

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

MARINA ANDRESSA FORMENTINI

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS VISANDO AO CONTROLE  
DA “AMPOLA DA ERVA-MATE” *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles)  
(Hemiptera: Psyllidae)

CASCADEL-PR

Dezembro/2012

MARINA ANDRESSA FORMENTINI

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS VISANDO AO CONTROLE  
DA “AMPOLA DA ERVA-MATE” *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles)  
(Hemiptera: Psyllidae)

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, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

CASCADEL-PR

Dezembro/2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

F725a Formentini, Marina Andressa  
Avaliação de fungos entomopatogênicos visando ao controle da  
"ampola da erva-mate" *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer &  
Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) / Marina Andressa Formentini.  
- Cascavel, 2012  
56 p.

Orientador: Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves

Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos  
Naturais) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus  
de Cascavel, 2012

1. Erva-mate - Pragas. 2. Fungos entomopatogênicos. 3.  
Pragas - Erva-mate - Controle biológico. I. Universidade  
Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 22.ed. 633.77  
633.7796  
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini-Leitzke CRB-9/539

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**MARINA ANDRESSA FORMENTINI**

“AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS VISANDO AO CONTROLE DA  
AMPOLA-DA-ERVA-MATE “*GYROPSILLA SPEGAZZINIANA*” (LIZER & TRELLES)  
(HEMIPTERA: PSYLLIDAE)”.

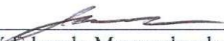
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais-Nível de Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, pela comissão Examinadora composta pelos membros:



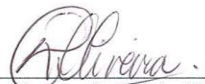
Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente/Orientador)



Prof. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Gisele da Silva Pinto  
Universidade estadual do Oeste do Paraná



Prof Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida  
Instituto Biológico de Campinas – SP



Prof Dr. Renato Cassol de Oliveira  
Faculdade Assis Gurgaz - Cascavel

Aprovada em 20 de Setembro de 2012.

Local da defesa: Unioeste, Prédio de Salas de Aula, sala 56, Cascavel-PR.

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."

(Augusto Cury)

## Dedicatória

*Aos meus avós maternos, Orlando e Terezinha da Silva,  
pelo verdadeiro amor e por sempre serem minha referência de família*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a força tão necessária para chegar ao fim.

Ao Prof. Dr. Luis Francisco A. Alves, por sempre acreditar na minha capacidade e por novamente ter me dado a chance de ser sua orientada. Pelos grandes ensinamentos ao longo de mais uma jornada, pela amizade e pelo exemplo profissional a ser seguido, sendo um verdadeiro orientador!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Estudos.

Ao Prof. Dr. José Eduardo M. de Almeida, do Instituto Biológico e à Dra. Maria Silvia Pereira Leite, da Embrapa Florestas, pela colaboração com o fornecimento de isolados fúngicos.

À Prof. Dra. Fabiana G. S. Pinto, pela ajuda e pelos grandes ensinamentos sempre concedidos. Por me apresentar à Genética Molecular e por confiar no meu trabalho, fornecendo o maior apoio.

Ao pessoal da Fazenda Vila Nova, em Ivaí - PR, que muitas vezes me forneceu mudas de erva-mate, além de sempre nos receberem tão bem.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais pelo conhecimento compartilhado, especialmente a Prof. Norma Catarina Bueno pela constante luta na consolidação do programa, e também às secretárias Antônia e Márcia.

À minha amiga argentina, Maria Elena, que foi fundamental para a realização desse trabalho, sempre buscando resolver os obstáculos que muitas vezes apareceram ao longo do estudo, e também pela valiosa amizade construída.

Aos meus pais, Paulo e Andréa, pela formação moral, educação e por sempre terem me incentivado a estudar e a lutar pela vida.

Às minhas irmãs, Laura, pelo carinho, preocupação e por ser minha companhia, e também, à Estela que, mesmo de longe, sempre torceu por mim. Vocês são irmãs preciosas!

Aos meus avôs, Orlando e Jandir, e minhas avós, Terezinha e Neiva, por fazerem tudo por mim e por minhas irmãs, por serem exemplos a serem seguidos e pela força fornecida quando parecia não haver mais solução.

Aos meus tios, André e Rudimar, e tias, Adriana e Ana Lúcia, pelo enorme carinho, pela amizade, pelas conversas, conselhos e principalmente pela ajuda oferecida nos momentos difíceis, e ao meu afilhado Téo que sinto tanta falta.

Aos amigos que conviveram comigo nesse período turbulento, onde tantas coisas aconteciam ao mesmo tempo, mas onde sempre pude contar com uma ajuda “extra”, em especial aos meus queridos amigos do Laboratório de Biotecnologia Agrícola, principalmente à Ana Paula, pela valiosa ajuda com os experimentos e também pela amizade conquistada nos últimos anos. Também, ao Daian, Janaína, André, Rafaela, Amanda, Silvana, Claudécir e aos amigos da Microbiologia, em especial à Laís, Mayara e Thomas que, ao longo do tempo, tornaram-se amigos muito queridos.

À Laís Weber, por me ensinar toda a prática da Genética Molecular sempre com muita disposição.

À Andréia K. Bonini, técnica do laboratório, pela ajuda incondicional com os experimentos, pela paciência, desabafos e apoio, sendo uma “mãezona” para mim.

A todas às sinceras amizades conquistadas na faculdade, em especial a Ana Paula, Andréia, Adriana, Emanuele, Jéssica, Elisângela, Marlu, Patrícia e Louise, assim como aos meus amigos do coração, Dhyego, Leonardo, Luiz Paulo, Jean, José Eduardo e Andrei, e também aos meus eternos amigos de colégio, Laís, Leti, Lari B., Lari S., Rodrigo e Pedro. Por tornarem minha vida mais fácil e mais feliz, por sempre estarem ao meu lado, mesmo na distância, pelo companheirismo, pelas infinitas risadas, conversas e confissões.

À Sidérea, a minha enorme gratidão pela valiosa força e incentivo, e por ser exemplo de pessoa de bem.

E à minha dog Clara, por alegrar os meus dias e por ser minha companhia durante as incontáveis madrugadas sentadas em frente ao computador.



Por fim, o meu muito obrigada a todos vocês e às pessoas que indiretamente também contribuíram com esse trabalho!

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS.....  | vi  |
| LISTA DE TABELAS .....   | vii |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 1   |
| 2. OBJETIVOS .....   | 3   |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 4   |
| 3.1 A erva-mate .....  | 4   |
| 3.2 A ampola da erva-mate ( <i>Gyropsylla spegazziniana</i> ) .....  | 7   |
| 3.2.1 Descrição, bioecologia e importância .....   | 7   |
| 3.2.2 Importância e danos .....  | 8   |
| 3.2.3 Controle .....   | 9   |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 15  |
| 5. CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS VISANDO AO CONTROLE DA “AMPOLA DA ERVA-MATE” <i>Gyropsylla spegazziniana</i> (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) ..... | 20  |
| Resumo .....   | 20  |
| Abstract .....   | 21  |
| Introdução .....   | 22  |
| Material e Métodos .....   | 23  |
| Resultados e discussão.....  | 28  |
| Conclusões .....   | 39  |
| Referências bibliográficas .....   | 40  |
| ANEXO.....   | 44  |

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

|   |   |
|---|---|
| <b>Figura 1.</b> <i>Gyropsylla spegazziniana</i> : A) adultos, B) ovos, C) ninfas, D) planta atacada<br>..... | 8 |
|---|---|

### Material e Métodos

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 2.</b> Gaiola de PVC usada para avaliação das mudas tratadas ..... | 25 |
|--|----|

### Resultados e discussão

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 3.</b> Mortalidade confirmada de <i>Gyropsylla spegazziniana</i> após inoculação de fungos entomopatogênicos ..... | 32 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 4.</b> Colônias de isolados de <i>Beauveria</i> spp., cultivadas em meio de esporulação, após 7 dias de incubação ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 h de fotofase) ..... | 34 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 5.</b> Dendograma das seqüências ITS dos 9 isolados de <i>Beauveria</i> spp., gerado pelo Mega versão 4.0, usando o algoritmo Neighbor-Joining, pela análise de 1000 bootstraps. A árvore foi analisada com outgroups de <i>B. brongniartii</i> , <i>B. bassiana</i> e <i>B. amorpha</i> ..... | 37 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 6.</b> Análise de agrupamento de 9 isolados de <i>Beauveria</i> spp. usando marcadores RAPD. O dendograma foi gerado pelo método UPGMA, índice de Jaccard a 3% de tolerância. Porcentagens de mortalidade total de <i>G. spegazziniana</i> e espécies de <i>Beauveria</i> spp. estão entre parênteses (ba: <i>B. bassiana</i> ; br: <i>B. brongniartii</i> )..... | 38 |
|---|----|

## LISTA DE TABELAS

### **Resultados e discussão**

**Tabela 1.** Isolados dos fungos entomopatogênicos utilizados no estudo e respectiva mortalidade média total ( $\pm$  EPM) e confirmada de *Gyropsylla spegazziniana*, após 10 dias de avaliação sob condições de laboratório ( $1 \times 10^9$  conídios/mL;  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 12h de fotofase e U.R.  $60 \pm 10\%$ ) .....29

**Tabela 2.** Médias ( $\pm$  EP) de diâmetro da colônia e da produção de conídios em colônias em meio M.E. e em arroz dos cinco isolados mais patogênicos de *Beauveria* spp., após 7 dias de incubação ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12 horas de fotofase) .....34

**Tabela 3.** Porcentagem de mortalidade total ( $\pm$  EP) de *Gyropsylla spegazziniana* por *Beauveria* spp. ( $1 \times 10^9$  conídios/mL) aos 3, 6 e 10 dias após a aplicação do fungo ( $1 \times 10^9$  conídios/mL;  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 12h de fotofase e U.R.  $60 \pm 10\%$ ).....35

## 1. INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma espécie nativa do sul do Brasil e caracteriza-se por ser uma importante fonte de renda em vários países da América do Sul, como no Paraguai, Argentina e Brasil. Tradicionalmente, compõe um dos sistemas agroflorestais, assumindo importância ambiental e socioeconômica, além de ter sido, por um longo período, um dos primeiros produtos das exportações brasileiras (Anuário Brasileiro da Erva-mate, 2000).

Nas últimas décadas, têm-se observado um crescimento e uma diversificação de produtos derivados de erva-mate, contudo, os avanços no desenvolvimento tecnológico não têm sido suficientes para essa cultura.

Originalmente, a erva-mate era explorada de florestas nativas, porém, na década de 70, com o avanço da fronteira agrícola, as áreas passaram a ser cultivadas como monocultura (Leite, 2002; Borges & Lazzari, 2008), cuja técnica proporcionou aumento da disponibilidade de matéria-prima, mas por outro lado, também propiciou maior oferta de alimento para insetos fitófagos (Díaz, 1997; Chiaradia, 2002).

Assim, muitos problemas de ordem fitossanitária surgiram nas lavouras de erva-mate, principalmente em relação ao aumento dos níveis populacionais de insetos que acabaram tornando-se pragas (Alves et al., 2000; Leite, 2002).

A ampola-da-erva-mate figura entre as principais pragas da cultura, visto que nos cultivos comerciais passou a ocorrer em populações elevadas e a provocar danos e perdas na produção (Chiaradia et al., 2000).

Considerando que o uso de inseticidas na cultura da erva-mate não é permitido, um dos desafios do seu cultivo é em relação aos insetos-pragas, sendo necessária a busca por alternativas econômica e ambientalmente viáveis para o controle da praga em questão, dentre as quais estão inseridos os fungos entomopatogênicos.

## **2. OBJETIVOS:**

- realizar a seleção de isolados de fungos entomopatogênicos virulentos e produtivos contra ampola da erva-mate;
- contribuir com alternativas sustentáveis de produção de erva-mate no Brasil e em outros países da América do Sul, do ponto econômico, social e ambiental;
- contribuir para a inovação tecnológica na produção da erva-mate.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A erva-mate

A erva-mate (*I. paraguariensis* St. Hil.) é uma espécie de origem sul-americana, sendo comum na vegetação nativa de uma extensa área que abrange Argentina, Paraguai e Brasil (região sul e uma pequena parte do estado do Mato Grosso do Sul, próximo à Ponta Porã) (Anuário Brasileiro da Erva-mate, 2000; Mazuchowski, 2000).

Na região sul do Brasil, a cultura constitui importante papel sócio-econômico, principalmente nas pequenas propriedades agrícolas, onde compõe um dos sistemas de exploração agroflorestais mais antigos e característicos da região (Bernardi et al., 2005; Renovatto & Agostini, 2008).

Por muitos anos, a erva-mate caracterizou-se como uma cultura extrativista, típica da região sul do Brasil (Anuário Brasileiro da Erva-mate, 2000; Mazuchowski, 2000), porém, na década de 1970, a expansão agrícola modificou a paisagem natural e levou à escassez de matéria-prima. Como alternativa, a erva-mate passou a ser cultivada



em consorciamento com pastagens e culturas anuais ou em monocultivos (Chiaradia et al., 2002).

A produção anual de erva-mate em todos os estados do Sul do Brasil (PR, SC e RS) é estimada em 200 mil ton, sendo o estado do Paraná responsável por 65% desse total (cerca de 150 mil ton), com receita em torno de R\$ 150 milhões (Anuário Brasileiro da Erva-mate, 2000, Fernandes et al., 2000).

Em 2010, foi registrado aumento de 4,3% na produção de erva-mate em comparação com o ano de 2009, chegando a 227,462 ton, sendo o Paraná responsável pela maior parte da produção, com 166,682 t (IBGE, 2012).

A erva-mate, tradicionalmente, é matéria-prima para a produção de diversas bebidas (chimarrão, tererê, refrigerantes e chás), mas também tem grande potencial para muitas aplicações industriais como: corante, conservante de alimentos, produtos de higiene e cosméticos (Maccari & Mazuchowski, 2000 *apud* Brondani et al., 2007). A erva-mate é considerada um alimento quase completo, visto que contém vitaminas A, B1, B2 e C, sais minerais, alumínio, cálcio, fósforo, quase a totalidade de aminoácidos essenciais, glicídios e lipídeos (Velloso & Rocha, 2007).

Sob o aspecto sócio-econômico, o plantio da erva-mate promove a fixação do homem na zona rural, pois, além de ser uma cultura permanente, a sua safra ocorre justamente na entressafra dos produtos agrícolas (feijão, milho, etc.), gerando trabalho e receita. Além disso, a maior parte do produto é proveniente de pequenos produtores que se reúnem em cooperativas para o processamento ou o comercializam com grandes indústrias produtoras de erva-mate no sul do país. A relevância do caráter social da atividade ervateira é demonstrada pelos indicadores das propriedades rurais, com um

total de aproximadamente 180.000 produtores, gerando cerca de 700.000 postos de trabalho diretos, com um volume de recursos da ordem de R\$ 180 milhões/ano (Lourenço et al., 1997; Canterle, 2005).

Embora produtivo, no monocultivo intensivo a planta é submetida a condições que diferem daquelas às quais se adaptou (Iede, 1985; Penteado, 1995; Penteado et al., 2000), favorecendo a incidência de doenças, insetos e ácaros pragas (Chiaradia et al., 2000). Segundo Borges et al. (2003), quando comparados os sistemas de cultivo da erva-mate, o tipo nativo apresenta menor incidência de pragas que o tipo adensado, reforçando Soares (1998), segundo o qual quando as erva-mates são cultivadas em locais abertos ficam sujeitas a estresses fisiológicos, que as predispõe ao aparecimento de pragas e doenças.

Ainda, de acordo com Iede & Machado (1989), foram constatadas mais de uma centena de espécies de insetos que ocorrem na erva-mate, mas somente 58 foram identificadas. Destas, destacam-se cinco espécies que ocorrem em níveis populacionais mais elevados e causam danos sérios às plantas, e por essa razão são consideradas pragas da erva-mate: cochonilha de cera (*Ceroplastes grandis*), lagartas (*Thelosia camina* e *Hylesia* sp.), ampola (*Gyropsylla spegazziniana*) e a broca (*Hedypathes betulinus*).

## 3.2 A ampola da erva-mate (*Gyropsylla spegazziniana*)

### 3.2.1 Descrição, bioecologia e importância

A ampola-da-erva-mate é uma praga específica da cultura, podendo ocorrer tanto em viveiros de mudas como em ervais nativos ou implantados. Os ovos são elípticos, pedunculados, translúcidos e de coloração esbranquiçada ou amarelada (Figura 1A) e as ninfas apresentam o corpo achatado dorso-ventralmente (Figura 1B) (Leite & Zanol, 2001). Os estádios ninfaís apresentam quatro a cinco ínstaes (Chiaradia et al., 2002). As fêmeas medem aproximadamente 2,6 mm de comprimento e os machos 2,2 mm, apresentando coloração verde amarelada. As antenas apresentam o comprimento do corpo, possuem dois pares de asas membranosas e suas pernas posteriores são adaptadas para saltar (Figura 1C) (Iede & Machado, 1989; Penteado, 1995).

A distribuição de adultos de *G. spegazziniana* está associada à condição de brotação das árvores, necessária à postura e, segundo Chiaradia et al. (2002), a temperatura mínima exerce influência sobre a população, sendo necessários 399,52 graus/dia para o ciclo biológico se completar, onde pode ocorrer até 8,05 gerações anuais do inseto (dado equivalente a região de Chapecó, SC).

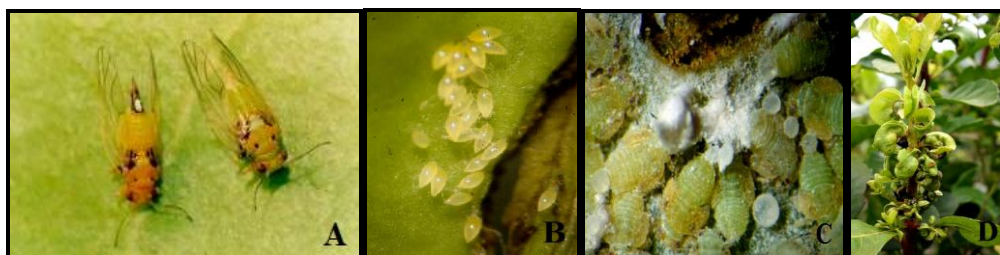
Aspectos comportamentais de *G. spegazziniana* em condições de laboratório foram estudados por Leite & Zanol (2001) que concluíram que o período de desenvolvimento do ovo à emergência do adulto foi de 38,7 dias, a longevidade do macho foi de 43,7 dias e das fêmeas foi de 15,2 dias, diferindo dos achados anteriores

de Sabedot et al. (1999) que constataram uma longevidade média das fêmeas e machos em torno de 10 e 12 dias, respectivamente.

Em relação à época de ocorrência, os dados também são variáveis de acordo com a região estudada, contudo, a tendência é que o pico populacional varie entre os meses de setembro e janeiro, acompanhando as temperaturas mais elevadas e a presença de brotações (Iede & Machado, 1989; Chiaradia, 2002; Leite et al., 2007; Borges & Lazzari, 2008).

### 3.2.2 Importância e danos

*G. spegazziniana* reproduz-se sexuadamente, fazendo as posturas em brotações, na nervura central da folha. Antes da oviposição, introduzem o aparelho bucal e inoculam saliva, que é tóxica à planta, causando hipertrofia das folhas, dando origem ao sintoma conhecido como “ampola-da-erva-mate”. Neste local, as ninfas sugam continuamente a seiva até próximo da fase adulta. Como resultado do ataque, as folhas deformadas geralmente caem, reduzindo o rendimento da cultura (Figura 1D). Além disso, contribui para a redução da produtividade pelo fato da planta despender mais reserva nutricional para emitir novas brotações (Iede & Machado, 1989; Penteadó, 1995; Chiaradia et al., 2000).



**Figura 1:** *Gyropsylla spegazziniana*: A) adultos, B) ovos, C) ninfas, D) planta atacada

A praga ataca erveiras de todas as idades, desde mudas até árvores adultas. Quando o ataque ocorre em mudas recentemente transplantadas, verifica-se um retardamento no desenvolvimento da planta, o que pode levar à perda da mesma ou, no caso de viveiros, gerar mudas de qualidade inferior, prejudicando os viveiristas (Penteado & Iede, 2005). A infestação pode ainda desqualificar o produto final devido ao aumento da quantidade de partículas do inseto, diminuindo seu valor no mercado. (Leite et al., 2007).

No Brasil, *G. spegazziniana* é tida como uma das pragas-chave da cultura, enquanto na Argentina, este psilídeo é considerado a principal praga da erva-mate, sendo que os danos causados provocam perdas de até 54% da produção no Brasil e 35% na Argentina (Trujillo, 1995; Diaz, 1997; Chiaradia et al., 2002; Borges & Lazzari, 2008).

### **3.2.3 Controle**

Apesar de o controle natural exercido pela chuva reduzir a população da praga por causarem a queda da ampola (Borges et al., 2003), bem como os inimigos naturais agirem sobre as ninfas da praga, no contexto da exploração em monocultura, as estratégias de controle estão inseridas como práticas essenciais para a redução populacional do inseto.

### **- Controle químico**

Apesar da reconhecida importância econômica da praga sobre os ervais, ainda não há produto registrado para seu controle e, no Brasil, o uso de inseticidas químicos é legalmente proibido para a cultura (Agrofit, 2012). No entanto, esses produtos são utilizados nas mudas, variando o número e o intervalo de aplicação (Grigoletti Jr. et al., 1996). Além disso, constata-se a recomendação de paration metílico e calda sulfocálcica (300 a 600g de sulfato de cobre + 150 a 300g de cal virgem para cada 100L de água) para o controle da ampola-da-erva-mate (Ambiente Brasil, 2009).

Na Argentina, há recomendações para o uso de 100 a 150 mL de dimetoato, metildemeton e endosulfan/100L de água (Burtnik, 2003). Também, Penteado et al. (2000) afirmam que, apesar da utilização de inseticidas ser freqüente, a eficiência desses produtos é praticamente desconhecida, sendo que Leite (2002) demonstrou que a ação do controle químico é por meio do inseticida sistêmico fenthion a 0,05%, limitada às características climáticas da região de cultivo.

### **- Controle cultural**

A preparação do solo, época de plantio e adubação adequada, além de material genético selecionado (sementes com boas condições fitossanitárias), densidade adequada e poda de formação no tempo e de forma corretos são premissas básicas para obtenção de plantas saudáveis e resistentes a pragas (Penteado, 1995; Díaz, 1997; Grigoletti Jr. et al., 1997; Prat Kricun & Belingheri, 2003; Borges & Lazzari, 2008).

Também se recomenda cuidado no adensamento de plantas de forma a permitir maior penetração de luz e circulação de ar, bem como balancear as formulações de

fertilizantes químicos solúveis, diminuindo os teores de nitrogênio ao indispensável e aumentando o de potássio, cuja técnica é importante para evitar o fenômeno da trofobiose (Trujillo, 1995).

Ribeiro (2005), estudando a influência da adubação nitrogenada na incidência de *G. spegazziniana* na erva-mate cultivada observou relação entre os dois fatores, sendo que 200 e 300 kg.ha<sup>-1</sup> de sulfato de amônio foram promissores para produção de biomassa, mas promoveu maior dano pelo inseto.

Em relação à poda das brotações atacadas, esta pode ser uma estratégia importante, pois também auxilia na manutenção do vigor, forma e a qualidade das plantas. Contudo, deve-se ter o cuidado para evitar podas exageradas, pois podem prejudicar o metabolismo normal da planta (Iede & Machado, 1989; Penteado, 1995; Díaz, 1997; Borges & Lazzari, 2007).

Nesse sentido, Ribeiro (2005) recomenda que a poda de colheita seja efetuada com cuidado para não danificar a planta e, preferencialmente, no período de menor incidência da praga, de forma que a presença do inseto nas folhas não venha desqualificar o produto final. Ainda, Leite (2002) sugeriu o ato de retirar e queimar os galhos atacados, tal como recomendaram Souza (1937) e Penteado (1995) como sendo efetivos, ao invés de utilizar produtos químicos.

#### **- Controle Físico**

Na erva-mate, algumas pesquisas têm sido realizadas com a utilização de armadilhas luminosas e/ou coloridas, visando principalmente obter subsídios para implementar o MIP de *G. spegazziniana*, a partir de seu monitoramento populacional.

Assim, Prat Kricun (1986) utilizou armadilhas amarelas tipo Möerick, enquanto Chiaradia & Milanez (1997) estudaram a atratividade da ampola-da-erva-mate por armadilhas de diferentes cores e concluíram a eficiência de bandejas de cor vermelha instaladas sobre as filas de árvores, em suportes de madeira de 1,40 m de altura, contendo água e detergente.

Ainda, Chiaradia et al. (2000) afirmam que adultos da ampola-da-erva-mate são também atraídos por armadilhas luminosas, equipadas com lâmpada ultravioleta modelo F-15,T-12. Além disso, Leite et al. (2007) desenvolveram uma armadilha colorida para captura de adultos, denominada Gyrotrap 95<sup>®</sup>, sendo utilizada posteriormente por Borges & Lazzari (2008) para estudo desse inseto na cultura.

### **- Inseticidas vegetais**

O uso de plantas inseticidas para o controle de pragas é uma prática bastante comum em países tropicais e foram muito utilizadas antes do surgimento dos inseticidas sintéticos. Porém, deixaram de ser usadas em troca dos produtos químicos que se mostraram mais eficientes e baratos. Entretanto, a busca por novos compostos que reduzam os problemas de contaminação ambiental e nos alimentos, fizeram com que pesquisas com inseticidas botânicos ressurgissem (Gallo et al., 2002).

Porém, até pouco tempo não haviam estudos relacionados ao uso de plantas para o controle de *G. spegazziniana*, sendo recentemente realizados por Haas et al. (2010), que verificaram a atividade do óleo de sementes de nim, em campo, sobre a praga em questão, quando se aplicou uma solução a 5 e 10% do produto, constatando 50% de mortalidade de adultos da praga, após 7 dias da aplicação.



Ainda, um estudo de avaliação da atividade inseticida de extratos vegetais também sobre a ampola-da-erva-mate, mostrou que os extratos alcoólicos a 25% de trichilia e fruto-do-conde, pulverizados previamente à infestação, ocasionaram mortalidade aproximada de 90% do inseto, enquanto na pulverização realizada previamente, o extrato alcoólico de leucena destacou-se, ocasionando 100% de mortalidade, apresentando potencial para uso no controle da praga (Barzotto, 2010).

### **- Controle Biológico**

Em se tratando de inimigos naturais de *G. spegazziniana*, foram registrados o parasitóide *Halictophagus* sp. (Strepsiptera: Halictophagidae) e predadores coccinelídeos, crisopídeos, hemerobídeos, sirfídeos, formigas, percevejos e ácaros predadores, sendo associados a ninfas e adultos da praga (Saini & De Coll, 1993; Soares, 1994; Díaz 1997; Chiaradía et al., 2000; Borges & Lazzari, 2008).

Em relação aos entomopatógenos, destacam-se os fungos entomopatogênicos, que são amplamente utilizados no controle microbiano de diversos insetos, apresentando a vantagem, para a maioria deles, de penetração via tegumento, o que não é visto nos demais entomopatógenos (Alves, 1998).

Especificamente sobre a ampola-da-erva-mate, verificou-se níveis de infecção de até 90% de *Zoophthora radicans* (Brefeld) sobre adultos da praga, em plantios de erva-mate em Governador Virasoro, Província de Corrientes, Argentina (Sosa-Gómez et al., 1994), sendo o mesmo ocorrido no Brasil, em um erval em Cascavel, PR, com níveis semelhantes de ocorrência na população, sendo os únicos registros de entomopatógenos (Alves et al., 2009).

Em vista da importância econômica de *G. spegazziniana* para a erva-mate e da falta de estudos pela busca de métodos de controle desta praga, ressaltando-se à proibição da utilização de inseticidas na cultura, o uso de fungos entomopatogênicos surge como uma opção promissora.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento:** Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 20 jul. 2012.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.289-381.

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**, v.38, p.697-698, 2009.

AMBIENTE BRASIL. **Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./florestal/index.html&conteudo=./florestal/ervamate.html>. Acesso em: 20 de jul. 2012.

**ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE**. Gazeta de Comunicações, 2000. 80p.

BARZOTTO, I.L.M. **Atividade inseticida de extratos vegetais sobre *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1917) (Hemiptera: Psyllidae)**. 2010. 60p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.

BERNARDI, E.; CALDEIRA, M.F.; NASCIMENTO, J.S. Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.489-493, 2005.

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**, v.47, p.563-568, 2003.

BORGES, L.R.; LAZZARI, S.M.N. Flutuação populacional de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles) (Hemiptera: Psyllidae) em dois sistemas de cultivo da erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae). **Floresta**, v.38, p.325-330, 2008.

BURTINIK, O.J. **Manual del pequeño yerbatero correntino**. INTA - AER Santo Tomé, Corrientes, Argentina, 2003. 58p.

BRONDANI, G.E.; ARAÚJO, M.A.; WENDLING, I.; KRATZ, D. Ambiente de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva-mate. **Scientia Agrária**, v.8, p.257-267, 2007.

CANTERLE, L.P. **Erva-mate e atividade antioxidante**. 2005. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CHIARADIA, L.A.; MILANEZ, J.M. Atratividade de armadilhas coloridas a *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer, 1917) (Homoptera: Psyllidae). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.3, p.183-185, 1997.

CHIARADIA, L.A.; MILANEZ, J.M.; SABEDOT, S.M. Caracterização e danos da ampola-da-erva-mate. **Agropecuária Catarinense**, v.13, p.50-53, 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**, v.32, p.385-391, 2002.

DIAZ, C.I.F. Perspectivas del manejo integrado de plagas em yerba mate. In: I CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE E II REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE (Ed. dos Organizadores), 1997, Curitiba. **Anais**. EMBRAPA FLORESTA, 1997. p.371-390.

FERNANDES, J.S.C.; USHIWATA, S.; DAMINELLI, R.M.; GABARDO, J.; KOBIYAMA, M.; MACCARI JR., A.; PREVEDELLO, C.; RESENDE, R.M.S.; RESENDE, M.D.V.; STURION, J.A. Estimativas de parâmetros relacionados ao melhoramento genético da erva-mate: possibilidade de seleção precoce. **Scientia Agraria**, v.1, p.45-53, 2000.

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

GRIGOLETTI JR., A.; AUER, C.G.; KIMATI, H.; AMORIM, L.A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: ESALQ, 1997. p.345-347.

HAAS, J.; TOMKIEL, M.V.; ALVES, L.F.A.; FANTI, A.L.P. 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, p.194-199, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Extração Vegetal**

e da **Silvicultura**: 2007. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_imprensa.php?id\\_noticia=1052](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_imprensa.php?id_noticia=1052). Acesso em: 16 jul. 2012.

IEDE, E.T. Considerações sobre a entomofauna da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: RESUMOS DO I SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS – SILVICULTURA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1985, Colombo. **Anais**. 1985.

IEDE, E.T.; MACHADO, D.C. Pragas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e seu controle. **Boletim de Pesquisa Florestal**, 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**, v.30, p.19-34, 2001.

LEITE, M.S.P. **Biologia e determinação do dano de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles, 1919), (Homoptera: Psyllidae) na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*. St. Hilaire)**. 2002. 84p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LEITE, M.S.P.; ZANOL, K.M.; IEDE, E.T.; PENTEADO, S.R.C. 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, p.520-523, 2007.

LOURENÇO, R.S.; CURCIO, G.R.; RACHWAL MEDRADO, M.J.S. Avaliação de níveis de nitrogênio sobre a produção de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em Fernandes Pinheiro, PR, em Latossolo Vermelho escuro. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v.34, p.75-98, 1997.

MAZUCHOWSKI, J. Z. Alternativas para o incremento da produtividade em ervais nativos. In: II CONGRESSO SUL- AMERICANO DA ERVA-MATE E III REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE. 2000, Encantado. **Anais**. Encantado: Ed dos organizadores, 2000. p.6-9.

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

PENTEADO, S.R.C.; IEDE, E.T.; LEITE, M.S.P. 2000. Pragas da erva-mate: perspectivas de controle.- In: II CONGRESSO SUL- AMERICANO DA ERVA-MATE

E III REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE. 2000, Encantado. **Anais**. Ed Universidade/ UFRGS, RS, 2000. p.27–37.

PRAT KRICUN, S.D. **Informe sobre investigaciones realizadas no período de 1984-85**. Misiones: INTA. E.E.A. Cerro Azul, 1986. 32p. (Miscelanea, 15).

PRAT KRICUN, S.D.; BELINGHERI, L.D. 2003. Sistemas de podas de rebaje en plantaciones de yerba mate de baja y alta densidad. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE. 2003, Chapecó, SC. **Anais**. Chapecó, SC: EPAGRI, 2003.

RENOVATTO, Y.P.; AGOSTINI, J. Qualidade microbiológica e físico-química de amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) comercializadas em Dourados, MS. **Interbio**, v.2, p.1981-3775, 2008.

RIBEIRO, M.M. **Influência da Adubação Nitrogenada na Incidência de *Gyropsylla spegazziniana***. 2005. 164p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SABEDOT, S.M.; MILANEZ, J.M.; GARCIA, F.R.M., CHIARADIA, L.A. Biología de *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer, 1917) (Homoptera: Psyllidae) em laboratório. **Acta Biologica Leopoldensia**, v.21, p.203-212, 1999.

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

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

SOARES, C.M.S. **Flutuação populacional, aspectos comportamentais e levantamento de inimigos naturais de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae), em um povoamento puro de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).** 1998. 73p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Entomologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

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

SOUZA, T.L. **Tecnologia da Erva-Mate.** Porto Alegre, RS: Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, 1937. 21p.

TRUJILLO, M.R. Agroecosistema yerbatero de alta densidad: plagas y enemigos naturales. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J. E. de A.; **Erva mate: biologia e cultivo no Cone-Sul.** Porto Alegre: UFRGS, 1995. p.129-134.

VELLOSO, C.C.; ROCHA, C.A. Papel artesanal de fibra de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) e sabonete medicinal de erva-mate: uma proposta em educação ambiental. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.1, p.1111-1113, 2007.

**5. CAPÍTULO 1: ATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE A “AMPOLA DA ERVA-MATE” *Gyropsylla  
spgazziniana* (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae)**

Pesquisa Agropecuária Brasileira

Marina Andressa Formentini<sup>1</sup>, Luis Francisco Angeli Alves<sup>1\*</sup>, Fabiana Gisele da Silva  
Pinto<sup>1</sup>, Maria Elena Schapovaloff<sup>2</sup>, Ana Paula Mamprim<sup>1</sup>, Andréia Kusumota Bonini<sup>1</sup>,  
Laís Weber<sup>1</sup> e Renan Augusto Ribeiro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Biotecnologia Agrícola, Rua Universitária, 2069, Cascavel, PR, 85819-110, [marinaformentini@hotmail.com](mailto:marinaformentini@hotmail.com), [luis.alves@unioeste.br](mailto:luis.alves@unioeste.br), [fabiana.pinto@unioeste.br](mailto:fabiana.pinto@unioeste.br), [anamamprim@hotmail.com](mailto:anamamprim@hotmail.com), [akbonini@hotmail.com](mailto:akbonini@hotmail.com), [layweber@gmail.com](mailto:layweber@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Avenida 122 y 60, La Plata, Buenos Aires, Argentina, [eschapovaloff@yahoo.com.ar](mailto:eschapovaloff@yahoo.com.ar)

<sup>3</sup>Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass – Distrito de Warta, Londrina, PR, 86001-970, [renanribeiro83@hotmail.com](mailto:renanribeiro83@hotmail.com)

\*autor para correspondência

**ATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS  
SOBRE A “AMPOLA DA ERVA-MATE” *Gyropsylla spgazziniana* (Lizer & Trelles)  
(Hemiptera: Psyllidae)**

Resumo – O objetivo desse trabalho foi selecionar e caracterizar isolados de fungos entomopatogênicos, visando o controle dessa praga. Para tal, ninfas de 5<sup>o</sup> ínstar foram transferidas para mudas de erva-mate, seguido da pulverização de suspensões de conídios ( $1 \times 10^9$  conídios/mL) de 48 isolados de *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae*, *Isaria* spp. e *Lecanicillium* spp. As mudas foram acondicionadas em gaiolas de PVC, e mantidas em sala climatizada ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 12 h de fotofase e U.R.  $60 \pm 10\%$ ).



A mortalidade dos insetos foi avaliada diariamente, por 10 dias e os isolados mais ativos foram comparados entre si por meio do crescimento vegetativo, produção de conídios em meios de cultura, atividade inseticida e análises moleculares, por meio do seqüenciamento da região rDNA-ITS e marcadores RAPD. O gênero *Beauveria* spp. foi mais eficiente dentre os fungos entomopatogênicos, em especial o isolado Unioeste 44 que apresentou o melhor desempenho, evidenciando seu potencial para o controle da praga. As análises moleculares da região rDNA-ITS possibilitou a identificação dos isolados como *B. bassiana* e *B. brongniartii* e os marcadores RAPD foram associados à virulência.

Termos para indexação: controle biológico, *Beauveria*, *Ilex paraguariensis*, rDNA-ITS.

ACTIVITY AND CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI  
AGAINST “PARAGUAY TEA AMPUL” (*Gyropsylla spegazziniana*) (Lizer & Trelles)  
(Hemiptera: Psyllidae)

Abstract - This study aimed to select and characterize strains of entomopathogenic fungi in order to control *Gyropsylla spegazziniana*. For this, the fifth instar nymphs were transferred to Paraguay tea seedlings, followed by spraying conidial suspensions of 48 strains of *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae*, *Isaria* spp. and *Lecanicillium* spp. at a concentration of  $1 \times 10^9$  conidia/mL. The seedlings were placed in PVC cages kept in a climatized room ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 12 h photophase and  $60 \pm 10\%$  R.H.), and the insect mortality was evaluated daily for 10 days. The most active isolates were compared by means of vegetative growth, conidial production in culture media, insecticidal activity and molecular analyses, by sequencing the region rDNA-ITS and RAPD. The genus

*Beauveria* spp. was more efficient among the entomopathogenic fungi, especially for strain Unioeste 44 that showed the best performance, demonstrating its potential to control the pest. Molecular analysis of rDNA-ITS region allowed the identification of isolates as *B. bassiana* e *B. brongniartii* and RAPD markers were associated with virulence.

Index terms: biological control, *Beauveria*, *Ilex paraguariensis*, rDNA-ITS

### Introdução

A cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é de grande importância sócio-econômica para Argentina, Paraguai e Brasil, concentrada neste último, na região sul, com produção de 229681 ton., em 2011. A planta destaca-se por ser utilizada no preparo de bebidas (chá, chimarrão, pós-solúveis) e também como matéria-prima para fármacos, cosméticos, etc. (Anuário Brasileiro da Erva-mate, 2000; IBGE, 2012).

A exploração desorganizada dos ervais nativos e a expansão das fronteiras agrícolas levaram a produção de erva-mate ao declínio e, pela falta de matéria-prima, passou a ser cultivada em reflorestamentos puros. Aliado a isso, o uso de produtos fitossanitários não registrados e/ou recomendados para a cultura, contribui para a formação de um ambiente desequilibrado ecologicamente, favorecendo o aparecimento de pragas, dentre elas, a broca, a ampola, ácaros e lagartas desfolhadoras (Iede & Machado, 1989; Borges et al., 2003).

*Gyropsylla spegazziniana*, ou “ampola da erva-mate” é uma das principais pragas da cultura, cujo ataque provoca deformação nas folhas, que geralmente caem,

reduzindo a produtividade em 54% no Brasil e de até 35% na Argentina (Chiaradia et al., 2000).

Os poucos estudos realizados com essa praga visam sua flutuação populacional, identificação de inimigos naturais e avaliação de estratégias controle (Borges et al., 2003; Leite et al., 2007; Barzotto, 2010). Contudo, não há no Brasil, produtos registrados para seu controle (Agrofit, 2012), comprovando a necessidade de busca de outras estratégias.

Os fungos entomopatogênicos são econômica e ambientalmente adequados para o controle da praga, sendo já relatada a epizootia de *Zoophthora radicans* (Brefeld) infectando *G. spegazziniana*, em ervais na Argentina (Sosa-Gómez et al., 1994) e no Brasil (Alves et al., 2009). Além disso, são seguros e já foram pesquisados contra outras pragas da cultura. Contudo, inexistem estudos visando o controle biológico da ampola da erva-mate com fungos, sendo o objetivo deste trabalho, selecionar e caracterizar isolados de fungos entomopatogênicos para utilização no controle da ampola da erva-mate.

## **Material e Métodos**

Foram avaliados 48 isolados de fungos entomopatogênicos obtidos nas coleções do Instituto Biológico, Embrapa Florestas e Laboratório de Biotecnologia Agrícola da Unioeste, (27 de *Beauveria* spp., 9 de *Metarhizium anisopliae*, 8 de *Isaria* spp. e 4 de *Lecanicillium* spp.) (Tabela 1), em duas fases: a) todos os isolados avaliados contra o inseto e, b) comparação dos melhores isolados entre si, quanto ao crescimento vegetativo, produção de conídios em meios de cultura, atividade inseticida e caracterização molecular.

Para a avaliação de patogenicidade, os isolados foram multiplicados em meio de esporulação (M.E.), e os conídios obtidos foram suspensos em água destilada + Tween 80 0,01% ( $1 \times 10^9$  conídios/mL) (Alves et al., 1998). Os insetos foram obtidos de ramos de erva-mate, coletados em um erval comercial, em Cascavel, PR, e com pincel umedecido foram transferidos para mudas de erva-mate, sendo 20 ninfas por muda. Em seguida, 2 mL da suspensão de cada isolado foram pulverizadas com aerógrafo acoplado a um compressor de ar ( $0,7 \text{ kgf/cm}^2$ ), a cerca de 10 cm das mudas. Na testemunha, as mudas foram pulverizadas com água destilada + Tween 80 0,01%. Para cada tratamento foram preparadas 4 mudas.

As mudas de erva-mate foram acondicionadas individualmente em gaiolas de cloreto de polivinila (PVC) incolor (13 cm de diâmetro  $\times$  40 cm de altura) (Figura 2), e mantidas em sala climatizada ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 12 h de fotofase e U.R.  $60 \pm 10\%$ ). Durante 10 dias, os insetos mortos foram retirados, imersos em solução alcoólica 70% e água destilada, por 10 segundos, e mantidos em câmara úmida, nas mesmas condições. Os insetos que não apresentaram sinais da presença do fungo foram transferidos para o meio seletivo de aveia (Alves et al., 1998) e incubados nas mesmas condições. Os isolados que ocasionaram as maiores porcentagens de mortalidade foram selecionados para a segunda fase.



**Figura 2.** Gaiola de PVC usada para avaliação das mudas tratadas.

Para avaliação do crescimento vegetativo e produção de conídios em meio artificial (M.E.), baseando-se em Rohde et al. (2006), os isolados selecionados foram inoculados em três pontos na superfície do meio M.E., e após 7 dias de incubação ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e 12h de fotofase), o diâmetro das colônias foi medido. Em seguida, as colônias foram recortadas do meio de cultura na linha terminal do halo e individualizadas em tubos de vidro com 10 mL de água destilada esterilizada + Tween 80 0,01%. Os tubos foram agitados em vórtex por um minuto e a quantificação da produção de conídios foi realizada em câmara de Neubauer. Foram preparadas cinco placas por isolado, sendo cada colônia considerada uma repetição.

A produção de conídios em arroz foi realizada em sacos plásticos de polipropileno (22 cm de largura  $\times$  35 cm de altura), contendo 100 g de arroz polido, tipo 1 + 20 mL de água destilada. Os sacos foram fechados e autoclavados (30 minutos a  $120^\circ\text{C}$ ), e após o resfriamento, cada um recebeu 10 mL da suspensão de conídios contendo  $1 \times 10^8$  conídios/ml. Os sacos foram incubados a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e 12h de fotofase,

por 7 dias. Para cada isolado foram preparadas 5 sacos (repetições). Na avaliação, amostras de 1g de arroz/saco foram transferidas para tubos de vidro com água destilada esterilizada + Tween 80 0,01%. Após agitação em vórtex por 1 minuto, fez-se a quantificação em câmara de Neubauer.

A atividade inseticida dos isolados também foi avaliada e, para isso, foi adotado o mesmo procedimento da seleção dos isolados, porém, a pulverização foi realizada sobre as ninfas de 5<sup>o</sup> ínstar dispostas em placas plásticas de Petri, sendo pulverizado 1 mL da suspensão dos isolados por meio de Torre de Potter (pressão de 10 kgf/cm<sup>2</sup>). Os insetos foram então, transferidos para mudas de erva-mate, sendo 20 insetos/muda e 4 repetições/isolado. A testemunha foi pulverizada com água destilada + Tween 80 0,01%. Diariamente fez a avaliação e considerou-se a mortalidade total acumulada no 3<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à variância pelo teste F. As médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey (P<0,05), utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011). Para atividade inseticida, os dados foram transformados em  $\arcsen\sqrt{x/100}$  e, para interação do efeito dos diferentes fatores, foi adotado o esquema fatorial 6 × 3 (6 tratamentos × 3 intervalos de tempo), dispostos em parcelas subdivididas no tempo.

Em relação à caracterização molecular, foram selecionados 9 isolados de *Beauveria* spp. estudados por meio do seqüenciamento da região rDNA-ITS e de marcadores RAPD, para verificar a relação entre o perfil molecular dos isolados e as respectivas origens geográficas, hospedeiro inicial e a virulência sobre a ampola da erva-mate. Para a extração de DNA, uma suspensão com  $1 \times 10^8$  conídios/mL dos isolados selecionados foi inoculada em frascos de Erlenmeyer contendo 150 mL de M.E., incubados por 72 h a 120 rpm e  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . Em seguida, o micélio foi coletado em

filtro de Büchner, lavado com água destilada esterilizada e armazenado a -20°C até o momento da extração. O DNA genômico dos isolados foi extraído segundo metodologia descrita por Azevedo et al. (2000) com modificações.

Para amplificação e seqüenciamento da região rDNA-ITS, utilizaram-se os primers ITS 1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) e ITS 4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) como forward e reverse, respectivamente (White et al., 1990). As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 25 µl, contendo 2,5 µL PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl concentrado em 10×); 1,2 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 5,0 µL dNTP (1,5 mM); 1 µL de cada primer (50 mM); 0,2 µL *Taq* DNA polimerase (5 U/ µL) e 20 ng DNA genômico e realizadas em termociclador (MG PTC-200). A amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C/3 min, seguido de 35 ciclos a 94°C/1 min, 57°C/1 min, 72°C/1 min e um ciclo a 72°C/3 min. Em seguida, os produtos da PCR foram purificados com o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e o seqüenciamento foi realizado com o Kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v 3.1 Cycle Sequencing, pelo ABI 3730 DNA Analyser. As seqüências de nucleotídeos foram depositadas no GenBank (números de acesso: KC004059 - KC004067) e foram organizadas em contigs por meio dos programas Phred (Ewing et al., 1998), Phrap ([www.phrap.org](http://www.phrap.org)) e Consed (Gordon et al., 1998), e comparadas com a base de dados do GenBank. Os alinhamentos das seqüências foram analisados usando o software Clustal X - 1.83 (Thompson et al., 1997). Uma árvore filogenética foi construída usando o programa Mega 4.0 (Kumar et al., 2004), com o algoritmo Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), pela análise de 1000 bootstraps.

As análises dos perfis de RAPD selecionaram 13 primers (Operon Technologies<sup>®</sup>) que apresentaram padrões de bandas consistentes: OPA 13, OPB 1, OPB 8, OPD 2, OPD 3, OPE 1, OPE 7, OPE 16, OPQ 2, OPQ3, OPZ 19, OPAC 3 e

OPAC 9. A mistura das reações foi preparada para um volume final de 25 µl [2,5 µL PCR buffer (200 mM Tris-Hcl, pH 8,8, 500 mM KCl concentrado em 10×); 1,5 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 2,5 µL dNTP (2,5 mM); 1 µL de cada primer (100 µM); 0,2 µL *Taq* DNA polimerase (5 U/ µL) e 1 µL DNA (20 ng)]. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (MG PTC-200) programado para uma desnaturação inicial a 94°C/5 min, seguido de 39 ciclos a 92°C/1 min, 35°C/1 min e 30seg, e 72°C/2 min, e um ciclo a 72°C/5 min. Em seguida, as amostras foram analisadas em gel de agarose a 1,4%, a 100 V, utilizando-se como padrão de peso molecular o marcador 1Kb plus DNA Ladder (Life Technologies®), coradas com brometo de etídio a 10 mg/mL e fotografadas (L Pix Loccus Biotecnologia).

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, versão 2.0). Para o agrupamento utilizou-se o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) e o coeficiente de Jaccard, em um nível de tolerância de 3%.

## **Resultados e discussão**

Verificou-se grande variação na atividade dos isolados, e, no geral, todos foram patogênicos, com mortalidade total variando entre 5,8 a 81,7%. A mortalidade confirmada foi bastante reduzida e com grande variação entre os isolados (entre 0 e 37,0%) (Tabela 1; Figura 3).



**Tabela 1.** Isolados dos fungos entomopatogênicos e respectiva origem e mortalidade média total ( $\pm$  EPM) e confirmada de *Gyropsylla spegazziniana*, após 10 dias ( $1 \times 10^9$  conídios/mL;  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 12h de fotofase e U.R.  $60 \pm 10\%$ ).

| Isolado               | Hospedeiro                              | Localidade                   | Mortalidade (%)  |            |
|-----------------------|---|------------------------------|------------------|------------|
|                       |   |                              | Total            | Confirmada |
| <i>Beauveria</i> spp. |   |                              |                  |            |
| Unioeste 44           | adulto Hemiptera, Pentatomidae          | Fazenda Timburi, Toledo , PR | 81,7 $\pm$ 10,38 | 12,0       |
| Unioeste 38           | lagarta de <i>Bombyx mori</i>           | Ibaiti, PR                   | 67,3 $\pm$ 9,19  | 5,0        |
| CG 716                | adulto <i>Hedypathes betulinus</i>      | Ivaí, PR                     | 60,1 $\pm$ 11,38 | 15,1       |
| CNPSO Bb 134          | <i>Piezodorus guildinii</i>             | Warta - Londrina, PR         | 51,7 $\pm$ 4,85  | 30,8       |
| Unioeste 52           | adulto de <i>Alphitobius diaperinus</i> | Boa Vista da Aparecida, PR   | 48,7 $\pm$ 12,50 | 23,9       |
| Unioeste 65           | adulto de <i>Anthonomus grandis</i>     | Cascavel, PR                 | 48,4 $\pm$ 5,08  | 21,1       |
| Unioeste 46           | adulto de <i>Euschithus heros</i>       | Cascavel, PR                 | 41,8 $\pm$ 3,23  | 37,0       |
| Unioeste 60           | adulto de Chrysomelidae, Coleoptera     | Catanduvas, PR               | 40,5 $\pm$ 8,45  | 7,4        |
| Unioeste 64           | adulto <i>Hedypathes betulinus</i>      | Cascavel, PR                 | 40,4 $\pm$ 2,20  | 18,2       |
| Unioeste 4            | larva de <i>Alphitobius diaperinus</i>  | Cascavel, PR                 | 40,2 $\pm$ 8,19  | 13,9       |
| Unioeste 57           | Hemiptera, Pentatomidae                 | Cascavel, PR                 | 36,3 $\pm$ 8,02  | 12,0       |
| IBCB 21               | Solo                                    | Cascavel, PR                 | 35,3 $\pm$ 11,82 | 7,3        |
| Unioeste 70           | adulto de <i>Vatiga manihotae</i>       | Marechal C. Rondon, PR       | 33,7 $\pm$ 6,92  | 16,5       |
| Unioeste 59           | adulto de <i>Alphitobius diaperinus</i> | Cascavel, PR                 | 31,3 $\pm$ 3,29  | 6,7        |
| CNPSO Bb 159          | <i>Nezara viridula</i>                  | Warta - Londrina, PR         | 26,0 $\pm$ 7,73  | 10,0       |
| IBCB 34               | Solo                                    | Cascavel, PR                 | 19,3 $\pm$ 5,15  | 10,3       |
| IBCB 31               | <i>Nezara viridula</i>                  | Piracicaba, SP               | 19,0 $\pm$ 1,60  | 3,4        |
| Unioeste 25           | solo, plantaço de erva-mate             | Cascavel, PR                 | 17,5 $\pm$ 1,27  | 1,3        |
| Unioeste 47           | adulto de Hemiptera, Pentatomidae       | Primavera do Leste, MT       | 16,8 $\pm$ 4,38  | 7,0        |
| Unioeste 69           | adulto <i>Hedypathes betulinus</i>      | Ivaí, PR                     | 15,8 $\pm$ 5,25  | 6,7        |
| Unioeste 26           | solo, plantaço de erva-mate             | Cascavel, PR                 | 14,4 $\pm$ 3,33  | 4,0        |

Continuação Tabela 1.

| Isolado                       | Hospedeiro                                   | Localidade                   | Mortalidade (%) |            |
|-------------------------------|--|------------------------------|-----------------|------------|
|                               |  |                              | Total           | Confirmada |
| Unioeste 71                   | ninfa mosca-branca ( <i>Bemisia tabaci</i> ) | Marechal C. Rondon, PR       | 13,9±3,61       | 6,5        |
| IBCB 486                      | solo – cana                                  | Espírito Santo do Pinhal, SP | 13,0±3,49       | 2,5        |
| CNPSo Bb 161                  | <i>Anticarsia gemmatalis</i>                 | Warta - Londrina, PR         | 11,8±2,62       | 0,0        |
| IBCB 66                       | <i>Hypothenemus hampei</i>                   | São José do Rio Pardo, SP    | 10,4±5,78       | 2,4        |
| CNPSo Bb 282                  | abelha Europa                                | Warta - Londrina, PR         | 9,0±4,68        | 1,5        |
| IBCB 548                      | Solo – café                                  | Matão, SP                    | 6,1±3,98        | 2,3        |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> |  |                              |                 |            |
| CNPSo Ma 548                  | <i>Solenopsis</i> sp.                        | Porto Alegre, RS             | 28,7±6,45       | 5,3        |
| IBCB 353                      | <i>Mahanarva fimbriolata</i>                 | Valparaíso, SP               | 25,0±3,29       | 1,3        |
| CNPSo Ma 554                  | <i>Mahanarva fimbriolata</i>                 | São José do Rio Claro, MT    | 16,4±0,60       | 9,9        |
| IBCB 352                      | Solo   | Valparaíso, SP               | 15,9±3,78       | 2,9        |
| IBCB 418                      | Lagarta                                      | Iporanga, SP                 | 14,4±5,30       | 8,1        |
| IBCB 364                      | Bicudo                                       | Araras, SP                   | 11,7±1,69       | 4,7        |
| CNPSo Ma 550                  | <i>Mahanarva posticata</i>                   | Alagoas                      | 10,2±0,16       | 3,8        |
| Unioeste 22                   | solo, plantação de erva-mate                 | Cascavel, PR                 | 9,1±0,43        | 2,7        |
| CNPSo Ma 549                  | <i>Mahanarva posticata</i>                   | Pernambuco                   | 8,6±4,61        | 0,0        |
| <i>Isaria</i> spp.            |  |                              |                 |            |
| Turfal 01                     | Desconhecido                                 | Desconhecido                 | 27,1±5,08       | 8,5        |
| CNPSo Pae 355                 | Desconhecido                                 | Desconhecido                 | 16,3±5,50       | 6,3        |
| CNPSo Pae 217                 | <i>Anticarsia gemmatalis</i>                 | Warta - Londrina, PR         | 14,0±4,73       | 0,0        |
| CNPSo Pae 219                 | <i>Anticarsia gemmatalis</i>                 | Warta - Londrina, PR         | 11,4±1,83       | 1,3        |
| CNPSo Pae 218                 | <i>Anticarsia gemmatalis</i>                 | Warta - Londrina, PR         | 9,5±3,60        | 0,0        |
| IBCB 201                      | Solo   | Cascavel, PR                 | 7,4±1,47        | 1,6        |
| IBCB 500                      | Solo   | Monte Alegre, SP             | 7,4±1,53        | 5,8        |
| IBCB 236                      | Café   | Poloni, SP                   | 6,1±3,03        | 4,9        |

Continuação Tabela 1.

| Isolado                   | Hospedeiro            | Localidade   | Mortalidade (%) |            |
|---------------------------|-----------------------|--------------|-----------------|------------|
|                           |                       |              | Total           | Confirmada |
| IBCB 638                  | <i>Bemisia tabaci</i> | Desconhecido | 5,8±1,46        | 4,2        |
| <i>Lecanicillium</i> spp. |                       |              |                 |            |
| Isolado                   | Hospedeiro            | Localidade   | Mortalidade (%) |            |
|                           |                       |              | Total           | Confirmada |
| Turfal 01                 | Desconhecido          | Desconhecido | 30,4±4,82       | 22,1       |
| Turfal 02                 | Desconhecido          | Desconhecido | 28,4±6,26       | 15,6       |
| IBCB 616                  | <i>Myzus persilae</i> | Campinas, SP | 18,1±3,13       | 13,3       |
| IBCB 618                  | <i>Myzus persilae</i> | Campinas, SP | 17,0±4,70       | 10,6       |



**Figura 3.** Mortalidade confirmada de *Gyropsylla spegazziniana* após inoculação de fungos entomopatogênicos.

Independente disso, elevado percentual de mortalidade total implica na redução populacional da praga, no entanto, a conidiogênese nos cadáveres é um fator importante para a disseminação da doença no campo, mas está diretamente ligada às condições ambientais, ao isolado e também ao tamanho do hospedeiro (Alves, 1998). Além disso, a infecção do fungo, após a penetração via tegumento do inseto, pode levar à morte de forma indireta, por meio de danos mecânicos, exaustão de nutrientes e alterações fisiológicas/bioquímicas, e/ou de forma direta, por intoxicação e disfunção de órgãos (Hajek & St. Leger, 1994; Alves 1998). Assim sendo, é possível que nos insetos mortos sem sinais do fungo na sua superfície, o fungo não tenha sido capaz de completar seu ciclo de infecção, o que segundo Shimazu (1994), é um fenômeno relativamente comum.

As baixas porcentagens de confirmação também foram observadas em outros estudos, avaliando diferentes fungos entomopatogênicos contra hemípteros (Loureiro et al., 2005; Barboza et al., 2011), verificando-se até mesmo ausência de qualquer sintoma de morte pelo fungo (Villacarlos et al., 2003). Ainda, Padulla (2007) somente comprovou a mortalidade de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae) por

meio da visualização microscópica de corpos hifais e micélio no interior dos cadáveres do inseto.

O gênero *Beauveria* spp. sobressaiu-se em relação aos demais, com o maior percentual de mortalidade total, destacando-se o isolado Unioeste 44 (81,7%), e juntamente com Unioeste 38, CG 716, CNPSo Bb 134, Unioeste 52 e Unioeste 65 (que causaram mortalidade total entre 48,4 e 67,3%), foram selecionados para a fase seguinte. As outras espécies de fungos avaliadas não alcançaram 30% (Tabela 1), confirmando assim, a importância da seleção de isolados apropriados para determinado inseto-praga.

O destaque da atividade de isolados de *Beauveria* spp. no controle microbiano é conhecida, com diversos exemplos de sucesso (Alves et al., 2010), o que pode ser atribuído à sua capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários envolvidos na patogênese e na virulência, além de possuir mais proteínas e enzimas relacionadas ao metabolismo celular e maior número de genes que expressam toxinas semelhantes às de bactérias que outras espécies de fungos entomopatogênicos (Xiao et al., 2012).

Na avaliação do crescimento vegetativo, o Unioeste 38 apresentou a maior média de diâmetro, com 3,2 cm, seguido dos isolados CNPSo Bb 134, Unioeste 52, Unioeste 44 e CG 716, sendo que todos diferiram significativamente entre si (Figura 4). Rohde et al. (2006), Santoro et al. (2008) e Petlamul & Prasertsan (2012) também observaram variações significativas entre os isolados analisados.



**Figura 4.** Colônias de isolados de *Beauveria* spp., cultivados em meio de esporulação, após 7 dias de incubação ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e 12 h de fotofase).

Houve também, entre os isolados, variações significativas na produção de conídios em meio artificial (M.E.), que foi significativamente maior para Unioeste 38 ( $13 \times 10^7$  conídios/colônia), demonstrando assim, correlação positiva entre tamanho de colônia e produção, corroborando Potrich et al. (2006) e Petlamul & Prasertsan (2012). Já em relação à produção de conídios em arroz, CNPSO Bb 134, Unioeste 44 e Unioeste 52 foram significativamente superiores (respectivamente com  $4,7$ ;  $4,2$  e  $4,3 \times 10^7$  conídios/g de arroz) (Tabela 2). Valores aqui obtidos são próximos ou distintos aos verificados em outros estudos, contudo, há dificuldade de comparação entre os resultados, já que fatores como as condições de incubação, o tipo e a qualidade do meio de cultura e a variabilidade genética dos isolados interferem nos resultados (Potrich et al., 2006; Rohde et al. (2006). Vale ressaltar a variação da produção dos isolados entre os diferentes meios de cultura, como visto para o Unioeste 44 que apresentou baixa

produção em meio sintético e elevada em arroz, concluindo assim, que determinada composição nutricional proporciona melhor desenvolvimento do fungo.

**Tabela 2.** Valores médios ( $\pm$  EP) de diâmetro da colônia e de produção de conídios em colônias em meio de cultura, de cinco isolados *Beauveria* spp. selecionados, após 7 dias de incubação ( $26\pm 1^\circ\text{C}$ , 12 horas de fotofase).

| Isolados     | Diâmetro médio das colônias (cm) | Produção média de conídios/colônia <sup>1</sup> | Produção média de conídios/arroz/g <sup>2</sup> |
|--------------|----------------------------------|---|---|
| Unioeste 44  | 2,4 $\pm$ 0,03 d                 | 0,1 $\pm$ 1,64 c                                | 4,2 $\pm$ 0,95 ab                               |
| Unioeste 38  | 3,2 $\pm$ 0,04 a                 | 13,0 $\pm$ 1,11 a                               | 2,0 $\pm$ 0,31 c                                |
| CG 716       | 2,2 $\pm$ 0,06 e                 | 0,4 $\pm$ 2,51 c                                | 3,0 $\pm$ 1,54 bc                               |
| CNPSo Bb 134 | 3,0 $\pm$ 0,02 b                 | 4,4 $\pm$ 2,83 b                                | 4,7 $\pm$ 4,91 a                                |
| Unioeste 52  | 2,6 $\pm$ 0,05 c                 | 7,0 $\pm$ 1,14 b                                | 4,3 $\pm$ 1,92 ab                               |
| CV (%)       | 3,53                             | 12,3  | 14,6  |

<sup>1</sup>Número médio de conídios por colônia  $\times 10^7$ ; <sup>2</sup>Número médio de conídios por grama de arroz  $\times 10^7$   
Médias ( $\pm$  EP) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Em relação à atividade inseticida, os isolados foram semelhantes entre si, com valores próximos aos do bioensaio de seleção inicial, variando de 48,7 a 82,2%, cujo valor máximo pertence ao Unioeste 44. Contudo, quando analisados individualmente em cada tempo, foi visto que a maioria teve seu pico de ação no 6<sup>o</sup> dia, destacando-se o Unioeste 44 (45,4%) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Porcentagem de mortalidade total ( $\pm$  EP) de *Gyropsylla spegazziniana* por *Beauveria* spp. ( $1 \times 10^9$  conídios/mL) aos 3, 6 e 10 dias após a aplicação do fungo ( $1 \times 10^9$  conídios/mL;  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 12h de fotofase e U.R.  $60 \pm 10\%$ ).

| Tratamento     | 3 dias             | 6 dias              | 10 dias            | Mortalidade Total (%) |
|----------------|--------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| Testemunha     | $0,0 \pm 0,0$ Ba   | $0,0 \pm 0,0$ Ba    | $0,0 \pm 0,0$ Ba   | $0,0 \pm 0,0$ B       |
| Unioeste 44    | $11,4 \pm 1,7$ ABb | $45,4 \pm 3,4$ Aa   | $33,2 \pm 6,5$ Aa  | $82,2 \pm 17,8$ A     |
| Unioeste 38    | $17,7 \pm 6,4$ Aa  | $32,5 \pm 1,9$ Aa   | $14,4 \pm 7,5$ ABa | $64,7 \pm 13,1$ A     |
| CG 716         | $11,9 \pm 7,2$ Aba | $22,6 \pm 10,0$ ABa | $26,5 \pm 9,4$ Aa  | $61,9 \pm 11,5$ A     |
| CNPSO 134      | $18,3 \pm 1,8$ Aa  | $28,7 \pm 5,1$ Aa   | $14,4 \pm 1,6$ ABa | $61,3 \pm 10,9$ A     |
| Unioeste 52    | $16,0 \pm 4,8$ Aa  | $20,3 \pm 11,9$ ABa | $12,3 \pm 1,9$ ABa | $48,7 \pm 14,1$ A     |
| CV (%) = 38,72 |                    |                     |                    | CV (%) = 34,21        |
| CV (%) = 40,58 |                    |                     |                    |                       |

\*Dados originais apresentados; para análise estatística foram transformados em  $\arcsen\sqrt{x/100}$

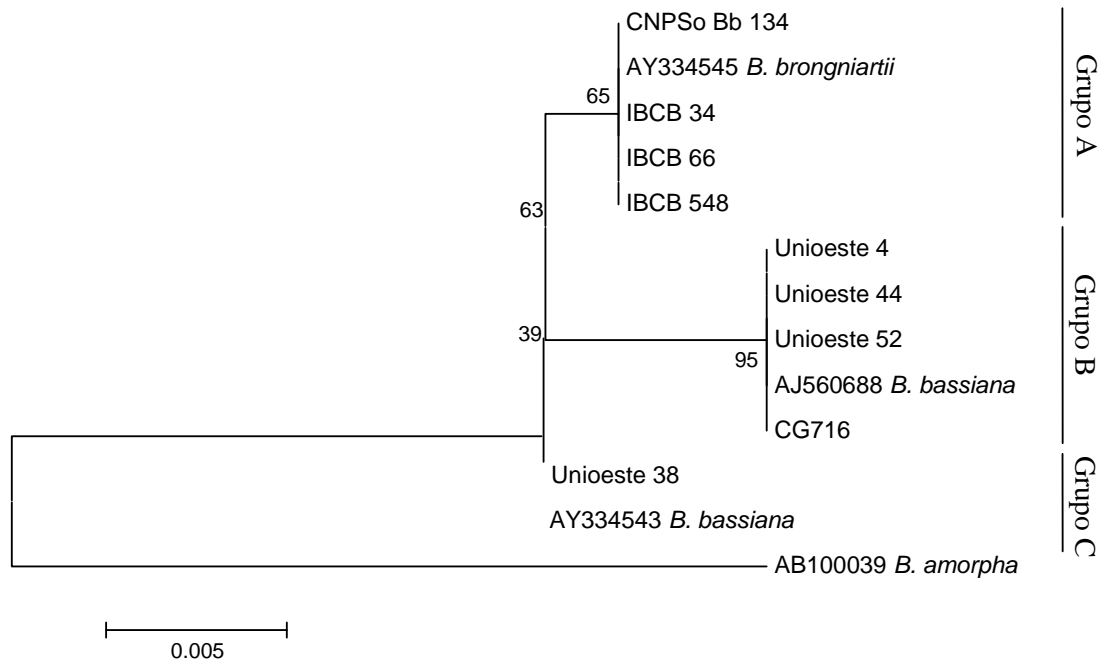
Médias ( $\pm$  EP) seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Tratamento  $\times$  Tempo = 0,271; fatores independentes.

Médias ( $\pm$  EP) de mortalidade total seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

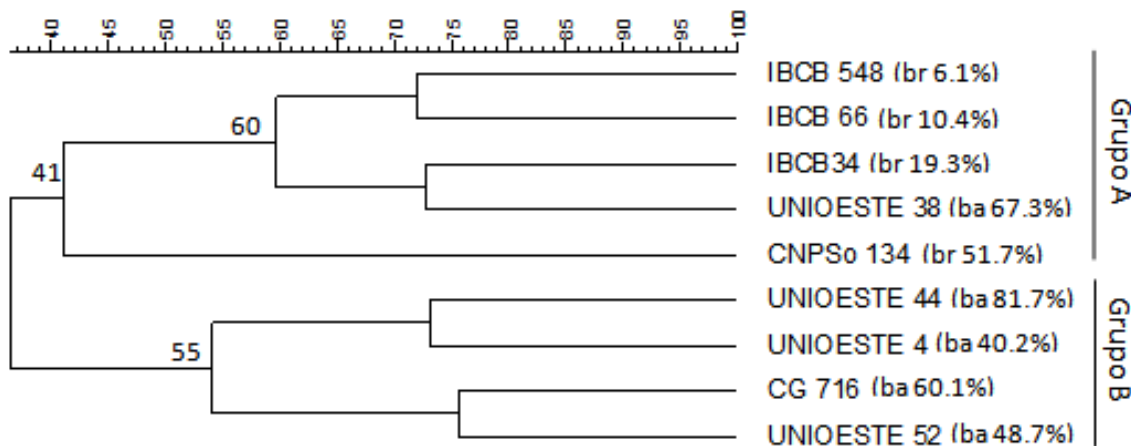
A caracterização molecular mostrou ausência de polimorfismo no comprimento da região rDNA entre os isolados de *Beauveria* spp., visto que um fragmento de cerca de 540 pb foi amplificado para todos os isolados. As seqüências dos fragmentos foram comparadas com dados do GenBank e os isolados foram caracterizados como *B. bassiana* ou *B. brongniartii* com alto grau de identidade, sendo apenas 6 nucleotídeos diferentes entre ambas espécies. Os isolados analisados pertencem a diferentes hospedeiros e localidades geográficas (Tabela 1) e, independente disso, a árvore consenso baseada nas seqüências ITS distribuiu os isolados em três grupos distintos, sendo que aqueles identificados como *B. brongniartii* foram todos agrupados (Grupo A) e separados daqueles identificados como *B. bassiana*, que foram particionados em grupos B e C, sendo que neste último encontra-se somente o Unioeste 38 (Figura 5). O uso potencial de isolados virulentos para o controle da ampola da erva-mate sugere a necessidade de confirmação molecular da identidade taxonômica do fungo.





**Figura 5.** Dendrograma das seqüências ITS dos 9 isolados de *Beauveria* spp., gerado pelo Mega versão 4.0, usando o algoritmo Neighbor-Joining, pela análise de 1000 bootstraps. A árvore foi analisada com outgroups de *B. brongniartii*, *B. bassiana* e *B. amorpha*.

Os padrões de RAPD gerados revelaram 225 loci, sendo que a maioria deles (92,9%) foi polimórfica. O tamanho das bandas amplificadas variou de 250 pb a 2500 pb, e o número de bandas observadas foi de 4 (OPB 1, OPB 8 e OPD2) a 17 (OPAC 3). Os isolados foram divididos em grupos A e B, com nível de similaridade acima de 40% entre eles, sendo o grupo A representado pelos isolados de *B. brongniartii* (exceto o Unioeste 38), acima de 60% de similaridade entre eles, a não ser pelo isolado CNPSO 134 que apresentou menor similaridade com os demais (41%). O grupo B agrupou somente a espécie *B. bassiana*, com 55% de similaridade (Figura 6). A proporção de loci monomórficos entre os isolados mais virulentos foi baixa (16,2%).



**Figura 6.** Análise de agrupamento de 9 isolados de *Beauveria* spp. usando marcadores RAPD. O dendrograma foi gerado pelo método UPGMA, índice de Jaccard a 3% de tolerância. Porcentagens de mortalidade total de *G. spegazziniana* e espécies de *Beauveria* spp. estão entre parênteses (ba: *B. bassiana*; br: *B. brongniartii*).

Apesar de alguns estudos relatarem a relação entre o perfil molecular de isolados de fungos entomopatogênicos e o hospedeiro inicial (Carneiro et al., 2008; Oliveira et al., 2011) ou a proveniência geográfica (Fernandes et al., 2009), no presente estudo, essa relação não foi constatada, tanto pela análise da região rDNA-ITS, como pelos grupos gerados por RAPD, tal como também verificaram Becerra Velásquez et al. (2007) e Mendonça et al. (2012).

Em relação aos perfis de RAPD e à virulência, observou-se que o Grupo A reuniu os isolados menos virulentos, exceto o Unioeste 38 e CNPSo 134, enquanto no Grupo B ficaram somente isolados mais virulentos quando comparados ao outro grupo. Os seqüenciamento da região rDNA apresentou resultado semelhante, a não ser pelo Unioeste 38 que formou um grupo isolado. Esta relação entre perfis de RAPD e virulência também foi observada por Santoro et al. (2008) e Carneiro et al. (2008) que verificaram agrupamento de isolados mais virulentos, apesar de alguns isolados pouco virulentos também pertencerem ao mesmo grupo.

Recentemente, foi sugerido que *B. bassiana* é um entomopatógeno não-especialista, sendo o ambiente um dos principais fatores seletivo para a evolução genotípica da espécie (Ferri et al., 2012). Aliado a isso, é verificada alta variabilidade genética entre fungos entomopatogênicos, e o nível de polimorfismo pode ser altamente variável até mesmo dentro da mesma espécie (Fernandes et al., 2006).

Assim, do ponto de vista prático, ainda que semelhantes entre si, dentre os isolados selecionados, o Unioeste 44 sobressaiu-se na produção em arroz (método de obtenção em grande escala) e apresentou maior pico de mortalidade no 6<sup>o</sup> dia. Assim sendo, possui grande potencial de utilização em um futuro programa de controle biológico da ampola da erva-mate, sendo necessários estudos em condições de campo de forma a se comprovar a atividade inseticida em tais condições.

### **Conclusões**

1. Isolados do gênero *Beauveria* mostraram-se mais ativos contra a ampola, sendo Unioeste 44 aquele com grande potencial no controle da praga.
2. rDNA-ITS e marcadores RAPD são capazes de identificar isolados de *Beauveria* spp. e são úteis para detectar a variabilidade inter e intra-específicas dentro do gênero, podendo ser utilizados em programas de controle biológico de pragas.

### Referências bibliográficas

AGROFIT - **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento:** Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 20 de julho de 2012.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998 p.289-381.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR., A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.637-711.

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**, v.38, p.697-698, 2009.

ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.J.O.; FARIA, M.R. **Recomendações para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas**, Piracicaba, SP,: Editora Pedagógica e Universitária Ltda, 2010. 52p.

**ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE.** Gazeta de Comunicações, 2000. 80p.

AZEVEDO, A.C.S.; FURLANETO, M.C.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; FUNGARO, M.H.P. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. **Scientia Agricola**, v.57, p.729-732, 2000.

BARBOZA, M.R.; SILVA, D.N.; LUSTOSA, S.B.C.; HIROSE, E. Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre o percevejo *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae). **Ambiência**, v7, p.473-480, 2011.

BARZOTTO, I.L.M. **Atividade inseticida de extratos vegetais sobre *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1917) (Hemiptera: Psyllidae)**. 2010. 60p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2010.

BECERRA-VELÁSQUEZ, V.; CÁRCAMO, M.P.; MERIÑO, C.R.; IGLESIAS, A.F.; DURÁN, J.F. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.89-99, 2007.

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**, v.47, p.563-568, 2003.

CARNEIRO, A.A.; GOMES, E.A.; GUIMARÃES, C.T.; FERNANDES, F.T.; CARNEIRO, N.P.; CRUZ, I. Molecular characterization and pathogenicity of isolates

of *Beauveria* spp. to fall armyworm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.513-520, 2008.

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

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v8, p.175-185, 1998.

FERNANDES, E.K.K.; COSTA, G.L.; MORAES, A.M.L.; ZAHNER, V.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, v.98, p.324-332, 2006.

FERNANDES,É.K.K.; MORAES, Á.M.L.; PACHECO, R.S.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W. Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.760-774, 2009.

FERREIRA, D.F. **Sisvar: a computer statistical analysis system**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 2011.p.1039-1042. Acesso em 28 mai. 2012.

FERRI, D.V.; MUNHOZ, C.F.; NEVES, P.M.O.; FERRACIN, L.M.; SARTORI, D.; VIEIRA, M.L.C.; FUNGARO, M.H.P. Genetic variability of *Beauveria bassiana* and a DNA marker for environmental monitoring of a highly virulent isolate against *Cosmopolites sordidus*. **Indian Journal of Microbiology**, v.52, p.569-574, 2012.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v8, p.195-202, 1998.

HAJEK, A.E.; ST. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review Entomology**, v.39, p.293-322, 1994.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura: 2007**. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_impressao.php?id\\_noticia=1052](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1052). Acesso em 16 de julho de 2012.

IEDE, E.T.; MACHADO, D.C. Pragas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e seu controle. **Boletim de Pesquisa Florestal**, p.51-60, 1989.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform**, v.5, p.150-163, 2004.

LEITE, M. S. P.; ZANOL, K. M.; IEDE, E. T.; PENTEADO, S. R. C. 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, p.520-523, 2007.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; PESSOA, L.G.A. 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, p.791-798, 2005.

MENDONÇA, M.C.; SANTOS, M.F.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, J.M. RAPD, Microsatellites markers in the genetic diversity characterization of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolates. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.15, p.117-124, 2012.

OLIVEIRA, D.G.P.; PINTO, F.G.S.; BARCELLOS, F.G.; ALVES, L.F.A.; HUNGRIA, M. Variabilidade genética de isolados de *Beauveria* spp. e virulência ao cascudinho *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, p.147-156, 2011.

PADULLA, L.F.L. **Estudo de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psílideo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba,SP.

PETLAMUL, W.; PRASERTSAN, P. Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. **Mycobiology**, v.40, p.111-116, 2012.

POTRICH, M.; ALVES, L.F.A.; MERTZ, N. R.; SILVA, E. R. L. Avaliação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **BioAssay**, v.1, p.1-9, 2006.

ROHDE, C.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B.; SILVA, E.R.L.; ALMEIDA, J.E.M.; 2006. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o Cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.35, p.231-240, 2006.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v 4, p.406-425, 1987.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.O.J.; ALEXANDRE, T.M.; SARTORI, D.; ALVES, L.F. A.; FUNGARO, M.E.P. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.97, p.83-90, 1998.

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

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, p.127-130, 1994.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4882, 1997.

VILLACARLOS, L.T.; MEJIA, B.S.; KELLER, S. *Entomophthora leyteensis* Villacarlos & Keller sp. nov. (Entomophthorales: Zygomycetes) infecting *Tetraleurodes acaciae* (Quaintance) (Insecta, Hemiptera: Aleyrodidae), a recently introduced whitefly on *Gliricidia sepium* (Jaq.) Walp. (Fabaceae) in the Philippines. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.83, p.16-22, 2003.

XIAO, G.; YING, S. H.; ZHENG, P.; WANG, Z.L.; ZHANG, S.; XIE, X.Q.; SHANG, Y.; ST LEGER, R. J.; ZHAO, G.P.; WANG, C.; FENG, M.G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, v.2, p.1-10, 2012.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315–322.

## **Anexo**

Normas para submissão de artigos na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira



## **Diretrizes para Autores**

### **Escopo e política editorial**

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

### **Análise dos artigos**

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

### **Forma e preparação de manuscritos**

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

### **Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos**

No passo 1 da submissão (Início), em “comentários ao editor”, informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 da submissão (Inclusão de metadados), em “resumo da biografia” de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em “incluir autor” para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:

“Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado “.....” e com a submissão para a publicação na revista PAB.

#### **Como fazer:**

Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos co-autores num mesmo arquivo.

#### **Organização do Artigo Científico**

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

### **Título**

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.

- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.

- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.

- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

### **Nomes dos autores**

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

### **Endereço dos autores**

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.

- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.

- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

### **Resumo**

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

### **Termos para indexação**

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que compoñham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no [AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus](#) ou no [Índice de Assuntos da base SciELO](#).

### **Introdução**

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

### **Material e Métodos**

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.

- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

### **Resultados e Discussão**

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

### **Conclusões**

- O termo **Conclusões** deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

### **Agradecimentos**

- A palavra **Agradecimentos** deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

### **Referências**

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

### Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

- Redação das citações dentro de parênteses

- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

### **Fórmulas, expressões e equações matemáticas**

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

### **Tabelas**

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.



- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); \* e \*\* (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

## **Figuras**

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.

- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

### **Notas Científicas**

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

#### **Apresentação de Notas Científicas**

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.

- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- Resumo com 100 palavras, no máximo.
- Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

### **Outras informações**

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: [pab@sct.embrapa.br](mailto:pab@sct.embrapa.br) ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF

## Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O manuscrito deve ser inédito e não pode ter sido submetido, simultaneamente, a outro periódico, e seus dados (tabelas e figuras) não podem ter sido publicados parcial ou totalmente em outros meio de publicação técnicos ou científicos (boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas, etc.).
2. O texto deve ser submetido no formato do Microsoft Word, em espaço duplo, escrito na fonte Times New Roman 12, tamanho de papel A4, com páginas e linhas numeradas; e o arquivo não deve ultrapassar o tamanho de 20 MB.
3. O artigo deve ter, no máximo, 20 páginas e tem que estar organizado na seguinte ordem: Título; nome completo dos autores, seguido de endereço institucional e eletrônico; Resumo; Termos para indexação; Title, Abstract; Index terms; Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões; Agradecimentos; Referências; tabelas e figuras.
4. Os padrões de texto e de referências bibliográficas devem ser apresentados de acordo com as orientações, para a apresentação de manuscritos, estabelecidas nas Diretrizes aos autores, as quais se encontram na página web da revista PAB.
5. Mensagens de concordância dos coautores com o conteúdo do manuscrito e sua submissão à revista devem ser compiladas pelo autor correspondente em um arquivo do Microsoft Word e carregadas no sistema como um documento suplementar, no quarto passo do processo de submissão.

## Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

## [Embrapa Informação Tecnológica](#)

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (final) Caixa Postal 040315 -  
Brasília, DF - Brasil - 70770-901

Fone: +55 (61) 3448-4231 / 3448-4162 - Fax: (61) 3272-4168