

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Hedypathes betulinus* E AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA

Maria Sílvia Pereira Leite¹, Edson Tadeu Iede², Susete do Rocio Chiarello Penteadó³, Scheila Ribeiro Messa Zaleski⁴, Joelma Melissa Malherbe Camargo⁵, Rodrigo Daniel Ribeiro⁶

¹Bióloga, Dra., Turfal Ind. Com. Prod. Biológicos e Agrônomicos Ltda., Quatro Barras, PR, Brasil - silvia@turfal.agr.br

²Biólogo, Dr., Embrapa Florestas, Colombo, PR, Brasil - iedeet@cnpf.embrapa.br

³Bióloga, Dr^a., Embrapa Florestas, Colombo, PR, Brasil - susete@cnpf.embrapa.br

⁴Eng^a Agrônoma, Dra., Curitiba, PR, Brasil - srmzaleski@yahoo.com.br

⁵Bióloga, M.Sc., Curitiba, PR, Brasil - melissajoelma@yahoo.com.br

⁶Biólogo, M.Sc., Curitiba, PR, Brasil - rdrcwb@yahoo.com.br

Recebido para publicação: 19/07/2010 – Aceito para publicação: 30/05/2011

Resumo

Hedypathes betulinus (KLUG, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) é a principal praga da cultura da erva-mate. Para o seu controle, avaliou-se em laboratório e campo a utilização de fungos entomopatogênicos. Em laboratório, foi avaliada a infectividade de isolados dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, 1912; *B. brongniartii* (Sacc.) Petch, 1926; *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883, e *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp. Bainier, 1907, em adultos de *H. betulinus*. Os insetos foram imersos nas suspensões fúngicas na concentração de 10^7 conídios/mL. Após a aplicação, eles foram mantidos em laboratório para registro da mortalidade. Verificou-se que *B. bassiana* (CG 716) foi o mais infectivo, com 100% de mortalidade. Foi estimada a CL_{50} do isolado CG 716 de *B. bassiana* com cinco concentrações, variando de 10^5 a 10^9 conídios/mL, mais a testemunha. A CL_{50} estimada foi de $2,0 \times 10^6$ conídios/mL, variando de 6×10^5 a 5×10^6 conídios/mL. Foi avaliada a persistência do isolado CG 716 de *B. bassiana* formulado à base de óleo emulsionável em campo, verificando-se alta mortalidade nas primeiras três semanas após a aplicação do fungo, variando de 95 a 78%, decaindo para 65 a 47%, um e dois meses após a aplicação, respectivamente.

Palavras-chave: Controle biológico; broca-da-erva-mate; CL_{50} .

Abstract

Entomopathogenic fungi in the control of Hedypathes betulinus and evaluation of persistence. *Hedypathes betulinus* (KLUG, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) is the main pest of “erva-mate” (*Ilex paraguariensis*) culture. Focusing its control, it was evaluated in laboratory and field the entomopathogenic fungi using. In laboratory, it was evaluated the infectiveness of the strains of the following fungi: *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *B. brongniartii* (Sacc.) Petch, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), Sorokin and *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp. Bainier, in adults specimen of *H. betulinus*. The insects were immersed in a conidial suspension at a concentration of 10^7 conidia mL^{-1} . After the application the insects had been kept at laboratory for mortality register. It was verified that *B. bassiana* (CG 716) was more infective, reaching to 100% of mortality. It estimated LC_{50} of isolated CG 716 of *B. bassiana* with five concentrations and a variation of 10^5 to 10^9 conidia mL^{-1} , along the control plot. The estimated LC_{50} was $2,0 \times 10^6$ conidia mL^{-1} , ranging from 6×10^5 to 5×10^6 conidia mL^{-1} . The persistence of strain CG 716 of *B. bassiana* - formulate oil was evaluated in field, producing the highest mortality, at the first three weeks after the application of the fungus, with a variance of 95 to 78 %, with a decreasing of 65 to 47% , along one and two months after the application , respectively.

Keywords: Biological control; erva-mate pest; LC_{50} .

INTRODUÇÃO

No Brasil, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) é a principal praga da cultura erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.), distribuindo-se por toda a região produtora da erva-mate.

Essa praga pertence ao grupo dos serradores (CÂNDIDO FILHO, 1929), sendo assim chamada por perfurar os galhos, troncos e raízes da planta. Os danos mais severos são ocasionados pelas larvas, as quais constroem galerias longitudinais ascendentes no tronco, que impedem a circulação normal da seiva e resultam no depauperamento das erveiras, podendo causar mortalidade das árvores (ALENCAR, 1960).

O uso de agrotóxicos, tanto para o controle de formas imaturas como de adultos, não é recomendável, tendo em vista a inexistência de princípios ativos que sejam comprovadamente eficientes e de baixa toxicidade para homens e animais, assim como a proibição do emprego desses produtos na erva-mate, provavelmente devido ao risco de haver resíduos tóxicos no produto final (LEITE *et al.*, 2006, *apud* BORGES, 2007).

Pagliosa *et al.* (1994) realizaram estudos para a implementação do controle microbiano de *H. betulinus*, avaliando em laboratório a infectividade de isolados do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin 1912, obtidos de bancos genéticos, isolados de outras espécies de insetos. Resultados promissores foram obtidos com o isolado CG 152, cuja infectividade foi de 73,4%.

Soares *et al.* (1995) e Soares e Iede (1997), *apud* Borges (2007), detectaram a ocorrência natural dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883, em adultos de *H. betulinus*. Leite *et al.* (2000), *apud* Borges (2007), isolaram uma cepa de *B. bassiana* proveniente de adultos de *H. betulinus* coletados em campo, a qual foi incorporada e catalogada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, como CG 716. Esse isolado foi comparado a outros de *B. bassiana*, *B. brongniartii* (Sacc.) Petch, 1926, e *M. anisopliae*, apresentando-se como o mais eficiente, com alta infectividade em laboratório.

B. bassiana tem sido testada para o controle de diversos cerambicídeos, como em adultos de *Plectrodera scalator* Fabricius, 1792, praga de *Populus deltoides* Marsh (cottonwood), em Kentucky, Estados Unidos, atingindo porcentagens de mortalidade superiores a 60% (FORSCHLER; NORDIN, 1988). Na China, *B. bassiana* tem sido produzida em larga escala e utilizada no controle de mais de 30 espécies de pragas florestais e agrícolas (FENG *et al.*, 1994).

Como esses patógenos são muito sensíveis às condições do ambiente, para obterem maior estabilidade quando utilizados em campo é necessário que eles sejam formulados. Formulações à base de óleo, além de aumentar a sobrevivência dos conídios, auxiliam sua adesão ao tegumento do inseto, protegendo-os contra a dissecação e os raios ultravioleta, facilitando também o manuseio para o aplicador. O óleo auxilia na adesão dos conídios nas superfícies hidrofóbicas da cutícula dos insetos e das plantas (PRIOR *et al.*, 1988; JOHNSON; GOETTEL, 1993).

Depois da aplicação do patógeno no meio ambiente, o seu destino varia de acordo com a espécie do fungo e com os fatores ambientais. A sua persistência, o seu crescimento populacional e a sua dispersão são os principais fatores que afetam seu destino. Como os vírus e as bactérias, os fungos entomopatogênicos apresentam uma grande persistência no solo e na população hospedeira (FUXA, 1992). *B. bassiana* pode persistir no solo por períodos de 15 dias a 1 ano, após a liberação (WATT; LEBRUN, 1984; MÜLLER-KÖGLER; ZIMMERMAN, 1986). Thorvilson *et al.* (1985) e Daoust e Pereira (1986) observaram que *B. bassiana* tem persistência de 32 semanas em cadáveres hospedeiros.

Os objetivos do presente estudo foram realizar a seleção de isolados de fungos entomopatogênicos visando o controle de *H. betulinus* e avaliar a persistência em campo. Espera-se que, com este estudo, possa ser encontrado um agente controlador da praga em pelo menos 70% de sua população e que possua persistência acima de um mês.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de laboratório e de campo foram conduzidos na Embrapa Florestas Colombo, PR.

Os insetos utilizados nos bioensaios laboratoriais foram coletados em ervais localizados nos municípios de Ivaí (PR) e São Bento do Sul (SC). Em função da dificuldade de os insetos serem criados em laboratório, e para garantir a obtenção de insetos sadios e com poucos dias de vida, foram selecionados apenas os que apresentavam o corpo todo recoberto por pêlos de coloração branca (característica de insetos recém-emergidos) e sem danos, como ruptura de antenas e pernas. Em laboratório, os insetos foram selecionados e individualizados em copos plásticos transparentes, medindo 11 cm de altura x 8 cm de diâmetro, sendo ofertados ramos de erva-mate para sua alimentação.

Seleção dos isolados

Para avaliar a infectividade de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos em adultos de *H. betulinus*, foi realizado um bioensaio com os seguintes fungos: *Beauveria bassiana* (CG 152, 61, 15, 25, 544, 21, 716 e BB 01); *B. brongniartii* (CG 72); *Metarhizium anisopliae* (CG 100) e *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp. (CG 815), conforme tabela 1. Os isolados foram cultivados em meio de arroz e incubados a 24 ± 2 °C durante 20 dias. Para avaliar a viabilidade dos conídios dos isolados, eles foram plaqueados em meio de ágar-água. Após 24 h foi quantificada, em microscópio óptico, a porcentagem de germinação de 100 conídios, considerando-se conídio germinado aquele que apresentava o tubo germinativo. Posteriormente, os conídios dos isolados foram quantificados em câmara de Neubauer e ajustados na concentração de $3,5 \times 10^7$ conídios/mL. Adultos de *H. betulinus* foram imersos por um segundo nas suspensões compostas por conídios do fungo, água estéril e Tween 70%. A mesma metodologia foi adotada para a testemunha, porém sem o fungo. Após a imersão, os insetos foram individualizados em copos plásticos, contendo em sua base papel filtro. Ramos de erva-mate foram ofertados como alimento e as observações foram diárias, até a morte dos insetos. Após a morte, procedeu-se à imersão dos insetos em álcool 70% e água destilada e posterior individualização em câmara úmida, para se observar a extrusão do fungo e a confirmação do agente causal. O experimento constou de um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e 30 repetições, sendo cada repetição constituída de um inseto adulto. O experimento foi conduzido em salas climatizadas com temperatura de 24 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. A eficiência dos isolados foi avaliada mediante a porcentagem de mortalidade. Os dados referentes à mortalidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabela 1. Origem e hospedeiros dos isolados dos fungos entomopatogênicos utilizados nos testes de laboratório e campo.

Table 1. Origin and host of the isolates of the entomopathogenic fungi used in laboratory tests and field.

| Isolados | Hospedeiros | Origem |
|---|---|-----------------------|
| ----- <i>Beauveria bassiana</i> ----- | | |
| CG 716 | <i>Hedypathes betulinus</i> (Coleoptera: Cerambycidae) | Colombo - PR |
| CG 152 | (Coleoptera: Chrysomelidae) | Goiânia - GO |
| CG 61 | <i>Diabrotica</i> sp. (Coleoptera: Chrysomelidae) | Brasília - DF |
| CG 15 | <i>Lebia concinna</i> (Coleoptera: Carabidae) | Londrina - PR |
| CG 25 | <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae) | Brasília - DF |
| CG 544 | <i>Rhinostomus barbirostris</i> (Coleoptera: Curculionidae) | Cenargen |
| BB 01 | <i>Hedypathes betulinus</i> (Coleoptera: Cerambycidae) | São Bento do Sul - SC |
| ----- <i>Beauveria brongniartii</i> ----- | | |
| CG 72 | <i>Diatraea saccharalis</i> (Lepidoptera: Pyralidae) | Araras - SP |
| ----- <i>Metarhizium anisopliae</i> ----- | | |
| CG 100 | (Coleoptera: Cerambycidae) | Ivaí - PR |
| ----- <i>Paecilomyces</i> (= <i>Isaria</i>) sp.----- | | |
| CG 815 | <i>Hedypathes betulinus</i> (Coleoptera: Cerambycidae) | Ivaí - PR |

Concentração média letal

Para a estimativa da concentração média letal (CL_{50}) de conídios, foi selecionado o isolado CG 716 de *B. bassiana*, em função de ter apresentado a maior porcentagem de mortalidade (100%) e de ter sido, entre os fungos isolados do próprio inseto, o isolado que apresentou o menor TL_{50} (22,9 dias). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos (cinco concentrações de conídios do fungo e a testemunha) e 20 repetições. O fungo foi multiplicado em meio de arroz, conforme descrito no experimento anterior. Os conídios foram quantificados nas concentrações de 5×10^5 , 3×10^6 , 5×10^7 , 3×10^8 e 4×10^9 conídios/mL, e adultos de *H. betulinus* foram imersos por um segundo nas suspensões compostas por conídios de *B. bassiana*, água estéril e Tween 70%. A mesma metodologia foi adotada para a testemunha, porém sem o fungo. Posteriormente, os insetos foram individualizados em potes plásticos, sendo ofertados ramos de erva-mate até a morte dos insetos. Os procedimentos para a constatação da extrusão do fungo nos insetos mortos foram iguais aos do experimento anterior. O experimento foi conduzido em sala climatizada, com temperatura de 22 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase

de 12 horas. A estimativa da CL₅₀ foi efetuada mediante a utilização do programa computacional Micro Probit (versão 3.0). Os dados referentes à mortalidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Persistência

Para avaliar a persistência do isolado CG 716 de *B. bassiana* formulado à base de óleo vegetal emulsionável em campo, instalou-se um experimento, em blocos ao acaso, em um erval localizado na Embrapa Florestas, em Colombo (PR), com aproximadamente 10 anos de idade e espaçamento de 3 x 2 m. Foram selecionadas, ao acaso, cinco erveiras, as quais foram podadas previamente e cada uma acondicionada em uma gaiola confeccionada em madeira e tela metálica, medindo 1,50 x 1,60 m. A distância entre as gaiolas era de aproximadamente 10 metros, com exceção da testemunha, que equidistou 100 metros das demais. O fungo foi aplicado em quatro erveiras, na concentração de $4,6 \times 10^8$ conídios/mL mais 1% de óleo emulsionável. Utilizou-se uma erveira como testemunha, adotando-se a mesma metodologia de aplicação, porém sem o fungo. A suspensão foi aplicada com pulverizador costal, durante 15 segundos, apenas no tronco da erveira, utilizando-se 150 mL/planta, sendo, posteriormente, colocados cinco insetos adultos na base do tronco de cada erveira. O experimento constou de nove tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram: T1: insetos colocados logo após a aplicação do fungo; T2: insetos colocados 48 h após a aplicação do fungo; T3: insetos colocados 72 h após a aplicação do fungo; T4: insetos colocados 1 semana após a aplicação do fungo; T5: insetos colocados 2 semanas após a aplicação do fungo; T6: insetos colocados 3 semanas após a aplicação do fungo; T7: insetos colocados 1 mês após a aplicação do fungo; T8: insetos colocados 2 meses após a aplicação do fungo; e T9: testemunha, sem aplicação do fungo. Esse experimento foi iniciado no mês de dezembro e finalizado no início de fevereiro, com temperatura média de 21 ± 2 °C e UR de $79 \pm 10\%$. Foram utilizados 200 adultos de *H. betulinus*, na proporção de 4 machos para 1 fêmea, com 40 repetições por tratamento. Em todos os tratamentos os insetos permaneceram 24 h nas gaiolas e posteriormente foram coletados, identificados e individualizados em copos plásticos com alimento, permanecendo em laboratório até a sua morte, em condições não controladas, com temperatura média de 20 ± 2 °C e UR de $66,9 \pm 10\%$. Os procedimentos para verificar a extrusão do fungo nos insetos mortos foram iguais aos dos experimentos anteriores. Os dados referentes à mortalidade foram analisados através de análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção dos isolados

Os sintomas de infecção foram observados inicialmente por tremores nas pernas, diminuição da alimentação, ocorrendo a extrusão do fungo, primeiramente, nas inserções abdominais do corpo, aparelho bucal, antenas e pernas, produzindo conídios de coloração branca. Segundo Alves (1998), o inseto infectado cessa a alimentação, tornando-se fraco e visivelmente desorientado, aparecendo um halo branco associado à estrutura característica do conidióforo e dos conídios do fungo.

A germinação dos conídios de todos os isolados foi superior a 90%. Os valores referentes às percentagens de mortalidade de adultos de *H. betulinus* e TL₅₀, causados por diferentes isolados dos fungos avaliados, encontram-se na tabela 2. Os isolados que apresentaram alta infectividade foram: CG 716 e BB 01 do fungo *B. bassiana*, os quais não diferiram estatisticamente entre si, com infectividade de 95,8% e 100%, respectivamente. Os isolados que apresentaram infectividade moderada foram *B. bassiana* CG 544, CG 15, CG 61, CG 152 e *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp. CG 815, com mortalidade de 37,5% a 83%, diferindo estatisticamente entre si. Os isolados CG 100 (*M. anisopliae*), CG 72 (*B. brongniartii*) e CG 25 (*B. bassiana*) não diferiram estatisticamente da testemunha, mostrando baixa infectividade, variando de 2,1% a 31,2%. Na testemunha não foi verificada a ocorrência de fungos entomopatogênicos em nenhuma das repetições, entretanto a mortalidade foi de 10,4%, por causas naturais. Pagliosa *et al.* (1994) encontraram para o isolado CG 152, de *B. bassiana*, uma infectividade de 73,4% em adultos de *H. betulinus*, em laboratório.

A patogenicidade diferenciada entre os isolados dos fungos avaliados indica que os isolados CG 716 e BB 01 de *B. bassiana*, coletados em adultos de *H. betulinus*, apresentam maior virulência a essa

praga. De acordo com Alves (1998), quando as doenças de insetos ocorrem naturalmente nas populações de pragas, devem-se considerar esses patógenos como elementos básicos no manejo integrado da praga, dependendo principalmente do uso de medidas que favoreçam o bom desenvolvimento da epizootia. Shimazu *et al.* (2002) avaliaram a patogenicidade de isolados dos fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp. em larvas do cerambicídeo *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky, 1853). O fungo foi aplicado nas larvas em uma concentração de conídios semelhante à deste experimento, $1,0 \times 10^7$ conídios/mL, sendo o fungo *B. bassiana* F0003 o mais infectivo, causando 100% de mortalidade. Os resultados demonstram que para essas duas espécies de cerambicídeos o fungo *B. bassiana* foi o que causou os maiores índices de mortalidade.

O cálculo do TL₅₀ indicou uma variação entre os isolados de 9,8 a 32 dias, sendo que os isolados CG 61, CG 15, CG 152 e CG 72 apresentaram os menores valores, com 9; 8; 10; 10,1 e 14,3 dias, respectivamente (Tabela 2). Os isolados obtidos de *H. betulinus* apresentaram TL₅₀ superiores aos isolados obtidos de outros insetos. Isso também pode ser comprovado quando se compara o isolado mais infectivo obtido de *H. betulinus* (CG 716), que apresentou um TL₅₀ de 22,9 dias, com o CG 152 testado por Pagliosa *et al.* (1994), que foi obtido de outra espécie de inseto e apresentou um TL₅₀ de 9,4 dias. Shimazu *et al.* (2002) obtiveram um TL₅₀ de 16 dias para *Anoplophora glabripennis*, período também inferior ao encontrado para *H. betulinus*. O tempo médio para causar a mortalidade pode estar atribuído a vários fatores, entre eles a infectividade do isolado e a resistência do inseto. Para a seleção do isolado mais virulento para testes em campo, foram avaliados a infectividade, o TL₅₀ e a origem dos isolados. Optou-se pelo isolado CG 716 por ter sido um dos mais virulentos e por ter sido obtido de *H. betulinus*, pois, para utilização em campo, é necessário levar em consideração isolados que já estejam adaptados às condições climáticas do ambiente de origem, para causar epizootias.

Tabela 2. Eficiência de isolados de *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp. no controle de *H. betulinus*, em laboratório (n = 30).

Table 2. Efficiency of isolates of *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *M. anisopliae* and *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp. in the control of *H. betulinus* in the laboratory (n = 30).

| Isolados | Mortalidade (%) ⁽¹⁾ | TL ₅₀ (dias) IC ⁽²⁾ |
|---|--------------------------------|---|
| <i>B. bassiana</i> CG 716 | 100 ± 0,00 a | 22,9 ± 2,09 a (18,56-27,19) |
| <i>B. bassiana</i> BB 01 | 95,8 ± 4,08 a | 26,4 ± 2,47 a (21,28-31,49) |
| <i>B. bassiana</i> CG 544 | 90,0 ± 6,71 ab | 18,5 ± 2,24 a (21,38-30,71) |
| <i>B. bassiana</i> CG 15 | 83,0 ± 5,48 ab | 10,0 ± 0,40 b (9,30-10,91) |
| <i>B. bassiana</i> CG 61 | 76,6 ± 6,04 ab | 9,8 ± 0,48 b (8,83-10,79) |
| <i>B. bassiana</i> CG 152 | 66,6 ± 6,80 b | 10,1 ± 0,51 b (9,46-11,54) |
| <i>Paecilomyces</i> (= <i>Isaria</i>) sp. CG 815 | 37,5 ± 7,65 c | 32,0 ± 1,38 a (29,19-34,80) |
| <i>M. anisopliae</i> CG 100 | 31,2 ± 11,59 cd | 25,8 ± 2,70 a (20,07-31,53) |
| <i>B. brongniartii</i> CG 72 | 31,1 ± 6,90 cd | 14,3 ± 1,15 b (11,45-16,12) |
| <i>B. bassiana</i> CG 25 | 2,1 ± 2,04 d | 17,0 ± 0,00 ab |
| Testemunha | 10,45 ± 3,74 d | 27,7 ± 2,21 a (3,29-12,13) |

⁽¹⁾: Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ⁽²⁾: Intervalo de confiança.

Concentração média letal. A CL₅₀ estimada para o isolado CG 716 é de 2×10^6 conídios/mL, variando de 6×10^5 a 5×10^6 conídios/mL (Tabela 3).

As concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL causaram as mais elevadas porcentagens de mortalidade (84, 95 e 100%, respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si. Shimazu *et al.* (2002) estimaram a CL₅₀ para os isolados F-263 (*B. bassiana*) sobre larvas e adultos de *A. glabripennis*. A metodologia de aplicação foi semelhante à utilizada para *H. betulinus*, porém as concentrações utilizadas foram inferiores, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 conídios/mL, apresentando CL₅₀ semelhante à deste bioensaio, $4,1 \times 10^6$ conídios/mL, variando de $3,4 \times 10^5$ a $5,0 \times 10^7$ conídios/mL. Em relação ao TL₅₀, a concentração de 10^9 conídios/mL diferiu significativamente das outras concentrações avaliadas, apresentando 13,2 dias. Já para 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios/mL, foi encontrado um TL₅₀ de 20,2; 20,7; 27,6 e 23,4 dias, respectivamente. Shimazu *et al.* (2002) obtiveram um TL₅₀ inferior para F-263, de 8,1 a 10 dias.

Tabela 3. Mortalidade média (\pm EP) de adultos de *H. betulinus* ocasionada pelo isolado CG 716 de *B. bassiana*, em diferentes concentrações, em laboratório (n = 20).

Table 3. Mortality Mean (\pm SE) of adult *H. betulinus* caused by isolate CG 716 *B. bassiana* at different concentrations, in the laboratory (n = 20).

| Concentração (conídios/mL) | Mortalidade (%) ⁽¹⁾ | TL ₅₀ (dias) IC ⁽²⁾ | CL ₅₀ (conídios/mL) IC ⁽²⁾ |
|----------------------------|--------------------------------|---|--|
| 0 | 0,0 \pm 0,00 c | 0,0 \pm 0,00 b | 2,0x10 ⁶ |
| 5,5x10 ⁵ | 42,1 \pm 11,33 b | 23,4 \pm 2,05 a (19,09-27,66) | (6x10 ⁵ - 5x10 ⁶) |
| 3,3x10 ⁶ | 39,0 \pm 11,49 b | 27,6 \pm 1,61 a (24,18-30,96) | - |
| 4,9x10 ⁷ | 84,2 \pm 8,37 a | 20,7 \pm 1,49 a (17,56-23,81) | - |
| 3,2x10 ⁸ | 95,0 \pm 4,87 a | 20,2 \pm 1,2929 a (17,51-22,91) | - |
| 3,8x10 ⁹ | 100,0 \pm 0,00 a | 13,2 \pm 1,53 b (10,01-16,40) | - |

⁽¹⁾: Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ⁽²⁾: Intervalo de confiança.

Persistência

Verifica-se que o formulado fúngico utilizado neste experimento foi infectivo durante todo o período de avaliação (60 dias) (Figura 1). Nas primeiras três semanas após a aplicação, o fungo causou alta mortalidade, variando de 95 a 78%, decaindo para 65 a 47%, um e dois meses após a aplicação, respectivamente. O tempo médio de mortalidade variou de 20 a 35 dias. A testemunha apresentou mortalidade por causas naturais de 3% nas primeiras três semanas e de 7% um e dois meses após a aplicação, não apresentando nenhuma infecção por *B. bassiana*. Segundo Engler e Rogoff (1976), a rápida inativação dos entomopatógenos em condições de campo é devida às elevadas temperaturas, esterilização pela irradiação solar e microambientes na superfície das folhas, incluindo pH e os desconhecidos inativadores liberados pelas plantas. Conídios de *B. bassiana* são altamente suscetíveis ao detrimental efeito da luz solar (FARGUES *et al.*, 1996). A luz solar na faixa de 290 a 400 nm pode afetar a persistência dos fungos depositados nas folhagens (FUXA, 1987). Ambientes com temperaturas acima de 35 °C reduzem a persistência, apresentando as temperaturas baixas menores efeitos (McCOY *et al.*, 2006).

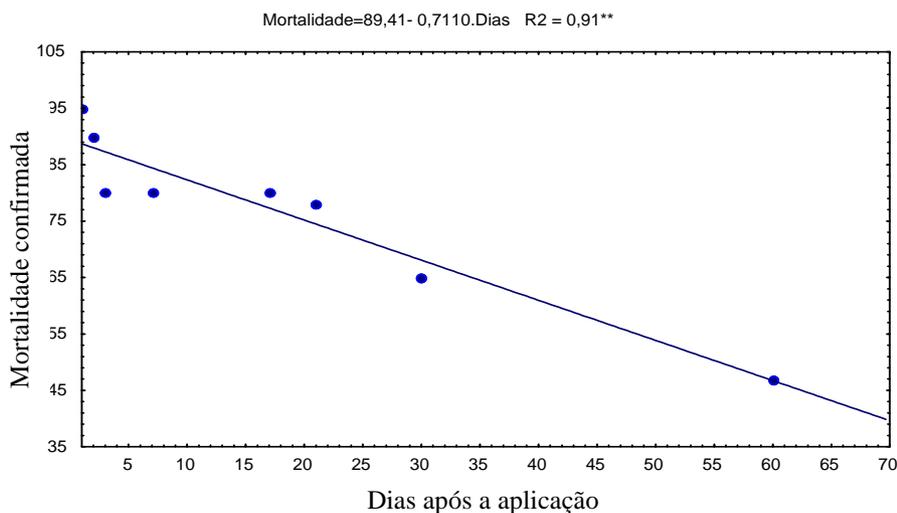


Figura 1. Persistência de *B. bassiana* avaliada em adultos de *H. betulinus*.

Figure 1. Persistence of *B. bassiana* evaluated in adults of *H. betulinus*.

Durante a avaliação do experimento, vários fatores auxiliaram na persistência do fungo, como as condições climáticas favoráveis, com U.R. média de 79,1 \pm 10% e temperatura média de 21 \pm 2 °C, a

aplicação do formulado no tronco, uma região da erveira que fica protegida da insolação direta, e a formulação em óleo, que auxiliou na proteção dos conídios.

Como os adultos de *H. betulinus* têm o hábito de caminhar e ovipositar no tronco da erveira, a aplicação do fungo direcionada é estratégica para atingir o inseto. Esse tipo de aplicação também limita a infecção de outros insetos associados às folhas e galhos da erva-mate, principalmente os inimigos naturais, além de não deixar resíduos nas folhas. O objetivo do controle microbiano é o controle da praga a um nível populacional que não chegue a ponto de ser prejudicial, pois a presença de um número mínimo desses insetos é favorável para a manutenção da população de predadores, parasitoides e patógenos que estão presentes no agroecossistema (ALVES, 1998).

De acordo com Luz *et al.* (1999), o desenvolvimento das formulações à base de óleo dos fungos entomopatogênicos é uma estratégia para preservá-los dos efeitos ambientais negativos. As formulações de fungos entomopatogênicos à base de óleo são superiores àquelas à base de água, especialmente em locais onde a umidade é baixa (BATEMAN *et al.*, 1993). Formulações em óleo prolongam a sobrevivência do conídio e diminuem a sensibilidade a radiações UV quando comparada com suspensões aquosas (INGLIS *et al.*, 1995).

A eficiência de fungo entomopatogênico na produção de uma cultura irá depender da persistência do inóculo em campo. Embora existam exceções, a persistência dos fungos entomopatogênicos em diferentes partes da planta é de poucos dias. *B. bassiana* permanece viável de 5 a 21 dias na superfície da planta (GARDNER *et al.*, 1977; IGNOFFO *et al.*, 1979). Inglis *et al.* (1995) reportaram que a chuva pode afetar a persistência de *B. bassiana* na folhagem. Os conídios de *B. bassiana* são mais persistentes quando depositados no solo (VESTERGAARD *et al.*, 2003). Inglis *et al.* (1997) relataram que, depois de um inicial declínio nos primeiros 20 dias após a aplicação dos conídios, a persistência se estabiliza por aproximadamente 200 dias. O fungo *B. bassiana* foi mais eficiente no controle de *H. betulinus* quando comparado com os fungos *B. brongniartii*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces* (= *Isaria*) sp., sendo o isolado CG 716 um dos mais infectivos, selecionado para estudos de persistência a campo. Esse isolado formulado em óleo emulsionável apresentou persistência durante os 60 dias de avaliação.

CONCLUSÕES

O fungo, *B. bassiana* CG 716 demonstrou ser um agente promissor para o manejo integrado da broca-da-erva-mate, apresentando controle acima de 70% da população da praga (95,8%), com persistência acima de mês.

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Paulo Corrêa, pela concessão da área experimental na região de Campo Alegre, SC.
À ervateira Bitumirim, pelo incentivo à pesquisa e fornecimento de insetos para os bioensaios.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, F. R. de. Erva-mate. **Serviço de Informação Agrícola**, Rio de Janeiro, p. 10 - 23, 1960.
- ALVES, S. B. Microorganismos associados a insetos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 75 - 96.
- BATEMAN, R. P.; CAREY, M.; MOORE, D.; PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locust at low humites. **Annals of Applied Biology**, v. 122, p. 145 - 152. 1993.
- 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). 102 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

- CÂNDIDO FILHO, J. A. A broca da herva-mate (*Hedypathes betulinus* Klug). In: **O Mate**. Curitiba, 1929. v. 1. p.13 – 14.
- DAOUST, R. A.; PEREIRA, R. M. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliales) conidia on cadavers of cowpea pests stored outdoors and in laboratory in Brazil. **Environmental Entomology**, v. 15, p. 642 - 647, 1986.
- ENGLER, R.; ROGOFF, M. H. Entomopathogens: ecological manipulation of natural associations. **Environmental Health Perspectives**, v. 14, p. 153 - 159, 1976.
- FARGUES, J.; GOETTEL, M. S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L. A.; LOMER, C. J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. **Mycopathologia**. v. 135, p. 171 - 181, 1996.
- FENG, M. G.; POPRAWSKI, T. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. **Biocontrol Science and Technology**, v. 4, p. 3 - 34, 1994.
- FORSCHLER, B. T.; NORDIN, G. L. Comparative pathogenicity of selected entomogenous nematodes to the hardwood borers, *Prionoxystus robiniae* (Lepidoptera: Cossidae) and *Megacyllene robiniae* (Coleoptera: Cerambycidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, n. 2, p. 343 - 347, 1988.
- FUXA, J. R. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. **Annual Reviews Entomology**, v. 32, p. 225 - 251, 1987.
- _____. Impact of the release of entomopathogens in the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, 1992.
- GARDNER, W. A.; SUTTON, R. M.; NOBLET, R. Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosema necatrix* on soybean foliage. **Environmental Entomology**, v. 6, p. 616 - 618, 1977.
- IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C.; ALYOSHINA, O. A.; LAPP, N. V. Laboratory and field studies with Boverin: a mycoinsecticidal preparation of *Beauveria bassiana* produced in the Soviet Union. **Journal of Economic Entomology**, v.72, p. 562 - 565, 1979.
- INGLIS, G. D.; JOHNSON, D. L.; GOETTAL, M. S. Effects of simulated rain on the persistence of *Beauveria bassiana* on leaves of alfafa and wheat. **Biocontrol Science and Technology**, v. 5, p. 365 - 369, 1995.
- INGLIS, G. D.; DUKE, G. M.; KANAGARATNAM, P.; JOHNSON, D. L.; GOETTAL, M. S. Persistence of *Beauveria bassiana* in soil following application of conidia through crop canopies. **Memory Entomological Society of Canada**, v. 171, p. 253 - 263, 1997.
- JOHNSON, D. L.; GOETTEL, M. S. Reduction of grasshopper populations following field application of the fungus *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, p. 165 - 175, 1993.
- LUZ, C.; SILVA, I. G.; MAGALHÃES, B. P.; CORDEIRO, C. M. T.; TIGANO, M. S. Control of *Triatoma infestans* (Reduviidae, Tria-tominae) with *Beauveria bassiana*: preliminary assays on formulation and application in the field. **Sociedade Entomológica Brasileira**, n. 28. p. 101 - 110, 1999.
- McCOY, C.; QUINTELA, E. D.; FARIA, M. **Environmental persistence of entomopathogenic fungi**. Disponível em: <www.isuagcenter.com/s265/mccoy.htm>. Acesso em: 12/09/2006.
- MÜLLER-KÖGLER, E.; ZIMMERMAN, G. On the viability of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. In contaminated soil under field and laboratory conditions. **Entomophaga**, v. 31, p. 285 - 292, 1986.
- PAGLIOSA, M. M. R.; SANTOS, H. R. dos; DIODATO, M. A. Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825), praga da erva-mate, *Ilex paraguariensis* St.-Hil. **Agrárias**, Curitiba, n. 13, v. 1/2, p. 229 - 231, 1994.

PRIOR, C.; JOLLANDS, P.; LE PATOUREL, G. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 66 - 72, 1988.

SHIMAZU, M.; ZHANG, B.; LIU, Y. Fungal pathogens of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) and their virulences. **Bulletin of FFPRI**. L1, p. 1123 - 1130, 2002.

THORVILSON, H. G.; LEWIS, L. C.; PEDIGO, L. P. Overwintering potential of *Nomuraea riley* (Fungi: Deuteromycotina) from *Plathypena scabra* (Lepidoptera: Noctuidae) cadavers in central Iowa. **Journal Kansas Entomology Society**, v. 58, p. 662 - 667, 1985.

VESTERGAARD, S.; CHERRY, A.; KELLER, S.; GOETTEL, M. Safety of Hyphomycete fungi as microbial control agents. In: **Environmental Impacts of Microbial Insecticides**. Ed. Hokkanen, H. M. T. University of Helsinki, Finland. p. 35 - 62. 2003.

WATT, B. A.; LEBRUN, R. A. Soil effects of *Beauveria bassiana* on pupal populations of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology**, v. 13, p. 15 - 18, 1984.

