com 24 h de emergência, mantidos em recipientes plásticos (5 cm altura x 6 cm diâmetro), com tampa e fundo perfurados, sendo preparados cinco grupos, cada um considerado uma repetição, totalizando 100 adultos para cada tratamento. Os insetos foram pulverizados diretamente nos recipientes, recebendo 0,2 mL da solução dos tratamentos com um micropulverizador acoplado a um compressor de ar com pressão média de saída de 0,5 kgf/cm², inserido na abertura da tampa do recipiente.

Após a pulverização, cada grupo de insetos foi transferido para uma gaiola de cloreto de polivinila (PVC) incolor com uma abertura na lateral e na parte superior cobertas por tecido "voil" contendo muda de erva-mate previamente acondicionada. Para avaliar o efeito de contato residual, mudas de erva-mate foram pulverizadas com 1 mL de cada tratamento com um micropulverizador acoplado a um compressor de ar (pressão média de saída de 0,5 kgf/cm²).

Após secagem, as mudas foram individualizadas em gaiolas de PVC incolor, identificadas e receberam 20 adultos da ampola. Para cada tratamento foram preparadas cinco repetições com 20 insetos cada (n=100). Em ambas as estratégias as gaiolas foram mantidas em sala climatizada (26 ± 1°C; 12 h de fotofase e U.R. 60 ± 10%) (Figura 6). Os bioensaios foram avaliados por 10 dias, retirando os insetos mortos, sendo assim considerados aqueles que não responderam ao toque de um pincel fino. Os insetos provenientes dos tratamentos com fungo foram individualizados e identificados.

Após desinfecção por imersão em etanol 70%, hipoclorito de sódio 13% e água destilada, foram acondicionados em uma placa de Petri de plástico (6 cm de diâmetro) com um pedaço de 20 mm² de papel filtro estéril. As placas foram incubadas em um recipiente contendo espuma umedecida com água destilada, fechada e mantida por sete dias em 26 ± 1 °C; 12 h fotofase; 60% U.R. A confirmação da mortalidade pelo fungo foi feita pela presença de conídios na superfície dos cadáveres

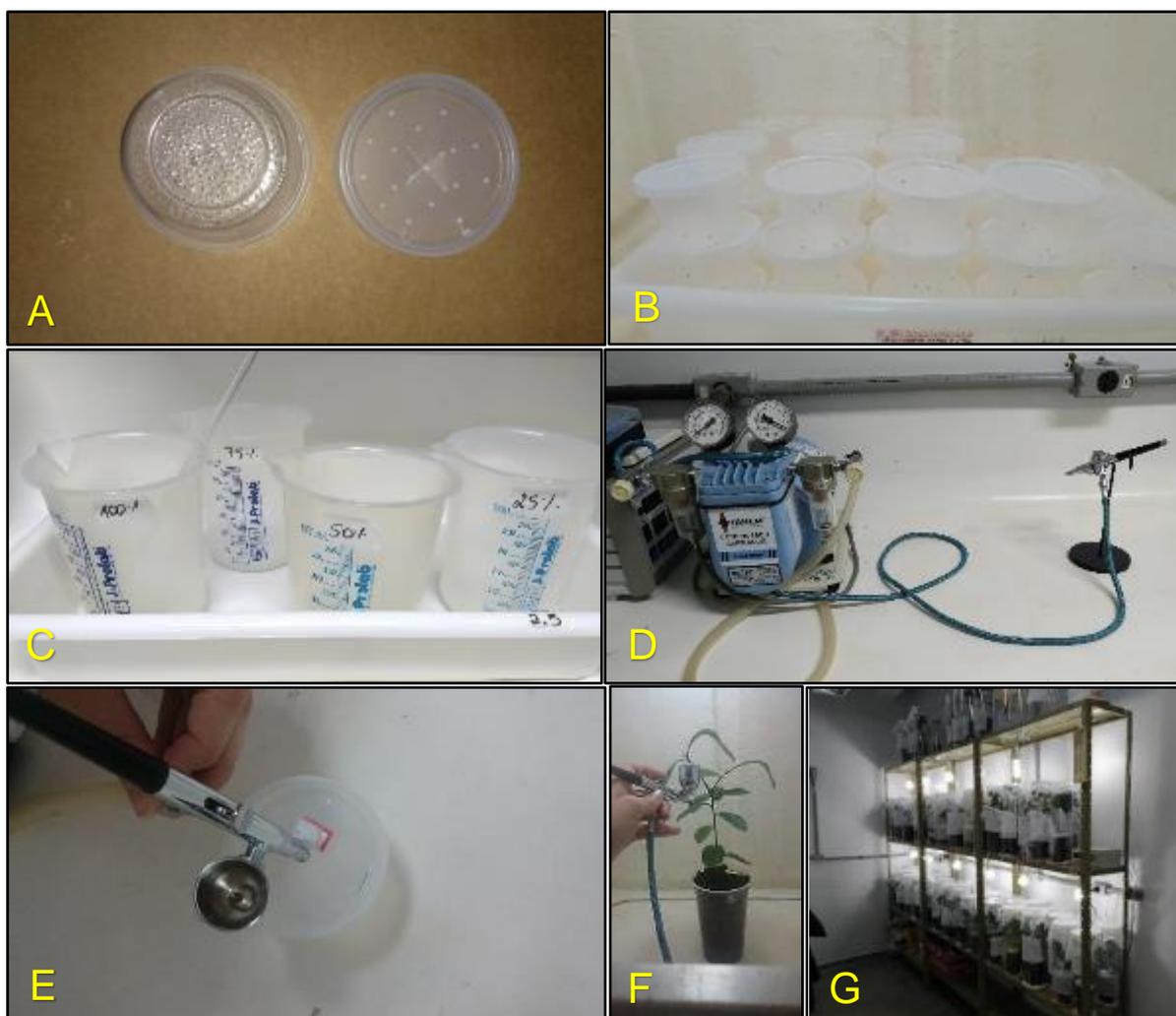


Figura 6. Recipientes plásticos (A) utilizados para a acomodação dos insetos (B). Tratamentos (C) e aerógrafo (D) utilizados para a pulverização dos insetos (E) no bioensaio de contato direto e mudas no bioensaio de contato residual (F). Gaiolas contendo os tratamentos acomodadas em sala climatizada (G) (Fonte: arquivo pessoal).

3.2.6 Efeito de adjuvantes sobre *Beauveria bassiana* Unioeste 44 – crescimento e conidiogênese

Foram avaliados os parâmetros biológicos relativos à germinação dos conídios, crescimento vegetativo e produção de conídios para identificar prováveis efeitos tóxicos “*in vitro*” dos adjuvantes em teste, conforme estudos desenvolvidos por Alves et al. (1998), Silva e Neves (2005) e Oliveira et al. (2015). Além dos adjuvantes, foi preparado um grupo de com inoculação da suspensão do fungo em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) da pulverização de solução de água destilada e Tween 80® 0,01%, como padrão para comparação. Para cada tratamento foram preparadas cinco placas, cada uma considerada uma repetição.

A classificação da toxicidade dos produtos foi obtida a partir do índice biológico (IB), para a classificação da toxicidade dos agroquímicos a fungos entomopatogênicos (ALVES et al., 2007), sendo tóxico (0 – 41); moderadamente tóxico (42 – 66); e compatível (>66), segundo a fórmula: $IB = \frac{47 (CV) + 43 (ESP) + 10 (GER)}{100}$, em que: CV é a percentagem do crescimento vegetativo da colônia após sete dias, em comparação à testemunha; ESP é a percentagem da esporulação das colônias após sete dias, em comparação à testemunha; GER é a percentagem de germinação dos conídios após 24 horas.

3.2.6.1 Germinação

Placas rodac contendo meio de cultura BDA + 5 mg/L de antibiótico (Agrosil 5 Mega®) foram inoculadas com 300 µL da suspensão do fungo ($1,0 \times 10^7$ conídios/mL), aplicados com um pipetador automático no centro da placa. Após leve agitação para distribuir a suspensão na superfície do meio, foi feita a pulverização de 250 µL dos produtos nas diferentes concentrações com um pulverizador acoplado a um compressor de ar, sob pressão constante de 12 Kgf/cm².

As placas foram incubadas por 24 horas em $26 \pm 0,5$ °C; 12 h fotofase e após este período foi feita a contagem do número de conídios germinados e não-germinados sob microscópio óptico (aumento de 400 x), focando-se diretamente quatro campos no centro de cada placa, totalizando-se quatro contagens com aproximadamente 200 conídios em média/quadrante. Foram considerados germinados (viáveis) os conídios que apresentavam o tubo germinativo com o comprimento igual ou maior do que o diâmetro.

Na análise dos resultados de germinação, adotaram-se os valores de germinação alta = 80-100%, germinação médio-alta = 60- 79%, germinação média = 50-59%, germinação médio-baixa = 30-49% e germinação baixa 0-29% (ZAPPELINI et al., 2005).

3.2.6.2 Crescimento Vegetativo

O fungo foi inoculado com uma alça de platina em três pontos equidistantes entre si, na superfície do meio de cultura BDA vertido em placas de Petri. A

pulverização da solução dos produtos foi realizada após 48 horas para evitar a remoção dos conídios. As placas foram incubadas a 26°C e 12 h de fotofase, durante sete dias. Após este período foi realizada a medida em dois sentidos perpendiculares utilizando uma régua, em pelo menos duas colônias mais uniformes de cada placa, tendo-se assim o diâmetro médio de colônias (Figura 7).

3.2.6.3 Produção de Conídios

Após a avaliação do crescimento vegetativo, duas colônias de cada uma das placas foram recortadas e transferidas individualmente para tubos de vidro estéril, onde foram adicionados 10 mL de água destilada com Tween 80® a 0,01% para agitação com o auxílio de um pincel para o desprendimento dos conídios. Em seguida, foram realizadas diluições e procedeu-se a contagem dos conídios em câmara de Neubauer. Foi realizada uma média da contagem das duas colônias recortadas (Figura 7).

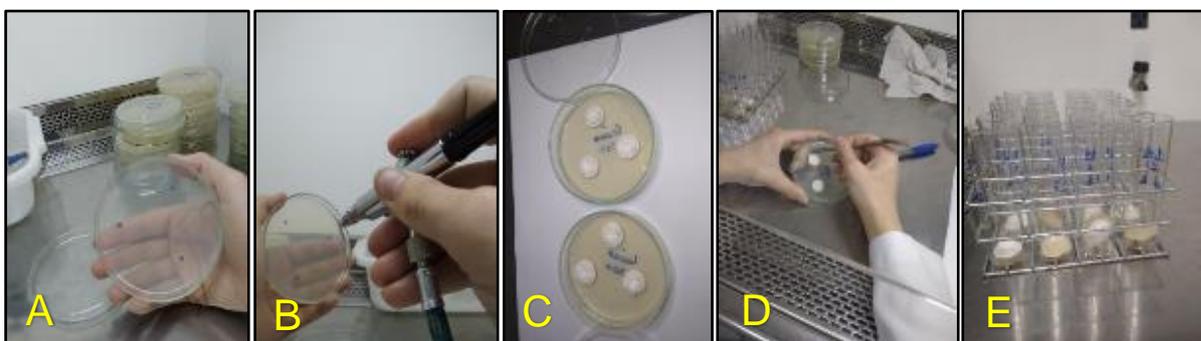


Figura 7. Placa inoculada com o isolado Unioeste 44 em três pontos equidistantes (A) e pulverização dos tratamentos utilizando um aerógrafo (B). Colônias do fungo após sete dias de incubação (C) e recorte após a estimativa do diâmetro (D) para avaliação da produção de conídios (E) (Fonte: arquivo pessoal).

3.2.8 Análise Estatística

Para os bioensaios de avaliação do efeito dos adjuvantes na suspensão do fungo foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo a normalidade e homogeneidade aferidas em todos os resultados.

Os dados de mortalidade total dos insetos foram comparados por ANOVA Fatorial tripla e para a esporulação nos cadáveres foi analisada através de ANOVA fatorial dupla, seguidos do teste de Fisher LSD como acompanhamento *post hoc*

($P < 0,05$). Em ambas as mortalidades as médias dos tratamentos obtidas pela avaliação do contato direto e residual foram comparadas através do Teste t de Student ($P < 0,05$).

As médias dos parâmetros avaliados para compatibilidade foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o Software Statistica® 7.0 (STATSOFT, 2004).

3.3 Resultados

3.3.1 Efeito de adjuvantes sobre *Gyropsylla spegazziniana*

Para a aplicação isolada dos adjuvantes via contato direto, os valores de mortalidade total obtidos com Assist® variaram de 5 a 57%, com pouca diferença entre as concentrações de 25, 50 e 75%. Contudo, no produto na concentração recomendada, a mortalidade foi significativamente maior, alcançando 57%. O mesmo foi observado para Áureo®, com valores inferiores de mortalidade. Por outro lado, Tween 80® 0,01%, usado como padrão de comparação, apresentou atividade muito baixa (12%), não diferindo da testemunha (Tabela 3).

Na avaliação do efeito residual, ainda que a mortalidade causada pelo produto Assist® tenha sido significativamente menor que a observada anteriormente (máximo de 31% na maior concentração), este adjuvante foi estatisticamente superior ao Áureo®, em todas as concentrações testadas. Além disso, o produto Áureo® não apresentou atividade residual significativa, assim como Tween 80® 0,01% (Tabela 3). Contudo, é válido ressaltar que a concentração recomendada de Assist® corresponde a 1% e a de Áureo® 0,25%, apenas.

No entanto, a associação dos adjuvantes com o fungo, com poucas exceções, resultou em mortalidade significativamente superior em relação aos adjuvantes isoladamente, tanto no contato direto, como no residual. Assim, apesar da variação em função do adjuvante e da respectiva concentração utilizada, a presença destes produtos não afetou a atividade do fungo, confirmada pelo fato de que nas maiores concentrações testadas a mortalidade manteve-se superior à suspensão de conídios com água destilada + Tween 80® 0,01% (padrão de comparação) nas concentrações recomendadas.

Tabela 3. Mortalidade total de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* submetidos aos tratamentos de suspensão de conídios do fungo *Beauveria bassiana* Unioeste 44 associado a adjuvantes e adjuvantes aplicados isoladamente, por meio de contato direto e residual, em diferentes concentrações.

Tratamento (% da concentração recomendada)	Adjuvantes						
	N	Assist [®]	Assist [®] + Uni 44 (1 × 10 ⁹)	Áureo [®]	Áureo [®] + Uni 44 (1 × 10 ⁹)	Tween 80 [®]	Tween 80 [®] + Uni 44 (1 × 10 ⁹)
CONTATO DIRETO							
100	100	57 ± 7,24 aB*	65 ± 7,07 aAB*	43 ± 10,72 aC*	74 ± 6,58 aA*	12 ± 1,58 aD*	47 ± 6,32 aBC*
75	100	18 ± 5,98 bBC	45 ± 12,74 bA	11 ± 3,76 bcC	24 ± 3,76 bB	12 ± 1,58 aC*	47 ± 6,32 aA*
50	100	5 ± 1,29 cC	47 ± 8,80 bA	16 ± 3,76 bB	18 ± 6,32 bB	12 ± 1,58 aBC*	47 ± 6,32 aA*
25	100	23 ± 6,64 bB	41 ± 5,16 bA	19 ± 6,58 bBC*	27 ± 7,79 bB	12 ± 1,58 aC*	47 ± 6,32 aA*
Testemunha	100	4 ± 2,41 cA	4 ± 2,41 cA	4 ± 2,41 cA	4 ± 2,41 cA	4 ± 2,41 aA	4 ± 2,41 bA
CONTATO RESIDUAL							
100	100	31 ± 5,16 aB	48 ± 4,83 aA	6 ± 2,41 aD	16 ± 4,74 aC	4 ± 1,29 aD	8 ± 1,29 aD
75	100	24 ± 5,55 bB	49 ± 3,76 aA	8 ± 3,29 aD	15 ± 4,56 abC	4 ± 1,29 aD	8 ± 1,29 aD
50	100	22 ± 4,37 bB*	37 ± 2,58 bA	8 ± 2,58 aC	17 ± 3,29 aB	4 ± 1,29 aC	8 ± 1,29 aC
25	100	14 ± 3,16 cB	36 ± 6,89 bA	5 ± 2,04 aC	14 ± 2,41 abB	4 ± 1,29 aC	8 ± 1,29 aC
Testemunha	100	5 ± 2,04 dA	5 ± 2,04 cA	5 ± 2,04 aA	5 ± 2,04 bA	5 ± 2,04 aA	5 ± 2,04 aA

¹Médias (±EPM) seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Fisher LSD (p<0,05).

*Diferença significativa para um mesmo tratamento, na respectiva concentração, entre estratégias de contato, comparados pelo teste t de Student (p<0,05).

Através da comparação do método de exposição verificou-se que na pulverização direta os adjuvantes associados ao fungo causaram mortalidade de 65 % (Assist®) e 74 % (Áureo®), quando ambos foram aplicados na maior concentração avaliada.

Na maioria dos tratamentos em que o fungo *B. bassiana* foi associado aos adjuvantes observou-se esporulação do fungo nos cadáveres, com variação em função do produto e concentração utilizada (variando entre 6 e 29 % de confirmação), com exceção de Tween 80® + Uni 44, não apresentou confirmação da morte pelo fungo no bioensaio de contato residual (Tabela 4).

Tabela 4. Mortalidade confirmada de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* submetidos aos tratamentos de suspensão de conídios do fungo *Beauveria bassiana* Unioeste 44 associado a adjuvantes, por meio de contato direto e residual, em diferentes concentrações.

Tratamento (% da concentração recomendada)	Adjuvantes			
	N	Assist® + Uni 44	Áureo® + Uni 44	Tween 80® + Uni 44
CONTATO DIRETO				
100	100	19 ± 6,25 bA	21 ± 5,55 aA*	24 ± 6,89 aA*
75	100	13 ± 6,32 bB	13 ± 5,62 abB	24 ± 6,89 aA*
50	100	29 ± 6,89 aA	6 ± 2,41 bB	24 ± 6,89 aA*
25	100	26 ± 6,89 abA	17 ± 4,37 aB	24 ± 6,89 aAB*
Testemunha	100	0 ± 0,00 cA	0 ± 0,00 bA	0 ± 0,00 bA
Tratamento (% da concentração recomendada)	Adjuvantes			
	N	Assist® + Uni 44	Áureo® + Uni 44	Tween 80® + Uni 44
CONTATO RESIDUAL				
100	100	21 ± 8,51 abA	6 ± 1,29 abB	0 ± 0,00 aB
75	100	29 ± 9,44 aA	9 ± 3,76 aB	0 ± 0,00 aC
50	100	17 ± 4,37 bA	11 ± 3,76 aA	0 ± 0,00 aB
25	100	21 ± 8,99 abA	7 ± 2,58 abB	0 ± 0,00 aB
Testemunha	100	0 ± 0,00 cA	0 ± 0,00 bA	0 ± 0,00 aA

¹Médias (±EPM) seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Fisher LSD (p<0,05). *Diferença significativa para um mesmo tratamento, na respectiva concentração, entre estratégias de contato, comparados pelo teste t de Student (p<0,05).

Na comparação do tipo de contato, houve diferença significativa na maior concentração do adjuvante Áureo® + fungo (mortalidade confirmada de 21 % no contato direto em relação ao mesmo tratamento no contato residual) e para o tratamento Tween 80® + Uni 44 (Tabela 4).

3.3.2 Efeito de adjuvantes sobre *Beauveria bassiana* isolado Unioeste 44 – crescimento vegetativo e conidiogênese

Com exceção da conidiogênese, os demais parâmetros biológicos de *B. bassiana* Unioeste 44 foram alterados pelos adjuvantes avaliados. Na viabilidade, houve diferença significativa nesse parâmetro em relação à testemunha, contudo, os valores sempre foram elevados (acima de 90%) (Tabela 5). O mesmo foi verificado para o crescimento vegetativo onde o produto Assist® apresentou o menor diâmetro da colônia. Assim, todos os produtos testados foram classificados como compatíveis com *B. bassiana* Unioeste 44.

Tabela 5. Efeito de adjuvantes sobre crescimento, esporulação, viabilidade e compatibilidade com *Beauveria bassiana* Unioeste 44 e respectivo índice biológico.

Tratamentos	Crescimento Vegetativo (cm ²)	Conidiogênese (×10 ⁸)	Viabilidade (%)	Índice Biológico (%) ¹	Classificação
Testemunha	1,98 ± 0,05 a	1,35 ± 7,28 a	96,0 ± 1,03 a	-	-
Assist®	1,88 ± 0,04 b	1,12 ± 6,96 a	90,8 ± 1,75 c	89,58	Compatível
Áureo®	1,90 ± 0,04 ab	1,17 ± 17,01 a	94,7 ± 1,38 b	91,89	Compatível

¹Calculado segundo a fórmula $IB=[47(CV)+43(ESP)+10(GER)]/100$, em que: CV é a percentagem de crescimento vegetativo da colônia, após sete dias, em comparação à testemunha; ESP é a percentagem da esporulação das colônias, após sete dias, em comparação à testemunha; e GER é a percentagem de germinação dos conídios, após 24 horas. Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.4 Discussão

Em relação à presença de adjuvantes, a mortalidade de até 57% obtida na aplicação isolada de Assist® e 43% para Áureo® demonstra que estes produtos apresentaram atividade inseticida, provavelmente em função da presença de óleo na composição. Isto porque, uma emulsão oleosa causa aderência das asas e outras

estruturas dos insetos levando à morte. Também, substâncias oleosas são passíveis de causar mortalidade aos insetos por sufocação ou anoxia devido ao entupimento dos espiráculos, podendo atuar também como fumigantes, disrupção nervosa e narcose, corrosão, ruptura celular e dessecação (TAVERNER, 2002; LEONG et al., 2012).

Os maiores índices de mortalidade por fungo no contato direto quando comparado ao contato residual podem ser atribuídos à maior quantidade de inóculo exposto aos insetos, pois conforme mostrado por Ausique et al. (2017), avaliando a mortalidade de *D. citri* por *B. bassiana* com adjuvantes em contato residual, observou-se menor adesão de conídios nos insetos em relação ao contato direto (pulverização ou imersão).

De forma complementar, Conceschi (2017) verificou, por meio de microscópio eletrônico de varredura, alterações na cutícula de adultos de *D. citri* em forma de manchas, localizadas na região dorsal e ventral após terem sido pulverizados com os adjuvantes KBRAdj® e Silwet L-77®; fato não observado nos insetos tratados com o adjuvante Tween 80®. Estas alterações podem decorrer da remoção de hidrocarbonetos ou lipídios que se encontram depositados no corpo do inseto, os quais conferem aos insetos maior resistência à penetração de patógenos e perda de água (BUTELER e STADLER, 2011).

Ainda que na maioria das concentrações avaliadas não tenha sido observada diferença significativa na mortalidade em função do método de aplicação utilizado, a mortalidade obtida no contato direto foi significativamente superior para ambos adjuvantes na maior concentração, isoladamente ou em associação com o fungo. A baixa mortalidade obtida nos tratamentos com Tween 80® ressalta a inocuidade do mesmo para os insetos, justificando assim a sua escolha como padrão de comparação.

O acréscimo na mortalidade observada nos tratamentos em que houve associação do adjuvante com o fungo pode indicar um efeito aditivo dos produtos ao desempenho do fungo *B. bassiana* para o controle de *G. spegazziniana*. O uso de adjuvantes associados a suspensões de *B. bassiana* pode ser considerada uma estratégia interessante para incrementar a infecção de *G. spegazziniana* pelo patógeno. Visto que podem permitir melhor dispersão e solubilização do ingrediente ativo, aumentam a deposição, espalhamento, molhamento, adesão e retenção dos conídios sobre o inseto ou estrutura da planta (COSTA et al., 2003).

Da mesma forma, Conceschi (2013) estudou a patogenicidade dos fungos *B. bassiana* e *I. fumosorosea* associados aos adjuvantes KBRAdj® e Silwet L-77® para o controle de diferentes pragas no citros e verificou efeito aditivo da associação dos adjuvantes com o fungo, além de apresentarem ação inseticida quando aplicados isoladamente, tal como observado no presente estudo.

Métodos de aplicação que favorecem o contato dos insetos com os conídios no substrato após a aplicação têm grande relevância não apenas em bioensaios de laboratório, mas também em uma possível utilização em campo. Isto porque, o inseto nem sempre é atingido diretamente, porém ainda há a possibilidade de haver o contato com o resíduo da pulverização que permanece sobre estruturas da planta atingidas pela pulverização.

Nesse sentido, Mota (2017), ao avaliar diferentes formas de inoculação do fungo *B. bassiana* contra *H. hampei*, sugeriu que métodos de inoculação que permitam a contaminação indireta através do efeito residual após a pulverização seriam mais eficientes que a pulverização direta. Pensando na continuidade deste estudo, métodos semelhantes devem ser avaliados. Pois, este fato poderia aumentar a possibilidade do controle de populações de *G. spegazziniana*, visto que este inseto permanece boa parte de seu ciclo de vida nas brotações da erva-mate, alimentando-se da seiva destas plantas (LEITE e ZANOL, 2001).

A baixa mortalidade obtida nos tratamentos com Tween 80® quando comparado as maiores concentrações de Assist® e Áureo®, principalmente na aplicação via contato residual, corroboram o estudo de Conceschi et al. (2016). Segundo o autor, houve melhor desempenho dos produtos KBRAdj® e Silwet® em relação ao Tween 80® associando adjuvantes com o fungo *Isaria fumosorosea* pulverizado sobre ninfas e adultos de *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908) (Hemiptera: Liviidae). O mesmo foi relatado recentemente por Mota (2017), ao verificar que Tween 80® foi o adjuvante que apresentou a menor contribuição para aumentar a eficácia do fungo *B. bassiana* no controle de *D. citri*. A inocuidade do mesmo para os insetos justifica sua escolha como padrão de comparação.

A baixa mortalidade obtida com a aplicação isolada de Tween 80® pode estar relacionada à sua função na suspensão, não sendo esperado que melhore o desempenho do fungo para o controle dos insetos. Corroborando esta observação, Conceschi (2017) constatou que a aplicação de Tween 80® a 0,01% não afetou a

cutícula de adultos de *D. citri* nas regiões dorsal e ventral. O autor também verificou a ausência de germinação dos conídios pulverizados com este adjuvante.

Alves et al. (2001) avaliaram a relação entre o uso de formulações de fungo em óleos adjuvantes emulsionáveis (OAE) e verificaram que conforme a concentração do OAE aumenta, o espalhamento também melhora, assim como concentrações de OAE entre 5 e 25%, superior as concentrações avaliadas neste estudo, aumentam a infectividade do fungo e são mais eficientes que o fungo em água com Tween 80®.

A baixa mortalidade confirmada observada em ambas as estratégias de pulverização pode ser devida ao fato do patógeno não ter completado o ciclo de infecção na maioria dos insetos mortos, o que segundo Shimazu (1994) é considerado um fenômeno relativamente comum. Além disso, após a penetração do fungo no tegumento, a morte dos insetos pode ocorrer indiretamente por danos mecânicos, exaustão de nutrientes, alterações fisiológicas ou intoxicação, sem necessariamente ocorrer a esporulação do cadáver (ALVES, 1998).

Ainda, a baixa porcentagem de mortalidade confirmada já havia sido relatada para *G. spegazziniana* no estudo de Formentini et al. (2015) e é frequentemente observada em estudos com outros insetos (LOUREIRO et al., 2005; BARBOZA et al., 2011). Padulla (2007) apesar de verificar sinais de morte pelo fungo, não constatou sinais de conidiogênese em cadáveres de *D. citri*, conforme observado neste estudo para o tratamento com o adjuvante Tween 80®, na aplicação via contato residual. Também, o fato de a mortalidade total deste tratamento não ter diferido da testemunha indica que os insetos provavelmente morreram por causas naturais e não pela infecção causada pelo fungo.

Em relação à compatibilidade verificada neste estudo, de forma semelhante, Silva et al. (2006) estudaram os efeitos de diferentes produtos à base de óleo mineral e vegetal sobre *B. bassiana*, verificando que o fungo foi compatível com a maioria dos produtos avaliados. Segundo Moino Jr. e Alves (1998), o microrganismo, ao metabolizar os princípios tóxicos do ingrediente ativo, num mecanismo de resistência fisiológica, provoca a liberação de moléculas que podem ser utilizadas como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento vegetativo e conidiogênese.

Além disso, o fungo pode ter utilizado todo o seu esforço reprodutivo quando em presença de um princípio tóxico, que altere seu ambiente prejudicando o seu desenvolvimento, resultando assim, em maiores níveis de crescimento vegetativo e conidiogênese (LOUREIRO et al., 2002). Para Alves et al. (1998), a esporulação

(conidiogênese) é considerada um fator mais importante que o crescimento vegetativo, visto que os conídios são estruturas que se disseminam no ambiente e são responsáveis pelo início da infecção no campo (CAVALCANTI et al., 2002). Ainda, segundo Tanada e Kaya (1992), a ação dos produtos fitossanitários sobre o crescimento dos entomopatógenos, pode variar em razão da natureza química dos produtos, do tempo de exposição e das condições ambientais.

A compatibilidade de Assist® com *B. bassiana* foi também verificada por Luz et al. (1999), associando o produto a *B. bassiana* no controle do percevejo *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae), com germinação acima de 98% após a incubação dos conídios durante 24 h em meio de cultura contendo o adjuvante. Posteriormente, Silva et al. (2006) também constataram a compatibilidade deste mesmo produto para o fungo *B. bassiana* testado em mistura em calda.

A compatibilidade verificada em testes de laboratório tem a vantagem de expor o patógeno a atividade máxima possível dos produtos avaliados, uma situação que não ocorre em condições de campo. Portanto, quando um tratamento é compatível “*in vitro*” há é uma forte evidência de sua seletividade em condições de campo (ALVES et al., 1998). Em condições de campo os fatores ambientais reduzem a ação de compostos tóxicos sobre o fungo, assim, as formulações consideradas compatíveis em testes de laboratório podem ser consideradas seguras sobre o fungo (DEPIERI et al., 2005).

Para o Manejo Integrado de Pragas (MIP), quanto à estratégia de aplicação de fungos entomopatogênicos associados a inseticidas deve-se dar prioridade ao uso dos produtos que apresentam compatibilidade, levando em consideração que estes entomopatógenos podem adaptar-se ao ambiente, apresentando posteriormente ação de enzootia e epizootia contribuindo para o controle biológico natural (COSTA et al., 2018).

Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação conjunta entre os produtos Assist® e Áureo® e a suspensão do fungo indicam um possível efeito aditivo quando comparados ao desempenho da suspensão com o adjuvante Tween 80®, amplamente utilizado em suspensões fúngicas. Esse resultado indica que os produtos avaliados podem ter sido mais eficientes no molhamento da superfície do corpo do inseto (contato direto) ou da estrutura da planta (contato residual), permitindo um aumento na adesão e distribuição dos conídios sobre o alvo (CONCESCHI, 2017).

3.5 Considerações finais

A aplicação isolada dos adjuvantes Assist[®] e Áureo[®] demonstrou atividade inseticida, assim como a presença dos adjuvantes na suspensão de conídios pulverizada sobre os insetos aumentou a eficácia dos tratamentos, representando uma alternativa para aumentar a atividade do fungo visando ao controle da população de *G. spegazziniana*.

Os produtos foram compatíveis com o fungo *B. bassiana*, contudo, mais estudos são necessários para avaliação desses e outros adjuvantes quanto ao efeito na preservação do patógeno contra as condições adversas no campo, visando seu melhor desempenho e escolha de um produto que apresente o melhor custo-benefício para o produtor de erva-mate.

Além disso, a aplicação convencional do fungo através de pulverização aquosa pode ser associada a outras estratégias de controle, como o uso de produtos de origem vegetal, como o produto comercial Azamax[®], à base do limonóide azadiractina A e B, que apresentou efeito inseticida, com ação de contato direto, residual e sistêmico contra ninfas e adultos de *G. spegazziniana* (LOEBLEIN, dados não publicados).

Por fim, as informações obtidas neste estudo, assim como a metodologia descrita podem corroborar para o desenvolvimento de trabalhos com pragas da mesma família.

REFERÊNCIAS

ALVES, L. F. A. et al. Susceptibility of *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 363-366, July/Sep. 2013.

ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Performance of *Metarhizium anisopliae* formulations with oil adjuvants on *Tenebrio molitor*. In International Symposium on adjuvants for Agrochemicals, 5. Memphis. **Proceedings**. Memphis: sn, v. 1, p. 170-175, Aug. 1998.

ALVES, R.T. et. al. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 1, p. 91-99, Mar. 2002.

ALVES, R.T. et al. Evaluation of application techniques of emulsifiable adjuvant fungal formulation. In International Congress of Entomology, 21. Brazilian Congress of Entomology, 18. Foz de Iguassu. **Abstracts**. Londrina: Embrapa Soja. p. 512, 2000.

ALVES, R.T. et al. **Espalhamento e eficiência de uma formulação de fungo a base de óleo adjuvante emulsionável**. Folhetos. EMBRAPA – CERRADOS, 2001.

ALVES, S. B. Fungos Entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.289-382, 1998.

ALVES, S.B., MOINO JR., A.; ALMEIDA, J.E.M. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos, p.217-238. In S.B. Alves (ed.), **Controle microbiano de insetos. Piracicaba**, FEALQ, 1163p.

ALVES, S.B. et al. Novo índice biológico para classificação da toxicidade de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 10, 2007, Brasília. **Resumos**. Brasília: Embrapa, 2007. CD-ROM.

AUSIQUE, J.J.S. et al. Efficacy of entomopathogenic fungi against adult *Diaphorina citri* from laboratory to field applications. *Journal of Pest Science*, v. 90, n. 3, p. 947-960, June 2017.

BARBOZA, M. R. et al. Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre o percevejo *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae). **Ambiência**, v. 7, n. 3, p. 473-480, 2011.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGE, J.P. Nonspecific Factors Involved in Attachment of Entomopathogenic Deuteromycetes to Host Insect Cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1795-1805, July 1988.

BUTELER, M.; STALLER, T. **A review on the mode of action and current use of petroleum distilled spray oils**. *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*, Margarita Stoytcheva. (ed.), 2011. DOI: 10.5772/20394.

CAVALCANTI, R. S. et al. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidaclopride, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 3, p.17-22, 2002.

CHIARADIA, L. A., MILANEZ, J. M.; SABEDOT, S. M. Caracterização e danos da ampola-da-erva-mate. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 13, n. 1, p. 50-53, mar./maio 2000.

CONCESCHI, M.R. et al. Transmission potential of the entomopathogenic fungi *Isaria fumosorosea* and *Beauveria bassiana* from sporulated cadavers of *Diaphorina citri* and *Toxoptera citricida* to uninfected *D. citri* adults. **BioControl**, v. 61, n. 5, p. 567-577, Oct. 2016.

CONCESCHI, M.R. **Parâmetros a serem considerados nas pulverizações do fungo *Isaria fumosorosea* para o manejo de *Diaphorina citri***. 2017. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

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, Dec. 2003.

COSTA, E.A.D. et al. Compatibilidade de adjuvantes no desenvolvimento “in vitro” dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **STAB**, v. 22, p. 38-40, nov. 2003.

COSTA, M.A. et al. Compatibilidade de inseticidas utilizados na cultura do eucalipto com *Metarhizium rileyi* (Farlow) (= *Nomuraea rileyi*). **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 3, p. 44-48, Jul./set. 2018.

DEPIERI, R.A.; MARTINEZ, S.S.; MENEZES JR., A.O. Compatibility of the Fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) With Extracts of Neem Seeds and Leaves and the Emulsible Oil. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 601-606, July-Aug. 2005.

FORMENTINI, M. A. et al. Characterization and activity of entomopathogenic fungi isolates against "Paraguay tea ampul" (*Gyropsylla spegazziniana*) (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 3553-3566, Dec. 2015.

IEDE, E. T.; D. C. MACHADO. **Pragas da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e seu controle**. Colombo: EMBRAPA/ CNPF (Boletim de Pesquisa Florestal 18/19), p. 51-60, 1989.

LEITE, M.S.P.; ZANOL, K.M.R. Biologia e morfologia de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera, Psyllidae). **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 19-34, jan. – dez. 2001.

LEONG, S.C.T. et al. Impacts of horticultural mineral oils and two insecticide practices on population fluctuation of *Diaphorina citri* and spread of huanglongbing in a citrus orchard in Sarawak. **The Scientific World Journal**, v. 3, May 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1100/2012/651416>.

LOEBLEIN, J.S. et al. Bioassay Technique and Maintenance of *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer, 1719) (Hemiptera: Psylloidea: Aphalaridae) *in vitro* Conditions. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 3, Aug. 2019.

LOUREIRO, E.S. et al. Efeito de produtos Fitossanitários Químicos Utilizados em Alfaca e Crisântemo Sobre Fungos Entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 2, p. 263-269, June 2002.

LOUREIRO, E. S. et al. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v. 34, n.5, p.791-798, 2005.

LUZ, C. et al. Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 211-218, June 2004.

LUZ, C. et al. Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: Preliminary assays on formulation and application in the field. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 101-110, Mar. 1999.

MOINO JR., A.; ALVES, S.B. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Soroki. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 4, p. 611-620, dez. 1998.

MOTA, L.H.C. **Estratégias de utilização de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) para o manejo de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)**. 2017. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de

Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017. doi:10.11606/T.11.2017.tde-17082017-151031.

NANKINGA, C.M.; MOORE, D. Reduction of banana weevil populations using different formulations of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Bioc. Sci. Tech*, v. 10, n. 5, p. 645-657, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/095831500750016442>.

OLIVEIRA, D.G.P.; PAULI, G.; MASCARIN, G.M.; DELALIBERA JR., I. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 44-52, 2015.

PADULLA, L. F. L. **Estudo de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psilídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PENTEADO, S. R. C. Principais pragas da erva-mate e medidas alternativas para seu controle. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (Ed). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone sul**. Porto Alegre: Editora Universidade/UFRGS, 1995. p.109-120.

REHNER, S.A; MINNIS, A.M; SUNG, G.H; LUANGSA-ARD, J.J; DEVOTTO, L; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, n. 5, p. 1055-1073, Sept-Oct 2011.

RODRÍGUES-LAGUNES, D.A. et al. Velasco. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y extractos acuosos de nim (*Azadirachta indica*) para el control de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*). **Manejo Integrado de Plagas**, v. 44, p. 14-19, June 1997.

SHIMAZU, M. Potential of the cerambycid-parasitic type of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for microbial control of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 29, n. 1, p. 127- 130, 1994.

SIDHU, O.P.; KUMAR, V.; BEHL, H.M. Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of neem among different provenances of India. **Industrial Crops and Products**, v. 19, n. 1, p. 65-75, Jan. 2004.

SILVA, R.Z. et al. Efeito de Agroquímicos à Base de Óleo Mineral e Vegetal Sobre a Viabilidade dos Fungos Entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Bainier. **Bioassay**, v. 1, n. 1, 2006. DOI: <https://doi.org/10.14295/BA.v1.0.33>.

SILVA, R.Z.; NEVES, P.M.O.J. Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals)Vuill and in vitro phytosanitary products. **Pest Management Science**, v.61, p.667-674, 2005.

STATSOFT. *Statística: data analysis software system, version 7.0* Tulsa-USA. 2014.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. Fungal infections. In: TANADA, Y.; KAYA, H.K. (Ed.). **Insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. p.318-387.

TAVERNER, P. Drowning or just waving? A perspective on the ways petroleum-derived oils kill arthropod pests of plants. In: BEATTIE, G.A.C. et al. (eds.). **Spray Oils beyond 2000 – Sustainable Pest and Disease Management**. Sydney: University of Western, 2002. p. 78-87.

ZAPPELINI, L.O.; ALMEIDA, J.E.M.; GASSEN, M.H. Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com emulsificantes para óleo vegetal e pó molhável. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 1-63, 2005.

4. ESTRATÉGIA ATRAI-E-INFECTA PARA DISSEMINAÇÃO DE *Beauveria bassiana* VISANDO AO CONTROLE DE *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae)

Resumo

A ampola-da-erva-mate (*Gyropsylla spegazziniana*) reduz a produção e compromete o desenvolvimento da erva-mate em função de seu hábito alimentar e desenvolvimento durante a sua fase imatura. Por ser um produto consumido praticamente “*in natura*”, métodos de controle alternativos ao uso de inseticidas químicos são necessários para o manejo desta praga. Diante do potencial do fungo *Beauveria bassiana* para o controle de *G. spegazziniana*, neste trabalho foram avaliados dispositivos para autoinoculação do fungo nos insetos e também a transmissão horizontal do patógeno na população. Os dispositivos foram preparados com papelão ondulado e também com painel comercial (Isca Tecnologias Ltda.), todos na cor amarela, impregnados com conídios do fungo puro ou em mistura com terra de diatomáceas (TD). Os dispositivos foram dispostos em gaiolas cilíndricas (40 cm de altura x 13 cm de diâmetro) com mudas de erva-mate individualizadas e também em gaiolas teladas (0,5 m³) com 10 mudas de erva-mate e adultos da ampola. Avaliou-se ainda a transmissão horizontal do fungo entre indivíduos contaminados e sadios e também a viabilidade dos conídios nas armadilhas ao longo do tempo. Comprovou-se atratividade e a infecção dos insetos, independente do modelo de dispositivo, alcançando 95% de mortalidade total e 73% de mortalidade confirmada em gaiolas com mudas individualizadas e 80% de mortalidade total e 35% de confirmação, nas gaiolas teladas. Além disso, houve incremento na atividade com a incorporação de terra de diatomáceas aos conídios. A viabilidade dos conídios foi reduzida ao longo do tempo de 98 % para 47,9% após 21 dias de armazenamento, porém mantendo a atividade inseticida, causando mortalidade de até 50% nos insetos. Assim, o uso do dispositivo de autoinoculação com conídios de *B. bassiana* mostrou potencial como método para manejo populacional da ampola-da-erva-mate.

Palavras-chave: Autoinoculação. Transmissão horizontal. Fungo entomopatogênico. Terra de diatomáceas.

Abstract

Paraguay tea ampul (*Gyropsylla spegazziniana*) reduces production and impairs mate's development due to its eating habits and development during its immature phase. As it is a product consumed practically “*in natura*” alternative control methods to the use of chemical insecticides are necessary for the management of this pest. Given the potential of the fungus *Beauveria bassiana* for the control of *G. spegazziniana*, this work evaluated devices for fungal self-inoculation in insects and also the horizontal transmission of the pathogen in the population. The devices were prepared with corrugated cardboard and with commercial panel (Isca Technologies Ltda.), All in yellow, impregnated with pure fungus conidia or mixed with diatomaceous earth (TD). The devices were arranged in cylindrical cages (40 cm high x 13 cm in

diameter) with individualized yerba mate seedlings and also in screened cages (0.5 m³) with 10 yerba mate and adult seedlings. The horizontal transmission between contaminated and healthy individuals and the viability of the conidia in the traps over time were also evaluated. Attractiveness and infection of insects, regardless of the device model, were found to reach 95% total mortality and 73% confirmed mortality in cages with individualized seedlings and 80% total mortality and 35% confirmation in cages of 0, 5 m³. In addition, there was an increase in activity with the incorporation of diatomaceous earth into the conidia. Conidia viability was reduced over time from 98 % to 47.9% after 21 days of storage, but maintaining insecticidal activity, causing mortality of up to 50% of insects. Thus, the use of the *B. bassiana* conidia self-inoculation device has potential as a method for population management of Paraguayan tea ampul.

Keywords: Autoinoculation. Horizontal transmission. Entomopathogenic fungus. Diatomaceous earth.

4.1 Introdução

A ampola-da-erva-mate, *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1919) (Hemiptera: Aphalaridae) é considerada uma das principais pragas da cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (St Hil., 1822) (Magnoliophyta: Aquifoliaceae). Durante sua fase imatura se desenvolve dentro de “galhas” ou “ampolas” formadas nas folhas das brotações da erva-mate, pela inoculação da saliva durante a alimentação do adulto. Quando alcançam o último instar ninfal, abandonam estas estruturas, que caem em seguida, causando prejuízos quantitativos. Além disso, causam redução de qualidade do produto final (IEDE e MACHADO, 1989; PENTEADO, 1995; CHIARADIA et al., 2002; LEITE, 2002).

Por outro lado, frente à inexistência de inseticidas registrados para o controle do inseto (AGROFIT, 2019) usualmente faz-se o controle manual com a poda e destruição dos ramos infestados (PENTEADO, 1995; PENTEADO et. al., 2000). Porém, recentemente, foi comprovado o potencial do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) isolado Unioeste 44 para o controle da praga, com mortalidade de até 80% de ninfas pulverizadas com conídios (FORMENTINI et al., 2015).

Outra forma de se utilizar o fungo no controle desta praga pode ser por meio da autocontaminação dos insetos atraídos para armadilhas contendo o patógeno com o objetivo de induzir epizootias, técnica eficientemente utilizada para outras espécies de insetos (LYONS et al., 2012; GETAHUN et al., 2016). Nesse sentido, recentemente, foi desenvolvido um dispositivo autodisseminador de conídios do fungo *I. fumosorosea*

utilizando a cor amarela como atrativo para contaminação de adultos de *D. citri*. Segundo os autores, mesmo com a redução da viabilidade do fungo, a concentração de conídios que aderiu ao corpo do inseto foi suficiente para causar altos índices de mortalidade de adultos, resultando em transmissão horizontal e secundária do patógeno para ninfas (PATT et al., 2015).

Assim, este estudo teve por objetivo avaliar o potencial de infecção e a viabilidade de *B. bassiana* isolado Unioeste 44 em dispositivos de autoinoculação utilizando-se diferentes preparações com terra de diatomáceas e também avaliar a ocorrência de transmissão horizontal do fungo entre adultos de *G. spegazziniana*.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Insetos

Os insetos foram provenientes de um erval comercial localizado no município de Cascavel, PR (24°58'02"S; 53°24'22"W; 746 m de altitude), obtidos de ramos de plantas de erva-mate infestadas. No Laboratório de Biotecnologia Agrícola da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, *Campus* de Cascavel, foi realizada a triagem do material coletado. Para isso, as ampolas obtidas das plantas foram parcialmente abertas e armazenadas em recipientes plásticos com tampa telada contendo papel toalha em seu interior para absorver o excesso de umidade, sendo separadas aquelas que continham ninfas de 4º e 5º instares, com base nas características do inseto (LEITE e ZANOL, 2004). Posteriormente os recipientes foram acondicionados em sala climatizada (26 ± 2°C; 12 h de fotofase e U.R. 60 ± 10%) até a emergência dos adultos. Nos bioensaios foram utilizados insetos adultos com pelo menos 24 horas de vida pós-emergência.

4.2.2 Plantas

Para os bioensaios, mudas de erva-mate foram obtidas de um produtor comercial e cultivadas em recipientes plásticos com 700 mL capacidade, com composto orgânico Húmiterra®. As mudas foram mantidas em um ambiente sombreado artificial com tela de polipropileno 50% e a cada dois dias eram irrigadas

com 30 mL de água. Foram selecionadas plantas com aproximadamente 20 cm de altura da base ao topo.

4.2.3 Produção do fungo e preparo do inóculo

O isolado de *Beauveria bassiana* Unioeste 44, previamente selecionado como virulento para *G. spegazziniana*, foi identificado pelo sequenciamento da região rDNA-ITS (FORMENTINI et al., 2015). O fungo foi cultivado em meio para produção de conídios (ME: KH₂PO₄ 0,36 g, NA₂HPO₄ 7H₂O 1,05 g, MgSO₄ 7H₂O 0,60 g, KCL 1,00 g, glucose 10,0 g, NaNO₃ 1,58 g, extrato de levedura 5,00 g, ágar 20,0 g, água destilada 1000,0 mL) e incubado a 26 °C ± 0,5 °C; 12 h fotofase, por 7 - 10 dias até conidiogênese, quando coletaram-se os conídios raspando-se a superfície do meio de cultura com uma espátula.

Os conídios foram submetidos ao processo de secagem em dessecador com sílica gel, por sete dias e peneirados em malha 35 mesh e novamente expostos ao dessecante por mais três dias a 22 °C. Estimou-se a produção em $1,1 \times 10^{11}$ conídios/g, com viabilidade acima de 90%. Em seguida, foram preparadas misturas de conídios e terra de diatomáceas e armazenadas a - 20°C, em frascos de vidros hermeticamente fechados por 2 a 8 semanas antes do uso, durante a qual a viabilidade dos conídios permaneceu estável, segundo avaliação.

4.2.4 Tratamentos

Para os bioensaios foram avaliados seis tratamentos e quatro dispositivos de autoinoculação (Tabela 6).

Tabela 6. Caracterização dos tratamentos e dispositivos de autoinoculação avaliados nos bioensaios de contaminação com superfície tratada, atração-e-infecção e atividade do fungo no tempo de armazenamento.

Tratamentos ¹	Conídios/g	Formato do dispositivo	Área de cada dispositivo	Composição
F	10×10^{10}	Cilíndrico	35 cm ²	papel micro-ondulado
75% F + 25% TD	$7,5 \times 10^{10}$	Quadrado	25 cm ²	papel micro-ondulado
50% F + 50% TD	5×10^{10}	Retângular	35 cm ²	papel micro-ondulado
25% F + 75% TD	$2,5 \times 10^{10}$	Papel comercial	35 cm ²	Armadilhas Colortrap®
TD	-	-	-	-
Testemunha	-	-	-	-

¹F – Conídios do fungo, TD – terra de diatomáceas.

4.2.5 Bioensaios de contaminação em superfície tratada

4.2.5.1 Contaminação em colônia

Com o objetivo de verificar o potencial de contaminação dos insetos através do contato com uma superfície contendo fungo, colônias do fungo foram produzidas diretamente em meio de cultura distribuído no fundo de copos plásticos (6 cm de diâmetro x 5 cm de altura), conforme descrito no item 4.2.3. Em seguida, 20 insetos adultos foram inseridos nos recipientes onde permaneceram por aproximadamente 30 minutos, em ambiente controlado (26 ± 2 °C; $60 \pm 10\%$ U.R.; 12 h fotofase) (Figura 8).



Figura 8. Copos plásticos contendo meio de cultura (M.E.) (A); colônia produzida após sete dias de incubação (B); transferência dos insetos para os recipientes contendo as colônias (C) e manutenção dos contatos por um período de 30 minutos (D) (Fonte: arquivo pessoal).

Decorrido este período, os insetos foram transferidos para uma gaiola (13 cm de diâmetro x 40 cm de altura) de cloreto de polivinila (PVC) incolor, contendo uma abertura na lateral e na parte superior coberta com tecido “*voil*” para permitir a aeração e uma muda de erva-mate. As mudas foram acondicionadas na parte inferior de Placas de Petri de plástico (14 cm de diâmetro) contendo papel filtro qualitativo (15 cm de diâmetro). A base das plantas foi revestida com um disco de 9 cm de diâmetro do mesmo papel, com o objetivo de facilitar a visualização dos indivíduos mortos. As mudas foram acondicionadas em sala climatizada com as mesmas condições citadas anteriormente (Figura 9).

Cada tratamento foi constituído por cinco repetições com 20 insetos cada ($n=100$). O experimento foi avaliado diariamente por 10 dias. Os insetos mortos (que não responderam ao toque de um pincel fino), foram retirados e imersos sequencialmente em solução de etanol 70%, hipoclorito de sódio e água destilada.



Figura 9. Mudanças padronizadas para os bioensaios (A) inseridas em placas de Petri contendo papel filtro no interior (B) e também na base (C). Mudanças inseridas em gaiolas (D) e posteriormente mantidas em sala climatizada (26 ± 2 °C; $60 \pm 10\%$ U.R.; 12 h fotofase) (E) (Fonte: arquivo pessoal).

Em seguida, foram acondicionados em câmara úmida (placa de Petri com um pedaço de 20 mm^2 de papel filtro esterilizado e umedecido e inseridas em um recipiente plástico fechado com espuma umedecida em saturação no fundo) e incubados em 26 ± 2 °C; $60 \pm 2\%$ U.R.; 12 h fotofase. Após sete dias, avaliaram-se a presença de micélio e conídios de *B. bassiana* na superfície dos insetos, confirmando o agente causal.

4.2.5.2 Contato com superfície tratada com o patógeno

Um segundo teste foi conduzido a fim de verificar o potencial de contaminação de adultos de *G. spegazziniana* com uma superfície revestida com uma fonte de inóculo. Para isso, recipientes plásticos foram recobertos com uma fina camada de cera emulsionada SPLAT® (SPLAT™ - ISCA Tecnologias Ltda., Brasil) e aplicaram-se sob agitação aproximadamente 0,5 g das diferentes formulações conforme Tabela 6. O excesso de produto aplicado foi retirado virando-se o recipiente com leve agitação

Em cada recipiente foram inseridos 20 adultos e ali permaneceram por 30 minutos. Então, os insetos foram transferidos para gaiolas de PVC incolor com uma muda de erva-mate e mantidos em sala climatizada (26 ± 2 °C; $60 \pm 10\%$ U.R.; 12 h fotofase) por 10 dias, sendo avaliados diariamente (Figura 10). No grupo testemunha, os insetos foram transferidos para recipientes sem qualquer tipo de contato com o patógeno, pelo mesmo período de tempo. Cada tratamento foi constituído por cinco repetições (copos plásticos), totalizando 100 insetos por tratamento. Os insetos mortos foram retirados em cada avaliação e submetidos ao processo para a confirmação do agente causal, conforme descrito anteriormente.

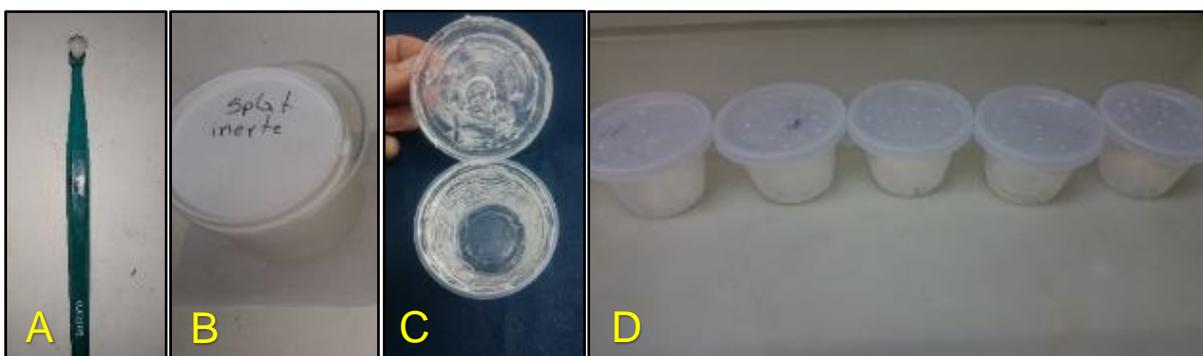


Figura 10. Escova (A) utilizada para a aplicação da cera Splat® (B) em recipientes plásticos (C) para aumentar a aderência dos tratamentos. Manutenção dos insetos nos recipientes em contato com os tratamentos por 30 minutos (D) (Fonte: arquivo pessoal).

4.2.6 Bioensaios de Atratividade e Infecção

4.2.6.1 Seleção do dispositivo de autoinoculação

Os dispositivos para autoinoculação dos conídios constaram de papel micro-ondulado amarelo cortado com formato quadrado (5×5 cm), retangular (5×7 cm) e cilíndrico (5×7 cm), visando a estimular a movimentação dos insetos sobre a superfície e aumentar a área de adesão das formulações testadas. Um quarto tipo foi preparado com painel amarelo comercial utilizado para armadilhas Colortrap (ISCA Tecnologias Ltda.), no formato retangular.

A coloração amarela foi determinada com base nos estudos de monitoramento e flutuação populacional de Prat Kricun (1986), Chiaradia e Milanez (1997) e Leite et al. (2007) e comprovada por Loeblein et al. (2018) como a mais atrativa para adultos de *G. spegazziniana*.

Os três dispositivos de autoinoculação em papel micro-ondulado foram revestidos com uma fina camada de cola entomológica da marca Colly® (Colly Química Indústria e Comércio Ltda) utilizando uma espátula. Em seguida, todos foram individualizados e pendurados nas gaiolas com um fio de nylon e fita adesiva através do tecido “voil” para que permanecessem no centro e acima da altura da planta. Em cada gaiola foi colocada uma muda de erva-mate, sendo liberados os insetos (Figura 11).

Para cada dispositivo testado foram preparadas cinco gaiolas com 20 adultos, cada uma sendo considerada uma repetição (n=100). As avaliações foram diárias, por 21 dias, quantificando-se os adultos aderidos aos dispositivos. No tratamento testemunha os insetos foram inseridos nas gaiolas com os dispositivos ausentes de contato com a cola.

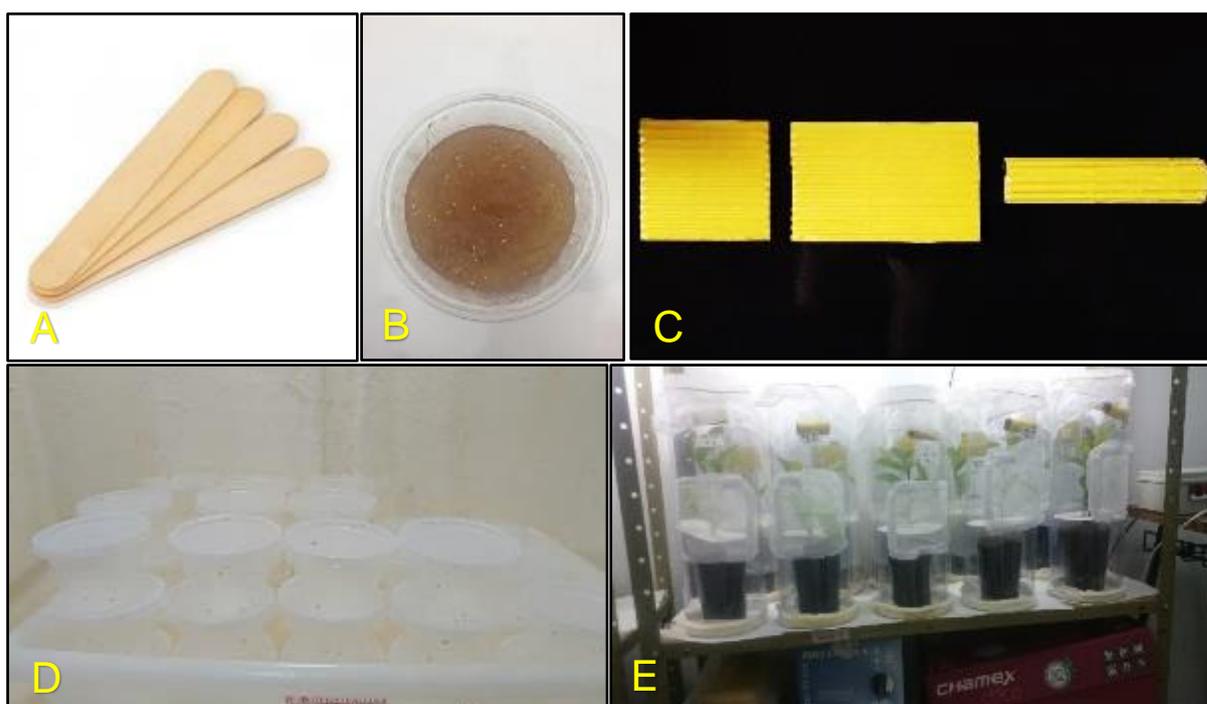


Figura 11. Espátula de madeira (A) utilizada para aplicação da cola entomológica (B) nos dispositivos de autoinoculação (C). Insetos acomodados em recipientes plásticos (D) para transferência em gaiolas contendo as mudas e os dispositivos (E) (Fonte: arquivo pessoal)

4.2.6.2 Efeito da cola entomológica na confirmação de morte pelo fungo em armadilhas adesivas

Com o objetivo de verificar a ocorrência de confirmação de mortalidade de *G. spegazziniana* pelo fungo *B. bassiana* em armadilhas adesivas com cola entomológica, foi desenvolvido um bioensaio comparando-se dois dispositivos: i) armadilha comercial amarela Colortrap® (ISCA Tecnologias Ltda., Brasil); e ii) dispositivo preparado com papel micro-ondulado revestido com cola entomológica (Colly Química Indústria e Comércio Ltda), conforme descrito no item anterior. Após serem recortados (5 × 7 cm) foram inseridos nas gaiolas também como descrito (Figura 12).

Na sequência, indivíduos adultos foram contaminados com o fungo (conforme o item 4.2.5.2) e inseridos nas gaiolas. Os dispositivos com cola foram substituídos a cada dois dias e incubados conforme o item 4.2.3. Para cada dispositivo testado foram preparadas cinco gaiolas com 20 adultos cada (n=100), cada uma sendo considerada uma repetição. O experimento foi avaliado a cada dois dias quantificando-se o total de adultos aderidos aos dispositivos. O tratamento testemunha consistiu na inserção da população de indivíduos na gaiola sem qualquer tipo de contato com o fungo e sem a cola.

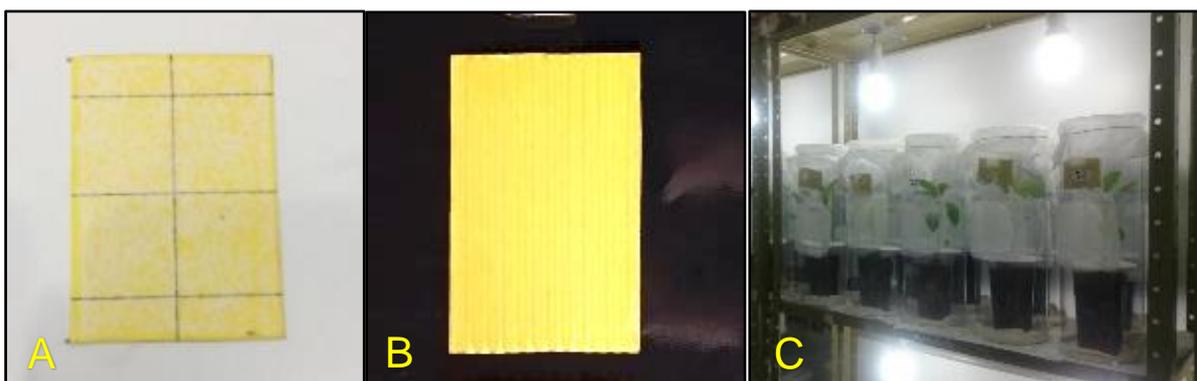


Figura 12. Dispositivos de autoinoculação fabricados a partir de papel comercial Colortrap® (A) e papel micro-ondulado (B) para inserção e avaliação em gaiolas (C) (Fonte: arquivo pessoal)

4.2.6.3 Teste de atração-e-infecção

Os dispositivos de autoinoculação foram testados com a presença ou não da cera emulsionada SPLAT[®]. No primeiro grupo, a superfície de cada dispositivo foi revestida com uma fina camada (aproximadamente 0,05 g) de SPLAT[®] utilizando-se uma escova. Na sequência, com um pincel de cerdas finas foi distribuída a formulação na superfície dos dispositivos imediatamente antes do início de cada bioensaio. O excesso foi retirado com agitação leve dos dispositivos.

A quantidade de inóculo aderida aos dispositivos e o número de conídios foi estimada por meio da pesagem antes e depois do tratamento. Para o grupo sem a cera os dispositivos receberam o fungo diretamente na sua superfície. Durante os testes, cada dispositivo foi anexado em uma gaiola de PVC incolor com uma muda de erva-mate e insetos, conforme já descrito (Figura 13).

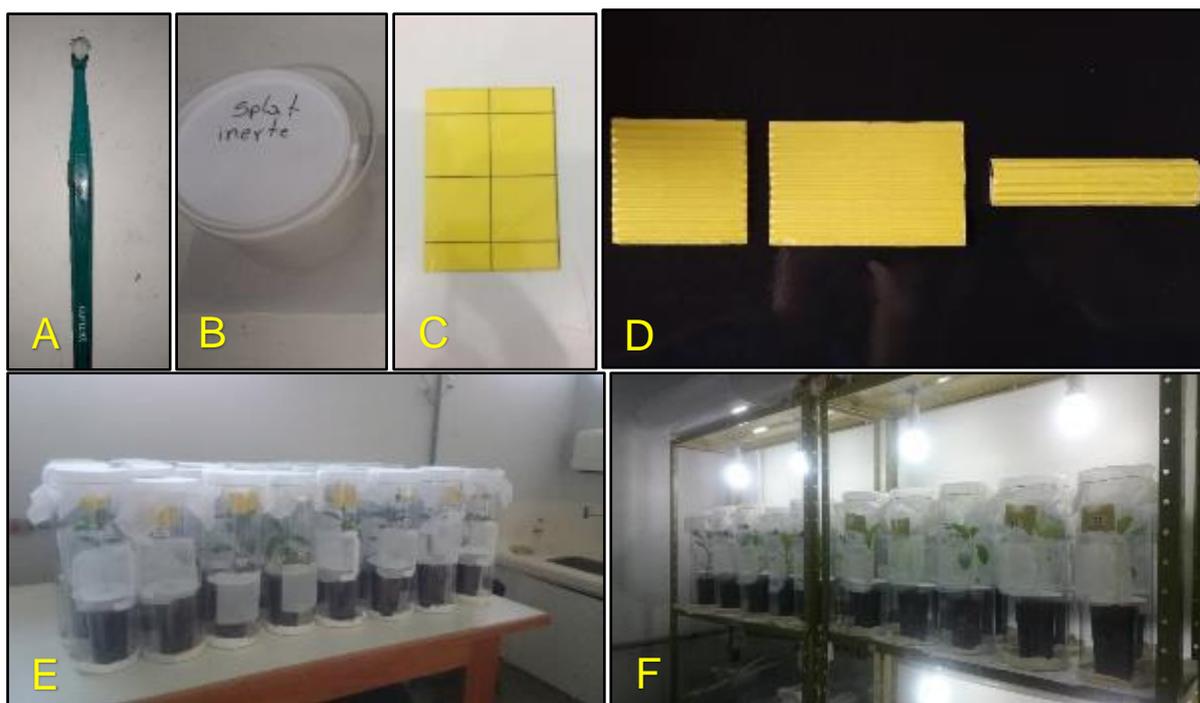


Figura 13. Escova (A) utilizada para a aplicação da cera Splat[®] (B) nos dispositivos de autoinoculação (C, D). Dispositivos anexados em gaiolas para infestação (E) e manutenção dos insetos em sala climatizada (F) (Fonte: arquivo pessoal).

Da mesma forma, foram seguidos procedimentos de incubação e avaliação. Para a testemunha foram preparadas gaiolas com dispositivos sem a presença de qualquer tratamento. Foram preparadas cinco unidades experimentais para cada tratamento, bem como para a testemunha. A avaliação ocorreu semanalmente,

durante três semanas, sendo os indivíduos mortos encontrados na gaiola retirados e incubados conforme o item 4.2.3 para a confirmação do agente causal.

4.2.7 Bioensaios de Transmissão

4.2.7.1 Obtenção de inóculo

4.2.7.1.1 Cadáveres esporulados

Foi preparada uma suspensão de conídios em água destilada + Tween 80[®] (0,01%) (1×10^9 conídios por mL), sendo 0,2 ml pulverizados sobre grupos de 20 adultos com pelo menos 24 h após emergência, mantidos em recipientes plásticos com tampa e fundo perfurados com um micropulverizador acoplado a um compressor de ar com pressão média de saída de $0,5 \text{ kgf/cm}^2$, inserido na abertura da tampa do recipiente (Loeblein et al. (2019)).

Após a pulverização, cada grupo de insetos foi transferido imediatamente para uma gaiola de PVC com uma muda de erva-mate e mantidos em sala climatizada ($26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; $60 \pm 10\%$ U.R.; 12 h fotofase). A avaliação foi diária, sendo os indivíduos mortos mantidos em câmara úmida, conforme o item 4.2.3. Os cadáveres com a superfície contendo conídios foram acondicionados em placas de Petri seladas com Parafilm[®] e armazenados em freezer a $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ até a sua utilização.

4.2.7.1.2 Insetos vivos contaminados

Foram preparados recipientes plásticos com a superfície interna recoberta com uma fina camada de cera emulsionada SPLAT[®] e polvilhado com o fungo *B. bassiana* produzido anteriormente. O excesso de fungo foi retirado com leve agitação do recipiente. Os insetos permaneceram no recipiente por aproximadamente 30 minutos e na sequência foram imediatamente utilizados nos bioensaios (Figura 10).

4.2.7.2 Bioensaio de Transmissão horizontal – cadáveres como fonte de inóculo

Foram preparadas gaiolas de PVC com mudas de erva-mate, conforme descrito anteriormente, sendo a base das plantas coberta com um disco de papel-filtro de 9 cm de diâmetro com o objetivo de facilitar a visualização dos indivíduos mortos. Os cadáveres obtidos anteriormente foram fixados às mudas com o auxílio de um alfinete entomológico e um pedaço de papel-filtro, próximo às brotações, em diferentes pontos de distribuição, conforme o número de cadáveres de cada tratamento. Em seguida, os adultos sadios foram liberados nas gaiolas (Figura 14).

Os tratamentos foram compostos por um, três, cinco e 10 cadáveres de *G. spegazziniana* e 20 adultos sadios. Na testemunha, 20 insetos sadios foram liberados em gaiolas sem adicionar os cadáveres. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada (26 ± 2 °C; $60 \pm 10\%$ U.R.; 12 h fotofase) durante três semanas, com avaliação a cada dois dias. Os insetos mortos foram removidos e submetidos à câmara úmida para confirmação da mortalidade pelo fungo, conforme o item 4.2.3. Para cada tratamento foram preparadas cinco repetições (gaiolas). A mortalidade obtida foi utilizada para estimar a eficácia da transmissão horizontal.

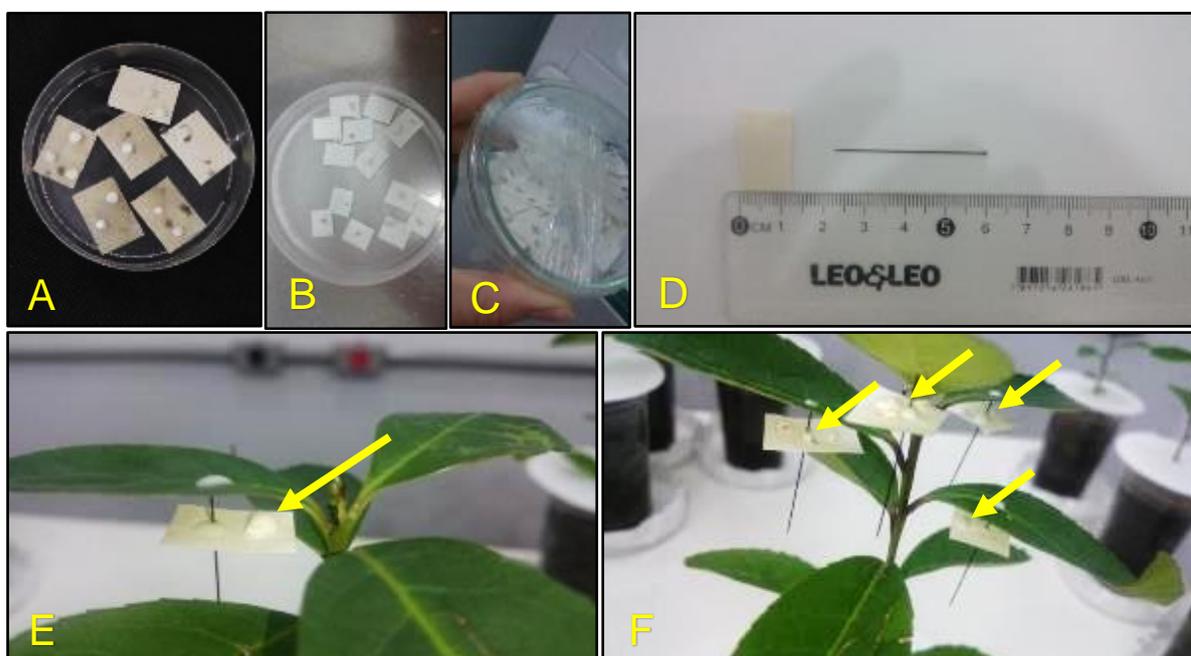


Figura 14. Cadáveres (A, B) obtidos através dos bioensaios de contato direto armazenado em placas de Petri (C) a -10 C. Papel filtro e alfinete entomológico (D) utilizados para anexar os cadáveres nas mudas de erva-mate (E, F) (Fonte: arquivo pessoal).

4.2.7.3 Bioensaio de Transmissão horizontal – insetos vivos contaminados como fonte de inóculo

Utilizando as mesmas condições descritas no bioensaio anterior, os insetos vivos contaminados foram transferidos para gaiolas com mudas e logo após foram liberados os adultos não infectados. Os tratamentos foram compostos por um, três, cinco e dez insetos contaminados e 20 adultos não infectados. No tratamento testemunha, 20 adultos não infectados foram liberados em gaiolas sem adicionar os insetos contaminados.

4.2.8 Atividade do fungo ao longo do tempo

4.2.8.1 Avaliação da viabilidade do fungo

Para avaliar a redução da viabilidade dos conídios ao longo do tempo foram preparados os dispositivos de autoinoculação (5 × 7 cm) com papel micro-ondulado com duas formulações do inóculo tratadas ou não com a cera emulsionada SPLAT®, sendo os tratamentos: i) Fungo puro; ii) mistura Fungo 50% + TD 50%, selecionados com base nos resultados obtidos nos bioensaios 4.2.5.3.

Logo após o preparo, as armadilhas foram separadas em grupos de seis unidades e armazenadas em frascos de vidro hermeticamente fechados, totalizando cinco frascos por tratamento. Os frascos foram identificados de acordo com o tipo de armadilha contidas em seu interior e armazenados em 26 ± 2 °C; $60 \pm 2\%$ U.R.; e 12 h de fotofase, em câmara de incubação B.O.D. Um frasco de cada tratamento foi selecionado aleatoriamente para receber um termo-higrômetro para monitorar as condições internas do mesmo, durante três semanas. As avaliações de viabilidade foram realizadas previamente ao início do experimento e dois, quatro, sete, 14 e 21 dias após o início do experimento.

Uma armadilha de cada tratamento foi retirada aleatoriamente do respectivo frasco em cada período e transferida para um tubo de vidro e adicionados 10 mL de água esterilizada + Tween 80® (0,01%). Após vigorosa agitação em vórtex por dois minutos e vibração ultrassônica por mais 2 minutos, procedeu-se a quantificação dos conídios em câmara de Neubauer e padronizou-se a concentração em 1×10^6 conídios/mL.

Alíquotas de 10 μ L de cada suspensão foram inoculadas na superfície de meio de cultura Batata Ágar Dextrose (BDA) em placa Rodac. Após secagem da placas abertas em fluxo laminar estas foram incubadas por 20 h em câmara de incubação ($26 \pm 0,5$ °C; $60 \pm 2\%$ U.R.; 12 h fotofase) para contagem dos conídios germinados e não germinados sob microscópio óptico em aumento de 400 x (Figura 15) (OLIVEIRA et al., 2015).

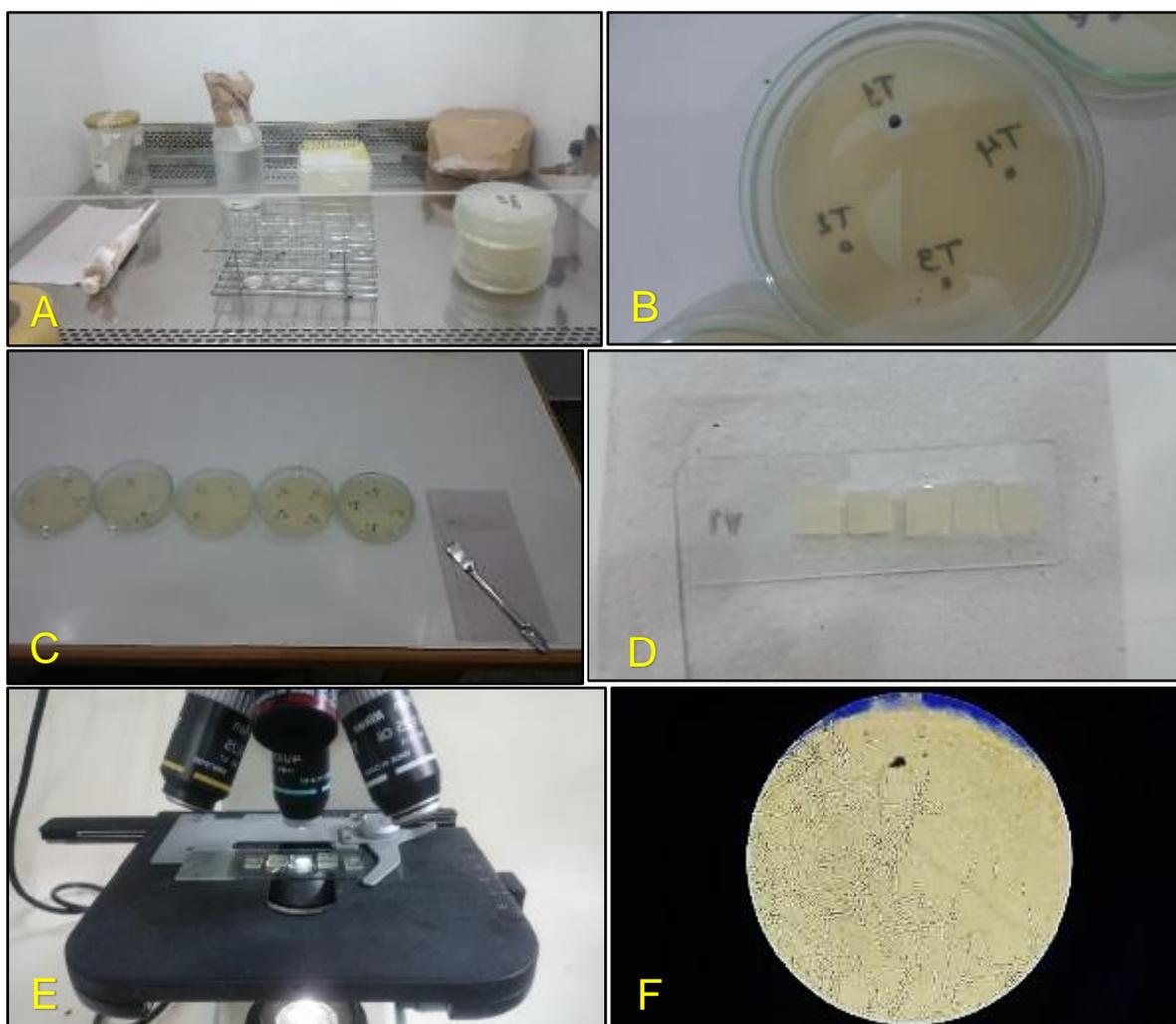


Figura 15. Material utilizado para a diluição dos tratamentos (A) e inoculação em placas e Petri (B, C). Recorte das alíquotas após 20 horas de incubação (D) para avaliação em microscópio óptico (E) e determinação da viabilidade (F) (Fonte: arquivo pessoal).

4.2.8.2 Avaliação da atividade inseticida

O efeito do tempo de armazenamento também foi avaliado, retirando-se as demais armadilhas do armazenamento, as quais foram colocadas em recipientes e

liberando-se 20 adultos para a contaminação. Os insetos permaneciam aproximadamente 30 minutos e, em seguida, eram transferidos para gaiolas de PVC incolor com uma muda de erva-mate e mantidos em sala climatizada (26 ± 2 °C; $60 \pm 10\%$ U.R.; 12 h fotofase) durante 10 dias, avaliando-se diariamente durante este período (Figura 16).

Os insetos mortos eram retirados e incubados conforme o item 4.2.5.3 para a confirmação do agente causal. Cada tratamento foi constituído por cinco repetições com 20 insetos cada. No tratamento testemunha os insetos foram expostos a armadilhas sem conídios do fungo.

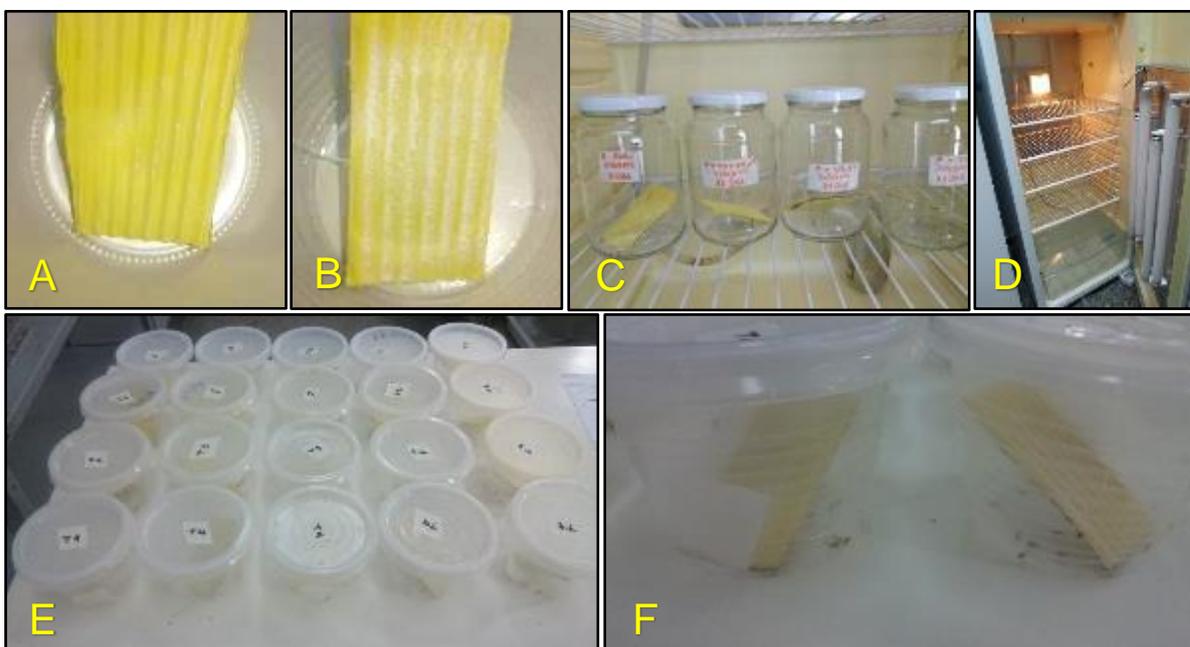


Figura 16. Dispositivos de autoinoculação contendo os tratamentos (A, B) retirados de frascos de vidro (C) mantidos em B.O.D (D) a cada avaliação. Manutenção dos insetos em contato com os dispositivos por um período de 30 minutos (E, F) (Fonte: arquivo pessoal).

4.2.9 Bioensaio de atração-e-infecção em gaiolas teladas

Com base nos resultados anteriores, foram preparados dispositivos retangulares de papel micro-ondulado, com e sem a presença da cera emulsionada SPLAT® e o tratamento conídios do Fungo 50% + TD 50%, conforme item 4.2.5.3. Na testemunha, os insetos foram liberados na gaiola sem qualquer tipo de contato como fungo.

Os dispositivos foram instalados no centro de cada gaiola de tecido *voil* (120 cm comprimento × 70 cm altura × 60 cm largura – com abertura lateral), na altura

acima das 10 mudas de erva-mate que estavam na mesma. Após anexar os dispositivos foram liberados 100 adultos em cada gaiola, onde permaneceram durante sete dias, em sala climatizada (26 ± 2 °C; $60 \pm 10\%$ U.R.; 12 h fotofase). Decorrido este período, os insetos mortos foram retirados e submetidos ao processo de confirmação da mortalidade pelo fungo (conforme o item 4.2.3).

Os adultos que ainda estavam vivos nas gaiolas foram coletados e mantidos em gaiolas de PVC incolor, nas mesmas condições por mais 14 dias, sendo avaliados e submetidos ao processo de confirmação do agente causal semanalmente (Figura 17). O bioensaio foi repetido 10 vezes, sendo cada vez considerada uma repetição. A cada repetição do experimento, a estrutura da gaiola era desmontada e juntamente com o tecido “voil” foram lavados e desinfectado com detergente e água sanitária.



Figura 17. Gaiolas teladas (A, B) contendo mudas de erva-mate (C) e um dispositivo de autoinoculação com o respectivo tratamento (D). Gaiolas pequenas contendo os insetos após uma semana de contato com o dispositivo em gaiolas teladas (E) (Fonte: arquivo pessoal).

4.2.10 Análise Estatística

Todos os experimentos foram conduzidos no delineamento experimental inteiramente aleatorizado e as análises foram realizadas utilizando o Software Statistica® versão 7.0 (STATSOFT, 2004) ou o Software Sisvar (versão 5.6). A análise da normalidade e homogeneidade foi realizada para todos os experimentos através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene Test, respectivamente. Quando necessário, os dados foram transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$.

Para análise dos bioensaios de contato com superfície tratada com a colônia as médias foram comparadas entre si pelo teste t de Student ($p < 0.05$) em comparações pareadas dos tratamentos e com a superfície contaminada utilizou-se o teste de Tukey ($p < 0.05$). O mesmo foi realizado para os bioensaios de seleção do dispositivo e efeito da cola entomológica na confirmação de morte pelo fungo.

Para avaliar a mortalidade total e confirmada nos testes de atração-e-infecção utilizou-se esquema fatorial 6×4 , considerando os tratamentos como fator principal e os dispositivos de autoinoculação como fator secundário. Para a comparação do desempenho das formulações na presença ou não da cera SPLAT® as médias foram comparadas entre si pelo teste t de Student ($p < 0.05$), em comparações pareadas dos tratamentos, utilizando o teste de Fisher (LSD) ($p < 0.05$) para acompanhamento das médias. De forma semelhante, a transmissão horizontal do fungo foi analisada em esquema fatorial 5×2 , considerando como fator principal a quantidade de inóculo e como fator secundário a fonte do inóculo.

A viabilidade dos conídios e mortalidade dos insetos nos bioensaios de atividade do fungo ao longo do tempo foram analisados por um modelo misto ANOVA de medidas repetidas, onde os tratamentos foram considerados como efeito fixo no modelo e o tempo como efeito aleatório, utilizando o teste de Tukey ($p < 0.05$) para comparação das médias. O mesmo foi realizado para o bioensaio em gaiola telada, porém utilizando-se o teste de Fisher (LSD) ($p < 0.05$) para comparação das médias.

4.3 Resultados

4.3.1 Produção do fungo e preparo do inóculo

Verificou-se que a quantidade e concentração de conídios aderidos aos dispositivos foi numericamente maior quando polvilhados na presença da cera SPLAT® (Tabela 7). Na ausência da cera a quantidade de conídios aderidos variou entre $0,17 \times 10^7$ a $2,5 \times 10^7$ conídios/dispositivo. Quando na presença de SPLAT®, a quantidade de conídios aderidos nos dispositivos quadrados, retangulares e papel comercial foi semelhante entre si, exceto o dispositivo cilíndrico e o copo que apresentaram os menores valores.

Tabela 7. Média de conídios do fungo *B. bassiana* por formulação preparada e quantidade de conídios ancorados nos diferentes dispositivos de autoinoculação.

Tratamento ¹	Conídios/g formulação	Média de conídios/dispositivo				
		Cilíndrico	Quadrado	Retangular	Papel comercial	Copo
SEM SPLAT						
F puro	$1,0 \times 10^{11}$	$2,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	-
75% F + 25% TD	$0,75 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$0,17 \times 10^7$	-
50% F + 50% TD	$0,50 \times 10^{11}$	$1,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$0,19 \times 10^7$	-
25% F + 75% TD	$0,25 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$0,3 \times 10^7$	-
COM SPLAT						
F. puro	$1,0 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$
75% F + 25% TD	$0,75 \times 10^{11}$	$3,6 \times 10^7$	$10,6 \times 10^7$	$10,1 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$
50% F + 50% TD	$0,50 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^7$	$10,7 \times 10^7$	$10,3 \times 10^7$	$10,3 \times 10^7$	$5,2 \times 10^7$
25% F + 75% TD	$0,25 \times 10^{11}$	$3,1 \times 10^7$	$10,9 \times 10^7$	$10,8 \times 10^7$	$11,2 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$

¹F – Fungo, TD – terra de diatomáceas.

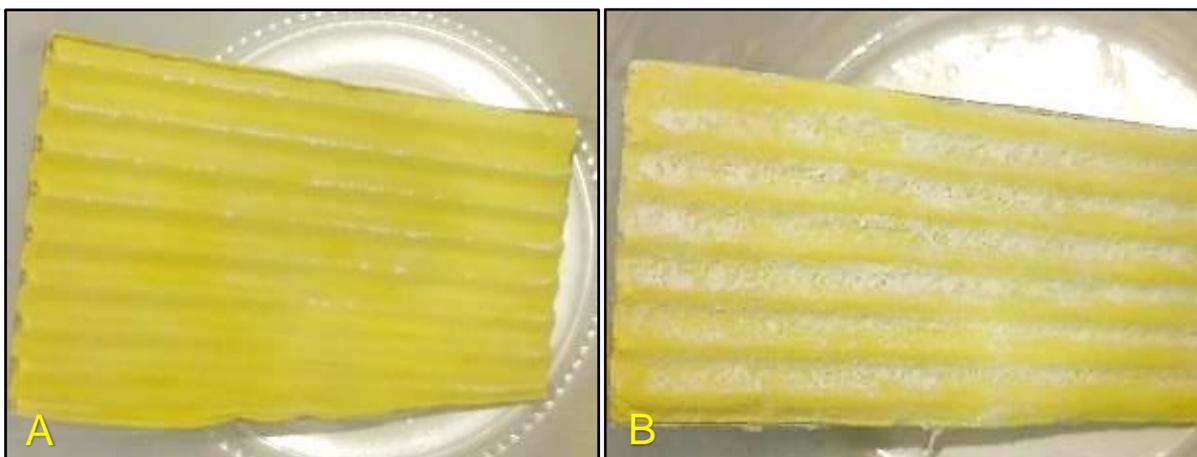


Figura 18. Aspecto dos dispositivos após aplicação da formulação em teste sem Splat® (A) e com Splat® (B) (Fonte: arquivo pessoal).

4.3.2 Bioensaios de contaminação em superfície tratada

Independente do tipo de substrato para contaminação, o inseto mostrou-se suscetível ao fungo por meio desta estratégia de exposição, com mortalidade total entre 67 e 90% e mortalidade confirmada entre 14 e 69% (Tabela 8).

Tabela 8. Mortalidade de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* pelo contato com superfícies contendo o fungo *Beauveria bassiana* isolado Unioeste 44.

Tratamentos	Mortalidade (%)		
	N	Total	Confirmada
SUPERFÍCIE DE CONTATO ¹			
colônia	100	77 ± 7,52 a	14 ± 4,28 a
testemunha	100	4 ± 3,16 b	0,0 ± 0,00 b
SUPERFÍCIE DE CONTATO ²			
Fungo puro	100	85 ± 8,16 a	58 ± 7,79 a
Fungo 75% + TD 25%	100	90 ± 5,40 a	69 ± 5,16 a
Fungo 50% F + TD 50%	100	76 ± 8,75 a	44 ± 16,25 a
Fungo 25% F + TD 75%	100	67 ± 12,17 a	40 ± 10,00 a
TD pura	100	76 ± 8,99 a	0,0 ± 0,00 b
Testemunha	100	10 ± 2,88 b	0,0 ± 0,00 b

¹Médias (±EPM) seguidas pela mesma letra na coluna para o respectivo tipo de superfície de contato, não diferem entre si pelo teste t de Student ($p < 0,05$); TD = terra de diatomáceas miconizada. ²Médias (±EPM) seguidas de mesma letra na coluna para o respectivo tipo de superfície de contato, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para análise os dados originais foram transformados em $\arcsen \sqrt{x}$.

Ressalta-se que não houve diferença nos resultados obtidos com as diferentes formulações, tanto na mortalidade total como confirmada. E ainda, os valores de mortalidade confirmada com estas formulações (40-69%) foram superiores ao verificado com a exposição na colônia de fungo (apenas 14%). Os resultados

indicaram a capacidade de contaminação dos insetos quando em contato com uma superfície tratada com o patógeno (Figura 19).



Figura 19. Adultos de *G. spegazziniana* contendo o fungo nas regiões dorsal e ventral logo após o contato com superfície tratada com as formulações (A) e colônia (B) (Fonte: arquivo pessoal).

4.3.3 Bioensaios de Atratividade e Infecção

4.3.3.1 Seleção do dispositivo de autoinoculação

Verificou-se que os dispositivos de autoinoculação foram atrativos para os adultos de *G. spegazziniana*, com 76 a 93% dos insetos liberados sendo capturados nos diferentes dispositivos testados (Tabela 9). Os dispositivos cilíndricos e retangulares foram os mais atrativos, e indicam que a cor amarela é atrativa e pode ser utilizada nos dispositivos para atração dos insetos adultos (Figura 20).

Tabela 9. Porcentagem média de captura de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* em diferentes dispositivos de autoinoculação revestidos com cola entomológica Colly® em condições de laboratório.

Dispositivos de autoinoculação	N	Captura
Cilíndrico	100	91 ± 5,55 ab
Quadrado	100	76 ± 7,47 b
Retangular	100	93 ± 4,83 a
Testemunha	100	11 ± 2,41 c

Médias (\pm EPM) seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para análise os dados originais foram transformados em $\arcsen \sqrt{x}$. Na tabela os dados são originais.



Figura 20. Dispositivos de autoinoculação cilíndrico (A), quadrado (B) e retângular (C) retirados das gaiolas ao final da avaliação contendo insetos aderidos em sua superfície (Fonte: arquivo pessoal).

4.3.3.2 Efeito da cola entomológica na confirmação da mortalidade ocasionada pelo fungo em armadilhas adesivas

Verificou-se que apesar de não haver diferença na captura nos dois tratamentos, a confirmação da morte pelo fungo *B. bassiana* foi significativa (78%) apenas nos dispositivos fabricados a partir de armadilhas comerciais (Tabela 10) (Figura 21).

Tabela 10. Mortalidade total e confirmada de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* em dispositivos de autoinoculação revestidos com diferentes tipos de cola entomológica em condições de laboratório.

Dispositivos revestidos com cola entomológica	Mortalidade (%)		
	N	Atração (%)	Confirmação
Papel Colortrap®	100	93 ± 5,62 a	78 ± 6,64 a
Papel micro-ondulado e cola entomológica Colly®	100	89 ± 6,58 a	2 ± 2,58 b
Testemunha	100	0,0 ± 0,00 b	0,0 ± 0,00 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para análise os dados originais foram transformados em $\arcsen \sqrt{x}$. Na tabela os dados são originais.



Figura 21. Dispositivo de papel Colortrap® (A) contendo cadáveres esporulados após o período de confirmação em câmara úmida e dispositivo de papel micro-ondulado (B) contendo cadáveres ausentes de crescimento do fungo após o período de confirmação (Fonte: arquivo pessoal).

4.3.3.3 Teste de atração-e-infecção

Todos os dispositivos testados foram atrativos e causaram mortalidade total média variando de 30 a 94% para testes sem a presença da cera emulsionada SPLAT® e 35 a 90% para testes com a presença do SPLAT® (Tabela 11). Além disso, verificou-se também que com a terra de diatomáceas utilizada para compor as

formulações e também pura obteve mortalidade total variando de 30 a 65% nos bioensaios com ou sem a presença de SPLAT® (Tabela 11).

Tabela 11. Mortalidade total de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* após contato com dispositivos de autoinoculação, contendo diferentes proporções de conídios de *Beauveria bassiana* Unioeste 44 e terra de diatomáceas, na ausência ou presença da cera emulsionada SPLAT® em condições de laboratório.

Tratamento ¹	Dispositivos de autoinoculação				
	N	Cilíndrico	Quadrado	Retangular	Papel comercial
SEM SPLAT®					
F	100	70 ± 7,35 bA*	71 ± 11,79 bA	72 ± 13,93 aA	68 ± 5,98 aA
75% F + 25 % TD	100	81 ± 6,58 abAB*	90 ± 7,35 aA	77 ± 8,31 aAB	71 ± 8,01 aB
50% F + 50% TD	100	94 ± 3,76 aA*	81 ± 11,25 abA	82 ± 7,79 aA	51 ± 4,28 bB
25% F + 75% TD	100	74 ± 8,01 bAB*	57 ± 9,91 cB	84 ± 5,55 aA	61 ± 10,28 abA
TD	100	65 ± 8,89 bA*	30 ± 3,53 dC	52 ± 4,83 bB	43 ± 7,52 bBC
Testemunha	100	14 ± 1,29 cA	14 ± 1,29 eA	14 ± 1,29 cA	14 ± 5,91 cA
Tratamento ¹	Dispositivos de autoinoculação				
	N	Cilíndrico	Quadrado	Retangular	Papel comercial
COM SPLAT®					
F	100	50 ± 4,56 bB	90 ± 8,16 aA	86 ± 7,74 aA	78 ± 4,37 aA
75% F + 25% TD	100	61 ± 6,25 abB	83 ± 6,95 abA	87 ± 4,83 aA	72 ± 3,87 aAB
50% F + 50% TD	100	71 ± 5,55 aB	80 ± 7,35 abAB	85 ± 6,12 aA	72 ± 4,37 aA*
25% F + 75% TD	100	53 ± 8,06 bB	77 ± 5,98 bA*	75 ± 10,60 aA	77 ± 10,52 aA
TD	100	35 ± 13,07 cB	59 ± 9,66 Ca*	47 ± 9,70 bAB	46 ± 4,74 bB
Testemunha	100	16 ± 2,41 dA	16 ± 2,41 dA	16 ± 2,41 cA	16 ± 2,41 cA

¹F – Fungo, TD – terra diatomácea. Médias (±EP) seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si através do teste ANOVA fatorial, tendo como fator principal os tratamentos e, como fator secundário, os dispositivos de autoinoculação (p<0,05). *Análise de comparação dos dados com e sem SPLAT® através do teste t de Student.

Nos testes sem a presença da cera emulsionada as formulações 75% F + 25% TD e 50% F + 50% TD obtiveram o melhor desempenho nos diferentes dispositivos de autoinoculação testados, e o mesmo foi observado na presença do SPLAT®. Além disso, todos os tratamentos do dispositivo cilíndrico apresentaram o melhor desempenho quando na ausência da cera. Especificamente em relação aos efeitos da cera SPLAT® nos dispositivos, verifica-se que houve superioridade apenas no tratamento 50% F + 50% TD no papel comercial, 25% F + 75% TD e TD do dispositivo quadrado, apenas.

Para a mortalidade confirmada, os valores variaram de 21 a 65% para os testes sem SPLAT® e 33 a 73% quando houve a presença de SPLAT® nos dispositivos de autoinoculação (Tabela 12).

Tabela 12. Mortalidade confirmada de adultos de *Gyropsylla spegazziniana* após contato com dispositivos de autoinoculação, contendo diferentes proporções de conídios de *Beauveria bassiana* isolado Unioeste 44 e terra de diatomáceas, na ausência ou presença da cera emulsionada SPLAT® em condições de laboratório.

Tratamento ¹	Dispositivos de autoinoculação				
	N	Cilíndrico	Quadrado	Retângular	Papel comercial
SEM SPLAT®					
F	100	48 ± 7,52 abA	48 ± 10,52 bA	57 ± 13,63 abA	56 ± 7,74 aA
75% F + 25% TD	100	57 ± 6,95 aAB	63 ± 10,52 aAB	65 ± 11,18 aA	51 ± 12,14 aB
50% F + 50% TD	100	57 ± 12,68 aA	42 ± 5,62 bB	49 ± 9,44 bAB	37 ± 6,64 bB
25% F + 75% TD	100	37 ± 9,91 bA	21 ± 2,41 cB	48 ± 1,58 bA	46 ± 10,68 abA
TD	100	0,0 ± 0,00 cA	0,0 ± 0,00 dA	0,0 ± 0,00 cA	0,0 ± 0,00 cA
Testemunha	100	0,0 ± 0,00 cA	0,0 ± 0,00 dA	0,0 ± 0,00 cA	0,0 ± 0,00 cA
Tratamento ¹	Dispositivos de autoinoculação				
	N	Cilíndrico	Quadrado	Retângular	Papel comercial
COM SPLAT®					
F	100	33 ± 5,98 bC	73 ± 12,84 aA*	67 ± 12,00 aAB	57 ± 4,83 aB
75% F + 25% TD	100	49 ± 3,76 aB	59 ± 2,41 bAB	63 ± 4,83 abA	55 ± 7,07 aAB
50% F + 50% TD	100	45 ± 9,35 abA	54 ± 5,55 bA	53 ± 9,91 bA	59 ± 8,99 aA*
25% F + 75% TD	100	38 ± 9,48 abC	50 ± 4,08 bB*	60 ± 9,35 abAB	64 ± 14,03 aA
TD	100	0,0 ± 0,00 cA	0,0 ± 0,00 cA	0,0 ± 0,00 cA	0,0 ± 0,00 bA
Testemunha	100	0,0 ± 0,00 cA	0,0 ± 0,00 cA	0,0 ± 0,00 cA	0,0 ± 0,00 bA

¹F – Fungo, TD – terra diatomácea. Médias (±EP) seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si através do teste ANOVA fatorial, tendo como fator principal os tratamentos e, como fator secundário, os dispositivos de autoinoculação (p<0,05). *Análise de comparação dos dados com e sem SPLAT® através do teste t de Student.

Com excessão do resultado do tratamento F puro na ausência de SPLAT® e 50% F + 50% TD na presença do adesivo, os demais resultados apresentaram variabilidade no desempenho das formulações nos dispositivos (Tabela 12). Os

tratamentos F e 25% F + 75% TD do dispositivo quadrado e 50% F + 50% TD do dispositivo de papel comercial apresentaram os maiores valores de mortalidade confirmada na presença de SPLAT®.

Considerando como parâmetro os valores obtidos na mortalidade total, e a quantidade de fungo e de terra de diatomáceas utilizadas nas preparações, na continuidade da pesquisa, optou-se pela preparação 50% F + 50% TD. Além disso, o papel micro-ondulado mostrou-se adequado para suporte da preparação, sendo igualmente escolhido.

Finalmente, apesar da pouca ou nenhuma diferença significativa nos testes sem e com a presença da cera SPLAT®, visivelmente foi possível constatar maior aderência dos preparados na superfície dos dispositivos testados. Assim, para efeito de continuidade do estudo, incluíram-se tratamentos com e sem a cera.

4.3.4 Bioensaios de Transmissão

Ambas as estratégias utilizadas permitiram a transmissão horizontal, não havendo diferença estatística, seja para fonte de inóculo os cadáveres ou insetos vivos e infectados pelo fungo (Tabela 13).

Tabela 13. Mortalidade de adultos de *G. spegazziniana* após a introdução da fonte de inóculo nas gaiolas para teste de transmissão em condições de laboratório.

Inóculo (insetos)	Mortalidade total (%)			
	N	vivos contaminados	N	cadáveres
1	100	68,0 ± 11,12 aA	20	54 ± 09,87 aA
3	100	70,8 ± 08,02 aA	20	71 ± 08,99 aA
5	100	74,4 ± 08,73 aA	20	74 ± 11,43 aA
10	100	87,6 ± 04,09 aA	20	72 ± 08,31 aA
Testemunha	100	13,0 ± 04,08 bA	20	13 ± 04,08 bA
inóculo	Mortalidade confirmada (%)			
	N	vivos contaminados	N	cadáveres
1	100	57,8 ± 12,99 aA	20	44 ± 06,89 aA
3	100	54,4 ± 14,70 aA	20	52 ± 08,06 aA
5	100	64,0 ± 08,45 aA	20	55 ± 09,78 aA
10	100	59,0 ± 05,59 aA	20	54 ± 08,01 aA
Testemunha	100	0,0 ± 00,00 bA	20	0,0 ± 00,00 bA

N = quantidade de insetos sadios. Médias (\pm EPM) seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si através do teste ANOVA fatorial, tendo como fator principal o inóculo e, como fator secundário, a fonte de inóculo ($p < 0,05$).

4.3.5 Atividade do fungo ao longo do tempo

A germinação do fungo foi significativamente reduzida com o aumento no tempo de armazenamento, independente da presença ou não da cera SPLAT[®]. No geral, após 21 dias de armazenamento, a viabilidade reduziu-se em média 47,9%, sendo inicialmente entre 96,4 e 98,9% e ao final entre 37,9 e 57,8% (Tabela 14).

A redução passou a ser significativa em todos os tratamentos a partir da avaliação de quatro dias de armazenamento e seguiu em queda a cada avaliação semanal ao longo dos 21 dias de armazenamento, exceto para F puro + SPLAT[®] que se manteve até 14 dias com mais de 80% de viabilidade. Especificamente, o tratamento F puro + SPLAT[®] apresentou a menor taxa de redução da viabilidade dos conídios (37,9%), seguido do tratamento 50% F + 50% (44,6). Os demais, ultrapassaram 50% de redução de viabilidade (51,5 e 57,8%) (Tabela 14).

O mesmo comportamento de redução ao longo do tempo também foi observado para a atividade inseticida. Considerando-se a mortalidade total, principalmente o tratamento F puro foi afetado, pois na avaliação de quatro dias apresentou redução de 17% após dois dias (Tabela 15). Foi observada interação significativa entre os dispositivos e o tempo de armazenamento na mortalidade total de adultos, sendo verificada a diferença nos resultados a partir de quatro dias de armazenamento no tratamento F puro, aos sete dias para 50% F + 50% TD e já no segundo dia para 50% F + 50% TD + SPLAT[®]. O único tratamento que não apresentou redução na atividade antes de 21 dias foi F puro + SPLAT[®] (Tabela 15).

Quanto à mortalidade confirmada, os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si nas avaliações realizadas ao longo do tempo e a redução total da porcentagem de mortalidade confirmada variou de 22 a 35% (Tabela 15). O tratamento F puro apresentou diferença aos sete dias, o tratamento 50% F + 50% TD a partir dos 14 dias e as duas formulações na presença de SPLAT[®] somente aos 21 dias.

Além disso, a atividade fúngica dos dispositivos tratados não foi influenciada pela presença de SPLAT[®], tanto para a mortalidade total, quanto para a mortalidade confirmada, resultado semelhante ao encontrado em testes de atração-e-infecção neste mesmo trabalho. No tratamento controle, a mortalidade foi inferior a 10% e por apresentar muitos zeros, os resultados não foram incluídos nas tabelas.

Tabela 14. Viabilidade (%) de conídios de *Beauveria bassiana* isolado Unioeste 44 em dispositivos de autoinoculação de papel micro-ondulado em diferentes preparações, armazenadas a 26 °C em laboratório.

Tratamentos ¹	Dias de armazenamento						Redução Total
	Prévia	2 dias	4 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
F puro	98,3 ± 0,42 aA	96,4 ± 0,36 aA	87,6 ± 1,31 aB	80,1 ± 2,01 aC	79,2 ± 3,42 aC	46,8 ± 0,64 bD	51,5 ± 0,51 ab
F puro + SPLAT®	96,4 ± 2,84 aA	96,1 ± 0,58 aA	87,0 ± 2,77 aB	83,1 ± 4,43 aB	83,0 ± 1,42 aB	58,5 ± 3,42 aC	37,9 ± 3,30 b
50% F + 50% TD	98,9 ± 0,27 aA	94,6 ± 0,58 aA	89,7 ± 2,86 aB	74,4 ± 2,60 bC	74,7 ± 1,19 bC	54,3 ± 1,15 aD	44,6 ± 1,16 b
50% F + 50% TD + SPLAT®	98,3 ± 0,27 aA	96,5 ± 1,03 aA	85,9 ± 2,82 aB	76,4 ± 3,32 bC	76,2 ± 2,08 bC	40,5 ± 2,54 bD	57,8 ± 3,25 a

¹F – Fungo, TD – terra de diatomáceas. Médias (±EPM) seguidas de mesma letra entre o tempo de armazenamento (minúscula na coluna) ou os tratamentos (maiúscula na linha) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 15. Porcentagem de mortalidade total e confirmada de *Gyropsylla spegazziniana* ocasionada pelo fungo *Beauveria bassiana* isolado Unioeste 44 em dispositivos de autoinoculação de papel micro-ondulado com e sem SPLAT® armazenados a 26 °C em laboratório.

		Dias de armazenamento							
		Prévia	2 dias	4 dias	7 dias	14 dias	21 dias	Redução Total	
Tratamentos ¹	N	Mortalidade Total							
F puro	100	85 ± 3,53 aA	86 ± 7,47 aA	68 ± 8,31 aB	65 ± 4,08 aB	63 ± 5,98 aB	51 ± 8,26 aB	34 ± 8,56 a	
F puro + SPLAT®	100	78 ± 5,62 aA	72 ± 5,98 aA	66 ± 2,41 aA	75 ± 6,45 aA	70 ± 5,40 aA	57 ± 4,83 aB	21 ± 8,75 a	
50% F + 50% TD	100	79 ± 9,66 aA	89 ± 5,16 aA	77 ± 5,24 aA	64 ± 5,55 aB	64 ± 7,74 aB	54 ± 8,99 aB	25 ± 11,36 a	
50% F + 50% TD + SPLAT®	100	90 ± 4,56 aA	76 ± 7,74 aB	72 ± 2,58 aB	77 ± 4,37 aB	70 ± 2,04 aB	64 ± 10,48 aB	26 ± 10,12 a	
Tratamentos ¹	N	Mortalidade Confirmada							
F puro	100	64 ± 7,74 aA	61 ± 6,89 aA	62 ± 9,48 aA	47 ± 11,65 aB	47 ± 3,29 aB	29 ± 8,01 aC	35 ± 12,24 a	
F puro + SPLAT®	100	54 ± 4,74 aA	51 ± 7,18 aA	54 ± 4,74 aA	53 ± 7,52 aA	48 ± 8,31 aA	32 ± 7,52 aB	22 ± 8,56 a	
50% F + 50% TD	100	47 ± 6,64 aA	54 ± 4,28 aA	63 ± 3,87 aA	44 ± 4,74 aA	37 ± 12,34 aB	20 ± 8,41 aC	27 ± 10,28 a	
50% F + 50% TD + SPLAT®	100	49 ± 9,21 aA	63 ± 6,32 aA	56 ± 4,28 aA	57 ± 6,64 aA	44 ± 6,89 aA	27 ± 4,37 aB	22 ± 11,47 a	

¹F – Fungo, TD – terra de diatomáceas. Médias (±EPM) de cada tipo de mortalidade seguidas de mesma letra entre o tempo de armazenamento (minúscula na coluna) ou os tratamentos (maiúscula na linha) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.3.6 Bioensaios de atração-e-infecção em gaiolas teladas

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com os dispositivos de autoinoculação contendo ou não a cera emulsionada SPLAT® utilizando a formulação 50% F + 50% TD, em todas as avaliações. As maiores taxas de mortalidade total foram obtidas na terceira avaliação, chegando a 52,6 e 57,9% (Tabela 16).

O mesmo foi observado para a mortalidade confirmada, entre 28,3 e 38,2% dos adultos mortos recuperados confirmaram a morte pelo fungo *B. bassiana* na terceira semana de avaliação. Além disso, a infecção causada pelo fungo persistiu ao longo das duas semanas seguintes quando os adultos recuperados foram alojados em gaiolas menores (Tabela 16).

Tabela 16. Mortalidade total e confirmada de *Gyropsylla spegazziniana* ocasionada por *Beauveria bassiana* isolado Unioeste 44 em dispositivos de auto inoculação de papel micro-ondulado com e sem SPLAT® em gaiola telada.

Tratamentos	N	Mortalidade Total					
		7 dias		14 dias		21 dias	
50% F + 50% TD	77,6	53,8 ± 6,84 aA	37,7	30,2 ± 10,32 aB	24,8	52,6 ± 13,51 aA	88,7 ± 7,50 a
50% F + 50% TD + SPLAT®	72,3	42,6 ± 7,85 aAB	40,6	36,7 ± 7,99 aB	10,9	57,9 ± 10,62 aA	88,5 ± 5,69 a
Testemunha	48,3	18,5 ± 2,93 bA	39,6	12,6 ± 2,41 bA	35,2	16,3 ± 2,32 bA	37,8 ± 8,28 b
Tratamentos	Mortalidade Confirmada						
50% F + 50% TD	77,6	19,7 ± 3,41 aA	37,7	18,7 ± 5,99 aA	24,8	28,3 ± 5,15 aA	37,7 ± 3,65 a
50% F + 50% TD + SPLAT®	72,3	10,6 ± 2,36 aB	40,6	28,3 ± 8,96 aA	10,9	38,2 ± 11,24 aA	39,0 ± 7,13 a
Testemunha	48,3	0,0 ± 0,00 bA	39,6	0,0 ± 0,00 bA	35,2	0,0 ± 0,00 bA	0,0 ± 0,00 b

N = soma de vivos recuperados e mortos; F = Fungo, TD = terra de diatomáceas. Médias (\pm EP) em cada tipo de mortalidade seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si através do teste ANOVA fatorial para medidas repetidas, tendo como fator principal os tratamentos e, como fator secundário, o tempo ($p < 0,05$).

Em relação à mortalidade total, ambos os tratamentos apresentaram uma tendência a diminuir a taxa de mortalidade na segunda semana de avaliação e a aumentar aos 21 dias. Quanto à mortalidade confirmada, apesar da semelhança entre os resultados, houve uma tendência numérica a aumentar a porcentagem a cada avaliação. Ao final das três avaliações, constatou-se mortalidade total de 88,5% e 88,7% e mortalidade confirmada média de 39,0% e 37,7% para os dispositivos com e sem SPLAT[®], respectivamente.

4.4 Discussão

A infecção fúngica causada por *B. bassiana* nos indivíduos adultos de *G. spegazziniana* foi significativa e a exposição de adultos a uma superfície contaminada ou colônia demonstrou o potencial do fungo nesta forma de utilização, causando elevado percentual de mortalidade com apenas 30 minutos de contato dos insetos com a fonte de inóculo. Desta forma, evidencia-se a elevada suscetibilidade do inseto e o potencial de uso do fungo *B. bassiana* por meio de contato de superfície tratada.

Para Alves (1998), a suscetibilidade e/ou resistência natural do próprio inseto hospedeiro é um importante fator a ser considerado na patogenicidade de um isolado. Além disso, a contaminação por contato com superfície contaminada foi relatada por Moran et al. (2011), com adultos de *D. citri* (Kuwayama, 1908) (Hemiptera: Liviidae), quando expostos a cartões amarelos com a superfície revestida com blastósporos do fungo *I. fumosorosea*.

A atratividade da cor amarela aqui observada para a ampola, com mais de 90% de captura de adultos corrobora estudos anteriores com o mesmo inseto em condições de campo, em que armadilhas de cor amarela escura foram as mais eficientes e sugeridas para estudos de monitoramento e flutuação (PRAT KRICUN, 1986; CHIARADIA E MILANEZ, 1997).

Em relação ao efeito da cola na confirmação de morte pelo fungo, os elevados valores observados no bioensaio com armadilhas Colortrap[®] indica a possibilidade destas armadilhas serem utilizadas em estudos conduzidos em condições de campo, visando a avaliar a eficiência dos dispositivos de autoinoculação.

O desempenho semelhante na eficiência dos dispositivos de autoinoculação avaliados nos testes de atração-e-infecção sugere que qualquer modelo pode ser utilizado para a continuidade dos testes, sendo que a pouca variabilidade pode estar

relacionada à interação dos insetos com os dispositivos em função do efeito atrativo da cor amarela e à suscetibilidade do inseto ao patógeno. Mota et al. (2017) em um estudo semelhante, verificaram que apenas cinco minutos de contato entre adultos de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1876) (Coleoptera: Curculionidae) e o fungo *B. bassiana* ancorados em um dispositivo de autoinoculação foi o suficiente para que os conídios aderissem a cutícula do inseto.

O uso de dispositivos de autoinoculação apresenta vantagens quando comparados ao tratamento convencional aplicado via pulverização, principalmente relacionadas à redução de efeitos indesejáveis do fungo sobre demais seres vivos, permanência do patógeno no ambiente e menor custo para a implantação da técnica (DOWD e VEGA, 2003; BAVERSTOCK et al., 2010; LOPES et al., 2014). Assim, os resultados obtidos indicaram que os diferentes dispositivos testados apresentaram potencial de atrai-e-infectar a população de *G. spegazziniana* liberada nas gaiolas, independente da formulação utilizada.

Os resultados obtidos com as diferentes formulações avaliadas demonstraram que a mortalidade dos insetos não foi afetada à medida que a quantidade de fungo foi reduzida e a proporção de terra de diatomáceas aumentou. Além disso, o teste utilizando apenas terra de diatomáceas como controle demonstrou que o pó inerte apresentou ação inseticida, atingindo até 65% de mortalidade, contribuindo para o controle do inseto.

A atividade inseticida de terra de diatomáceas já havia sido relatada para outros insetos (ALVES et al., 2006; ROSSATO et al., 2012), assim como sua associação com o fungo *B. bassiana* apresentando resultados positivos, visto que a terra de diatomáceas é inócua a *B. bassiana* (LORD, 2001; AKBAR et al., 2004; OLIVEIRA e ALVES, 2007; SANTORO et al., 2010) e ainda pode auxiliar a atividade do fungo, pois sendo um pó abrasivo, provoca danos a cutícula do inseto, à qual é uma barreira natural para o fungo (EBELING, 1971; GOLOB, 1997; KORUNIC, 1998; LORINI, 1999).

A presença da cera emulsionável SPLAT® aumentou a aderência das formulações sobre a superfície dos dispositivos de autoinoculação compostos tanto por papel micro-ondulado quanto por papel comercial Colortrap®, corroborando os resultados obtidos por Patt et al. (2015). Contudo, isso não refletiu em acréscimo na mortalidade da praga aqui avaliada. Mesmo assim, como não houve interferência na germinação dos conídios nos testes com a cera e na perspectiva de avaliar o

dispositivo em condições de campo, o uso da cera é conveniente em função das condições ambientais.

Isto porque, exposição à luz solar direta, chuva, temperatura ou baixa umidade relativa podem comprometer a eficácia de micoinsecticidas (JARONSKI, 2010). Ainda, considerando o efeito do vento e da chuva na remoção física do inóculo aderido nos dispositivos, o uso da cera pode preservar a ancoragem dos conídios por um período maior (PATT et al., 2015).

Em relação à transmissão horizontal não houve relação entre o aumento da quantidade de inóculo no ambiente e a mortalidade dos insetos. Isto contrasta com estudo de Conceschi et al. (2016) que observaram esta relação para *D. citri* e o aumento do número de cadáveres na proporção com insetos sadios e a infecção com os fungos *I. fumosorosea* e *B. bassiana*.

Da mesma forma, houve relação em estudos prévios entre a densidade de cadáveres e infecção de indivíduos não inoculados para *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) em bioensaios de laboratório com *B. bassiana* (LONG et al. 2001; KLINGER et al. 2006). Também, Lopes et al. (2011) ao estudar a transmissão horizontal do fungo *B. bassiana* em condições de laboratório para *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera, Curculionidae) constataram correlação positiva entre o aumento de indivíduos inoculados e a mortalidade de insetos saudáveis.

A transmissão horizontal do fungo pode ter ocorrido em função das interações comportamentais como acasalamento, contato com um substrato alimentar compartilhado ou a esporulação dos insetos mortos pelo fungo (UGINE et al., 2005; AVERY et al., 2009, 2010; BAVERSTOCK et al., 2010). A transmissão horizontal também foi demonstrada por Moran et al. (2011) em bioensaios com adultos de *D. citri* obtendo um nível de transmissão horizontal direta de 25% da população de vivos infectados a partir de cartões contaminados com o fungo *I. fumosorosea* para adultos não infectados.

Em um estudo semelhante, Patt et al. (2015) estudaram a transmissão de *I. fumosorosea* entre adultos de *D. citri* infectados e cadáveres esporulados para aglomerados de ninfas, chegando a obter níveis de infecção de até 92,8%. Além disso, também verificaram que a corrente do ar transportou os propágulos infectivos do fungo contido nos dispositivos e em cadáveres para indivíduos não infectados.

Stauderman (2012) sugeriu que conídios transportados em ar relativamente úmido podem ser um meio altamente eficaz para infectar psilídeos, justificando assim, o controle de até 95% da população obtido nos experimentos de atração-e-infecção, quando a umidade média do ambiente era de 60% aliado ao fluxo do ar condicionado. Da mesma forma, foi observada a transmissão horizontal de *B. bassiana* entre adultos de *D. citri* em laboratório e semi-campo, com mortalidade acima de 80,4% e 56,7%.

Segundo Hesketh et al. (2010), a esporulação é uma característica importante, pois os conídios servem como uma fonte de inóculo do patógeno para a transmissão horizontal, disseminação no ambiente e desenvolvimento do ciclo de infecção. Além disso, a transmissão horizontal do fungo *B. bassiana* ter sido semelhante entre cadáveres e vivos contaminados pode estar relacionado a diferentes fatores, como a virulência do fungo, potencial de disseminação e suscetibilidade do hospedeiro (CONCESCHI et al., 2016).

Sob a perspectiva de uma estratégia atrai-e-infecta, a transmissão horizontal é um fator decisivo e complementar para a evolução da doença na população de insetos praga, visto que os indivíduos adquirem os conídios no dispositivo e ainda vivos, podem transmitir a doença para a população (LOPES et al., 2011). Assim, os resultados obtidos com os testes de transmissão demonstram que os conídios liberados pelos cadáveres, assim como os indivíduos contaminados são altamente contagiosos para adultos não infectados e podem potencialmente vir a causar altos níveis de infecção em populações de *G. spegazziniana*.

Em relação à atividade do fungo ao longo do tempo, a presença da cera SPLAT® não apresentou proteção aos conídios do efeito do tempo de armazenamento, havendo significativa redução da viabilidade para ambos os tratamentos testados ao final de 21 dias. Além disso, a viabilidade dos conídios pode ter sido afetada pela umidade relativa do ambiente (SANDHU et al., 1993; HONG et al., 1997; FARIA et al., 2010). Ressalta-se que a umidade ideal deve permanecer abaixo de 30% para que a longevidade do fungo tenda a ser maior (HONG et al., 1997), diferente do utilizado para armazenamento dos dispositivos de autoinoculação neste estudo ($60 \pm 2 \%$).

Para Lopes e Faria (2019), em baixa umidade é provável que as células fúngicas atinjam um estado metabólico muito baixo e permaneçam viáveis por longos períodos de tempo, conforme estudo realizado com *B. bassiana*. Além disso, Hong et al. (2000) sugerem que o tempo para a secagem dos conídios seja inversamente

proporcional à sua longevidade. Assim, conídios secos mais lentamente tem longevidade superior aqueles que secam mais rápido.

Ainda assim, pode-se inferir a partir do observado neste estudo que nas condições verificadas um dispositivo pode ser mantido no campo por até 21 dias, devendo então ser substituído a fim de não afetar a eficiência da estratégia de controle. Além disso, a eficácia dos biopesticidas à base de fungos pode ser consideravelmente melhorada com formulações, principalmente aquelas contendo óleos, desde que os fatores que exercem influência sobre a estabilidade dos conídios (temperatura, umidade e tempo de armazenamento) sejam levados em consideração (BURGES, 1998; GLARE et al., 2012; JACKSON et al., 2010; LACEY et al., 2001; LACEY et al., 2015).

A mortalidade total de *G. spegazziniana* nos telados foi semelhante aos bioensaios em gaiolas individualizadas, porém a mortalidade confirmada foi menor (no geral, 57,75% para gaiolas pequenas e 35,4% para gaiolas grandes). Esta diferença pode estar relacionada ao tamanho das unidades experimentais que pode interferir no contato dos insetos com a fonte de inóculo e transmissão horizontal da doença.

Nesse sentido, Baverstock et al. (2010) verificaram uma relação positiva entre o movimento dos insetos e a transmissão horizontal de fungos entomopatogênicos. Também, Avery et al. (2010) explicam que ao diminuir a distância dos hospedeiros suscetíveis em relação aos cadáveres, o tempo de contato do hospedeiro com a fonte de inóculo é potencialmente encurtado, aumentando a eficiência da transmissão da doença.

Conseqüentemente, as gaiolas menores podem ter favorecido à atração e contato dos insetos com o dispositivo de autoinoculação, assim como o contato direto de insetos sadios com aqueles vivos e contaminados, influenciando a transmissão e disseminação dos conídios. No experimento nos telados é provável que a relação entre espaço, infecção e disseminação de conídios tenha influenciado a mortalidade dos insetos. Apesar disso, os resultados aqui obtidos apresentaram níveis consideráveis de mortalidade total e são promissores para dar continuidade a este estudo em condições de campo.

Nos bioensaios desenvolvidos neste estudo, os insetos foram encontrados mortos principalmente na região do caule e na parte abaxial das folhas das mudas de erva-mate, locais em que naturalmente os insetos sadios são encontrados e se concentram para alimentação, acasalamento e oviposição favorecendo assim o

contato e a transmissão do patógeno. Em condições de campo, a conidiogênese em indivíduos mortos pelo fungo poderia favorecer o desenvolvimento de uma infecção secundária e eventualmente sob condições de alta umidade um efeito epizoótico (AVERY et al., 2009).

Este estudo abordou uma proposta com potencial para controle de populações de *G. spegazziniana* a partir da estratégia atrai-e-infecta, utilizando uma linhagem do fungo *B. bassiana* disposta em dispositivos simples de autoinoculação. Os resultados obtidos indicaram que os diferentes dispositivos utilizados como suporte para o inóculo foram eficientes para atrair-e-infectar adultos de *G. spegazziniana*, provocando a morte pelo fungo e disseminando a doença entre os indivíduos. Este foi o primeiro relato do uso de dispositivo de autoinoculação do fungo *B. bassiana* para o controle de populações da ampola-da-erva-mate.

4.5 Considerações finais

A estratégia de autoinoculação para o caso da ampola-da-erva-mate poderá também ser complementada pela adição de um atrativo. Nesse sentido, Walerius (2017) forneceu evidências comportamentais para um feromônio sexual volátil, produzido por fêmeas de *G. spegazziniana*, podendo futuramente ser adicionado aos dispositivos de autoinoculação para aumentar a atração dos insetos e conseqüentemente a disseminação da doença através da transmissão horizontal.

Baseado nos resultados das primeiras tentativas de uso de autoinoculação obtidos neste estudo considera-se que o dispositivo retangular pode vir a se tornar uma medida viável no manejo de *G. spegazziniana* com baixo impacto sobre o ambiente. Para isso, mais testes são necessários para otimizar o dispositivo de autoinoculação, avaliar seu desempenho em condições de campo e propor uma estratégia de baixo custo e de fácil manuseio para obter ampla adoção.

Por fim, a metodologia utilizada neste estudo para o desenvolvimento de um dispositivo de autoinoculação também pode ser utilizado como modelo para estudo com outras pragas da mesma família.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L.F.A.; BUSARELLO, G.D.; OLIVEIRA, D.G.P.; ALVES, S.B. Ação da terra de diatomácea contra adultos do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 115-118, mar. 2006.
- ALVES, S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- AKBAR, W.; LORD, J.C.; NECHOLS, J.R.; HOWARD, R.W. Diatomaceous earth increases the Efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* Larvae and increases conidia attachment. **Journal of Economic Entomology**, v.97, n. 2, p. 273-280, Apr. 2004.
- AVERY, P.B.; QUEELEY, G.; FAULL, J.; SIMMONDS, M.S.J. Effect of photoperiod and host distribution on the horizontal transmission of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) in greenhouse whitefly assessed using a novel leaf model bioassay. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 10, p. 1097-1111, Nov. 2010.
- AVERY P.B. et al. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae). **Florida Entomol**, v. 92, n., p. 608-618, Dec. 2009.
- BAVERSTOCK, J.; ROY, H.E.; PELL, J.K. Entomopathogenic fungi and insect behaviour: From unsuspecting hosts to targeted vectors. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 89-102, Feb. 2010.
- BURGES, H.D. **Formulation of microbial biopesticides**. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers. 412p, 1998.
- CHIARADIA, L. A.; MILANEZ, J. M. Atratividade de armadilhas coloridas a *Gyropsylla spegazziniana* (Lizzer, 1917) (Homoptera, Psyllidae). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 3, n. 2, p. 183-185, nov. 1997.
- CHIARADIA, L. A.; MILANEZ, J. M.; ZIDKO, A. Estimativa das gerações anuais de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer, 1917) em função de sua exigência térmica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 3, p. 385-391, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n3/a04v32n3.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2018.
- CHOW, A. et al. Field Efficacy of Autodissemination and Foliar Sprays of an Entomopathogenic Fungus, *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae), for Control of Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), on Residential Citrus. **Biological and Microbial Control**, v. 20, n. 10, p. 1-12, Oct. 2018.
- CONCESCHI, R.M. et al. Transmission potential of the entomopathogenic fungi *Isaria fumosorosea* and *Beauveria bassiana* from sporulated cadavers of *Diaphorina citri* and *Toxoptera citricida* to uninfected *D. citri* adults. **BioControl**, v. 61, n. 5, p. 567-577, Mar. 2016.
- DOWD, P. F.; VEGA, F. E. Autodissemination of *Beauveria bassiana* by sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae) to Overwintering Sites. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, n. 1, p. 65-75, 2003.

EBELING, W. Sorptive dusts for pest control. **Annual Review of Entomology**, v. 16, p. 123-158, Jan. 1971.

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

FORMENTINI, M. A. et al. Characterization and activity of entomopathogenic fungi isolates against “Paraguay tea ampul” (*Gyropsylla spegazziniana*) (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 6, p. 3553-3566, Nov./Dec. 2015.

GETAHUN, M.N. et al. *Metarhizium sp.* Isolated from dead *Pachnoda interrupta* (Coleoptera: Scarabaeidae) as a potential entomopathogenic fungus for the pest insect: proof-of-concept for autodissemination. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 36, n. 1, p. 1-9, Mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1742758415000235>.

GLARE, T.R. et al. Have biopesticides come of age? **Trends Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 250–258, May 2012.

GOLOB, P. Current status and future perspectives for inert dusts for control of stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 33, n. 1, p. 69 -79, Jan. 1997.

HESKETH, H.; ROY, H.E.; EILENBERG, J.; PELL, J.K.; HAILS, R.S. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 55–73, Feb. 2010.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H.; MOORE, D. Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. **Annals of Botany**.v. 79, p. 121-128, 1997.

HONG, T.D.; JENKINS, N.E.; ELLIS, R.H. The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Mycological Research**, v. 105, n. 6, p. 662-665, 2000.

IEDE, E. T.; MACHADO, D. C. **Pragas da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e seu controle**. Colombo: EMBRAPA/ CNPF (Boletim de Pesquisa Florestal 18/19), 1989, p. 51-60.

JACKSON, M.A.; DUNLAP, C.A.; JARONSKI, S.T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **Biocontrol**, v. 55, n. 1, p. 129–145, 2010.

JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 159–185, Feb. 2010.

KLINGER, E.; GRODEN, E.; DRUMMOND, F. A. *Beauveria bassiana* horizontal infection between cadavers and adults of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Environmental Entomology**, v. 35, n. 4, p. 992-1000, Aug. 2006.

KORUNIC, Z. Diatomaceous earth: a group of natural insecticides. **Journal of Stored Product Research**, v. 34, n. 2, p. 87-97, 1998.

LACEY, L.A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? **Biological Control**, v. 21, n. 3, p. 230-248, July 2001.

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

LEITE, M.S.P. **Biologia e determinação do dano de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles, 1919) (Hemiptera, Psyllidae) na cultura da erva mate (*Ilex paraguaiensis*, St. Hilare)**. Curitiba, PR, 2002. 84p. Tese (Doutorado em Entomologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

LEITE, M.S.P. et al. Flutuação populacional de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera, Psyllidae) e de seus inimigos naturais em erva-mate no município de São Mateus do Sul, PR, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, n. 4, p. 520-523, dez. 2007.

LEITE, M.S.P.; ZANOL, K.M.R. Biologia e morfologia de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera, Psyllidae). **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 19-34, jan. – dez. 2001.

LOEBLEIN, J.S. et al. Resposta de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) a armadilhas de diferentes cores. XXVII Congresso Brasileiro e X Congresso Latino-Americano de Entomologia, 2018. Gramado, RS. Congresso...Gramado: Sociedade Entomológica do Brasil, 2018.

LONG, D.W.; GRODEN, E.; DRUMMOND, F.A. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 2, n. 1, p. 11-17, Dec. 2001.

LOPES, R.B. et al. Combination of the fungus *Beauveria bassiana* and pheromone in an attract-and-kill strategy against the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 151, n. 1, p. 75-85, 2014.

LOPES, R.B. et al. Virulence and horizontal transmission of selected Brazilian strains of *Beauveria bassiana* against *Cosmopolites sordidus* under laboratory conditions. **Bulletin of insectology**, v. 64, n. 2, p. 201-208, 2011.

LOPES, R.B.; FARIA, M. Influence of two formulation types and moisture levels on the storage stability and insecticidal activity of *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 5, p. 1-14, Jan. 2019.

LORD, J. C. Desiccant dusts synergize the effect of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on stored-grain beetles. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, n. 2, p. 367-372, Apr. 2001.

LORINI, I. **Pragas de grãos de cereais armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 60 p.

LYONS, D.B. et al. Towards the Development of an Autoinoculation Trap System to Manage Populations of Emerald Ash Borer (Coleoptera: Buprestidae) with the Native Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 6, p. 1929-1939, Dec. 2012.

MORAN, P.J. et al. Localized autoinoculation and dissemination of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid in south Texas. **Subtropical Plant Science**, v. 63, p. 23–35, Jan. 2011.

MOTA, L.H.C. **Estratégias de utilização de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) para o manejo de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)**. 2017. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de

Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017. doi:10.11606/T.11.2017.tde-17082017-151031.

OLIVEIRA, D.G.P.; ALVES, L.F.A. Interação do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com terra diatomácea para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), o cascudinho dos aviários. **BioAssay**, v. 2, p.6, July 2009. DOI: 10.14295/BA.v2.0.48 Acesso em: 24 abr. 2009.

PATT, J. M. et al. Efficacy of na autodisseminator of na entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea*, to suppress Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, under greenhouse conditions. **Biological Control**, v. 88, p. 37-45, Sept. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.014>.

PENTEADO, S. R. C.; IEDE, E. T.; LEITE, M. S. P. Pragas da erva mate: perspectivas de controle. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2º; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA MATE, 3ª, 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: EMBRAPA, 2000. p. 27-38.

PENTEADO, S. R. C. Principais pragas da erva-mate e medidas alternativas para seu controle. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (Ed). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone sul**. Porto Alegre: Editora Universidade/UFRGS, 1995. p.109-120.

PRAT KRICUN, S.D. Informe sobre investigaciones realizadas no período de 1984-1985. Misiones: INTA. E. E. A. Cerro Azul, 32 p. (Miscelanea, 15), 1986.

REHNER, S.A. et al. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, n. 5, p. 1055-1073, Sept-Oct 2011.

ROSSATO, C.; LORINI, I.; MOSCARDI, F.; FERRI, G.C. Tratamento inseticida a base de terra de diatomáceas no controle de pragas de soja armazenada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6, 2012, Cuiabá. Soja: Integração nacional e desenvolvimento sustentável: **resumo**. Brasília, DF: Embrapa, 2012, p. 225, res.394. Resumo em Anais de Congresso.

SANDHU, S. S.; RAJAK, R. C.; AGARWAL, G. P. Studies on prolonged storage of *Beauveria bassiana* conidia: effects of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against *Chickpea Borer*, *Helicoverpa armigera*. **Biocontrol Science and Technology**. v. 3, p. 47-53, 1993.

SANTORO, P.H. et al. Associação de pós inertes com fungo entomopatogênico para o controle do cascudinho ("*Alphitobius diaperinus*"). **Ciência rural**, v. 40, n. 6, p. 1354-1359, June 2010.

STATSOFT. **Statística**: data analysis software system, version 7.0 Tulsa-USA. 2014.

STAUDERMAN, K.; AVERY, P.; ARISTIZÁBAL, L.F.; ARTHURS, S. Evaluation of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). **Biocontrol Science Technology**, v. 22, n. 7, p. 747–761, July 2012.

UGINE, T.A.; WRAIGHT, S.P.; SANDERSON, J.P. Acquisition of lethal doses of *Beauveria bassiana* conidia by western flower thrips, *Frankiniella occidentalis*, exposed to foliar spray residues of formulated and unformulated conidia. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 90, n. 1, p. 10-23, Sep. 2005.

WALERIUS, A. H. **Comportamento de acasalamento e atratividade ao ferômonio sexual de *Gyropsylla spegazziniana* Lizer & Trelles (HEMIPTERA: PSYLLIDAE).** 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017.