

UNIOESTE
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO

ANDRÉ LUIS PEREIRA FANTI

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS E NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS VISANDO AO CONTROLE DA BROCA DA ERVA-
MATE (*Hedypathes betulinus*) KLUGER (COLEOPTERA; CERAMBYCIDAE)**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2011

ANDRÉ LUIS PEREIRA FANTI

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS E NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS VISANDO AO CONTROLE DA BROCA DA ERVA-
MATE (*Hedypathes betulinus*) KLUGER (COLEOPTERA; CERAMBYCIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Nível Mestrado, para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS FRANCISCO ANGELI ALVES

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2011

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jair e Iraci, que me deram sempre a oportunidade de estudar, apoiando e incentivando em todos os momentos da minha vida, e por serem as pessoas mais especiais pra mim, cujo meu amor só não é maior que a minha gratidão!

A toda minha família, Gerson, Ana, Marina, João Pedro, Gianne, Adriana, Zé, João Gabriel, Alice, Isabel e Bernardo. E em especial a minha irmã Fernanda, e meu cunhado, Igor, que me ajudaram a seguir o mesmo caminho que eles.

Ao Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves, por ter aberto uma porta quando mais precisei, além da amizade, orientação, muita paciência e dedicação no processo de formação.

Ao Centro de Ciências Biológicas e Saúde, pelas instalações, equipamentos disponibilizados e pela cordialidade dos funcionários que nunca hesitaram em ajudar.

Ao pessoal do laboratório de Biotecnologia, Marina, Leonardo, Dhyego, Luiz Paulo, Louise, Nicole, Elisangela, Roger, Rafaela, Daian, Vitor, Manu, Talita, Andréia, Ionete, que me ajudaram sempre nos bioensaios, além da amizade e companheirismo. E em especial, a Ana Mamprim, pela companhia nas viagens, disciplinas, estudos, diversões, sofrimentos e angustias durante o curso de mestrado. E também ao pessoal que fez parte das disciplinas do mestrado, que se tornaram grandes amigos como a Dionéia, Rosi, Luciana, Patricia Paro e todos mais!

Ao pessoal da Fazenda Vila Nova em Ivaí, pela amizade e pela ajuda nas coletas de insetos, em especial Dalnei Neiverth e o Afonso Oliszeski, que me ensinaram muito sobre a cultura da erva-mate.

À Empresa Turfal, e a Dr. Maria Silvia Pereira Leite.

A Prof^a. Dra. Viviane Sandra Alves, pela ajuda e fornecimento de nematóides, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, do Instituto Biológico pela ajuda com os fungos entomopatogênicos.

Ao Prof. Dr. Luis Garrigós Leite, do Instituto Biológico, pelo fornecimento de nematóides.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

A Fundação Araucária e CNPq, pelo financiamento do projeto de pesquisa com pragas de erva-mate.

Dedico este trabalho á
memória do meu pai, Jair Fanti,
que mesmo não estando
presente, foi, e sempre será
inspiração para minha vida.

Só enquanto eu respirar pai...

Seleção de isolados de fungos e nematoides entomopatogênicos visando ao controle da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) Kluger (Coleoptera; Cerambycidae)

Resumo

A erva-mate é uma cultura típica da região sul do Brasil, Argentina e Paraguai, tendo grande importância sócio-econômica e ambiental. Seu mercado encontra-se em expansão e é consumida em diversas partes do mundo. Com a escassez de ervas nativas, a cultura da erva-mate passou a ser cultivada em sistema de monocultivo, e como consequência alguns insetos tornaram-se pragas, sendo a broca, *Hedypathes betulinus*, a de maior expressão. Seu controle é baseado na poda dos ramos atacados e coleta de insetos, havendo perspectiva de uso do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.. A fim de incrementar o controle biológico na cultura, este trabalho visou selecionar em laboratório, isolados dos fungos entomopatogênicos, sendo 32 isolados de *B. bassiana* e 19 isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.. e também isolados de nematoides entomopatogênicos, da família Heterorhabditidae. O trabalho com fungos foi realizado em duas etapas, primeiramente avaliando a patogenicidade dos isolados, e posteriormente os melhores foram selecionados, avaliando-se a virulência e outros parâmetros biológicos (produção de fungos: crescimento vegetativo e produção de conídios em meio de cultura, arroz e em cadáveres de broca). Foram selecionados 3 isolados de *B. bassiana* (UNIOESTE 4, UNIOESTE 52 e UNIOESTE 64), destes destacando o isolado UNIOESTE 52, e um isolado de *M. anisopliae* (IBCB 352), este, causando a maior mortalidade confirmada. Devido à sazonalidade da broca da erva-mate, e a problemas na criação de nematoides, foram feitas apenas avaliações de patogenicidade, cujas mortalidades variaram de 0 a 75%, sendo o isolado NEPET 11, do gênero *Heterorhabditis* sp. o mais eficiente.

Palavras-chave: Controle microbiano, *Ilex paraguariensis*, controle biológico

Screening of entomopathogenic fungi and nematodes to control the borer of yerba mate (*Hedypathes betulinus*) Kluger (Coleoptera, Cerambycidae)

Abstract

Yerba mate is a typical culture of southern Brazil, Argentina and Paraguay, with socio-economic and environmental importance. Its market is expanding and is consumed in various parts of the world. Due the lack of native culture, yerba mate has become a monoculture, and as a consequence, insects have become problematic, like that causes further damage, the borer, *Hedypathes betulinus*. The control is based on the pruning of attacked branches and collection of insects, but there is very potential in the use of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. to control this insect. In order to improve biological control in the culture, this work aims to select in laboratory, isolates of fungi, being 32 isolates of *B. bassiana* (Bals.) Vuill and 19 isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., and also isolates of entomopathogenic nematodes of Heterorhabditidae family. The work with fungi was done in two steps, first evaluating the pathogenicity of the isolates, and subsequently the best were selected evaluating the virulence and other biological parameters (production of fungi: vegetative growth and conidial production in the middle of culture, rice and insects cadavers). It was selected three isolates of *B. bassiana* (UNIOESTE 4, UNIOESTE 52 e UNIOESTE 64), highlighting the *B. bassiana* isolate UNIOESTE 52, and one isolate of *M. anisopliae* (IBCB 352), this, causing the highest confirmed mortality. Due de seasonality of the borer, and problems with the nematodes creation, were made only pathogenic evaluation, whose mortality rates ranged from zero to 75%, being the isolate NEPET 11, of *Heterorhabditis* sp. the most efficient.

Keywords: microbiological control, *Ilex paraguariensis* , biological control

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Adultos, larvas e danos da broca da erva-mate.....	17
Figura 2.	Metodologia de aplicação de fungo.....	27
Figura 3.	Etapas de avaliação.....	28
Figura 4.	Mortalidade total acumulada de <i>Hedypathes betulinus</i> pelos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> após 8 dias de inoculação (cor clara) e 13 dias (cor escura).....	33
Figura 5.	Mortalidade total acumulada de <i>Hedypathes betulinus</i> pelos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> após 8 dias de inoculação (cor clara) e 13 dias (cor escura).....	34
Figura 6.	Adultos de <i>Hedypathes betulinus</i> mortos por fungos.....	36
Figura 7.	Nematoide pertencente à família Mermithidae.....	45
Figura 8.	Adultos de <i>Hedypathes betulinus</i> mortos por nematóides.....	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados, hospedeiro original e localização geográfica dos isolados de *Beauveria bassiana*.....24
- Tabela 2.** Isolados, hospedeiro original e localização geográfica dos isolados de *Metarhizium anisopliae*.....25
- Tabela 3.** Porcentagem de mortalidade total e confirmada de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) avaliados contra isolados de *Beauveria bassiana*.....32
- Tabela 4.** Porcentagem de mortalidade total e confirmada de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) avaliados contra isolados de *Metarhizium anisopliae*.....34
- Tabela 5.** Porcentagem média de mortalidade total de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) submetidos a diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase: 14h), 15 dias após o tratamento.....37
- Tabela 6.** Porcentagem média de mortalidade confirmada de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) submetidos a diferentes concentrações de conídios de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase: 14h), 15 dias após o tratamento.....38
- Tabela 7.** Diâmetro médio de colônias e produção de conídios dos isolados de *Beauveria bassiana* (*Bb*) e *Metarhizium anisopliae* (*Ma*) em meio-de-cultura (M.E.), 10 dias após inoculação ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase: 14h).....40

Tabela 8.	Produção de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ma) em arroz e cadáveres de <i>Hedypathes betulinus</i>	42
Tabela 9.	Porcentagem de mortalidade confirmada de adultos da broca da erva-mate (<i>Hedypathes betulinus</i>) testados contra isolados de nematóides entomopatogênicos.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 A Erva-Mate	13
2.2 <i>Hedypathes betulinus</i>	15
2.2.1 Descrição e Bioecologia.....	15
2.2.2 Importância e Danos.....	18
2.2.3 Controle de <i>H. betulinus</i>	18
2.2.4 Fungos Entomopatogênicos.....	29
2.2.5 Nematóides Entomopatogênicos.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Avaliação de Fungos Entomopatogênicos	22
3.1.1 Seleção de Isolados.....	22
3.1.2 Avaliação da Patogenicidade dos fungos.....	23
3.1.3 Comparação de Isolados	25
3.1.3.1 Virulência.....	25
3.1.3.2 Comparação de Parâmetros de Produção.....	29
3.1.3.2.1 Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios em Meio de Cultura.....	29
3.1.3.2.2 Produção de Conídios em Arroz e em cadáveres de Broca da erva-mate.....	29
3.2 Avaliação Nematóides Entomopatogênicos	30
3.2.1 Obtenção e Multiplicação dos Isolados.....	30
3.2.2 Seleção de Isolados de nematoides entomopatogênicos.....	31
3.3 Análises Estatísticas	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Avaliação de Patogenicidade dos Fungos	32
4.2 Comparação de isolados	37
4.2.1 Virulência.....	37
4.2.2 Comparação de parâmetros de produção.....	39
4.2.2.1 Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios em Meio de Cultura.....	39
4.2.2.2 Produção de Conídios em Arroz e em Cadáveres de Broca da erva-mate.....	41

4.3 Avaliação de nematoides entomopatogênicos.....	43
5 Conclusão.....	47
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) foi responsável por grande parte do desenvolvimento das regiões oeste e sudoeste do Paraná, na primeira metade do século XX, sendo explorada de ervais nativos. Devido ao seu crescente consumo e ao avanço da agricultura sobre a mata nativa, os ervais tornaram-se monocultura em sistemas adensados, favorecendo o desenvolvimento de populações de pragas, dentre elas, a broca, a ampola, ácaros e lagartas desfolhadoras.

Hedypathes betulinus (Klug), a broca da erva-mate, é a principal praga desta cultura. Suas larvas se alimentam internamente do tronco da árvore, construindo galerias que dificultam a circulação da seiva, causando o depauperamento dos galhos e da planta, podendo levar a mesma à morte.

Devido ao fato do maior consumo de erva-mate ser “*in natura*”, a legislação brasileira proíbe a utilização de qualquer produto fitossanitário na cultura, a fim de evitar resíduos que possam estar presentes no produto final.

Dentre as formas de controle possível, o método cultural com poda e catação de insetos é o mais utilizado, no entanto, torna-se pouco eficiente em ervais de grandes extensões, além de exigir grande quantidade de mão de obra.

Estudos são realizados há cerca de 15 anos, os quais mostram o potencial do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.. Contudo, a grande variação na virulência dos seus isolados, bem como no potencial de outros entomopatógenos, sugerem a necessidade de estudos prospectivos, no sentido de se obter espécies e isolados virulentos e com alta produtividade em meios de cultura.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar novos isolados dos fungos *B. bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e isolados de nematóides entomopatogênicos Heterorhabditidae, que possuam elevada atividade inseticida contra a broca-da-erva-mate, contribuindo para o desenvolvimento de produtos comerciais para o controle da broca na cultura, e também para a implementação de um programa de manejo integrado de pragas em erva-mate, bem como seu desenvolvimento sustentável no Brasil e em outros países da América do Sul, do ponto econômico, social e ambiental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Erva-Mate

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil. – Aquifoliaceae), é uma espécie de origem sul-americana, comum na vegetação nativa da 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 desempenha 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 e AGOSTINI, 2008).

A infusão de erva-mate é um hábito antigo, herdado dos indígenas que habitavam a região denominada de Cone Sul da América Latina, tradicionalmente constituído por Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai (WINGE et al., 1995). Com a chegada dos colonizadores, estes passaram a explorar economicamente os ervais nativos e posteriormente, dominando técnicas de plantio, passaram cultivá-los. Criou-se assim, um considerável aparato empresarial envolvendo a produção, beneficiamento, transporte e comercialização da erva-mate (LEITE, 2003; PASSINATO; 2003).

A família Aquifoliaceae possui apenas três gêneros, amplamente distribuídos nas zonas temperadas de ambos os hemisférios, dentre eles, o gênero *Ilex* se destaca na América do Sul com mais de 600 espécies. No entanto, somente três são exploradas comercialmente, sendo: *I. angustifolia*, conhecida como erva-mate Periquita; *I. amara*, também chamada de crioula, por ser mais amarga e a *I. paraguariensis* St. Hil., também conhecida como erva-mate argentina, que é a mais cultivada no Brasil, no Paraguai e Argentina (ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE, 2000; LORENZI, 2002; JOLY, 2005).

A erva-mate, em estado natural, é uma espécie umbrófila, de crescimento lento ou moderado, típica das florestas maduras, onde pode atingir densidade de centenas de indivíduos por hectare (SOARES; IEDE, 1997; BORGES et al., 2003). Devido a estas características, tradicionalmente foi explorada de árvores nativas, sem qualquer preocupação com a disponibilidade de matéria-prima. Desta forma, uma grande expansão agrícola nos últimos 40 anos, modificou a paisagem levando

escassez de erva-mate, assim passando a ser cultivada em consorciamento com pastagens e culturas anuais, ou em monocultivo (ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE 2000; MAZUCHOWSKI, 2000; CHIARADIA et al., 2002).

De acordo com o levantamento realizado pelo IBGE, em 2009 a produção anual de erva-mate na região sul do Brasil foi de 218.102 mil t, sendo o estado do Paraná responsável por 71,8% desse total (156.563mil t) com receita em torno de R\$ 86 milhões (IBGE, 2010).

Essa espécie é utilizada para a produção de bebidas (chimarrão, tererê, refrigerantes e chás), possuindo grande potencial para muitas aplicações industriais como: corante, conservante de alimentos, produtos de higiene e cosméticos, além de ser rica em vitaminas A, B1, B2 e C, sais minerais, alumínio, cálcio, fósforo, aminoácidos essenciais, glicídios e lipídeos (MACCARI e MAZUCHOWSKI, 2000 *apud* BRONDANI et al., 2007, VELLOSO e ROCHA, 2007).

Sob o aspecto sócio-econômico, a 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, sendo associada notadamente aos pequenos produtores. 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, gerando cerca de R\$ 180 milhões/ano no Brasil (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).

Nesse sentido, Borges (2003) verificou que quando comparados os sistemas de cultivo da erva-mate, o tipo nativo apresenta menor incidência de pragas que o tipo adensado. De acordo com Soares (1998), quando as erva-mates são cultivadas em pleno sol ficam sujeitas a estresses fisiológicos, dentre outros fatores como a simplificação do ambiente, que as predispõe ao aparecimento de pragas e doenças.

Assim, Iede e Machado (1989) relatam mais de uma centena de espécies de insetos associados à erva-mate, das quais se destacam cinco que ocorrem em níveis populacionais mais elevados e causam danos sérios às plantas, sendo consideradas pragas da cultura: a cochonilha de cera (*Ceroplastes grandis* Hempel),

lagartas (*Thelosia camina* Schaus e *Hylesia* sp.), ampola (*Gyropsylla spegazziniana* Lizer e Trelles) e a broca (*H. betulinus*), sendo esta última a de maior expressão, pelas perdas econômicas impostas sendo considerada a praga chave para o cultivo (SOARES, 1998).

2.2 Hedypathes betulinus

2.2.1 Descrição e Bioecologia

A broca da erva-mate, *Hedypathes betulinus* ou corintiano, é um besouro do grupo dos serra-paus, pertencente à família Cerambycidae (PENTEADO, 1995).

As larvas são ápodas, brancas e broqueiam longitudinalmente os ramos e tronco das plantas, impedindo a circulação da seiva, resultando no depauperamento das mesmas. As larvas, pela forma com que se alimentam deixam para trás, uma serragem, que serve de proteção, mas também denuncia sua presença, uma vez que esta serragem é expelida para fora do tronco, por um orifício feito pela própria larva e previamente à pupação, a larva constrói uma câmara, onde permanece até a emergência do adulto (PENTEADO, 1995; BRANDÃO FILHO, 1945 *apud* GUEDES et al., 2000; MALLMANN et al., 2001).

O adulto da broca mede aproximadamente 25 mm de comprimento. O corpo apresenta coloração geral preta, sendo recoberto em quase toda a sua superfície por pelos brancos. Na parte mediana dos élitros, ocorrem manchas escuras que se caracterizam pelo formato de "M". As antenas são longas e finas, apresentando de forma alternada manchas claras e escuras (SOARES, 1998).

Os adultos se alimentam da casca dos ramos e até mesmo da casca das brotações que apresentam uma coloração arroxeada. Os machos costumam roer o pecíolo das folhas, determinando a queda dessas. Algumas fêmeas, após a postura, alimentam-se das raízes finas que afloram à superfície do solo, no entanto, não há relatos das fêmeas alimentando-se da casca do tronco junto ao solo, ou dos brotos ladrões (SOARES, 1998; GUEDES et al., 2000). Os maiores danos, por causa da alimentação, ocorrem em galhos de diâmetro entre 30 e 40 mm, sendo as fêmeas mais vorazes que os machos (GUEDES et al., 2000).

Em estudos sobre a biologia de *H. betulinus* em condições controladas de laboratório, Cassanello (1993) descreveu o ciclo evolutivo durando em média 318

dias. Observando ainda, a longevidade média de 100 dias para os indivíduos adultos, concluindo assim, o ciclo de vida completo com aproximadamente 420 dias.

Já em estudos a campo, Soares (1998) observou um ciclo evolutivo, mensurado da postura dos ovos até a emergência de adultos de mais de 500 dias, com a longevidade dos indivíduos adultos de 294 dias para machos e 133 para fêmeas superando os dados de longevidade de adultos obtidos por Cassanello (1993) que foi de 148 dias para machos e 101 para fêmeas.

Quanto aos aspectos reprodutivos de *H. betulinus*, Cassanello (1993) observou fecundidade média de 95 ovos, para fêmeas obtidas em laboratório, sendo de 3,18 o número médio de ovos por postura, chegando a uma média total de 31 posturas durante todo o período reprodutivo; nas fêmeas emergidas de larvas coletadas em campo, a fecundidade média foi de 116,50 ovos, e o número médio de postura 30,25 durante o seu período reprodutivo. A fertilidade dos ovos das fêmeas do grupo 1 foi de 81,57% e do grupo 2 foi de 83,16%.

As posturas são feitas preferencialmente na região do colo da planta, podendo também ocorrer nas raízes expostas e brotos ladrões. Para a realização das posturas, há preferência por galhos com diâmetros de aproximadamente 15-20mm. A fêmea, após ter escolhido o local apropriado para a postura, prepara uma cavidade com suas mandíbulas, de aproximadamente 2-3mm de profundidade, perpendicular ao sentido do galho. Ao término dessa operação, a fêmea realiza um giro de 180° e com o seu ovopositor introduz apenas um ovo na fenda. Para o fechamento da cavidade, a fêmea volta à posição inicial e fez uma mistura de casca com lenho, cobrindo totalmente o ovo. Há também relatos de oviposições em fendas naturais, existentes na casca do galho escolhido pela fêmea (CASSANELLO, 1993; SOARES, 1998; GUEDES et al., 2000).

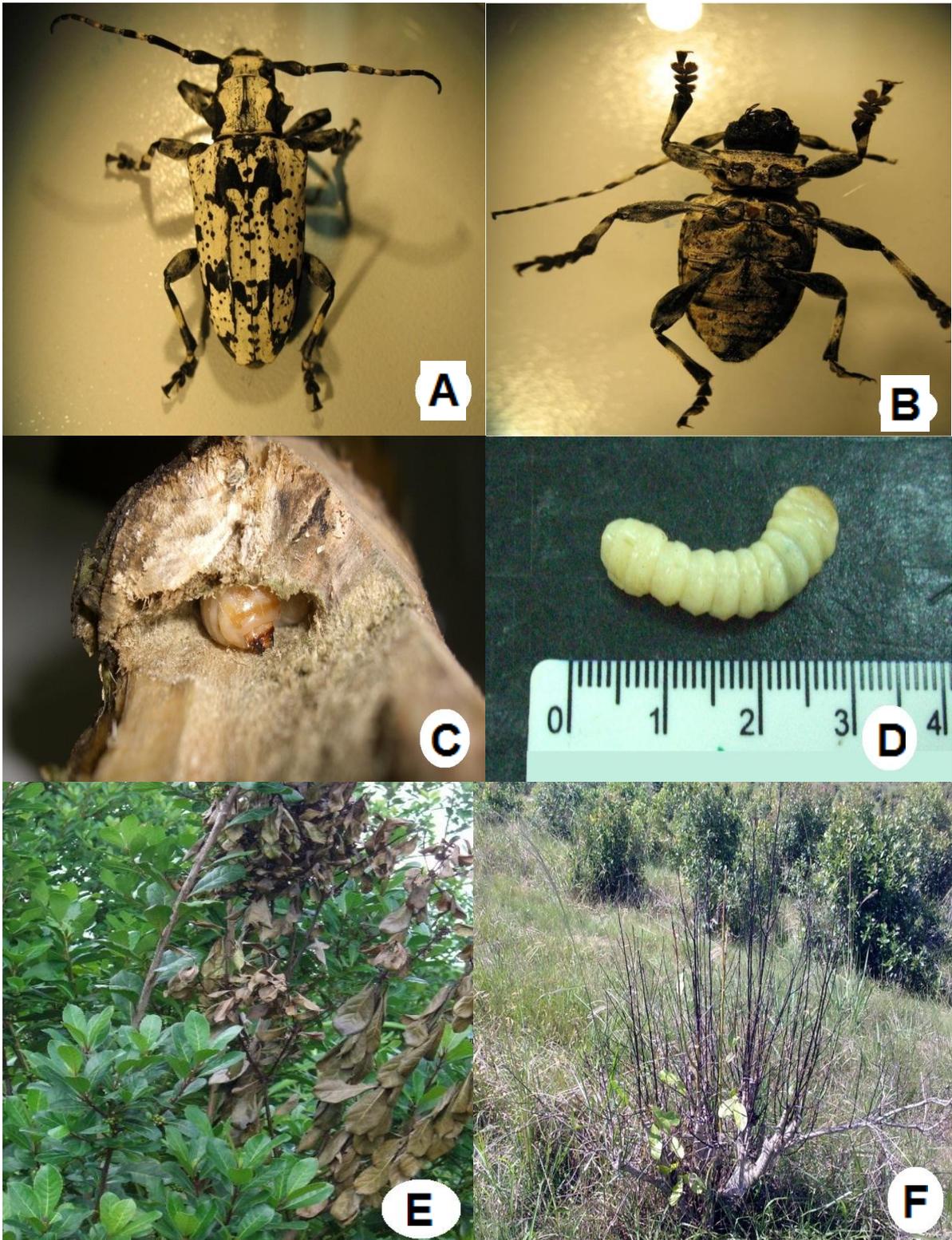


Figura 1. Adultos, larvas e danos da broca da erva-mate: **A** – Adulto de *Hedypathes betulinus* (dorsal); **B** – Ventral. **C** – Larva de *H. betulinus* em galeria realizada no tronco de *I. paraguariensis*. **D** – larva em detalhe. **E** – Sintoma de erva-mate atacada. **F** – erva-mate morta por ataques sucessivos. (Fotos: André L.P. Fanti)

2.2.2 Importância e Danos

Sendo a principal praga desta cultura, podem afetar 50-60% das plantas, reduzindo drasticamente a produtividade, sendo esta consequência do desequilíbrio ambiental causada pela implantação de monoculturas (D'ÁVILA, 2006).

Os danos mais severos são ocasionados pelas larvas, que recém-eclodidas, iniciam sua alimentação construindo galerias sub-corticais, longitudinais ascendentes, chegando ao lenho das plantas, impedindo a circulação da seiva, resultando o depauperamento da erva. Próximo à fase pupal, a larva desce até próximo ao colo da planta e constrói uma galeria anelar, fragilizando esta região, fazendo com que as plantas se quebrem à ação dos ventos, causando a mortalidade das árvores. Desta forma, além de danificarem a planta, facilita a entrada de fitopatógenos, e podem levar a planta à morte, dependendo do grau de comprometimento da mesma (PENTEADO, 1995; LEITE, 2006).

Como ataca planta em produção, todo o investimento feito é perdido, pois a planta tem de se recuperar, o que reduz a produção de biomassa. Além disso, por ser uma praga que ocorre todos os anos seguidamente, não há como mensurar as perdas, dificultando estimar o valor das mesmas.

2.2.3 Controle de *H. betulinus*

Como ocorre para todas as pragas da erva-mate, não há produtos registrados para o controle de pragas nessa cultura (AGROFIT, 2011).

Em estudo sobre a ecologia química da broca da erva-mate, Fonseca (2010) apresenta dados que demonstram que a comunicação entre *H. betulinus* é mediada pela combinação de um feromônio sexual produzido pelo macho e um feromônio de contato produzido pela fêmea, abrindo a possibilidade de armadilhas com aplicações para o controle da broca.

Contudo, dada à natureza perene da erva-mate e seu porte arbóreo/arbustivo, o controle biológico natural da praga na cultura é fortemente exercido por inúmeros inimigos naturais. Segundo Soares (1998), especificamente em relação à broca, desde 1929 há relatos da ocorrência de inimigos naturais sobre adultos em condições naturais em ervais no estado do Paraná.

Especificamente em relação à broca, dentre os seus principais inimigos naturais, destaca-se o parasitóide de ovos, *Eurytoma* sp. (Hymenoptera: Eurytomidae), que é citado por Penteado (1995), apresentando um parasitismo de 42%, e posteriormente Soares et al (1995), um parasitismo de 56%.

Também, Soares & Iede (1997) relatam a presença de formigas do gênero *Pheidole* e *Solenopsis* predando ovos do besouro, além de percevejos da família Pentatomidae (*Alcaeorrhynchus grandis*, *Brontocerus tabidus* e *Tynacantha marginata*) e da família Reduviidae (*Arilus carinatus* e *Apiomerus* sp.) predando adultos do besouro.

Graf e Marzagão (1999) descrevem a ocorrência do parasitóide *Labena fiorii* em larvas de *H. betulinus*, presentes em galhos de erva-mate, que continham galerias com larvas e pupas do hospedeiro e do parasitóide.

Em uma experiência, após ouvir relatos de pequenos produtores, Mallmann et al (2001) avaliou a utilização de galinhas-d'angola, dispersas em ervais, como predadores do besouro. O pesquisador relata que o ataque com maior eficiência, é de quando a fêmea de *H. betulinus*, desce próximo à raiz da planta para realizar a postura dos ovos, tornando-se uma presa fácil.

Além de predadores e parasitóides, Soares et al. (1995) relataram a ocorrência natural dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., em adultos de *H. betulinus* em erval no município de Ivaí, PR. Para esses autores, quando esses fungos são adequadamente veiculados e aplicados, podem apresentar elevado potencial de controle, baixo impacto ambiental e poucos resíduos no produto. Além disto, podem permanecer ativos por longos períodos no ambiente cultivado.

2.2.4 Fungos Entomopatogênicos

Diferentes de outros patógenos, os fungos causam infecção nos insetos não apenas pela ingestão, mas principalmente pela penetração via tegumento e espiráculos, o que os coloca em vantagem em relação às bactérias e vírus (cuja penetração ocorre apenas via oral) e sua utilização em diversas culturas é bastante promissora (ALVES, 1998a).

Em erva-mate, há registros de epizootias naturais com *B. bassiana* em diversas ordens de insetos da cultura. Estudos em laboratório para o controle de *H.*

betulinus, Ribeiro (1993) utilizando cinco linhagens de *B. bassiana* isoladas de insetos encontrados na erva-mate, obtiveram resultados de 69,6% de infectividade em adultos e de 93% em larvas.

Especificamente em relação à broca da erva-mate, Pagliosa (1994) testou cinco isolados do fungo *B. bassiana* (RF 785, 2629, CG152, CG 212 e ESALQ-447), a fim de verificar a patogenicidade do mesmo contra adultos da broca. Os insetos foram imersos em suspensões de conídios, na concentração de $2,2 \times 10^8$ conídios/mL e foi obtida mortalidade máxima de 73,4% com o isolado CG 152, e a mínima com o isolado CG 212 (45,1%).

A constatação em campo, da ocorrência natural de *B. bassiana* e de *M. anisopliae* sobre adulto da broca fez com houvesse um incremento nos estudos de avaliação de isolados de *B. bassiana*, com resultados considerados promissores (SOARES & IEDE, 1995; LEITE et al., 1998).

Posteriormente, estudos também foram realizados usando, além de isolados de *B. bassiana*, também *B. brongniartii*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces* sp., sendo os isolados CG716 e BB01 de *B. bassiana* os de melhor desempenho, causando mortalidade próxima a 100%. Por outro lado, os isolados CG100 (*M. anisopliae*), CG72 (*B. brongniartii*) e CG25 (*B. bassiana*) não diferiram estatisticamente da testemunha, mostrando uma baixa eficiência (LEITE et al., 2000, 2005, 2006).

Estudos em campo realizados por Leite et al. (2003) com o isolado CG716 de *B. bassiana* formulado em óleo, para o controle da broca da erva-mate, aplicando no tronco das erva-mates, mostraram cerca de 70% de eficiência, com tempo letal próximo a 30 dias.

Mais recentemente, Borges et al. (2007) desenvolveram um estudo de campo com o objetivo de avaliar o desempenho de uma formulação tipo óleo emulsionável à base de *B. bassiana* para o controle da broca. Verificou-se que as aplicações resultaram em uma redução significativa na intensidade do ataque da broca à erva-mate, quando feitas nos meses de pico populacional da praga, novembro e fevereiro.

Nos últimos anos, a empresa Novozymes Turfal em parceria com a Embrapa Florestas vem desenvolvendo o bioinseticida Bovemax® a base de *B. bassiana*, com objetivo de controlar a broca da erva-mate. O produto, que atualmente está em fase de registro, é formulado em óleo, que proporciona maior adesão dos esporos do fungo à cutícula do inseto e também proteção contra raios UV. A concentração deste

produto é de 1×10^7 conídios/mL e sua eficiência em campo fora testada com sucesso, recomendando duas aplicações anuais (fevereiro e novembro) (BORGES, 2007; GOMM, 2010). Além disso, Leite (2011) testou a transmissibilidade do produto Bovemax®, entre os indivíduos adultos, comprovando que o fungo é transmitido por contato, aumentando sua eficiência no controle da broca da erva-mate.

2.2.5 Nematóides Entomopatogênicos

Os nematoides entomopatogênicos mostram-se promissores no controle biológico de pragas por apresentarem vantagens quando comparados a outros entomopatógenos, como: resistência a vários defensivos agrícolas; ação sinérgica com outros entomopatógenos; capacidade de adaptação a novos ambientes; busca de hospedeiro; não causam danos a plantas; podem se reproduzir sem a presença de machos; podem ser aplicados em vários locais, desde que se observem as condições mínimas exigidas por eles, pois não são nocivos a nenhum outro grupo de animais, incluindo o homem (FERRAZ, 1998, LEWIS, et al., 2006).

Alguns nematóides apresentam associação mutualística com bactérias, sendo que os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* vivem associados a bactérias do gênero *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente. Estas bactérias não formam esporos, portanto são encontradas somente nesses nematóides ou em cadáveres de insetos infectados, visto que não apresentam formas resistentes em condições ambientais (FERRAZ, 1998).

Nessa relação, os nematóides contribuem fornecendo proteção às bactérias fora do corpo do inseto e atuam no transporte destas, entre um inseto já morto à hemocele de outro vivo. Já as bactérias causam a morte do inseto e digerem os tecidos do inseto, os quais o nematóide utiliza como alimento. Os nematóides penetram em seus hospedeiros através dos espiráculos, boca e ânus, podendo também penetrar pelo tegumento. Chegando a hemocele do inseto, liberam as bactérias, as quais se multiplicam rapidamente, levando o hospedeiro ao óbito por septicemia (FERRAZ, 1998).

Considerando não haver relatos da ocorrência natural de nematóides entomopatogênicos em *H. betulinus*, ALVES et al. (2009) demonstraram a suscetibilidade do inseto a nematóides do gênero *Steinernema*, obtendo 80% de

mortalidade em apenas 10 dias de tratamento, abrindo a perspectiva de utilização para este potencial grupo de entomopatógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação de Fungos Entomopatogênicos

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biotecnologia Agrícola da Unioeste, *Campus* de Cascavel, PR, sendo os insetos obtidos em plantação comercial de erva-mate localizada em Ivaí-PR, e mantidos em gaiolas teladas com 60 cm de altura x 40 cm de largura x 40 cm de comprimento, contendo ramos de erva-mate, até a instalação dos experimentos, por um período não superior a 7 dias, conforme trabalho desenvolvido por ALVES et al. (2009).

Para a instalação dos experimentos, foram selecionados insetos que encontravam-se íntegros, com movimentação e respostas normais a estímulos (SOARES, 1998).

Os isolados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram obtidos de coleções oficiais do Instituto Biológico e da Unioeste, e foram mantidos sob refrigeração (-10 °C) em forma de micélios e conídios. O isolado CG 716 foi utilizado como padrão por ter sido previamente selecionado para o controle da broca (LEITE, 2003).

3.1.1 Seleção de Isolados

A seleção foi constituída por duas fases, sendo a primeira, na qual todos os isolados foram avaliados contra o inseto e na segunda, os melhores isolados foram comparados entre si, em diversos parâmetros biológicos, conforme trabalho desenvolvido por Rohde et al (2006).

3.1.2 Avaliação da Patogenicidade dos fungos

Os isolados foram multiplicados em meio de cultura para produção de conídios (M.E.) (Alves et al., 1998b), em placas de Petri, incubados em câmara B.O.D. (26 ± 1 °C, 14h de fotofase), por um período de 7 a 10 dias para crescimento vegetativo e conidiogênese (Tabelas 1 e 2). Após este período, os conídios foram coletados, por meio de raspagem da superfície do meio de cultura armazenando-os a -10 °C em tubos de vidro fechados com filme de PVC transparente, por um período não superior a 15 dias.

No momento da instalação dos experimentos, os conídios foram suspensos em água destilada + Tween 80 a 0,01% e procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer para estimar a concentração da suspensão. Em seguida, foram preparadas suspensões contendo 1×10^8 conídios/mL (ALVES et al., 1998).

A inoculação foi feita adaptando-se a metodologia de LEITE (1998), imergindo individualmente 30 insetos adultos nas suspensões por 5 segundos, transferindo-os para placas de Petri com o fundo recoberto por papel-filtro para retirar o excesso da suspensão de fungo. Em seguida, foram individualizados em copos plásticos contendo um ramo de erva-mate fechados com tampa plástica perfurada. Cada inseto foi considerado uma repetição e da mesma forma, foi feito para a testemunha, na qual os insetos foram imersos apenas em água destilada + Tween 80 0,01%. (Figura 3).

Os insetos foram mantidos em condições controladas (26 ± 1 °C e 14h de fotofase) e diariamente procedeu-se a avaliação, durante 15 dias, sendo os insetos mortos retirados, desinfestados por imersão em solução alcoólica 70% e água destilada, e mantidos em câmara úmida para confirmação da mortalidade por fungo, nas mesmas condições citadas (Figura 4).

Foram avaliados 50 isolados de fungos, sendo 32 isolados de *B. bassiana* (Tabela 1) e 18 isolados de *M. anisopliae* (Tabela 2). Os isolados que causaram as melhores médias de mortalidade foram selecionados para a etapa posterior.

Tabela 1. Isolados, hospedeiro original e localização geográfica dos isolados de *Beauveria bassiana*.

Isolado	Hospedeiro original/substrato	Localização geográfica
CG 716	<i>Hedypathes betulinus</i>	Ivai - PR
IBCB 15	Solo	Aral Moreira - SP
IBCB 301	Solo	Ribeirão Preto - SP
IBCB 31	<i>Nezara viridula</i>	Piracicaba - SP
IBCB 34	Solo	Aral Moreira - SP
IBCB 365	Solo	Matão - SP
IBCB 527	Solo	Jaguariúna - SP
IBCB 614	<i>Epachoplon cruciatum</i>	Coronel Macedo - SP
IBCB 615	<i>E. cruciatum</i>	Coronel Macedo - SP
IBCB 88	<i>Leptopharsa heveae</i>	Itiquira - MT
UNIOESTE 2	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Cascavel – PR
UNIOESTE 25	Solo	Cascavel – PR
UNIOESTE 26	Solo	Cascavel – PR
UNIOESTE 37	<i>Bombyx mori</i>	Arapongas - PR
UNIOESTE 38	<i>B. mori</i>	Ibaiti - PR
UNIOESTE 39	<i>Cosmopolites sordidus</i>	São Miguel do Iguazu - PR
UNIOESTE 4	<i>A. diaperinus</i>	Cascavel – PR
UNIOESTE 44	Pentatomidae	Toledo - PR
UNIOESTE 45	<i>Astylus variegatus</i>	Mal. Cândido Rondon - PR
UNIOESTE 46	<i>Euschistus heros</i>	Cascavel - PR
UNIOESTE 48	<i>A. diaperinus</i>	Cascavel – PR
UNIOESTE 49	<i>A. diaperinus</i>	Cascavel – PR
UNIOESTE 52	<i>A. diaperinus</i>	Boa Vista de Aparecida - PF
UNIOESTE 53	<i>A. diaperinus</i>	Cascavel - PR
UNIOESTE 55	<i>A. diaperinus</i>	Cascavel - PR
UNIOESTE 56	<i>Anthonomus grandis</i>	Cascavel - PR
UNIOESTE 59	<i>A. diaperinus</i>	Cascavel – PR
UNIOESTE 60	Chrysomelidae	Catanduvas - PR
UNIOESTE 62	<i>A. diaperinus</i>	Cascavel – PR
UNIOESTE 64	<i>H. betulinus</i>	Cascavel – PR
UNIOESTE 65	<i>A. grandis</i>	Cascavel – PR
UNIOESTE 69	<i>H. betulinus</i>	Ivaí – PR

Tabela 2. Isolados, hospedeiro original e localização geográfica dos isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Isolados	Hospedeiro original ou substrato	Localização Geográfica
IBCB 121	Solo	Tabapuã - SP
IBCB 156	Solo	Cascavel - PR
IBCB 167	Solo	Cascavel - PR
IBCB 185	Solo	Cascavel - PR
IBCB 352	Solo	Valparaíso - SP
IBCB 353	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Valparaíso - SP
IBCB 380	<i>M. fimbriolata</i>	Água Branca - SP
IBCB 383	<i>M. fimbriolata</i>	Água Branca - SP
IBCB 410	Solo	Iporanga - SP
IBCB 417	Solo	Iporanga - SP
IBCB 418	Solo	Iporanga - SP
IBCB 478	Solo	Mogi das Cruzes - SP
IBCB 482	Solo	Campinas - SP
IBCB 52	Cigarrinha	Conquista - MG
IBCB 545	Solo	Pindamonhagaba - SP
IBCB 59	Cigarrinha	Conceição das Alagoas - MG
SLP 358	<i>Anthonomus grandis</i>	Piracicaba - SP
UNIOESTE 22	Solo	Cascavel - PR

3.1.3 Comparação de Isolados

Os isolados selecionados previamente, bem como o isolado CG716 considerado padrão de comparação, foram novamente multiplicados como descrito no item 3.1 para serem comparados simultaneamente entre si quanto à virulência e em outros parâmetros biológicos.

3.1.3.1 Virulência

Foram adotados os mesmos procedimentos descritos no item 3.1.2, porém, para cada um dos isolados selecionados foram preparadas suspensões em água destilada + Tween 80 0,01% com cinco concentrações distintas, sendo elas: 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 e 1×10^7 conídios/mL e para cada uma delas foram utilizados 60 insetos adultos, divididos em quatro repetições de 15 insetos cada. Os dados

obtidos foram submetidos à análise de Probit para estimar a concentração letal que mata 50% da população (CL_{50}), utilizando o programa Polo Plus.

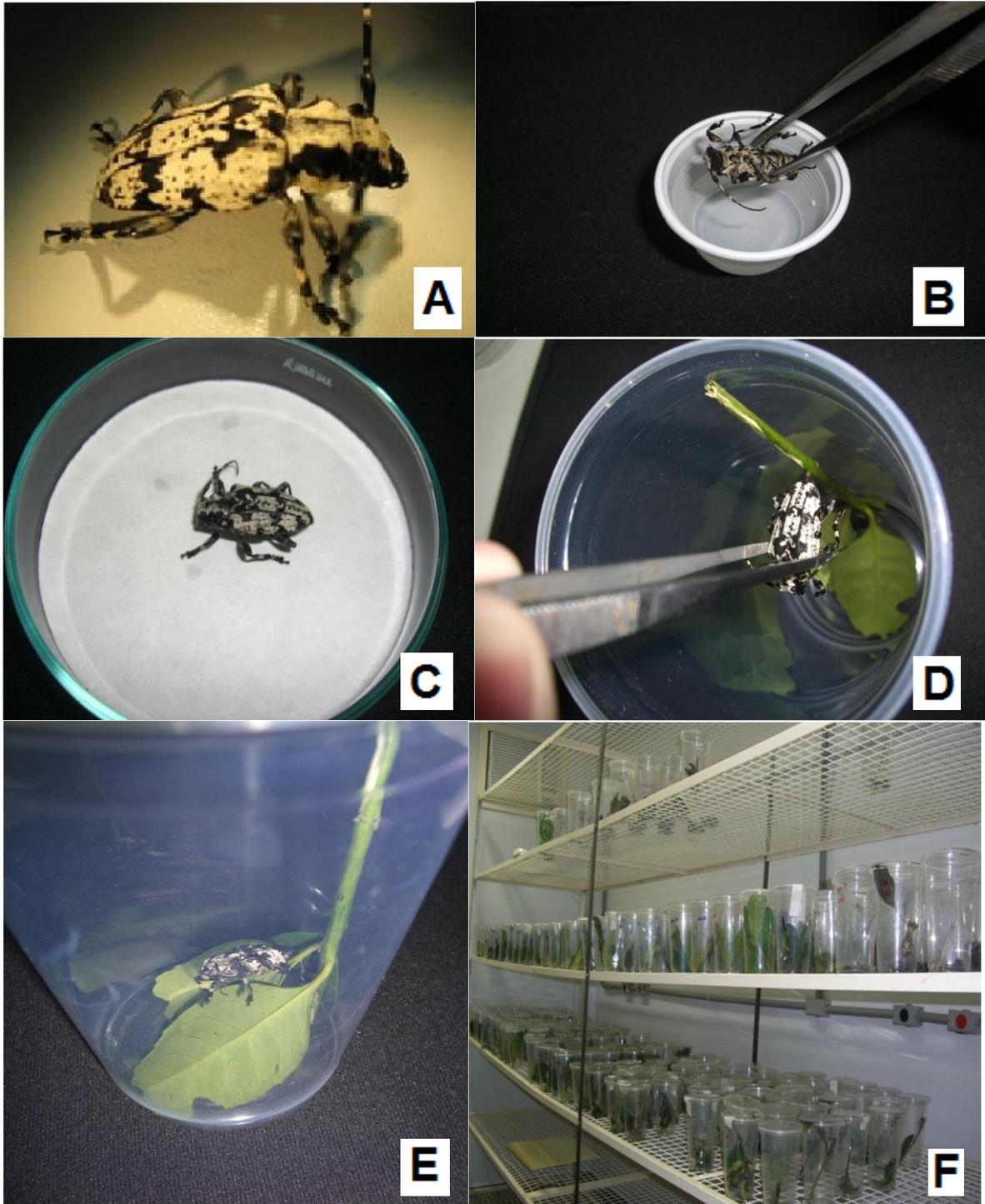


Figura 2. Metodologia de aplicação de fungo. **A** – Adulto de *Hedypathes betulinus*. **B** – Imersão da broca na suspensão fungica. **C**, – Sobre papel filtro para retirar o excesso da suspensão de conídios do fungo. **D**, **E** – Individualizados em copos plásticos contendo um ramo de erva-mate. **F** – Sala de incubação ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e 14h de fotofase). (Fotos: André L.P. Fanti)

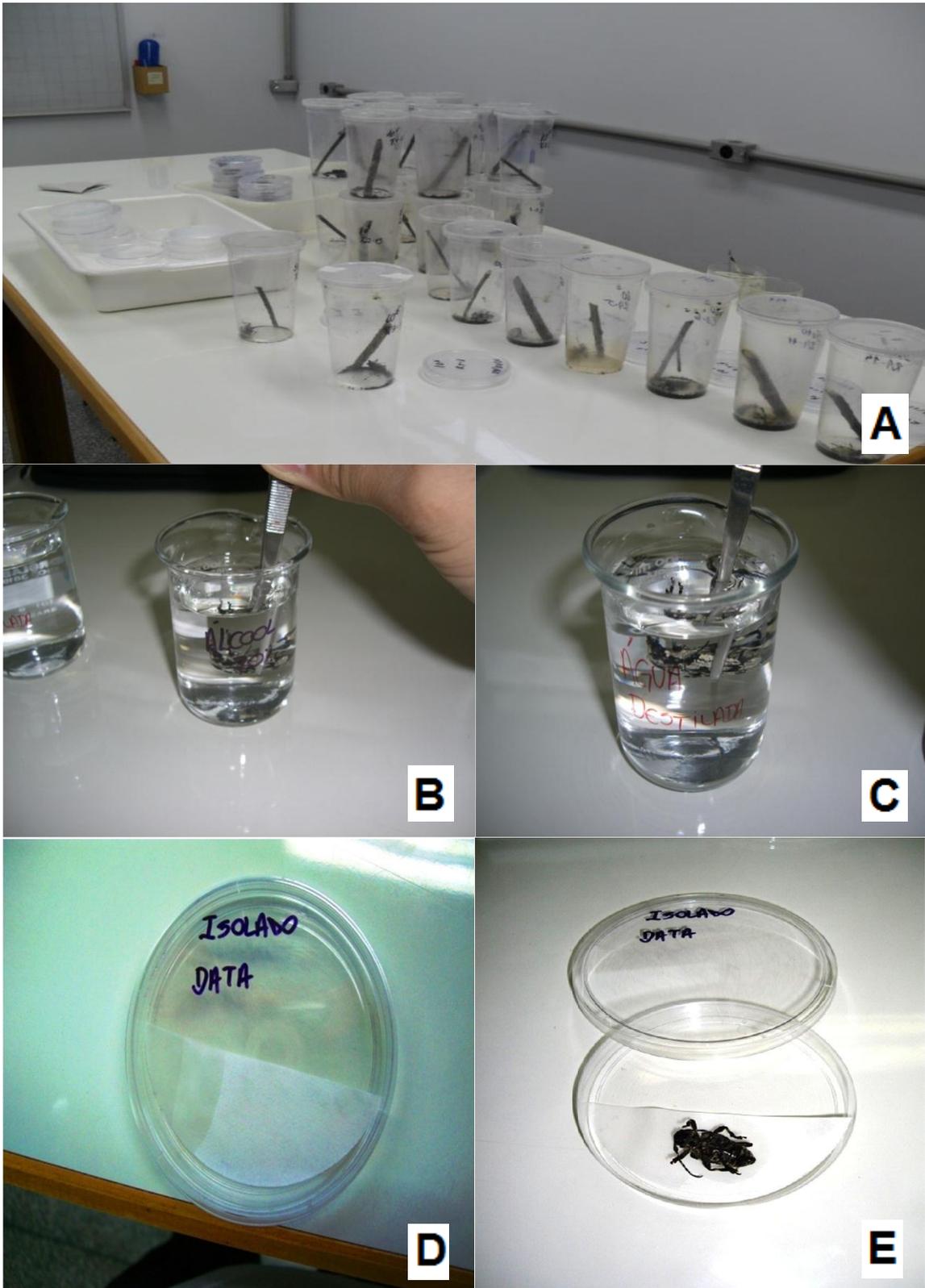


Figura 3. Etapas de avaliação. **A** – Brocas mortas e separadas. **B** – Imersão em solução alcoólica 70%. **C** – Imersão em água destilada, **D**, **E** – Câmara úmida para confirmação da mortalidade por fungo. (Fotos: André L.P. Fanti)

3.1.3.2 Comparação de Parâmetros de Produção

3.1.3.2.1 Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios em Meio de Cultura

Os isolados foram inoculados em três pontos na superfície do ME em placas de Petri, e incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 14h de fotofase. Após 10 dias, foi avaliado o tamanho das colônias por meio de duas medições perpendiculares, determinando-se o diâmetro médio. Para cada isolado foram preparadas três placas, sendo cada colônia considerada uma repetição.

Após a avaliação do crescimento vegetativo, as colônias foram recortadas do meio de cultura, na linha terminal do halo da colônia e individualizadas em tubos de vidro de fundo chato com 10 mL de água destilada e Tween 80 a 0,01%. Os conídios foram removidos com o auxílio de um pincel, e em seguida, os tubos a submetidos ação de vórtex por um minuto. A quantificação dos conídios foi feita em câmara de Neubauer.

3.1.3.2.2 Produção de Conídios em Arroz e em Cadáveres de Broca da Erva-Mate

A avaliação da produção de conídios em arroz foi realizada utilizando o método do Biomax® (Alves e Pereira 1998a). Para tal, sacos de polipropileno, contendo 100 g de arroz polido e pré-cozido por três minutos em água fervente, foram autoclavados por 15 min a 120°C . Após o resfriamento, foi realizada a inoculação (5ml de suspensão de conídios numa concentração de 1×10^8 conídios/mL, produzidos em meio de esporulação), sendo que para cada isolado foram preparadas três repetições. Os sacos foram incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 14h de fotofase durante sete dias, quando foram abertos e seu conteúdo exposto a um fluxo de ar em bandejas de plástico, em uma câmara asséptica por quatro dias, sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 24h de fotofase. Em seguida, efetuou-se a quantificação de conídios, individualizando 1 g de cada repetição em tubos de vidro de fundo chato com 10 mL de água destilada e Tween 80 a 0,01%, contando-os em câmara de Neubauer.

Para estimar a produção de conídios em cadáveres de broca, para cada um dos isolados, na concentração de 1×10^7 conídios/mL, foram selecionados 12 adultos

mortos e que apresentavam o corpo recoberto por conídios, sendo individualizados em tubos de vidro de fundo chato com 10 mL de água destilada e Tween 80 a 0,01%.

Em seguida, os conídios da superfície dos insetos foram removidos com auxílio de pincel, a suspensão foi agitada em vórtex durante um minuto e quantificada em câmara de Neubauer.

3.2 Avaliação de Nematóides Entomopatogênicos

3.2.1 Obtenção e Multiplicação dos Isolados

De forma a ampliar o conhecimento acerca da atividade de nematóides entomopatogênicos sobre adultos da broca da erva-mate, com base nos trabalhos de Quadros (2008) e Alves et al. (2009), foram desenvolvidos experimentos com isolados de nematóides fornecidos pela UENP (Universidade Estadual Norte Paranaense), obtidos em diferentes regiões do Brasil e também de outros países. A multiplicação dos nematóides foi feita em larvas da traça-dos-favos, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), criadas em dieta artificial e incubadas em câmara climatizada ($27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

Assim, adotando-se a metodologia descrita por POINAR (1979), larvas de último ínstar de *G. mellonella* foram infectadas com juvenis infectivos (JIs), por meio do sistema de infecção tópica, aplicando-se 2 mL de suspensão na concentração de 100 JIs/larva em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 10 larvas. Após a infecção, as larvas foram incubadas em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 dias, no escuro, e posteriormente transferidas para câmara seca, onde ficaram por mais 5 dias. Após esse período, os nematóides foram coletados em armadilhas de White sob as mesmas condições. Os JIs emergidos foram mantidos a 26°C em um béquer com água destilada com aeração fornecida por um compressor de ar, por no máximo cinco dias, até a realização do experimento.

3.2.2 Seleção de Isolados de nematoides entomopatogênicos

A metodologia descrita por ALVES et al. (2009) baseou-se na preparação de 40 recipientes plásticos de 400 mL divididos em 4 repetições, fechados com tampa plástica perfurada, contendo ramos de erva-mate para a alimentação da broca e 150g de areia em seu interior.

Na areia, foram feitas aplicações da suspensão de nematóides, na concentração de 100 JIs/cm², mediante contagem prévia. Após a aplicação da suspensão, foi adicionada água destilada e esterilizada em cada recipiente de forma a se obter 20% de umidade no substrato.

Em seguida, os insetos foram liberados individualmente sobre o ramo. Na testemunha, a areia foi tratada apenas com água destilada na quantidade necessária para se obter a umidade desejada.

Os recipientes foram fechados e mantidos em 26±1 °C e fotoperíodo de 14 h. As avaliações foram feitas diariamente, por 15 dias e os insetos mortos foram transferidos para câmara seca, constituída por placas de Petri contendo papel-filtro seco no fundo e mantidos nas mesmas condições por 5 dias. Após esse período, foram aplicados 2mL de água destilada na superfície do papel e após 24 h verificava-se a presença de nematóides no inseto. Quando necessário, os insetos foram dissecados para confirmar a presença de nematóides nos cadáveres.

3.3 Análises Estatísticas

Os dados obtidos em cada um dos experimentos foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey (P<0,05), segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 1992). Os dados obtidos na etapa 3.1.3.1, foram submetidos à análise de Probit para estimar a concentração letal que mata 50% da população (CL₅₀), utilizando o programa Polo Plus.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação de Patogenicidade dos Fungos

Nesta primeira etapa, além do isolado padrão CG 716, destacaram-se os isolados de *B. bassiana*, UNIOESTE 4, UNIOESTE 52 e UNIOESTE 64, cuja mortalidade manteve-se igual ou acima de 90%, sendo estes selecionados para a etapa posterior, por terem atingido as maiores médias de mortalidade confirmada (Tabela 3), os demais variaram de 7 a 87% de mortalidade confirmada.

Tabela 3. Porcentagem de mortalidade total e confirmada de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) avaliados contra isolados de *Beauveria bassiana*.

Isolado	% Mortalidade Total	% Mortalidade Confirmada
UNIOESTE 64	93	93
CG 716	90	90
UNIOESTE 4	90	90
UNIOESTE 52	97	90
UNIOESTE 60	87	87
UNIOESTE 38	80	80
UNIOESTE 65	93	80
UNIOESTE 69	90	80
UNIOESTE 62	77	77
UNIOESTE 2	100	73
UNIOESTE 49	87	73
IBCB 15	83	70
IBCB 301	87	70
UNIOESTE 39	97	70
UNIOESTE 53	97	70
IBCB 31	90	67
IBCB 365	83	67
UNIOESTE 59	83	67
IBCB 614	63	63
IBCB 88	100	63
UNIOESTE 46	100	63
UNIOESTE 56	83	63
UNIOESTE 37	67	60
IBCB 34	97	57
IBCB 527	67	57
UNIOESTE 25	93	50
IBCB 615	43	43
UNIOESTE 44	97	37
UNIOESTE 55	83	33
UNIOESTE 45	63	30
UNIOESTE 48	100	13
UNIOESTE 26	87	7

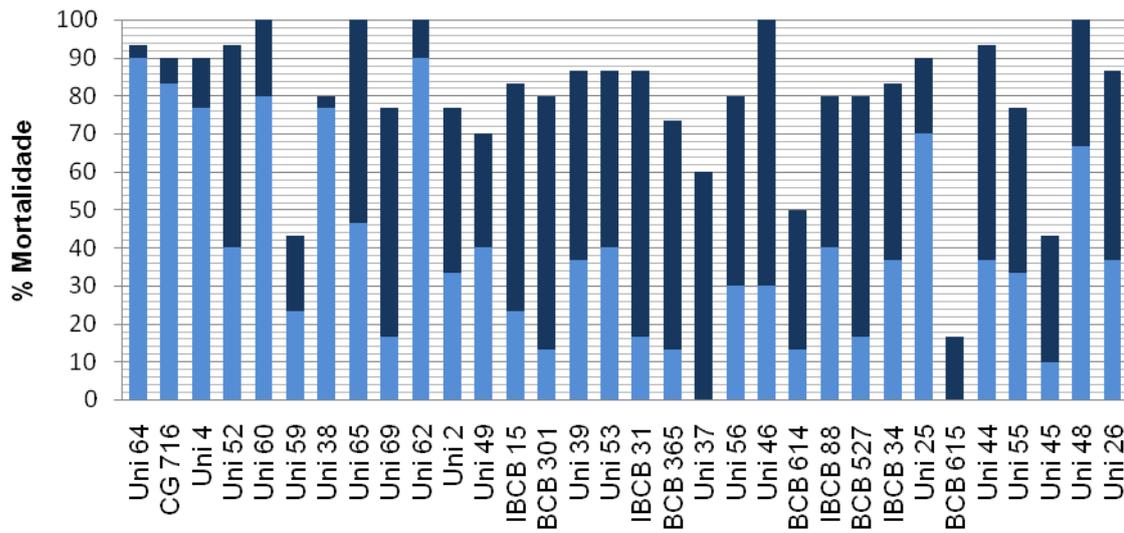


Figura 4. Mortalidade total acumulada de *Hedypathes betulinus* pelos isolados de *Beauveria bassiana* após 8 dias de inoculação (cor clara) e 13 dias (cor escura).

Segundo Xu (1988), *apud* Thomazoni (2009), os isolados de *B. bassiana* apresentam um alto nível de atividade inseticida para o hospedeiro do qual ele foi isolado ou de espécies próximas, dentro da mesma ordem, assim como os dados aqui apresentados e os de Rohde et al (2006), cujos isolados de *B. bassiana* selecionados para a etapa posterior, são todos da ordem Coleoptera, no entanto, não deve se tomar isso como regra, pois alguns isolados que também tinham coleópteros como hospedeiro original, inclusive da broca da erva-mate, caso do isolado UNIOESTE 69, obtiveram desempenho inferior aos demais, assim como em outros trabalhos de seleção de isolados, cujo eficiência do fungo não dependia da família do hospedeiro original (PIRES et al, 2010; SILVA, 2007; THOMAZONI, 2005; SILVA, 2001).

Para os isolados de *M. anisopliae*, a mortalidade confirmada variou entre 43 e 93%. (Tabela 4), sendo apenas o isolado IBCB 352 (93% de mortalidade confirmada) selecionado para a próxima etapa, por ser o único que se aproximou dos resultados com *B. bassiana*.

Tabela 4. Porcentagem de mortalidade total e confirmada de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) avaliados contra isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Isolado	% Mortalidade Total	% Mortalidade Confirmada
IBCB 352	93	93
IBCB 353	80	80
IBCB 418	90	80
IBCB 417	97	73
IBCB 52	97	73
UNIOESTE 22	90	73
IBCB 380	100	70
IBCB 410	100	70
IBCB 156	93	67
IBCB 478	93	67
IBCB 545	80	63
IBCB 482	100	57
IBCB 167	97	47
IBCB 185	97	47
SLP 358	60	47
IBCB 59	97	43
IBCB 121	97	43
IBCB 383	100	43

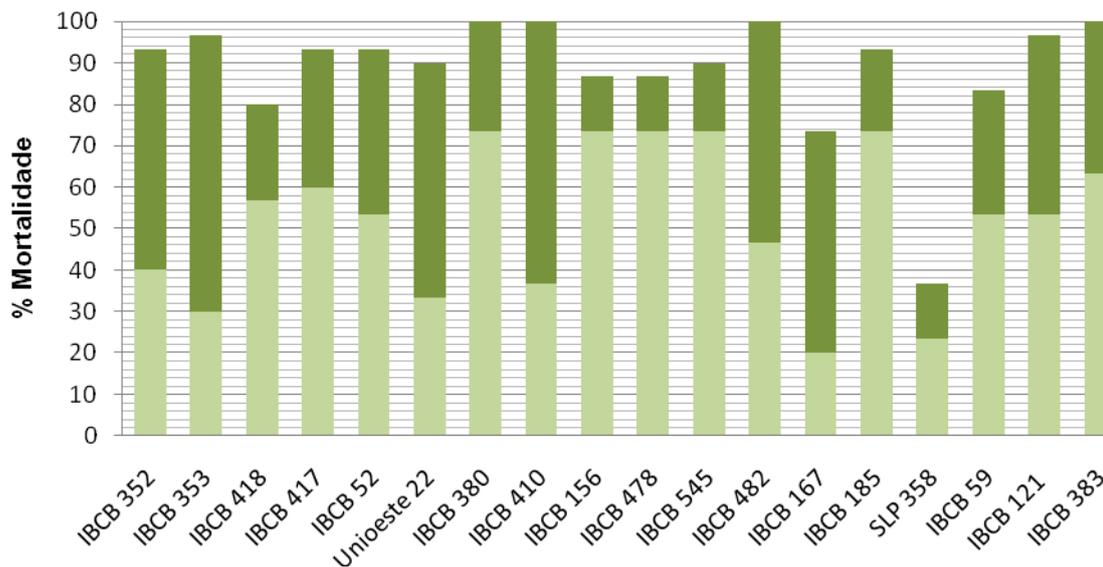


Figura 5. Mortalidade total acumulada de *Hedypathes betulinus* pelos isolados de *Metarhizium anisopliae* após 8 dias de inoculação (cor clara) e 13 dias (cor escura).

A variação na mortalidade confirmada, segundo Alves et al (1998), decorre da ampla variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos, o que faz com que os isolados tenham uma eficiência variável sobre diferentes insetos, e conseqüentemente uma maior especificidade.

Ambas as espécies de fungos, mostraram-se patogênicas ao inseto, confirmando os resultados obtidos por Pagliosa (1994), que testando cinco isolados de *B. bassiana* contra a broca da erva-mate, obteve uma variação entre 32,4 e 58,6% de mortalidade confirmada. Da mesma forma, Leite et al (2006), testando seis isolados de *B. bassiana* oscilaram entre 37 e 100% de mortalidade confirmada, no entanto no mesmo trabalho, um único isolado de *M. anisopliae* foi testado, obtendo baixa infectividade, não diferindo da testemunha.

De um modo geral, os adultos de *H. betulinus* mostraram-se bastante suscetíveis aos fungos (Figura 4), e apesar de vários isolados demonstrarem elevado potencial na mortalidade do inseto, optou-se por selecionar apenas os que alcançaram maior porcentagem de mortalidade confirmada, sendo esses submetidos a outros parâmetros de comparação, como estimativa de virulência, crescimento e esporulação em outros meios de cultura.

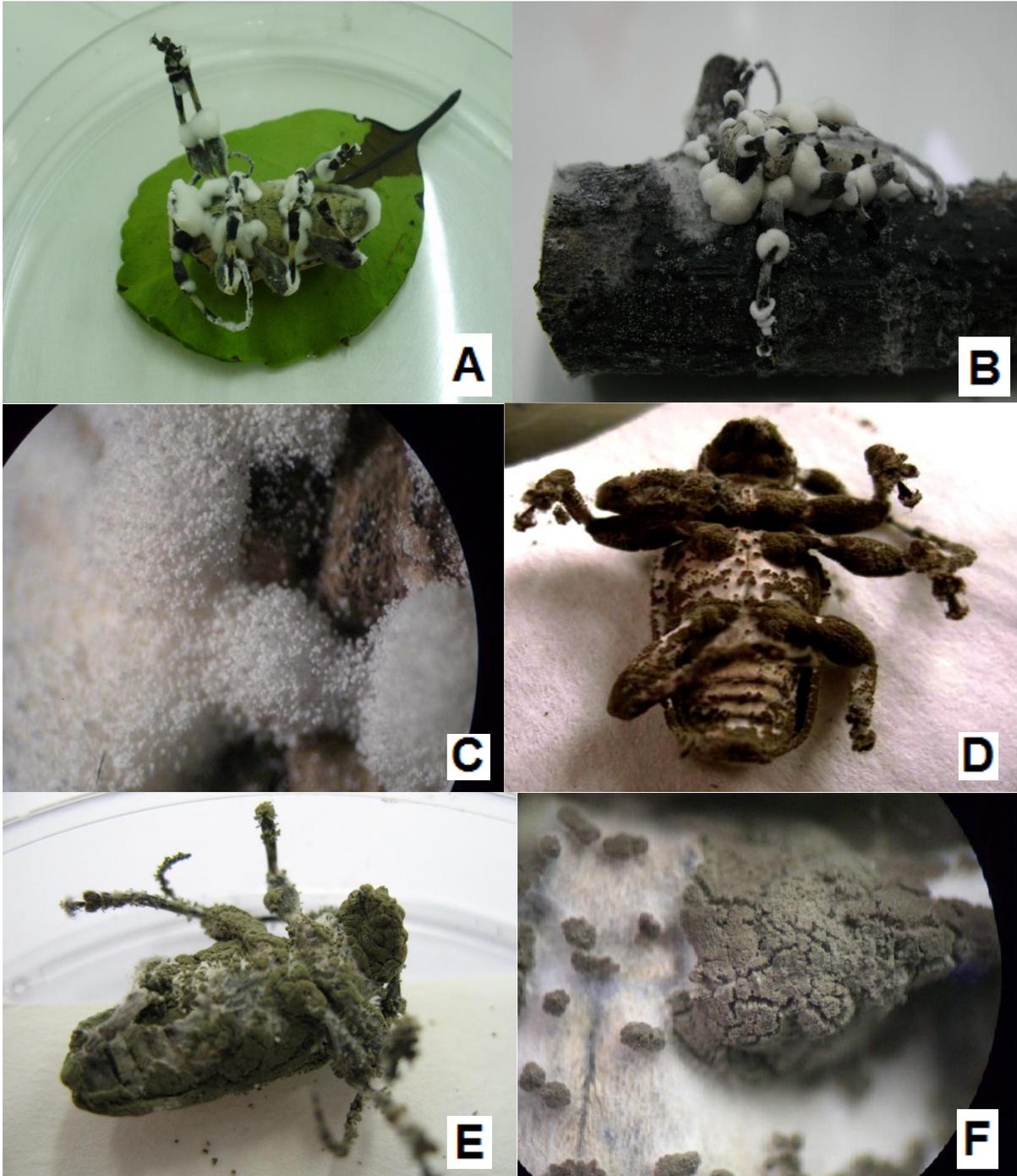


Figura 6. Adultos de *Hedypathes betulinus* mortos por fungos. **A, B** – Besouro morto por *Beauveria bassiana*. **C** – Detalhe do cadáver recoberto pelo fungo *B. bassiana*. **D, E** – Besouro morto por *Metarhizium anisopliae*. **F** – Detalhe do cadáver recoberto pelo fungo *M. anisopliae*.
(Fotos: André L.P. Fanti)

4.2 Comparação de isolados

4.2.1 Virulência

Os dados obtidos não se ajustaram ao modelo Probit, porque os bioensaios nem sempre seguiram o modelo do tipo estímulo-resposta (Haddad 1998).

Diante disso, optou-se pela comparação da porcentagem média da mortalidade total (Tabela 5) e confirmada (Tabela 6) de adultos da broca, após 15 dias da inoculação.

Tabela 5. Porcentagem média de mortalidade total de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) submetidos a diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (26 ± 1 °C, fotofase: 14h), 15 dias após o tratamento.

Isolados	Concentrações de conídios/mL					Teste.
	1×10^7	5×10^6	1×10^6	5×10^5	1×10^5	
UNIOESTE 4(Bb)	83,3±1,0Aa	66,6±1,4Aab	58,3±3,9Ab	73,3±2,4Aab	56,6±2,2Ab	0 Ac
UNIOESTE 52(Bb)	80,0±3,3Aa	76,6±2,9Aa	48,3±3,9Ab	68,3±2,8ABab	58,3±2,5Aab	0 Ac
UNIOESTE 64(Bb)	70,0±2,1Aa	61,5±2,1Aa	58,3±2,1Aa	51,6±4,4ABa	50±3,2Aa	0 Ab
CG 716(Bb)	80,0±3,0Aa	70±3,5Aa	75±3,7Aa	63,3±4,4ABa	55±4,4 Aa	0 Ab
IBCB 352(Ma)	73,3±1,4Aa	68,3±1,6Aa	58,3±2,8Aab	40,0±2,7Bb	40,0±2,4Ab	0 Ac

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} . Médias (\pm EP) seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Para o isolado UNIOESTE 4, na concentração mais elevada (1×10^7 conídios/mL) obteve a maior mortalidade total, não diferindo concentrações 5×10^6 e 5×10^5 conídios/mL. O isolado UNIOESTE 52, apresentou diferença estatística apenas na concentração 1×10^6 conídios/mL, sendo esta a que causou menor mortalidade (48,3%). Já os isolados UNIOESTE 64 e CG 716, não apresentaram diferença estatística entre as concentrações utilizadas.

O isolado de *M. anisopliae* IBCB 352, não apresentou diferença estatística nas três concentrações mais elevadas.

Quando analisado por concentrações, a única diferença estatística entre os isolados foi observada na concentração de 5×10^5 conídios/mL, cujo isolado IBCB 352 foi menos eficiente que os demais.

Tabela 6. Porcentagem média de mortalidade confirmada de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) submetidos a diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana* (*Bb*) e *Metarhizium anisopliae* (*Ma*) (26 ± 1 °C, fotofase: 14h).

Isolados	Concentrações de conídios/mL					Teste.
	1×10^7	5×10^6	1×10^6	5×10^5	1×10^5	
UNIOESTE 4(<i>Bb</i>)	36,3 \pm 1,0Ba	34,6 \pm 0,8Ba	19,8 \pm 1,3Ab	19,8 \pm 1,3BCb	6,6 \pm 0Ac	0 Ad
UNIOESTE 52(<i>Bb</i>)	42,9 \pm 2,1Bab	52,8 \pm 0Aa	21,4 \pm 2,8Ac	33,0 \pm 0Abc	19,8 \pm 1,3Ac	0 Ac
UNIOESTE 64(<i>Bb</i>)	37,9 \pm 0,8Ba	33,0 \pm 0Bab	29,7 \pm 1,7Ab	13,2 \pm 0Cc	6,6 \pm 0Ac	0 Ab
CG 716(<i>Bb</i>)	42,9 \pm 1,6Ba	34,6 \pm 0,8Bb	24,7 \pm 0,8Ac	19,8 \pm 0BCc	6,6 \pm 0Ad	0 Ab
IBCB 352(<i>Ma</i>)	62,7 \pm 1,6Aa	52,8 \pm 4,0Aab	29,7 \pm 3,7Abc	24,7 \pm 1,6Bc	11,5 \pm 2,5Ac	0 Ac

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} .

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

O isolado UNIOESTE 4 foi mais eficiente nas concentrações mais elevadas, (1×10^7 e 5×10^6 conídios/mL), diferindo das demais. Para o isolado UNIOESTE 52, a concentração que atingiu maior confirmação da mortalidade, foi a de 5×10^6 conídios/mL, não diferindo estatisticamente da concentração mais elevada. O isolado UNIOESTE 64, as duas concentrações mais elevadas também foram mais eficientes, não diferindo entre si. Já para o isolado CG 716, a concentração mais elevada (1×10^7 conídios/mL) foi mais eficiente, e diferiu de todas as outras.

O isolado de *M. anisopliae*, IBCB 352, obteve a maior porcentagem de confirmação (62,7%), sendo esta obtida na concentração de 1×10^7 conídios/mL, não diferindo apenas da concentração 5×10^6 conídios/mL.

Quando analisado por concentrações, o isolado de *M. anisopliae* (IBCB 352), causou a maior mortalidade na concentração mais alta (1×10^7 conídios/mL), diferindo estatisticamente dos demais. Já na concentração 5×10^6 conídios/mL, este isolado não diferiu estatisticamente do isolado UNIOESTE 52, e ambos diferiram dos demais. Nas concentrações 1×10^6 e 1×10^5 , os isolados não diferiram entre si, mas na concentração 5×10^5 o isolado UNIOESTE 52 foi superior, diferindo dos demais.

O fungo quando ultrapassa o exoesqueleto e atinge a hemocele, pode causar a morte do hospedeiro diretamente pela ação de micotoxinas que atuam na fisiologia do inseto, ou de forma indireta pela exaustão de nutrientes, quebras fisiológicas/bioquímicas e também pelo bloqueio mecânico do aparelho digestivo, devido ao crescimento vegetativo entre outros danos físicos. A diferença entre a mortalidade total e confirmada pode ocorrer pela variabilidade genética dos isolados e

dos mecanismos de defesa dos insetos-alvo, desta forma, mesmo quando aplicado em baixa concentração, a morte do inseto pode ocorrer antes da colonização total do cadáver, dificultando a sua conidiogênese, corroborando com os dados aqui apresentados, uma vez que houve grande diferença entre a mortalidade total e a mortalidade confirmada, abrindo a possibilidade de que o fungo, mesmo não esporulando, foi o causador da morte do inseto (ALVES, 1998; NEVES e HIROSE, 2005).

Além disso, segundo Alves e Pereira (1998 b), alguns fungos são incapazes de penetrar o inseto através do sistema digestivo, mas podem causar danos independentemente da posterior colonização do hospedeiro, pela liberação de toxinas no sistema digestivo dos insetos. Assim, nas infecções via oral, os conídios podem liberar toxinas quando digeridos pelo hospedeiro, causando a morte do mesmo, independente do crescimento do patógeno.

De acordo com a metodologia utilizada, imergindo o inseto numa suspensão fungica, há a possibilidade do patógeno penetrar no hospedeiro via oral, resultando na morte do mesmo pela ação de toxinas, sem o crescimento do fungo, justificando assim a diferença entre a mortalidade total e a confirmada pela esporulação do fungo.

O que também pode explicar a variação da mortalidade entre os diferentes isolados e as diferentes concentrações é a idade dos indivíduos adultos, uma vez que não houve padronização deste parâmetro, pois os insetos eram coletados a campo de forma aleatória.

4.2.2 Comparação de parâmetros de produção

4.2.2.1 Crescimento Vegetativo e Produção de Conídios em Meio de Cultura

Em relação ao crescimento vegetativo, os isolados que obtiveram maior diâmetro médio de colônia, foram UNIOESTE 4, UNIOESTE 52 , UNIOESTE 64 e CG 716 (3,1cm, 3,0cm, 3,0cm e 3,0 cm respectivamente). O isolado IBCB 352 obteve 2,70cm de diâmetro médio (Tabela 7).

Tabela 7. Diâmetro médio de colônias e produção de conídios dos isolados de *Beauveria bassiana* (*Bb*) e *Metarhizium anisopliae* (*Ma*) em meio-de-cultura (M.E.), 10 dias após inoculação ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase: 14h).

Isolados	Diâmetro médio das colônias (cm)	Produção de conídios/colônia ($n \times 10^7$)	Produção média de conídios/cm ² ($n \times 10^7$)
UNIOESTE 4(<i>Bb</i>)	3,10±0,02 a	5,10±0,19 bc	0,63±0,02 b
UNIOESTE 52(<i>Bb</i>)	3,00±0,01 ab	1,94±0,07 d	0,26±0,01 c
UNIOESTE 64(<i>Bb</i>)	3,30±0,04 a	10,4±0,43 a	1,15±0,05 a
CG 716(<i>Bb</i>)	3,30±0,02 a	8,9±0,42 ab	0,98±0,05 ab
IBCB 352(<i>Ma</i>)	2,70±0,05 b	4,70±0,18 c	0,81±0,07 ab
C.V. (%)	4,40	22,04	19,96

Dados originais apresentados, para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} Médias(±EP) seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Estes valores são próximos dos obtidos por Thomazoni (2009), que nesse mesmo parâmetro avaliou o crescimento dos isolados UNIOESTE 1 e UNIOESTE 64 de *B. bassiana*, cujo diâmetro médio de colônia foi de 3,2 e 2,8 respectivamente, e também dos valores apresentados por Rohde et al. (2006), que realizando esse teste com os isolados de *B. bassiana* UNIOESTE 4, UNIOESTE 5, UEL 25, o diâmetro médio de colônia variou de 3,6 a 3,9 cm. Porém, foram inferiores aos obtidos por Potrich (2006), que avaliou o crescimento vegetativo dos isolados de *B. bassiana* UNIOESTE 04, UNIOESTE 39 e ESALQ 643, obtendo valores superiores que variaram de 3,4 a 4,5cm, porém, após 8 dias de incubação.

Em relação ao fungo *M. anisopliae*, os resultados aqui apresentados são inferiores aos de Rohde et al. (2006), quando comparados os crescimento vegetativo (3,8 cm para o isolado CB 320), distantes também, porém superiores, dos resultados de Alexandre et al. (2006) que obtiveram média de 1,35 cm no diâmetro das colônias para *M. anisopliae*.

Jabor et al (2003) testaram o crescimento vegetativo e a esporulação de 7 linhagens de *M. anisopliae*, em 3 diferentes meios de cultura (Meio completo, Meio Sabouraud, e BDA) obtendo diferentes respostas de um mesmo isolado com diferentes meios de cultura, onde na maioria dos casos, o meio que melhor expressou o crescimento vegetativo do isolado, não proporcionou a melhor resposta em esporulação, evidenciando o delicado processo de interação dos ciclos vegetativo e de esporulação, com a disponibilidade dos nutrientes.

Quanto a produção de conídios, o isolado UNIOESTE 64 obteve $10,4 \times 10^7$ e $1,2 \times 10^7$ na produção de conídios por colônia e produção de conídios por cm^2 respectivamente, diferindo significativamente dos isolados UNIOESTE 4, UNIOESTE 52, UNIOESTE 64 e IBCB 352, tanto na produção de conídios por colônia, como na produção de conídios por cm^2 (Tabela 7).

Resultados aqui apresentados, diferentes dos alcançados por Thomazoni (2009) com o isolado UNIOESTE 64, cuja produção de conídios por colônia foi de $1,8 \times 10^8$ conídios. E também dos apresentados por Rohde et al (2006) cuja produção do isolado UNIOESTE 4 foi de $33,5 \times 10^8$ conídios/colônia.

Em relação aos valores de crescimento vegetativo e os de produção de conídios, ambos os autores verificaram a ausência de relação entre eles, já que a produção de conídios não foi proporcional ao crescimento vegetativo das colônias. O que difere de Potrich (2006), que apresenta uma relação positiva entre o diâmetro médio das colônias e a produção média de conídios/colônia. Para este autor, as variações entre isolados da mesma espécie podem ser ocasionadas pelo fotoperíodo, temperatura, umidade relativa, assim como o tipo e espessura do meio de cultura e da genética dos isolados que podem variar dentro da mesma espécie e também dentro do mesmo isolado. Contudo, o procedimento para obtenção de colônias em meio de cultura, é feito através de alça de platina, que entra em contato com o inóculo, e então perfura-se o meio de cultura na placa de Petri, em três pontos para avaliar o crescimento vegetativo, não havendo a mensuração da quantidade de conídios aplicado.

4.2.2.2 Produção de Conídios em Arroz e em Cadáveres de Broca da Erva-Mate

Os isolados UNIOESTE 64 e CG 716 obtiveram maior produtividade de conídios/g de arroz que UNIOESTE 4 e UNIOESTE 52 (Tabela 8). No entanto, os resultados são inferiores aos obtidos por Rohde et al (2006), que para o mesmo isolado UNIOESTE 4 foi obtida produção de $8,3 \times 10^8$ conídios/g de arroz, logo, comparando os resultados com Thomazoni, o isolado UNIOESTE 64 obteve melhores resultados do que o encontrado pelo autor ($1,2 \times 10^8$ conídios/g de arroz).

Contudo, Zappellini et al (2010) obtiveram quantidade média de 2,52 e $2,46 \times 10^9$ conídios/g dos isolados de *M. anisopliae* IBCB 417 e 481 respectivamente, muito superiores do aqui apresentado pelo isolado IBCB 352 ($17,6 \times 10^7$ conídios/g).

Esta diferença pode estar relacionada a fatores que envolvem o método de produção empregado, assim como a quantidade de substrato dentro de cada recipiente e a quantidade de inóculo aplicado. Além desses fatores, a qualidade do arroz utilizado no experimento, a qualidade e quantidade do inóculo empregado, são essenciais para a boa produção (POTRICH, 2006)

Tabela 8. Produção de conídios de *Beauveria bassiana* (Bb) e *Metarhizium anisopliae* (Ma) em arroz e cadáveres de *Hedypathes betulinus*.

Isolados	Número de conídios/g de arroz ($n \times 10^7$)	Número de conídios/cadáver ($n \times 10^7$)
UNIOESTE 4(Bb)	5,90±0,32 b	0,29±0,02 b
UNIOESTE 52(Bb)	9,30±1,80 b	3,75±0,85 b
UNIOESTE 64(Bb)	23,3±1,30 a	0,36±0,02 b
CG 716(Bb)	26,6±2,14 a	0,69±0,11 b
IBCB 352(Ma)	17,6±0,56 ab	27,9±1,51 a
C.V. (%)	37,01	64,42

Dados originais apresentados; para análise estatística os dados foram transformados em \sqrt{x} Médias (\pm EP) seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Já na produção de conídios em cadáveres de broca, o isolado de *M. anisopliae* IBCB 352 destacou-se com produção média de $27,9 \times 10^7$ conídios/cadáver, muito superior aos demais. No entanto, entre os isolados de *B. bassiana*, destaca-se o UNIOESTE 52 (Tabela 8).

Este parâmetro é de grande importância quando se trata de aplicações futuras em campo, pois um isolado que apresenta um elevado potencial de inóculo, tem maior probabilidade de manter-se presente no campo, causando epizootia. Segundo Albuquerque (2005), é importante que nos estudos de seleção de isolados se inclua a avaliação da produção de conídios em cadáveres, pois estes informam a capacidade dos fungos em aumentar o potencial de inóculo no ambiente dos hospedeiros, após sua eventual aplicação, facilitando a sua transmissão e disseminação nas populações de insetos e também garantindo o inóculo no ambiente por maior período de tempo.

De acordo com Santoro et al (2007), a variabilidade genética dos isolados de fungos, podem proporcionar um melhor ou pior aproveitamento dos nutrientes disponíveis em determinado meio de cultura, provocando assim, uma diferença na produção dos fungos.

4.3 Avaliação de nematoides entomopatogênicos

O isolado NEPET 8 não se mostrou eficiente contra o besouro, e não apresentou nenhuma morte durante o experimento, diferente dos isolados NEPET 11 e NEPET 36 que causaram mortalidade confirmada de 75 e 45% respectivamente (Tabela 9). Estes dados corroboram com Alves et al. (2009), que avaliaram a suscetibilidade de adultos de *H. betulinus* a *Steinernema carpocapsae*, que atingiu mortalidade de 78,1% com a mesma concentração (100Jl/cm²).

Também QUADROS (2008), avaliou 8 isolados de *Heterorhabditis* sp. contra a broca da erva-mate, utilizando a mesma metodologia aqui descrita, obtendo resultados promissores, ultrapassando 90% de mortalidade.

Tabela 9. Porcentagem de mortalidade confirmada de adultos da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) testados contra isolados de nematoides entomopatogênicos.

Isolado	Espécie	Origem	% de mortalidade
NEPET 8	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Solo	0
NEPET 11	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Solo	75
NEPET 36	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Solo	45

Devido à sazonalidade da ocorrência de adultos de broca da erva-mate em campo e esta estando sujeita a condições climáticas, houve atraso nas coletas dos mesmos, devido sua baixa incidência no início da safra que compreende o verão de 2010-2011, impossibilitando que mais isolados de nematoides fossem testados.

A suscetibilidade da broca da erva-mate aos nematoides entomopatogênicos já fora comprovada de acordo com Alves (2009), no entanto, considerando que os nematoides necessitam de um substrato úmido para a sua sobrevivência e tendo em vista que a maioria dos de nematoides entomopatogênicos são isolados de amostras de solo, sua utilização contra pragas que vivem na parte aérea da planta é um fator limitante. No caso da broca da erva-mate, cujo adulto permanece maior tempo na parte média da planta, deve-se propor sua utilização em conjunto com outras táticas de controle, como a utilização de armadilhas que atraiam o besouro para parte inferior da planta. Nesse sentido, Fonseca (2010) avaliou um feromônio sexual sintético (visando atração de fêmeas) e desta foram, o adulto poderia ser infectado e

se deslocar no ambiente, vindo a morrer em outro local, disseminando o patógeno no campo.

Vale ressaltar que durante os períodos de coletas de adultos de broca da erva-mate, provindos da Fazenda Vila Nova, no município de Ivaí – PR, ao decorrer desta pesquisa, em alguns adultos foram encontrados nematoides pertencentes à família Mermithidae, ocorrendo naturalmente em campo (Figura 5). No entanto, devido a quantidade pequena e esporádica de ocorrência, tornou-se inviável mensurar a frequência com que ocorrem (FANTI, dados não publicados). Gomm (2008) também relata a ocorrência desses nematoides em broca da erva-mate na mesma região de coleta de insetos.

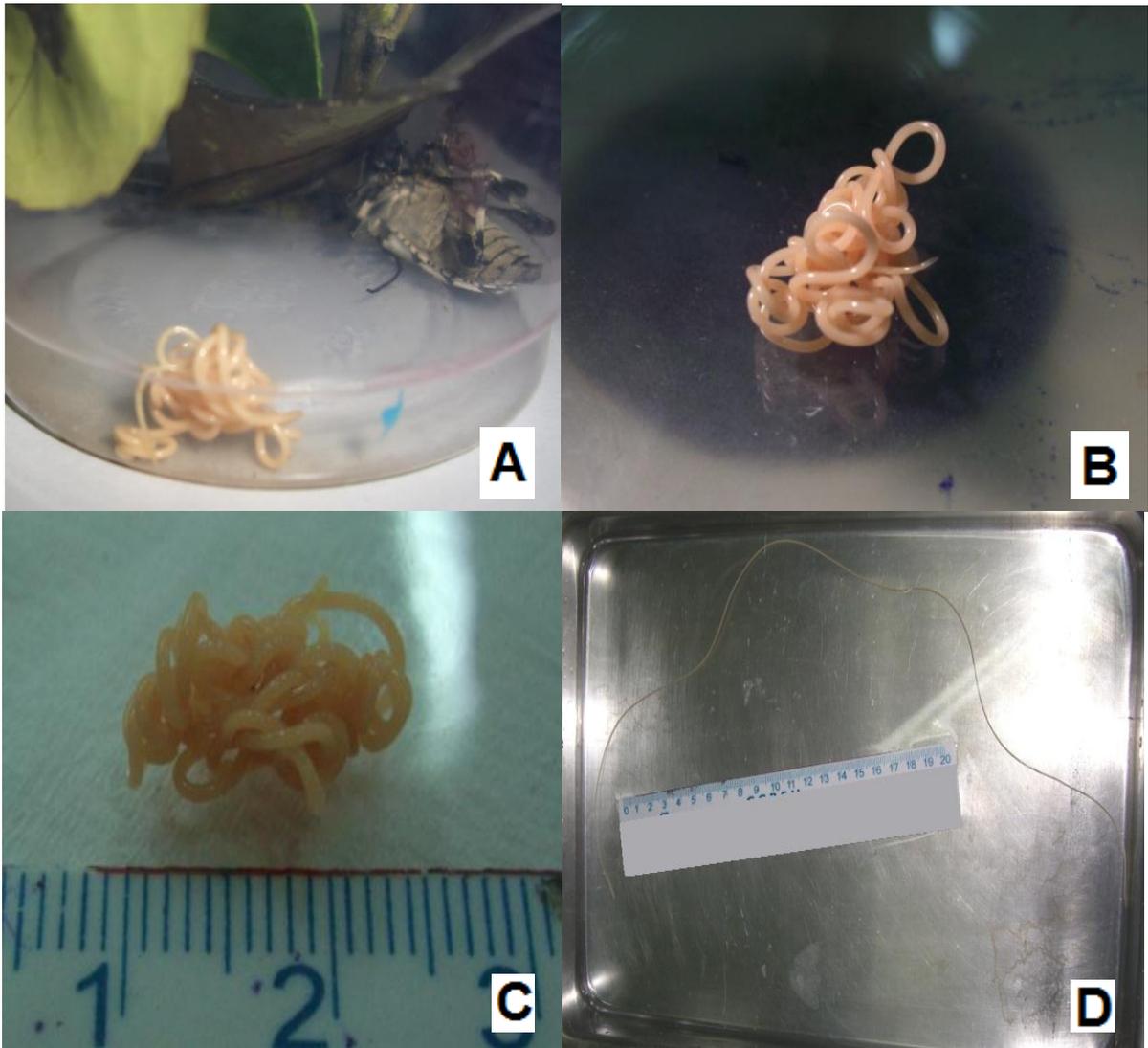


Figura 7: Nematóide pertencente à família Mermithidae. **A** – Nematóide junto ao hospedeiro. **B**, **C** – Detalhe do nematóide. **D** – nematóide distendido.
(Fotos: André L.P. Fanti)

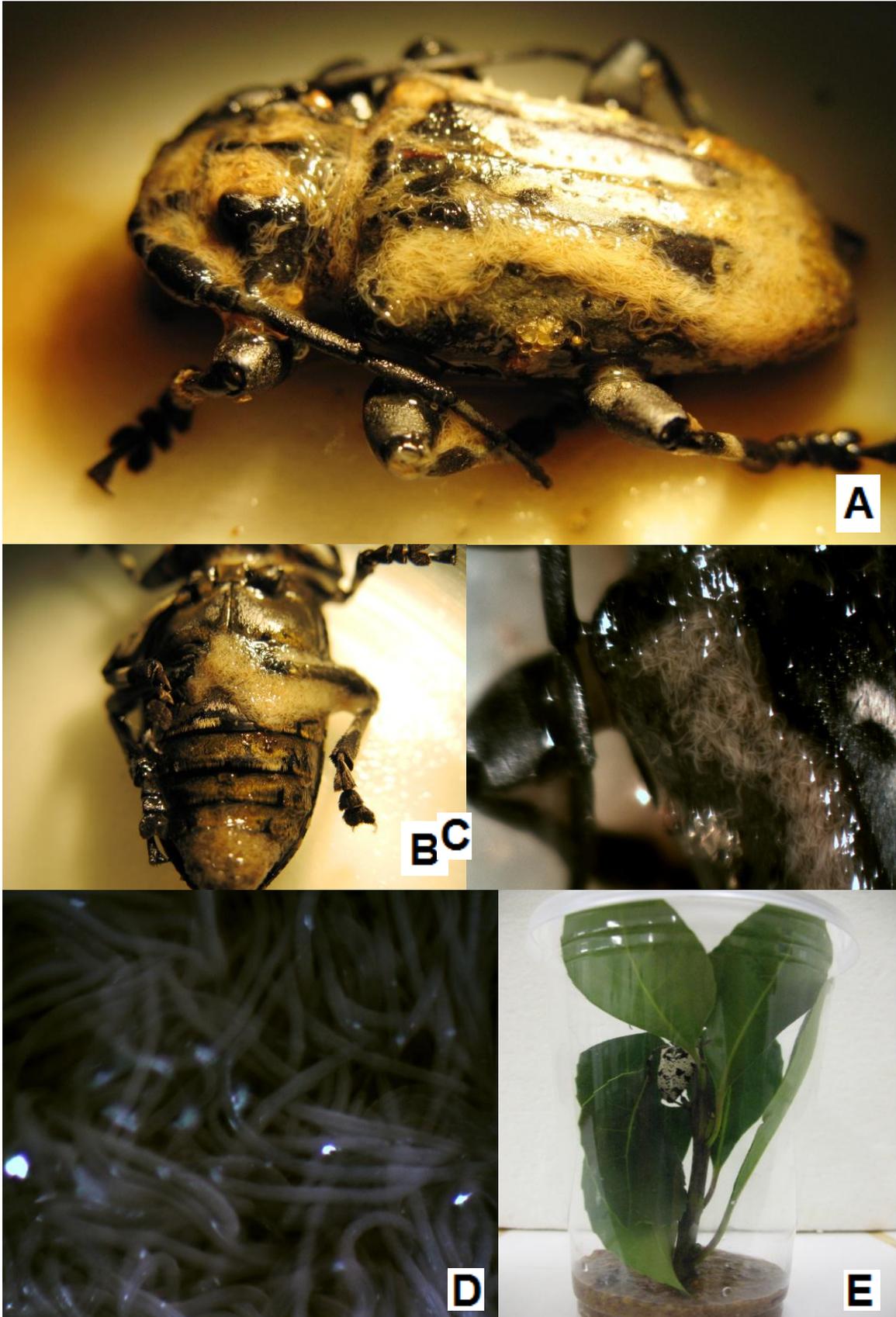


Figura 8: Adultos de *Hedypathes betulinus* mortos por nematoides. **A, B, C** – Adulto de *Hedypathes betulinus* coberto por nematoides entomopatogênicos. **D** – Detalhe dos nematoides. **E** – Copo plástico com areia como substrato para nematoides. (Fotos: André L.P. Fanti)

5. CONCLUSÃO

A broca da erva-mate mostrou-se bastante suscetível aos fungos entomopatogênicos, tendo em vista que ao longo dos bioensaios a maioria dos isolados causou mortalidade em mais da metade do grupo de insetos cujas aplicações foram feitas. Os isolados de *B. bassiana* UNIOESTE 4 e UNIOESTE 52, destacaram-se na mortalidade total e confirmada dos insetos. O isolado IBCB 352 de *M. anisopliae*, apesar de ser o único deste gênero a ser selecionado para a segunda etapa, manteve-se a frente na mortalidade confirmada e conidiogênese em cadáveres de broca, indicando um elevado potencial de inóculo, sendo este, junto com o isolado UNIOESTE 52 de *B. bassiana*, os indicados para avaliação do desempenho do patógeno em campo.

É importante salientar que mesmo havendo produtos comerciais à base de fungo no mercado, uma seleção de isolados abre possibilidade para a descoberta de novos entomopatógenos mais eficiente contra a o inseto-praga em questão, contribuindo assim para o desenvolvimento de programas de manejo integrado de pragas.

Quanto aos nematóides, devem-se testar novos isolados, para que além da virulência sejam avaliados outros parâmetros, como produção de nematoides em hospedeiros alternativos à *Galleria mellonella*, como em *Tenebrio molitor* e na broca da erva-mate, uma vez que o inseto mostrou-se suscetível a este entomopatógeno.

6 REFERENCIAS 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. Acesso em 01 de julho de 2011.

ALBUQUERQUE, A. C., et al: Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) **Neotropical Entomology** v.34, n.4, p.585-591, 2005.

ALEXANDRE, T.M., et al. Efeito da temperatura e Cama do Aviário na Virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o Controle do Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, Vacaria, v.35, n.1, p.75-82. 2006.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba - SP: Fealq, 2ed. p.308-310, 1998a.

ALVES, S.B e PEREIRA R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba - SP: Fealq, 2ed. p.308-310, 1998a.

ALVES, S.B e PEREIRA R.M. Distúrbios fisiológicos provocados por entomopatógenos. In: ALVES, S.B.: Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba - SP: Fealq, 2ed. p.308-310, 1998b.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR., A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**, p.637-711, Ed. Fealq, 1998b.

ALVES, V.S. et al Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) ao nematóide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.479-482, 2009

ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE. Gazeta de Comunicações, 25p., 2000.

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

BORGES, L. R. **Eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycota) para o controle de *Hedypathes betulinus* (Klug) (Coleoptera: Cerambycidae) em erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae).** 102p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Entomologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

BORGES, L.R., S.M.N. LÁZZARI; F.A. LÁZZARI. 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.

BRONDANI, G. E., et al. Ambiente de enraizamento e substratos na miniestquia de erva-mate. **Scientia Agraria**, v.8, p.257-267, 2007.

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

CASSANELLO, A. M. L. **Ciclo de vida e aspectos morfológicos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae) em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire)**. Curitiba, PR. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 1993.

CHIARADIA, L.A.; MILANEZ, J. M.; ZIDKO, A. Estimativa das gerações anuais de *Gyropsylla spegazziniana* (LIZER, 1917) em função de sua exigência térmica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.3, p.385-391, 2002.

D'AVILA, M.; COSTA, E. C. GUEDES, J. V. C. Bioecologia e Manejo da broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.16, n.2, p.233-241, 2006.

FERRAZ, L.C.C.B. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. et al. **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba - SP: Fealq, 2ed. p.541-567, 1998.

FERREIRA, D.F. SISVAR (Sistema para análise de variância para dados balanceados). Lavras, UFLA, 79p., 1992.

FONSECA, M.G. **Estudo da ecologia química da broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae)**. Tese. 102p. Doutorado em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GOMM, P.C. **Eficácia de diferentes dosagens do formulado fúngico à base de *Beauveria bassiana* (Vuill, 1912) no controle de adultos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae)** 32p. Monografia (Graduação em Agronomia) Ponta Grossa, Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG. 2008.

GOMM, P. C. et al.: Eficácia de diferentes dosagens do formulado fúngico à base de *Beauveria bassiana* (Vuill, 1912) no controle de adultos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae). **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**. Curitiba, v.8, n.1, p.55-60, jan./mar., 2010

GRAF, V. MARZAGÃO, M.R.: Ocorrência de parasitóide *Labena fiorii* sp.n. (Hymenoptera, Ichneumonidae) em larvas de *Hedypathes betulinus* (Klug), broca da erva-mate e em *Chydarteres striatus* (Fabricius), broca da aroeira, (Coleoptera, Cerambycidae). **Revista Brasileira de Zoologia** v.16, n.1, p.185-190, 1999.

GUEDES, J. V. C.; d'AVILA, M.; DORNELLES, S. H. B. Comportamento de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) em erva-mate em campo. **Ciência Rural**, v.30, n.6, p.1059-1061, 2000.

HADDAD, M.L. Utilização do Polo-PC para análise de Probit, p.21-38. In S.B. Alves, **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba, Fealq, 2ed. 1163p., 1998.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=1052. Acesso em 01 junho de 2011.

IEDE, E.T. Considerações sobre a entomofauna da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Resumos** do I Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais – Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), Colombo, PR., 1985.

IEDE, E.T.; MACHADO, D. C. Pragas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e seu controle. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Colombo, n18/19, p. 51-60, 1989.

JABOR, I. A. S. et al.: Análise do desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em resposta a fatores nutricionais. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v.25, n.2, p.497-501, 2003.

JOLY, A. B.: **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Nacional, 777p., 2005.

LEITE, M.S.P. et al. Seleção de linhagens de *Beauveria* spp. patogênicas à *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) em laboratório. In: XVII Congresso Brasileiro de Entomologia, VIII Encontro Nacional de Fitossanitaristas, Rio de Janeiro, **Anais**. v.2, p.767, 1998.

LEITE, M. S. P.; SOARES, C. M. S.; IEDE, E. T.; PENTEADO, S. R. C.; CASTELLANO, C. Seleção de linhagens de fungos entomopatogênicos para o controle de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) em laboratório e eficiência da linhagem selecionada em campo. **II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica da Erva-mate**. Encantado, Ed. dos Organizadores, p.314-317, 2000.

LEITE, M.S.P.; Penteado, S.R.C.; Oliveira, S. Eficiência do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. No controle de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae), em campo. In: III Congresso sul-americano da erva-mate. **Anais**, 2003.

LEITE, M.S.P. et al. Determinação da CL50 do isolado de CG 716 de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Para o controle de *Hedypathes betulinus* (Klug), em laboratório. In: 9º Simpósio de Controle Biológico, Recife, **Anais** v.1, 2005.

LEITE, M.S.P. et al. Eficiência de fungos entomopatogênicos no controle de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera:Cerambycidae), em laboratório. In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, Recife, **Anais**, 2006.

LEITE , M.S. P., RIBEIRO , R.D. E PENTEADO , S.R.C.: Transmissibilidade de *Beauveria bassiana* entre adultos de *Hedypathes betulinus*.In: V CONGRESSO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE., Posadas, Misiones Argentina. Posadas: Instituto Nacional de la Yerba Mate. **Anais**,v.1, p.94, 2011.

LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, San Diego, v.38, n.1, p.66-79, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 368p., 2002.

LOURENÇO, R. S. et al. 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**. Colombo, n.34, p.75-98, 1997.

MACHADO, L. A., et al . Controle de *Migdolus fryanus* na cultura da cana-de-açúcar com nematóides entomopatogênicos. In: IX Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico - RIFIB, 2003, Catanduva/SP. IX Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico. São Paulo/SP: **Instituto Biológico**, p.65-72, 2003.

MALLMAN, J.A. et al: Controle da broca da erva-mate através da galinha-d'Angola, **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**,Porto Alegre, v.2, n.3, jul./set., 2001.

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. Encantado, RS, **Anais** p.6-9, 2000.

NEVES P.M.O.J.; HIROSE E. Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* Para o Controle Biológico da Broca-do-Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) **Neotropical Entomology**. v.34 n.1 p.77-82, 2005.

PAGLIOSA, M.M.R; SANTOS, H.R.; DIOTATO, M.A. Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* (BALS) VUILL., em *Hedypathes betulinus* (KLUG, 1825), praga da erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Agrárias**, v.13, p.225-228, 1994.

PENTEADO, S.R.C. Principais pragas da erva-mate e medidas alternativas para o seu controle, p. 109-120. In H. WINGE; A.G. FERREIRA; J.F.A. MARIATH; L.C. TARASCONI (Org.), **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Ed.Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 356p., 1995.

PENTEADO, S.R.C.; E.T. IEDE; M.S.P. LEITE.: Pragas da erva-mate: perspectivas de controle. In: II Congresso Sul-Americano da Erva-mate e III Reunião Técnica da Erva-mate. Encantado, RS, 27–37. **Anais**, 2000.

PIRES, L.M., et al.: Seleção de Isolados de Fungos Entomopatogênicos para o Controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e sua Compatibilidade com Alguns Inseticidas Usados na Cultura do Tomateiro. **Neotropical Entomology**. v.39 n.6 p.977-984, 2010.

POINAR, G. O. Jr. **Nematodes for biological control of insects**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1979.

POTRICH, M.; **Associação de variedades resistentes de milho e fungos entomopatogênicos para o controle de *Sitophilus spp.*** 131 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal), Marechal Cândido Rondon, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), 2006.

QUADROS, J.C.: **Seleção de isolados de nematóides entomopatogênicos visando o controle da Broca da erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008.

QUADROS, J.C. et al.: Suscetibilidade da broca da erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) a *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). **Anais**. Simpósio de Controle Biológico, Brasília, 2007.

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

RIBEIRO, M.M.: **Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em *Hedypathes betulinus* (Klug, 1925) (Coleoptera: Cerambycidae), em condições de laboratório e de campo**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 58p., 1993.

ROHDE, C. et al.: 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.

SANTORO, P.H. et al: Interferência da metodologia nos resultados de bioensaios de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.4, p.483-489, 2007.

SILVA, C. A. D. : Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.243-247, 2001.

SILVA, E.A.R., **Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Leptopharsa hevea* Drake & Poor (Hemiptera: Heteroptera, Tingidae)**. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas – Botucatu, 60p. 2007.

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.)**. 73p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Entomologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

SOARES, C.M.S.; IEDE E.T. Perspectivas para o controle da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) Coleoptera: Cerambycidae. In: **I Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e II Reunião Técnica do Cone Sul** sobre a Cultura da erva-mate. Curitiba, Ed. dos Organizadores, p.391-400, 1997.

SOARES, C.M.S.; IEDE, E.T.; SANTOS, H.R. Levantamento de insetos predadores de adultos da broca-da-erva (*Hedypathes betulinus*) (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae). In: V SICONBIOL, Simposio de Controle Biológico. **Anais**. p.80, 1995a.

SOARES, C.M.S.; IEDE, E.T.; SANTOS, H.R. Ocorrência natural dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre *Hedypathes betulinus* (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE). In: V SICONBIOL, Simpósio de Controle Biológico. **Anais**. p.81, 1995b.

THOMAZONI, D.: Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*) visando o controle do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*, Boheman 1843) (Coleoptera: Curculionidae). In: V Congresso Brasileiro de Algodão, Salvador-BA. **Anais** v.1 p.34-34, 2005.

THOMAZONI, D. : **Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos visando o controle da lagarta-do-cartuchodo-milho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**. 50p. Monografia (Graduação - Bacharelado em Ciências Biológicas), Cascavel, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste, 2009.

TIAGO, P. V.; FURLANETO, M. C.: O papel de proteases degradadoras de cutícula produzidas por fungos entomopatogênicos. **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.2, n.1, p.40-51, 2003.

VELLOSO, C. C.; ROCHA, C. A. Papel artesanal da fibra de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) e sabonete medicinal de erva-mate: uma proposta em educação ambiental. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.2, n.1, p. 1111-1113, 2007.

WINGE; A.G. et al(Org.), **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 356p, 1995.

XU, R.; DE LA ROSA, W.; ALATORRE, R.; TRUJILLO, J.; BARRERA, J.F. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) Strains Against the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scotlytidae). **Journal of Economic Entomology**, Riverside, v.90, n.6, p.1534-1538, 1988.

ZAPPELINI, L.O. et al. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. visando o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.77, n.1, p.75-82, 2010.