

**LARISSA ROLIM BORGES**

**EFICIÊNCIA DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL.  
(DEUTEROMYCOTA) PARA O CONTROLE DE *Hedypathes betulinus*  
(KLUG) (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE) EM ERVA-MATE,  
*Ilex paraguariensis* ST. HIL. (AQUIFOLIACEAE)**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Sonia Maria Noemberg Lazzari

Co-orientadores: Dr. Edson Tadeu Iede

Dra. Ida Chapaval Pimentel

**CURITIBA**

**2007**

EFICIÊNCIA DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. (DEUTEROMYCOTA) PARA O  
CONTROLE DE *Hedypathes betulinus* (KLUG) (COLEOPTERA: CERAMBYCIDAE)  
EM ERVA-MATE, *Ilex paraguariensis* ST. HIL. (AQUIFOLIACEAE)

**LARISSA ROLIM BORGES**

Tese apresentada à Coordenação do Curso Pós-Graduação em Ciências Biológicas,  
como requisito parcial para obtenção do grau de “Doutor em Ciências Biológicas” no  
Programa de Pós-Graduação em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná.

Dra. Sonia M. N. Lazzari  
UFPR

Dra. Ida Chapaval Pimentel  
UFPR

Dr. Edson Tadeu Iede  
EMBRAPA FLORESTAS

Dra. Maria Silvia Pereira Leite  
TURFAL

Dr. Wilson Reis Filho  
EPAGRI

Curitiba, 29 agosto de 2007

## ***Ofereço***

*A Deus, que guia meus passos;*

*E ao meu pai, Rogério Rollin Borges, que está ao Seu lado...*

"Sonhei que estava andando na praia,  
e no céu passavam cenas da minha vida.  
Para cada cena, eram deixados dois pares de pegadas  
na areia, entretanto nos momentos mais difíceis havia  
apenas um, e perguntei ao Senhor: - Tu me disseste que  
andarias sempre comigo, e não compreendo porque nas  
horas em que eu mais necessitei me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu: Jamais te deixaria,  
quando viu na areia apenas um par de pegadas,  
eram as minhas, de quando eu te carreguei..."

Margareth F. Powers

*À Isabela Borges Paluch*

*Dedico*

*"... Meu coração, sem direção  
Voando só por voar, sem saber onde chegar  
Sonhando em te encontrar  
E as estrelas que hoje eu descobri no seu olhar  
As estrelas vão me guiar  
Se eu não te amasse tanto assim  
Talvez perdesse os sonhos dentro de mim  
E vivesse na escuridão  
Se eu não te amasse tanto assim  
Talvez não visse flores  
Por onde eu vim, dentro do meu coração..."*  
*Herbert Viana*

## **Agradecimentos**

*A minha orientadora Dra. Sonia M.N. Lazzari, pela dedicação e paciência nas correções e sugestões da minha tese e pela amizade;*

*Aos meus co-orientadores, Dr. Edson Tadeu Iede e Dra. Ida Chavapal Pimentel, pelo incentivo, amizade e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho;*

*A Dra. Maria Silvia P. Leite pela dedicação, paciência e prestimosas sugestões;*

*À Embrapa Florestas, em especial aos pesquisadores Dr. Edilson Batista de Oliveira, Dr. Wilson Reis Filho e Susete Penteado pelas sugestões, e inestimável amizade;*

*À Empresa Turfal, em especial Rubens Buschmann Jr. (diretor) pelo apoio e financiamento;*

*À Empresa Modo Battistella S.A. pela disponibilização dos dados meteorológicos;*

*Ao Sr. Paulo Corrêa pela concessão da área experimental em Campo Alegre – SC;*

*Ao Ivan Jorge da Silva, técnico da Embrapa Florestas, pelo auxílio em minhas coletas;*

*Ao Dr. Juarez Gabardo e Júlio Valaski pelas análises estatísticas;*

*À família Telma, especialmente Seu Gerônimo e D. Maria Rita pela colaboração imprescindível nas coletas e acima de tudo pela amizade e confiança;*

*Ao meu cunhado Guillermo Arriagada Berrios pelo grande auxílio em meu trabalho;*

*Às minhas estagiárias do Laboratório de Microbiologia Lívia Camargo e Lílian Kalinowski;*

*Aos os amigos da Entomologia, em especial a Dra. Josiane Cardoso e Dra. Daniéla Calado;*

*A todos os pesquisadores e produtores de erva-mate (*Ilex paraguariensis*);*

*Ao CNPQ pela bolsa concedida*

***Aos meus familiares e amigos por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos e ideais...***

*Meu marido, Márlon Paluch, pelo incentivo, amor, carinho e inestimável dedicação;*

*Minha amada filhinha Isabela Borges Paluch;*

*Minha amadas, mãe Janete Borges, irmãs Lívia e Cíntia e sobrinhas Thainá e Vivian;*

*Meus queridos avós, Janet e Hamilton Rolim;*

*A minha prima Kátia Luciane Neira e seu marido Flávio Lopes Jr.;*

*Às famílias Woiski e Paluch, em especial D. Ana Catharina e minha afilhada Ana Gabriela;*

*À família Carmelo Fukui pela amizade;*

*A toda a minha família por existirem em minha vida...*

## ÍNDICE

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. <i>Ilex paraguariensis</i> .....	4
2.2. Pragas de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	5
2.3. <i>Hedypathes betulinus</i> .....	6
2.3.1. Biologia de <i>Hedypathes betulinus</i> .....	8
2.3.2. Flutuação Populacional de <i>Hedypathes betulinus</i> .....	9
2.4. Manejo Integrado de Pragas.....	9
2.5. Manejo Integrado de Pragas em Erva-mate.....	10
2.6. Agentes de Controle Biológico.....	12
2.6.1. Parasitóides e Predadores.....	12
2.6.2. Fungos Entomopatogênicos.....	12
2.6.2.1. Sintomas do ataque fúngico.....	14
2.6.2.2. <i>Beauveria bassiana</i> .....	15
2.6.2.3. Inóculos de Fungos no Solo.....	17
3. Material e Métodos.....	20
3.1. Caracterização da Área Experimental.....	20
3.2. Linhagem e formulação de <i>Beauveria bassiana</i> .....	20
3.3. Escolha da concentração de <i>Beauveria bassiana</i> .....	21
3.4. Tratamentos e cronograma de aplicação de <i>Beauveria bassiana</i> em campo.....	21

3.5. Aplicação de <i>Beauveria bassiana</i> a campo.....	24
3.6. Amostragem e flutuação populacional de <i>Hedypahtes betulinus</i> .....	24
3.7. Avaliação da mortalidade de adultos de <i>Hedypahtes betulinus</i> coletados a campo após aplicação fúngica.....	25
3.8. Proporção sexual de adultos de <i>Hedypathes betulinus</i> .....	26
3.9. Distribuição de <i>Hedypathes betulinus</i> nos estratos da erveira.....	26
3.10. Distribuição espacial de <i>Hedypathes betulinus</i> nos diferentes tratamentos.....	27
3.11. Intensidade dos danos causados por <i>Hedypathes betulinus</i> .....	27
3.12. Infectividade e transmissão da linhagem CG 716 de <i>B. bassiana</i> em adultos de <i>Hedypathes betulinus</i> , em laboratório.....	27
3.13. Coleta das amostras de solo.....	29
3.13.1. Preparo das amostras compostas.....	30
3.13.2. Isolamento de colônias.....	31
3.13.3. Identificação dos isolados.....	31
3.13.4. Método de Cultura em Lâmina ou Microcultivo.....	31
3.14. Análises Estatísticas.....	32
3.15. Dados meteorológicos.....	32
4. Resultados e Discussão.....	33
4.1. Avaliação quantitativa de <i>Hedypathes betulinus</i> .....	33
4.2. Flutuação populacional de <i>Hedypathes betulinus</i> .....	36
4.3. Mortalidade de adultos de <i>H. betulinus</i> coletados a campo após aplicação fúngica.....	38
4.4. Proporção sexual de adultos de <i>Hedypathes betulinus</i> .....	41
4.5. Distribuição dos adultos de <i>Hedypathes betulinus</i> nos estratos da erveira.....	43
4.6. Distribuição espacial de <i>H. betulinus</i> nos tratamentos.....	45

4.7. Intensidade dos danos causados por <i>H. betulinus</i> .....	50
4.8. Infectividade e transmissão de <i>B. bassiana</i> em adultos de <i>H. betulinus</i> em laboratório.....	54
4.9. Inóculos de fungos nas amostras de solo.....	56
4.10. <i>Beauveria bassiana</i> .....	56
4.11. Outros fungos isolados do solo.....	61
5. Conclusões.....	70
6. Referências Bibliográficas.....	73
Anexos.....	87



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1a.</b> Adultos de <i>H. betulinus</i> em cópula (fêmea embaixo e macho em cima).....	7
<b>Figura 1b.</b> Adultos de <i>H. betulinus</i> fêmea realizando postura na base de <i>I. paraguariensis</i> (erva-mate).....	7
<b>Figura 2a.</b> Larva de <i>H. betulinus</i> em galeria realizada no tronco de <i>I. paraguariensis</i> (erva-mate).....	7
<b>Figura 2b.</b> Larva de <i>H. betulinus</i> em detalhe.....	7
<b>Figura 3.</b> Croqui da área experimental no município de Campo Alegre – SC. TI - testemunha; TII - catação; TIII - 2 aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ; TIV - 3 aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> .....	23
<b>Figura 4.</b> Adulto de <i>H. betulinus</i> marcado no pronoto com esmalte (indicando o tratamento) e grafite nos élitros (com o número 81).....	25
<b>Figura 5a.</b> Avaliação da infectividade de <i>B. bassiana</i> , na concentração de $3,5 \times 10^7$ conídios/mL.; imersão de ramos de erva-mate no formulado fúngico.....	29
<b>Figura 5b.</b> Avaliação da infectividade de <i>B. bassiana</i> , na concentração de $3,5 \times 10^7$ conídios/mL; macho copulando com fêmea infectada.....	29
<b>Figura 6.</b> Flutuação populacional de adultos de <i>H. betulinus</i> para os tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), TIV (três aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), em um povoamento puro de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no município de Campo Alegre – SC.....	37
<b>Figura 7.</b> Flutuação populacional de machos e fêmeas de <i>H. betulinus</i> , obtidos no tratamento TII (catação) em um povoamento puro de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no município de Campo Alegre – SC.....	42

<b>Figura 8.</b> Distribuição (%) de <i>H. betulinus</i> nos estratos da planta nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais) e TIV (três aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ) em povoamento puro de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no mês de janeiro de 2005 e 2007 no município de Campo Alegre – SC.....	45
<b>Figura 9.</b> Distribuição de <i>H. betulinus</i> nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), TIV (três aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), em janeiro de 2005, em um povoamento de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no município de Campo Alegre – SC.....	47
<b>Figura 10.</b> Distribuição de <i>H. betulinus</i> nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), TIV (três aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), em janeiro de 2006, em um povoamento puro de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no município de Campo Alegre – SC.....	48
<b>Figura 11.</b> Distribuição de <i>H. betulinus</i> nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), TIV (três aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), em janeiro de 2007, em um povoamento puro de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no município de Campo Alegre – SC.....	49
<b>Figura 12.</b> Intensidade dos danos causados por <i>H. betulinus</i> nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), TIV (três aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ) em janeiro de 2006 (14 meses após o início da aplicação), em um povoamento puro de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no município de Campo Alegre – SC.....	52
<b>Figura 13.</b> Distribuição espacial dos danos causados por <i>H. betulinus</i> nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), TIV (três aplicações anuais de <i>B. bassiana</i> ), em janeiro de 2007 (após 26 meses do início das aplicações), em um povoamento puro de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no município de Campo Alegre – SC.....	53

<b>Figura 14.</b> Intervalo de dias da mortalidade em fêmeas de <i>H. betulinus</i> contaminadas com formulado de <i>B. bassiana</i> (fêmeas C) e dos machos colocados em contato com estas fêmeas (machos C), em laboratório.....	55
<b>Figura 15.</b> Adulto de <i>H. betulinus</i> , em laboratório, apresentando extrusão do fungo <i>B. bassiana</i> em câmara úmida.....	56
<b>Figura 16.</b> Número total de colônias de <i>B. bassiana</i> isoladas do solo registradas nos tratamentos TIII (duas aplicações anuais do patógeno) e TIV (três aplicações anuais com <i>B. bassiana</i> ) correlacionado com temperatura média (T <sub>méd</sub> °C) e umidade relativa (UR%) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no município de Campo Alegre – SC.....	60
<b>Figura 17a.</b> <i>Beauveria bassiana</i> , colônia.....	60
<b>Figura 17b.</b> <i>Beauveria bassiana</i> , conídios.....	60
<b>Figura 17c.</b> <i>Beauveria bassiana</i> ; conídios com conidióforos formando cachos, fiálides com parte basal dilatada terminando em zigue-zague em microscopia eletrônica de varredura (M.E.V), aumento de 4985X.....	60
<b>Figura 18.</b> Número total de colônias de fungos filamentosos de <i>Penicillium</i> sp. (Pen), <i>Acremonium</i> sp. (Acr) e <i>Aspergillus</i> sp. (Asp) encontradas nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com <i>B. bassiana</i> ) e TIV (três aplicações anuais com <i>B. bassiana</i> ) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no município de Campo Alegre – SC.....	65
<b>Figura 19.</b> Número total de colônias de fungos entomopatogênicos de <i>Cladosporium</i> sp. (Cla), <i>Fusarium</i> sp. (Fus), <i>Metarhizium</i> sp. (Met) e <i>Rhizopus</i> sp. (Rhi) encontradas nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com <i>B. bassiana</i> ) e TIV (três aplicações anuais com <i>B. bassiana</i> ) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, <i>I. paraguariensis</i> , no município de Campo Alegre – SC.....	67

**Figura 20.** Número total de colônias isoladas do solo de fungos filamentosos de *Lecanicillium* sp. (Lec), *Trichoderma* sp. (Tri), *Gliocladium* sp. (Gli) e *Paecilomyces* sp. (Pae) encontradas nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais com *B. bassiana*) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.....68

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Cronograma de aplicação de *B. bassiana* nas áreas TIII e TIV (duas e três aplicações anuais, respectivamente) no período de novembro/2004 a fevereiro/2007 no município de Campo Alegre – SC.....24
- Tabela 2.** Média de adultos de *H. betulinus*, obtidos em cada uma das avaliações para os tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.....35
- Tabela 3.** Número de insetos capturados após 60 dias da última aplicação de 2005 para verificação da mortalidade de adultos de *H. betulinus* por *B. bassiana*.....39
- Tabela 4.** Número de insetos capturados após 60 dias da última aplicação de 2006 para verificação da mortalidade de adultos de *H. betulinus* por *B. bassiana*.....40
- Tabela 5.** Número de insetos capturados em fevereiro de 2007 para verificação da mortalidade de adultos de *H. betulinus* por *B. bassiana*.....40
- Tabela 6.** Distribuição (%) de *H. betulinus* nos estratos da erva-mate para os tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), nos meses de janeiro de 2005 e 2007, em um povoamento puro de erva-mate no município de Campo Alegre – SC.....44
- Tabela 7.** Mortalidade de adultos de *H. betulinus* (fêmeas T e machos T), fêmeas contaminada (fêmeas C) e machos que copularam com as fêmeas contaminadas (machos C), com formulado de *B. bassiana*, em laboratório.....55

**Tabela 8.** Número total de colônias de *B. bassiana* isolados do solo e fatores abióticos registrados nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais) e TIV (três aplicações anuais do patógeno) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.....59

**Tabela 9.** Número total de colônias isoladas do solo do grupo 1 - *Penicillium* sp., *Acremonium* sp. e *Aspergillus* sp. registradas nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais com *B. bassiana*) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre –SC.....64

**Tabela 10.** Número total de colônias isoladas do solo do grupo 2 - *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Metarhizium* sp. e *Rhizopus* sp. registradas nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais com *B. bassiana*) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.....66

**Tabela 11.** Número total de colônias isoladas do solo do grupo 3 - *Lecanicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp. e *Paecilomyces* sp. registradas nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais com *B. bassiana*) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.....66

## Resumo

O controle das pragas da erva-mate, dentre as quais a broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus*, é bastante limitado em função da proibição de uso de inseticidas químicos nesta cultura, dependendo apenas de técnicas silviculturais, catação manual ou de controle biológico. A fim de contribuir com informações para o controle biológico de *H. betulinus* foi desenvolvido o presente trabalho, o qual teve por objetivos: determinar o número de aplicações anuais do micoinseticida a base de *Beauveria bassiana* para o controle desta praga e avaliar a presença e persistência no solo deste fungo entomopatogênico e avaliar a transmissão do fungo por contato entre os insetos, em laboratório. Os experimentos foram conduzidos de novembro/2005 a abril/2007 em uma área de erva-mate em monocultura, no município de Campo Alegre – SC, Brasil. O fungo (cepa sob o código CG 716 do CENARGEN) foi formulado em óleo emulsionável a 0,5% e pulverizada na concentração de  $10^7$  conídios/mL na base do tronco das árvores com pulverizador costal, de acordo com um cronograma de duas ou três aplicações, em diferentes meses do ano. Estes tratamentos foram comparados à catação e testemunha sem aplicação do fungo. Realizou-se a inspeção visual das erveiras para a avaliação dos danos e para a coleta e marcação dos adultos de *H. betulinus*, antes e após os tratamentos, a fim de avaliar a extrusão do fungo e mortalidade do inseto. Para a avaliação da presença de inóculos de fungos no solo, foram coletadas amostras e realizada a contagem e isolamento para a identificação dos mesmos. Constatou-se a eficácia do formulado fúngico nas duas áreas tratadas, porém, não houve diferença estatística entre os tratamentos com duas e três aplicações. As pulverizações de *B. bassiana* nos meses de novembro e fevereiro resultaram em uma epizootia mais generalizada e persistente, possivelmente em função da maior atividade dos adultos. A distribuição espacial do inseto mostrou-se casualizada no erval. Os picos populacionais ocorreram nos meses de março, no primeiro ano, e em janeiro nos dois anos seguintes. Os adultos demonstraram uma preferência significativa pelo estrato médio da árvore. Não foi detectada a ocorrência natural do fungo *B. bassiana* no solo das áreas estudadas, antes dos tratamentos. Após a última pulverização,

realizada em fevereiro, os inóculos persistiram por três meses no tratamento com duas aplicações e quatro meses nos tratamentos com três aplicações, provavelmente, em razão das atividades dos insetos infectados e da presença das carcaças dos espécimes que morreram por infecção fúngica. Nos bioensaios laboratoriais, o contato entre os insetos favorece a disseminação do fungo dentro da população. A intensidade dos danos foi significativamente maior no primeiro ano e nas áreas sem tratamento, sem diferença significativa entre as áreas com duas e três aplicações, indicando que a pulverização na concentração de  $10^7$  conídios/mL é adequada para reduzir a população da praga e, conseqüentemente, os danos. A temperatura afetou a persistência do fungo no solo, mas a umidade e precipitação pluviométrica não mostraram uma influência significativa sobre a persistência de *B. bassiana*. As análises das amostras de solo indicaram a presença de 11 gêneros de fungos filamentosos na área do erval em monocultura, pertencentes aos filos Ascomycota, Zygomycota e Deuteromycota, sendo que muitos deles apresentam ação entomopatogênica. O estudo demonstrou o potencial do controle biológico de *H. betulinus* com *B. bassiana* em monocultivo de erva-mate, mas dependente da adoção de um cronograma de duas aplicações anuais do formulado, nos meses de novembro e fevereiro.



## Abstract

Pest control in yerba maté, especially of the beetle *Hedypathes betulinus*, is limited due to the prohibition of application of chemical insecticides. Pest management for this culture relies basically on cultural measures, insect removal and biological control. In light of the need of generating more data for the biological control of *H. betulinus*, this research was carried out. The main objectives were to evaluate the efficacy of a formulation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to control this pest species and to determine the presence and persistence of this fungus in the soil. The experiments were carried out from November/2005 to April/2007 in an area of monoculture of yerba maté, in the county of Campo Alegre, in the state of Santa Catarina, Brazil. The fungus *B. bassiana* (strain under the code CG 716 from CENARGEN) was formulated in the concentration of  $10^7$  conidia/ mL and sprayed on the base of the trunk of the trees, following a chronogram of two and three applications, in different months; other treatments were the manual removal of the insect from the area and a control without any application. The trees were examined visually to evaluate the damage and to collect and mark the adults of *H. betulinus*, before and after the treatments, in order to verify the extrusion of the fungus and the insect mortality. To evaluate the presence of inoculums of fungi in the soil, the samples were collected and plated on suitable medium for identification. The efficacy of the fungus *B. bassiana* was verified in the treated areas (two and three applications); however, there was no significant difference between them. The treatments with *B. bassiana* in November and February presented the best control of *H. betulinus* with a good epizootic spread attributed to the high insect activity. The spatial distribution of the insect was randomized in the area. The population peaks occurred in March, in the first year, and in January in the following years. The adult *H. betulinus* showed a significant preference for the middle stratum of the tree. It was not detected natural occurrence of *B. bassiana* in the soil of the surveyed areas before the treatments, but after the application of the fungus the inoculums persisted for about six months in the area with two applications and seven in the area of three applications, without significant difference. The persistence resulted from the

activities of the infected insects in the area and from the corpses of the specimens killed by the pathogen. Contact between sexes helped to disseminate the fungus within the population. The intensity of the damage was significantly higher during the first year in the untreated areas; however the difference was not significant between the two treated areas. These results indicate that the application of *B. bassiana* at a concentration of  $10^7$  conidia/mL is adequate to reduce the pest population and consequently their damage. The temperature influenced significantly the persistence of the fungus in the soil, but the humidity and precipitation, at the levels observed, did not show significant influence on the persistence of *B. bassiana*. The soil samples did not contain inoculums of *B. bassiana* before the applications. Other 11 genera of filamentous fungus were detected in the soil of the area evaluated, belonging to the phyla Ascomycota Zygomycota and Deuteromycota, most of them with entomopathogenic activity. This study showed the high potential of the biological control of *H. betulinus* using *B. bassiana* in the area of yerba maté in monoculture; however, it is necessary to adopt a chronogram of two applications in the months of November and February in areas where the inoculums are not present in the soil.

## 1. Introdução

A erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hilaire, 1920 (Aquifoliaceae), é uma cultura importante no sul do Brasil, e em função do seu crescente consumo, os produtores têm implantado povoamentos puros onde antes havia florestas nativas. Assim, quando cultivadas a pleno sol, espécies ombrófilas ficam sujeitas a estresse fisiológico que as tornam mais suscetíveis ao ataque de pragas e doenças (Carpanezzi 1995; Soares 1998). Em função disto, diversas espécies de insetos que se alimentavam em diferentes partes da planta, em ervais nativos, tiveram um grande aumento populacional tornando-se pragas e provocando sérios danos à cultura, dentre as quais a broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) (Penteado 1995; Diaz 1997; Soares 1998).

A legislação brasileira é bastante severa em relação ao uso de agroquímicos nesta cultura, não permitindo a aplicação de nenhuma classe de moléculas inseticidas. Aliado a este, o fato do produto ser consumido principalmente “in natura”, reforça a necessidade de medidas de controle inseridas em um programa de Manejo Integrado de Pragas, visando um produto final sem resíduos tóxicos.

Neste contexto, pesquisas têm comprovado que o emprego de fungos entomopatogênicos apresenta-se como uma excelente medida para o controle biológico de diversos insetos, pois muitos deles apresentam baixo impacto ambiental e podem complementar outros métodos de supressão populacional. Além disto, a constatação da ocorrência natural do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycota), infectando adultos de *H. betulinus*, abre perspectivas para sua utilização visando assegurar a melhoria fitossanitária, e conseqüentemente a qualidade e produtividade da erva-mate, atendendo às atuais exigências do mercado.

Com base nestas considerações, o propósito desta pesquisa foi verificar a eficiência de *B. bassiana* como agente de controle biológico para a redução das populações de *H. betulinus* a campo. Além disto, averiguar a persistência deste fungo entomopatogênico no solo seguindo um cronograma de aplicação e/ou pela

presença de insetos infectados no ambiente do erval. Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Avaliar a eficácia do tratamento com *B. bassiana* para o controle de *H. betulinus* em um sistema de monocultivo de erva-mate;
- Comparar a utilização de *B. bassiana* com a catação manual;
- Identificar aspectos comportamentais de *H. betulinus* que contribuam para a dispersão do fungo e aumento da eficiência dos tratamentos com os entomopatógenos;
- Determinar os fatores abióticos que afetam a eficácia das pulverizações com o fungo;
- Verificar a presença natural e a persistência de *B. bassiana* no solo em monocultura de erva-mate;
- Testar a infectividade do formulado de *B. bassiana* em adultos de *H. betulinus* e sua transmissão por contato;
- Isolar, identificar e quantificar os fungos filamentosos no solo do erval.

## 2. Revisão Bibliográfica

A erva-mate, *I. paraguariensis*, compõe um dos sistemas agroflorestais mais antigos e característicos da região sul do Brasil (Penteado et al. 2000). É uma espécie vegetal que ocorre naturalmente na Floresta Ombrófila Mista, ecossistema associado à Mata Atlântica, podendo atingir uma densidade de centenas de árvores por hectare (Miranda e Urban 1998). Entretanto, a simplificação do ambiente, decorrente do cultivo a pleno sol, provoca um estresse fisiológico na planta que pode aumentar sua suscetibilidade a pragas e doenças (Soares 1998).

Na condição de árvore nativa, a erva-mate apresenta uma ampla gama de artrópodes associados, que geralmente têm suas populações controladas naturalmente por predadores, parasitóides e doenças. Entretanto, ambientes profundamente alterados, como plantios agroflorestais intensivos e extensivos, favorecem a presença dos insetos fitófagos pela maior disponibilidade de alimento e redução da densidade e diversidade de inimigos naturais, que não encontram locais adequados para se alimentar, reproduzir ou se proteger em diferentes fases de seu ciclo de vida (Iede 1985; Diaz 1997; Soares 1998; Leite et al. 2006a).

Em resposta a estes problemas, práticas agrícolas alternativas e menos agressivas que as convencionais, tornaram-se necessárias para o controle de insetos fitófagos. O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é uma estratégia que utiliza várias ferramentas em harmonia com o ambiente e considera o inseto como parte integrante da cultura (Alves 1998; Gallo et al. 2002).

Nesta cultura, o método de controle mecânico, pela catação dos adultos de *H. betulinus* é o mais utilizado (Soares e Iede 1997). Apesar de primitivo, este método é adotado pela maioria dos produtores em função da sua eficiência e fácil execução, principalmente quando há disponibilidade de mão-de-obra (Leite et al. 2006a).

Entretanto, o controle biológico com fungos entomopatogênicos representa uma das medidas mais promissoras para o manejo integrado de pragas em razão de sua ampla distribuição geográfica e ocorrência em condições naturais, enzoótica ou epizooticamente entre outros (Bellows 2001; Headrick e Goeden 2001; Lanza et al. 2004).

## 2.1. *Ilex paraguariensis*

Saint Hilaire foi o primeiro cientista a classificar e publicar uma nomenclatura para a erva-mate, baseado em exemplares coletados na região de Curitiba, durante suas viagens ao sul do Brasil, em 1920. O cientista enviou amostras da planta para o Museu de História Natural de Paris, onde ocorreu uma mistura com outras amostras, havendo troca de etiquetas de identificação e assim, a erva-mate brasileira foi considerada idêntica à do Paraguai, ganhando o nome de *Ilex paraguariensis* (Linhares 1969).

O gênero *Ilex*, com cerca de 600 espécies é numericamente o mais importante da família Aquifoliaceae, sendo *I. paraguariensis*, do ponto de vista econômico e sócio-cultural, a principal espécie na América do Sul. A erva-mate em seu hábitat natural, a Floresta Ombrófila Mista ou Mata de Araucária, é uma planta perenifólia, seletiva higrófito, de crescimento lento ou moderado. Em florestas maduras pode atingir 10 a 15 m de altura e sua densidade pode exceder centenas de indivíduos por hectare (Carpanezi 1995; Miranda e Urban 1998; Soares 1998).

O caule é um tronco de cor acinzentada, geralmente com 20 a 25 cm de diâmetro. As folhas são simples, alternas, e mostram-se estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice com bordas providas de pequenos dentes. As flores são de cor branca, pequenas, pedunculadas e dispostas na axila das folhas superiores. O fruto é globoso, tetralocular, de cor verde quando novo, passando a vermelho-arroxeadado em sua maturidade (Mazuchowski 1991; Valduga 1995).

A área de dispersão geográfica desta espécie é restrita a três países; Argentina, Paraguai e Brasil, sendo que neste último distribui-se nos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O clima predominante nessas regiões é de subtropical a temperado, com temperatura média anual entre 12 e 24°C, com chuvas regulares distribuídas ao longo do ano (Martins 1949; Oliveira e Rotta 1985).

## 2.2. Pragas de *Ilex paraguariensis*

No início da década de 1970, o avanço da fronteira agrícola no sul do Brasil foi responsável pela extinção de grande parte das florestas nativas. Os ervais nativos remanescentes foram levados à exaustão pelo desconhecimento de técnicas adequadas de manejo, condução e exploração. Em função da gradativa diminuição na oferta de matéria-prima para a indústria ervateira foi necessário o reflorestamento da espécie para aumentar a produção (Iede 1985; Penteado 1995).

Em um ambiente natural, a diversidade de plantas sustenta a existência de um complexo de inimigos naturais que mantém diferentes espécies de insetos em baixos níveis populacionais. No entanto, em um ambiente artificial, como uma monocultura, há uma drástica eliminação de espécies de plantas que servem de alimento e abrigo aos inimigos naturais de insetos fitófagos. A este aspecto, soma-se a maior oferta de alimento e, dessa forma, espécies que ocorriam em baixos níveis populacionais tornam-se pragas, provocando severos danos à cultura (Penteado 1995).

Iede e Machado (1989) citaram a ocorrência de 86 espécies de insetos alimentando-se de diferentes partes da erva-mate, porém, poucas podem ser consideradas pragas, uma vez que a maioria ocorre esporadicamente em baixos níveis populacionais, não causando danos econômicos significativos. Segundo Iede et al. (2000), seis espécies de insetos são consideradas pragas da cultura: *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae); *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer y Trelles, 1919) (Hemiptera: Psyllidae); *Thelosia camina* Schaus, 1920 (Lepidoptera: Eupterotidae); *Hylesia* Hübner, 1820 (Lepidoptera: Saturniidae); *Ceroplastes grandis* Hempel, 1900 (Hemiptera: Coccidae); e *Isomerida picticollis* Bates, 1881 (Coleoptera: Cerambycidae).

### **2.3. *Hedypathes betulinus***

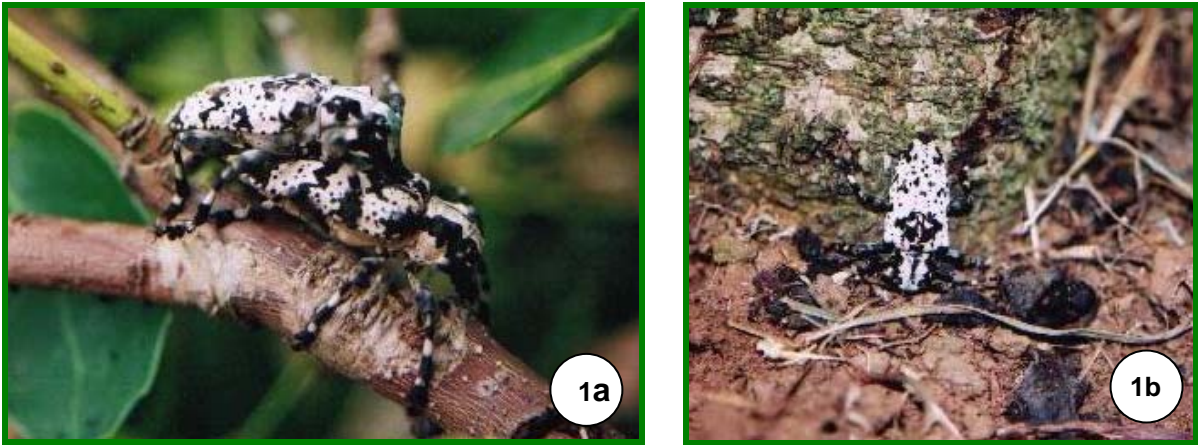
Dentre os insetos que ocasionam perdas significativas na rentabilidade e produtividade da cultura, a broca-da-erva-mate, *H. betulinus* é a praga mais importante. Os danos mais severos são ocasionados pela larva, que no processo de alimentação, constrói galerias no tronco, galhos e raízes das erva-mates dificultando a circulação da seiva, podendo acarretar na morte da planta (Penteado 1995; Penteado et al. 2000; Iede et al. 2000; d'Avila et al. 2006).

O adulto é um besouro de aproximadamente 25 mm de comprimento, coloração preta, recoberto por pêlos brancos esparsos no protórax e nos élitros, formando linhas sinuosas; as antenas são longas e finas, com manchas alternadas claras e escuras (Figura 1a).

As fêmeas realizam as posturas principalmente no colo da planta ou em fendas na casca do tronco. Entretanto, também podem fazê-las nas raízes expostas e galhos da região próxima do ponto onde ocorreu a última poda (De Coll e Saini 1992; Cassanello 1993; Galileo et al. 1993; Penteado 1995) (Figura 1b).

A larva é ápoda e de coloração branca, e inicia a sua alimentação construindo uma galeria geralmente longitudinal ascendente (Figura 2a e 2b). O que dificulta a circulação da seiva e resulta no depauperamento ou até na morte das erva-mates. Durante o processo de broqueamento, a larva deixa atrás de si uma serragem que lhe serve de proteção, e que aos poucos se acumula na base do caule, denunciando a sua presença. As erva-mates atacadas apresentam folhagem escassa e amarelada; galhos secos no ápice da planta; e galhos ou a planta quebrada pela ação dos ventos (Alencar 1960; Cassanello 1993; Iede et al. 2000).





**Figura 1.** Adultos de *H. betulinus*; **1a.** em cópula (fêmea embaixo e macho em cima); **1b.** fêmea realizando postura na base de *I. paraguariensis* (erva-mate).



**Figura 2.** Larva de *H. betulinus*; **2a.** em galeria realizada no tronco de *I. paraguariensis* (erva-mate); **2b.** em detalhe.

### 2.3.1. Biologia de *Hedypathes betulinus*

Cassanello (1993) estudou diversos aspectos da biologia de *H. betulinus*, em laboratório, a uma temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 horas. O ciclo evolutivo dura em média 318 dias, sendo 12 dias do período de incubação; estágio larval de 278 dias, 7,73 dias de estágio pré-pupal e 20 dias de estágio pupal.

Cassanello (1993) verificou a diferença entre os insetos adultos obtidos desde ovo em laboratório (grupo I) e de adultos provenientes de larvas coletadas em campo que completaram seu desenvolvimento em laboratório (grupo II). A longevidade dos adultos machos foi em média de 100-148 dias para os grupos I e II, respectivamente, e das fêmeas 101-144 dias para os mesmos grupos, respectivamente. O ciclo de vida completo de *H. betulinus* foi, portanto, de aproximadamente 423 dias para o macho e 490 para a fêmea. A fecundidade média foi de 95-117 ovos e a fertilidade média de 82-83% para os grupos I e II. O número aproximado de posturas durante o período reprodutivo totalizou 31 posturas. A proporção sexual variou entre 1,22 e 2,25 machos para cada fêmea dos grupos I e II.

Soares (1998), em estudos realizados em Ivaí - PR, verificou que o ciclo evolutivo, mensurado da postura até a emergência do adulto, levou em média 17 meses (mais de 500 dias). A proporção sexual foi de 1,57 machos para cada fêmea. O pico de posturas ocorreu entre março e abril e o de cópulas entre fevereiro e março, pelo método de marcação e recaptura. O mesmo autor estimou a longevidade em 294 dias para machos e 133 dias para fêmeas, resultados muito superiores que os verificados por Cassanello (1993) para machos e próximo ao mencionados por este autor para fêmeas.

Quanto aos aspectos reprodutivos de *H. betulinus*, Cassanello (1993), verificou que a fecundidade média das fêmeas obtidas a partir de ovo em laboratório foi de 95 ovos (variando de 63 a 127). O número médio de ovos por postura foi de 3,18 ovos (variando de 2,45 a 3,53), totalizando em média 31 posturas durante todo seu período reprodutivo, com variação de 20 a 44 posturas. Em fêmeas provenientes de larvas de campo, a fecundidade média foi de 116,50

ovos (com variação de 58 a 208), sendo o número médio de posturas 30,25 (variando entre 22 e 43). A fertilidade dos ovos provenientes das fêmeas criadas desde ovo foi em média de 81,57% (variando de 79,37 a 83,46%). Os ovos provenientes de larvas de campo apresentaram média de fertilidade de 83,16% (com variação de 80 a 86,20% de ovos férteis). Em ambos os casos, não houve diferença significativa na fertilidade e fecundidade entre os grupos de fêmeas.

### **2.3.2. Flutuação Populacional de *Hedypathes betulinus***

Os dados referentes à flutuação populacional, citados por Soares (1998) e lede et al. (2000), indicam que os adultos estão presentes durante todo o ano no erval, ocorrendo em grande número entre os meses de outubro e final de junho, com pico populacional entre fevereiro e março. Os machos estão presentes no erval aproximadamente um mês antes das fêmeas, e são mais abundantes no período compreendido entre agosto e março. Entretanto, nos menores níveis populacionais registrados nestes estudos, as fêmeas eram mais numerosas.

Segundo Soares (1998), as variações numéricas da população são influenciadas pela temperatura, não o sendo pela precipitação pluviométrica. Portanto, as maiores populações foram verificadas quando a temperatura média foi igual ou superior a 20°C, constatando-se que a flutuação populacional é do tipo sazonal, com maior atividade nas estações mais quentes.

### **2.4. Manejo Integrado de Pragas**

O uso indiscriminado e contínuo de produtos fitossanitários em culturas de importância econômica tem sido o principal fator de desequilíbrio ecológico, contribuindo para o aumento das populações de pragas, redução da produtividade e efeitos indesejáveis sobre o ambiente, o homem e outros animais. Além disso, casos de resistência a estes defensivos agrícolas, detectados em diversas

espécies de pragas, bem como seu custo elevado, têm estimulado o desenvolvimento de Programas de Manejo Integrado de pragas (MIP) como a melhor alternativa na preservação do equilíbrio nos ecossistemas (Lacey et al. 2001; Gallo et al. 2002).

A combinação de técnicas e recursos disponíveis utilizados no MIP tem por objetivo manter a população de insetos-praga a níveis abaixo da densidade em que acarreta prejuízos econômicos à cultura e ao meio ambiente (Crocomo 1990; Diaz 1997; Pereira et al. 1998). Os principais métodos e medidas para o controle das pragas são: a) legislativas, b) físicos, c) mecânicos, d) de resistência de plantas aos insetos e doenças, e) por comportamento, f) químico, g) biológico entre outros (Fiorentino e Diodato 1997).

## **2.5. Manejo Integrado de pragas em Erva-mate**

Para o Manejo Integrado de pragas (MIP) é primordial um monitoramento adequado visando a detecção de alterações na densidade e dinâmica populacional do inseto. Estas avaliações são estratégias necessárias para a previsão de surtos de pragas e a rápida tomada de decisões para seu controle (Soares e Iede 1997; Leite et al. 2006a).

Em um programa de MIP, todas as táticas de supressão populacional e métodos de controle são importantes e podem ser utilizados. Entretanto, o uso de moléculas inseticidas em plantios florestais apresenta sérias restrições. Para a erva-mate, além do emprego destes produtos ser proibido pela legislação, não há princípios ativos comprovadamente eficazes e de baixa toxicidade para esta cultura (Soares e Iede 1997). Além disto a aplicação e eficiência a campo devem ser adequadas ao comportamento e distribuição do inseto na área e na planta (Leite et al. 2006a). Em função disto, os métodos de controle citados a seguir, com reduzido impacto ambiental e de fácil harmonização entre si, são os recomendados para o MIP em erva-mate (Soares e Iede 1997).

No controle biológico podem ser utilizados agentes que visem a regulação das densidades populacionais dos insetos ou plantas consideradas pragas das

culturas comerciais. Entre os agentes mais utilizados estão os inimigos naturais (parasitóides e predadores) e os patógenos (fungos, vírus, bactérias e protozoários) (Gallo et al. 2002; Alves 1998). Dentre os patógenos, os fungos entomopatogênicos são o principal grupo, e sua ocorrência natural é fator determinante na regulação populacional de insetos praga (Sousa 1999).

O método mecânico de supressão populacional mais utilizado pelos produtores é a coleta dos adultos da broca-da-erva-mate, pela sua eficiência e fácil execução (Leite et al. 2006a). Entretanto, requer mão-de-obra disponível para a sistematização do processo, pois quando deixa de ser realizado pode apresentar um incremento populacional de 3,2 vezes ao ano com graves prejuízos à cultura (Soares e Iede 1997).

O emprego de outras táticas para redução de níveis populacionais também devem ser empregados, como a poda, a capina e o coroamento, deixando faixas de vegetação secundária entre as linhas de plantio. Estes métodos favorecem a visualização do inseto e eliminam as regiões preferenciais de abrigo, expondo-os à insolação (dessecação) e ação de predadores. Estas práticas também melhoram as condições microclimáticas e a eficácia do controle biológico com fungos entomopatogênicos (Soares e Iede 1997; Leite et al. 2006a). O adensamento com espécies nativas favorece a nidificação de pássaros, e incrementa as populações de inimigos naturais. O cultivo da erva-mate em condições próximas ao ambiente natural também reduz o “stress” da planta e a torna mais capaz de resistir ao ataque de pragas (Soares e Iede 1997).

Borges et al. (2003), em trabalho comparando os sistemas de cultivo nativo e adensado, concluíram que uma opção adequada é o adensamento planejado a partir das áreas de erva-mate nativa, retirando-se a vegetação de pequeno porte e espécies sem valor econômico. Em seguida, procede-se ao plantio de mudas de procedência garantida entre as árvores nativas, tornando o cultivo mais rentável e mais equilibrado, com menor incidência de pragas do que a monocultura.

## **2.6. Agentes de Controle Biológico**

### **2.6.1. Parasitóides e Predadores**

Os principais inimigos naturais descritos para *H. betulinus* são os parasitóides de ovos *Eurytoma* sp. (Hymenoptera: Eurytomidae) (Penteado 1995; Soares 1998) e de larvas *Labena* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) (Ribeiro 1993; Pagliosa et al. 1994; Soares 1998).

As formigas predadoras de ovos *Pheidole* sp. e *Solenospis* sp. (Hymenoptera: Formicidae) e os percevejos predadores de adultos *Alcaeorrhynchus grandis* (Dallas, 1851), *Brontocerus tabidus*, *Tynacantha marginata* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae), *Arilus carinatus* (Forster, 1771) e *Apiomerus* sp. (Hemiptera: Reduviidae) (De Coll e Saini 1993; Diaz 1997; Soares e Iede 1997; Soares 1998; Penteado et al. 2000).

### **2.6.2. Fungos Entomopatogênicos**

Com um mecanismo de infecção especializado, alguns fungos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, inclusive os estágios em que estes não se alimentam, como ovos e pupas (Alves e Lecuona 1998). Os fungos apresentam grande versatilidade podendo causar danos a artrópodes que vivem em plantas, solo e ambientes aquáticos.

Os fungos pertencem ao Reino Fungi e são definidos como organismos eucarióticos cujos núcleos são dispersos em um micélio - conjunto de hifas - contínuo ou septado. Não possuem pigmentos fotossintéticos e sua nutrição é obtida por absorção. Os fungos são bastante conhecidos pela produção de compostos químicos, alguns bastante potentes causando reações adversas em outros organismos vivos, como os antibióticos e micotoxinas (produzidas em cereais atacados por fungos).

Estes agentes foram os primeiros patógenos de insetos (entomopatógenos) a serem utilizados no controle microbiano. Aproximadamente 80% das doenças dos insetos têm como agentes etiológicos os fungos. A grande ocorrência desses fungos, em condições naturais, tanto enzoótica como epizooticamente, tem sido fator importante na redução da população de pragas (Alves 1998; Pereira et al. 1998).

Diferente de outros patógenos, os fungos causam infecção nos insetos não apenas pela ingestão, mas principalmente pela penetração via tegumento e espiráculos (Ferron 1977; Alves 1998). Esta propriedade coloca-os em vantagem em relação às bactérias e vírus (cuja penetração ocorre apenas via oral) e sua utilização em diversas culturas é bastante promissora (Alves 1998).

No Brasil, mais de 20 gêneros ocorrem naturalmente sobre insetos de importância econômica, sendo que os mais importantes são *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin; *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.; *Nomureae rileyi* (Farlow) Samson; *Lecanicillium* (Zimm.) Viègas; *Paecilomyces* Samson; *Aspergillus* Michelli; *Fusarium* Link (Atractium) e *Cladosporium* (Fresen.) (Alves 1998; Shah e Pell 2003).

Em erva-mate, há registros de epizootias naturais com *B. bassiana* em diversas ordens de insetos da cultura. Ribeiro (1993) realizou estudos em laboratório para o controle de *H. betulinus* testando cinco linhagens de *B. bassiana* isoladas de insetos encontrados em erva-mate. Os resultados mais promissores foram obtidos com a linhagem 152, isolada de Chrysomelidae. A infectividade deste isolado em laboratório foi de 69,62% em adultos e 93,02% em larvas de *H. betulinus*.

Dalla Santa (2000) testou, em laboratório, uma cepa de *B. bassiana*, isolada de lagarta infectada a campo, para o controle de *T. camina* e *Hylesia* sp., sendo a mortalidade superior a 90 e 49%, respectivamente, após 10 dias, pelo método da pulverização.

Oliveira et al. (2000) testaram a patogenicidade de isolados de *B. bassiana* ao ácaro vermelho da erva-mate, *Oligonychus yothersi* (McGregor, 1914) (Acari: Tetranychidae) provenientes do Instituto Biológico de São Paulo. A mortalidade desta espécie variou de 77 a 98% para todos os isolados.

Soares et al. (1995) e Soares e Iede (1997) detectaram a ocorrência natural dos gêneros *B. bassiana* e *M. anisopliae* em adultos de *H. betulinus*, em um erval no município de Ivaí – PR. Para estes 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 de cultivo. Estes organismos ocorrem naturalmente nos ervais estremes, indicando, também sua adaptação ao ecossistema modificado.

Leite et al. (2000) testaram, em laboratório, sete linhagens de *B. bassiana*, uma de *B. brongniartii* (Sacc.) Petch e uma de *M. anisopliae* obtidas da Embrapa Recursos Genéticos. A linhagem de *B. bassiana* CG 716, isolada de adulto de *H. betulinus* a campo, apresentou os melhores resultados, com mortalidade de 94,1 e 100% em campo, com tempo médio de mortalidade de 36 dias.

Leite et al. (2003) realizaram testes em laboratório com duas espécies de fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* (linhagem CG 716) e *Paecilomyces* sp., obtidos de *H. betulinus* em campo. Verificou-se que *B. bassiana* foi mais infectivo, apresentando uma mortalidade de 97,5% contra 37,5% do segundo. Os tempos médios de mortalidade foram de 16,8 e 32 dias para *B. bassiana* e *Paecilomyces* sp., respectivamente.

Leite et al. (2006b) testaram a linhagem de *B. bassiana* (CG 716), em campo, formulada em duas concentrações de óleo emulsionado e três concentrações de conídios. O formulado mais eficiente foi o de concentração  $10^7$  conídios/mL e 0,5% de óleo, obtendo uma infectividade de 76% nos insetos avaliados.

#### **2.6.2.1. Sintomas do ataque fúngico**

Os sintomas iniciais da doença são manchas escuras nas pernas e regiões intersegmentares ou distribuídas por todo tegumento. O inseto infectado reduz a alimentação rapidamente até que cessa completamente; tornam-se debilitados e,



geralmente, letárgicos (lentos), apresentam paralisia e perdem a coordenação dos movimentos; podem apresentar também alteração na coloração da cutícula.

Geralmente morrem com relativa rapidez por colonização do fungo nos tecidos e, ocasionalmente, pela intoxicação por micotoxinas. O corpo do inseto, após sua morte, geralmente, apresenta um crescimento fúngico que emerge dos espiráculos e junções intersegmentares até recobrir todo corpo (Alves 1998).

### **2.6.2.2. *Beauveria bassiana***

O gênero *Beauveria* inclui espécies de fungos com grande potencial como agente de controle microbiano, sendo comumente encontrado infectando mais de 200 espécies de insetos de importância agrícola, como cupins (Almeida et al. 1998), coleópteros (Furlong e Groden 2003), hemípteros (Sosa-Gómez et al. 1997), blatódeos (Pachamuchu e Kamble, 2000), ortópteros e pragas de grãos armazenados.

A duração das diferentes fases dos ciclos das interações entomopatógeno-hospedeiro depende das espécies de insetos envolvidos (fatores bióticos) e das condições climáticas durante a ocorrência da doença (fatores abióticos). A germinação dos conídios de *B. bassiana* ocorre, geralmente, em um período de 12 horas após a inoculação. A fase de penetração do fungo, geralmente pelo tegumento, ocorre em função de uma ação mecânica e efeitos enzimáticos, com duração de aproximadamente 12 horas. Após 72 horas da inoculação, o inseto apresenta-se colonizado com uma grande quantidade de conidióforos e conídios. Entretanto, para aumentar a capacidade de disseminação dos propágulos, são necessárias algumas condições favoráveis, destacando-se a temperatura, umidade relativa e radiação (Alves 1998).

**Temperatura:** É o principal fator para a germinação dos conídios, crescimento vegetativo e esporulação. Segundo Alves e Lecuona (1998), *B. bassiana* requer

uma faixa de 23 a 28°C para apresentar um bom desenvolvimento, porém pode suportar temperaturas de até 45°C.

Segundo Roberts e Campbell (1977), tanto o desenvolvimento quanto a virulência do fungo são mais altos em temperatura ótima. Em alguns casos, temperaturas abaixo do ótimo aumentam os tempos letais sem afetar a mortalidade total, mas temperaturas acima do ótimo podem reduzir a mortalidade dos insetos por fungos entomopatogênicos.

Para Alves e Lecuona (1998), o fungo *B. bassiana*, na forma de conídios puros, pode perder sua viabilidade em 60 dias, porém, as formulações podem atingir até oito meses com alguma viabilidade de conídios. A sua preservação por longos períodos exige temperaturas baixas, na faixa de -20 a +8°C.

**Umidade Relativa (UR%):** Pode manifestar-se através da chuva, umidade do solo e do ar. Alves (1998) sugere que a umidade desempenha importante papel para o inseto hospedeiro, cuja atividade e desenvolvimento são limitados a ambientes com UR inferior a 40%. Nesses insetos esta umidade pode afetar a espessura da camada de cera tornando-os menos resistentes a ação dos patógenos (Ferron 1977).

Em estudos sobre a influência da UR na infectividade de alguns fungos, observou-se que *B. bassiana* em *Blissus leucopterus* (Say 1832) (Hemiptera: Lygaeidae) provocou doença no inseto sob umidades relativas de 30, 50, 75 e 100%, porém a conidiogênese somente ocorreu em ambiente com UR de 50 e 100%. Para o mesmo inseto, o fungo *P. farinosus* foi mais exigente, não apresentando patogenicidade em UR de 51 e 74% (Alves e Lecuona 1998).

**Radiação Solar:** A radiação não é necessariamente prejudicial ao patógeno, pois pode variar com o tipo de organismo, fase de desenvolvimento e quantidade de radiação empregada. A radiação também pode atuar sobre a germinação e nos estágios iniciais de crescimento do tubo germinativo (Alves e Lecuona 1998).

Segundo Alves e Morales (1979) o desenvolvimento de *B. bassiana* é estimulado pela luz contínua (de curto comprimento de onda), e produz o maior

número de conídios. Entretanto, Bell (1974) afirma que este fungo perde a infectividade quando submetido a três horas de luz solar direta.

**Solo:** É nesse ambiente que os patógenos sofrem a ação dos fatores bióticos e abióticos, tendo como consequência sua maior ou menor permanência em condições de campo. A maior parte dos conídios dos fungos entomopatogênicos dificilmente sobrevivem por mais de três meses nos diferentes tipos de solos, porém, existem algumas estruturas de resistência que podem ser responsáveis pela persistência de alguns fungos por períodos mais longos. Os diversos fatores que podem afetar a persistência dos inóculos de fungos no solo são discutidos a seguir.

### **2.6.2.3. Inóculos de Fungos no Solo**

De acordo com Alves (1998), o solo é o reservatório natural dos fungos entomopatogênicos, por isto o sucesso do seu emprego em programas de manejo integrado de pragas é condicionado à sua eficácia e persistência nesse ambiente. Porém, existem fatores bióticos e abióticos que podem ser responsáveis pela sua persistência por longos períodos. Entre esses, os principais são a temperatura e a umidade (Lingg e Donaldson 1981; Studdert e Kaya 1990; Rath et al. 1992); tipo de solo (Storey et al. 1989; Vanninen et al. 2000); organismos antagônicos (Fargues et al. 1983; Fargues e Robert 1985) e a presença do hospedeiro específico em condições naturais (Kessler et al. 2003; 2004)

A temperatura e umidade ideal do solo para a persistência de alguns fungos entomopatogênicos pode variar de acordo com a linhagem. Entretanto, em estudos com *B. bassiana* e *M. anisopliae* constatou-se que condições de baixa ou média temperatura e umidade do solo favorecem a sobrevivência dos conídios, enquanto alta temperatura e umidade elevada podem reduzi-la (Studdert e Kaya 1990; Kessler et al. 2003, 2004).

Lingg e Donaldson (1981) estudaram a estabilidade de *B. bassiana* no solo e observaram que a sobrevivência dos conídios foi primariamente dependente da

temperatura nesse ambiente. A meia-vida dos conídios variou de 14 dias (25°C e 75% saturação do solo) a 276 dias (10°C e 25% saturação). Conídios mantidos nas umidades 0, 32, 52, 75, e 100% e baixa temperatura não sofreram redução na sua viabilidade. Entretanto, nas umidades acima citadas e altíssima temperatura (55°C) não se recuperou nenhuma unidade formadora de colônia (UFC). Segundo Quintela (1986), ocorre menor sobrevivência dos conídios deste fungo quanto mais elevada for a temperatura e porcentagem de saturação de água no solo; observou também que solo coberto com vegetação propicia maior proteção para esse patógeno.

O tipo de solo também pode exercer efeito significativo na sobrevivência dos conídios (Prado 2001). Lanza et al. (2004) verificaram que o tipo de solo influenciou significativamente a sobrevivência do fungo, sendo que a menor quantidade de UFC foi encontrada no latossolo de textura argilosa. Corrêa e Azevedo (1986) também verificaram que solos argilosos são menos favoráveis que os arenosos para manutenção da viabilidade de conídios de *M. anisopliae*.

Quintela et al. (1992) avaliaram a sobrevivência de conídios de *B. bassiana* aplicado em terra roxa estruturada latossólica eutrófica em solo desnudo e com planta. Em ambos, UFCs foram recuperadas após os 94 dias de avaliação; entretanto, solos com cobertura propiciam maior proteção ao fungo.

A microbiota do solo também é relatada como importante agente na sobrevivência dos fungos (Sharapov e Kalvish 1984; Shields 1981). Segundo Alves (1998), após a aplicação do fungo entomopatogênico no solo, ocorre um rápido aumento na sua população, seguido por um decréscimo após semanas ou meses e desaparecendo quase completamente devido à ação de organismos antagonistas e outros fatores.

Gama et al. (2005) mencionam que ocorre maior conidiogênese de fungos sobre os cadáveres de insetos ou a formação de novos propágulos a partir do inóculo existente no solo. Por isto, diversos fungos entomopatogênicos podem sofrer reduções na sua densidade na ausência do hospedeiro, como exemplos *B. bassiana* (Gaugler et al. 1989; Storey et al. 1989), *B. brongniartii* (Kessler et al. 2004), *N. rileyi* (Ignoffo et al. 1978), *P. fumosoroseus* (Fargues e Robert 1985). Em contraste, *M. anisopliae* é conhecido por sua grande persistência, apesar da

ausência do hospedeiro alvo, podendo ser atribuído à presença de outros hospedeiros suscetíveis no solo (Vänninen et al. 2000).

Contudo, as informações sobre a ação de fungos entomopatogênicos sobre *H. betulinus* ainda são restritas, existindo uma lacuna de dados no que se refere às epizootias, persistência e presença de inóculos no solo. Desta forma, este estudo vem preencher e ampliar os conhecimentos para o uso efetivo desses agentes para o controle da broca-da-erva-mate.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Caracterização da Área Experimental**

Os estudos de campo foram conduzidos em um plantio em monocultura de erva-mate estabelecido em 1998, situado no município de Campo Alegre – SC (26° 11' S, 49° 14' W) ocupando uma área total de aproximadamente 28 ha de erva-mate plantada dividido em lotes de aproximadamente 1ha com espaçamento de 1,5 m x 3,0 m. O solo da região é originado de rochas sedimentares argilosas (Da Croce 2002).

Em função do manejo adotado pelo produtor consistir de uma poda a cada dois anos, esta foi realizada durante o período experimental em janeiro de 2006 nos tratamentos TII, TIII e TIV (área de catação e nas áreas com duas e três pulverizações com *B. bassiana*, respectivamente). Em setembro de 2006 foi realizada a poda na área TI (testemunha). A poda consistiu na retirada de toda a massa verde da planta, ficando apenas o tronco, com altura aproximada de 50 cm.

Foram adotadas práticas silviculturais de capina mecânica mensalmente no verão e a cada três meses nas outras estações do ano, auxiliando no controle de plantas invasoras e facilitando a visualização dos insetos para fins de amostragem. Nenhum tipo de tratamento fitossanitário químico foi realizado na área em todo o período experimental. Na implantação do experimento, em novembro de 2004, o erval apresentava um intenso ataque de *H. betulinus*, com média de dois adultos por erva.

#### **3.2. Linhagem e formulação de *Beauveria bassiana***

Neste estudo, o micoinseticida experimental Bovemax, em fase de registro pela Embrapa Florestas e Turfal Ind. e Com. de Produtos Biológicos e Agronômicos, à base de *B. bassiana*, foi formulado em óleo emulsionável a 0,5% e aplicado na concentração que variou de 2,7 a 3,5 X 10<sup>7</sup> conídios/mL. Esta cepa foi

isolada a partir de adultos de *H. betulinus* coletados em campo (Leite et al. 2000) e encontra-se catalogada na coleção da Embrapa Recursos Genéticos (CENARGEN) sob o código CG 716.

Em função da sensibilidade do fungo entomopatogênico quando utilizado em condições de campo, é importante que este seja formulado para se obter uma maior sobrevivência no ambiente (Leite et al. 2006b). Entende-se como formulação, a mistura do fungo a outro ingrediente, favorecendo a sua viabilidade, eficácia e proteção do agente de controle microbiano. Outra função do óleo é diminuir a sensibilidade à radiação ultravioleta (UV) e favorecer a adesão dos conídios na cutícula dos insetos e plantas (Couch e Ignoffo 1981; Prior et al. 1988).

### **3.3. Escolha da concentração de *Beauveria bassiana***

Em testes realizados a campo por Leite et al. (2005), verificou-se que a  $CL_{50}$  para o isolado CG 716 de *B. bassiana* é  $10^6$  conídios/mL. Entretanto, Leite et al. (2006b), comparando as concentrações de conídios  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  em campo, concluiu que o formulado na concentração  $10^7$  é mais eficiente (infectando 76% dos insetos) e viável para produção comercial. Em função da relevância dos trabalhos citados, optou-se pelo formulado na concentração  $10^7$  conídios/mL para o controle de *H. betulinus* neste experimento.

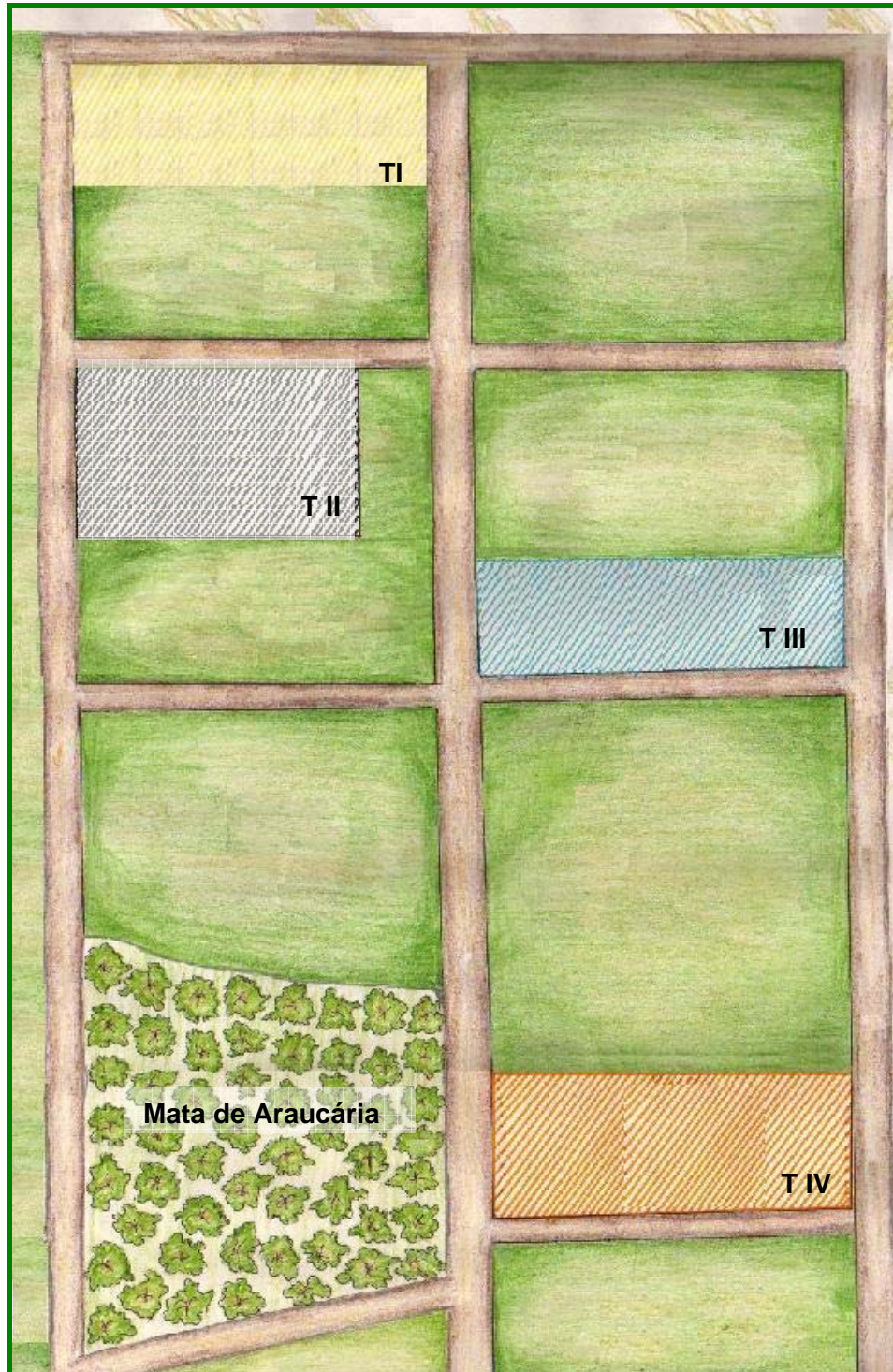
### **3.4. Tratamentos e cronograma de aplicação de *Beauveria bassiana* em campo**

O erval experimental foi dividido em quatro áreas de 0,5 ha cada (Figura 3), sendo que cada uma correspondia a um tratamento (T) conforme se segue:

- TI: sem trato cultural contra *H. betulinus* (testemunha);
- TII: catação manual (com retirada dos insetos adultos de *H. betulinus*);
- TIII: duas aplicações anuais com formulado fúngico de *B. bassiana* nos meses de novembro e fevereiro;
- TIV: três aplicações anuais com formulado fúngico de *B. bassiana* nos meses de novembro, janeiro e fevereiro.

O cronograma de aplicação de *B. bassiana* a campo foi baseado principalmente no ciclo biológico do inseto, visando a potencialização do patógeno. Assim, realizou-se uma aplicação no início da emergência dos adultos (novembro) e outra(s) no período de pico populacional da praga (janeiro e/ou fevereiro) (Tabela 1).





**Figura 3.** Croqui da área experimental no município de Campo Alegre – SC. TI - testemunha; TII - catação; TIII - 2 aplicações anuais de *B. bassiana*; TIV - 3 aplicações anuais de *B. bassiana*.

**Tabela 1.** Cronograma de aplicação de *B. bassiana* nas áreas TIII e TIV (duas e três aplicações anuais, respectivamente) no período de novembro/2004 a fevereiro/2007 no município de Campo Alegre – SC.

Data	Área	Meses de aplicação de <i>B. bassiana</i>		
		Novembro	Janeiro	Fevereiro
1º ano 2004/2005	TIII	X	-	X
	TIV	X	X	X
2º ano 2005/2006	TIII	X	-	X
	TIV	X	X	X
3º ano 2006/2007	TIII	-	-	-
	TIV	-	-	-

(-) = sem aplicação

### 3.5. Aplicação de *Beauveria bassiana* a campo

O formulado de *B. bassiana* foi aplicado nos tratamentos TIII e TIV, apenas no tronco das erveiras com um pulverizador costal durante 15 segundos, utilizando-se aproximadamente 150 mL por planta. Esta metodologia tem como objetivo não deixar resíduo do fungo nas folhas (que são consumidas “in natura”); restringir a aplicação ao local onde os insetos adultos de *H. betulinus* caminham e ovipositam; e evitar a infecção de insetos associados às outras partes da erveira, principalmente os inimigos naturais.

### 3.6. Amostragem e flutuação populacional de *Hedypahtes betulinus*

As coletas foram realizadas quinzenalmente entre os meses de novembro a abril, que corresponde ao período das densidades populacionais mais elevadas, e mensalmente nos meses de maio a outubro, durante o período de baixas densidades populacionais.

Foi feita amostragem absoluta, realizando-se a inspeção visual em todas as 1.000 árvores que compunham cada parcela (tratamento). Durante as inspeções, todos os insetos encontrados nos tratamentos TI (testemunha), TIII e TIV (com aplicação de *B. bassiana*) foram retirados da planta, marcados no pronoto com esmalte de cores diferentes (uma para cada tratamento), grafite nos élitros com um número (código) e devolvidos para a erveira (Figura 4). No tratamento TII (catação) não houve marcação dos insetos, apenas a sua contagem e retirada do erval.



**Figura 4.** Adulto de *H. betulinus* marcado no pronoto com esmalte (indicando o tratamento) e grafite nos élitros (com o número 81).

### **3.7. Avaliação da mortalidade de adultos de *Hedypahtes betulinus* coletados a campo após aplicação fúngica**

Em função da dificuldade em se encontrar insetos mortos (contaminados ou não pelo fungo), realizaram-se coletas de insetos no mês de abril de 2005 e 2006, ou seja, após 60 dias da última aplicação fúngica anual (que ocorreu no mês de fevereiro). Estas coletas visaram amostrar os insetos vivos que se encontravam nas

áreas dos tratamentos no período da aplicação fúngica do mês de fevereiro (grupo A) e insetos que se incorporaram ao tratamento posteriormente à aplicação fúngica (grupo B). No ano de 2007 não houve divisão em grupos, pois não foi feita aplicação fúngica, sendo que as amostras foram coletadas em janeiro com o intuito de verificar se houve mortalidade por *B. bassiana*, após 12 meses de sua aplicação.

Os insetos coletados foram levados para o laboratório, individualizados em copos plásticos de 11 X 8 cm, com tampa perfurada e identificados com numerais cardinais. Foram oferecidos diariamente, como alimento e substrato aos insetos, ramos de erva-mate. Para confirmação da porcentagem de infecção dos insetos mortos, estes foram colocados em câmaras úmidas até à extrusão do fungo.

### **3.8. Proporção sexual de adultos de *Hedypathes betulinus***

Os insetos adultos encontrados na área de catação (TII) foram contados e sexados para a verificação da proporção sexual, empregando-se como parâmetros o diâmetro dos fêmures do primeiro par de pernas e o dos escapos antenais, conforme preconizado por Cassanelo (1993).

### **3.9. Distribuição de *Hedypathes betulinus* nos estratos da erva**

Visando estabelecer o padrão de distribuição do inseto na planta, nos quatro diferentes tratamentos, utilizou-se a metodologia proposta por Soares (1998). Este método propõe a divisão da planta em três estratos: inferior (do colo até o início das ramificações), médio (do início das ramificações até a metade da copa) e superior (da metade da copa até à extremidade dos ramos).

A inspeção minuciosa de duzentas ervas em cada um dos quatro tratamentos ocorreu em janeiro de 2005 e 2007. Nestas coletas, anotou-se o sexo e a localização de cada inseto na planta.

### **3.10. Distribuição espacial de *Hedypathes betulinus* nos diferentes tratamentos**

A avaliação da distribuição espacial do inseto nos tratamentos baseou-se nas coletas do mês de janeiro de 2005, 2006 e 2007. Para isto, as inspeções foram feitas em duzentas árvores de cada tratamento, anotando-se o número de insetos por planta e sua localização no erval.

### **3.11. Intensidade do ataque de *Hedypathes betulinus***

As árvores de erva-mate atacadas por *H. betulinus* foram identificadas pela presença de orifícios formados pela larva na base do fuste e nos galhos, com depósito de serragem no colo da erveira, próximo ao tronco (Soares 1998; Borsoi e Costa 2001).

Para a obtenção de um mapeamento das áreas de ataque dos insetos na planta, foram realizadas observações meticulosas em duzentas árvores de cada tratamento em janeiro de 2006 e 2007.

### **3.12. Infectividade e transmissão de *Beauveria bassiana* em adultos de *Hedypathes betulinus*, em laboratório**

Em função da dificuldade em se criar estes insetos, coletou-se manualmente os adultos de *H. betulinus* em um monocultivo de erva-mate em Campo Alegre – SC. Nestas coletas selecionou-se insetos adultos com pêlos de coloração branca, indicando a emergência recente do adulto, e sem ruptura nas antenas e pernas, segundo a metodologia preconizada por Leite et al. (2006b).

Os insetos foram transportados para o laboratório em frascos plásticos e após a sexagem, os insetos foram individualizados em copos plásticos de 11 X 8 cm, com tampa perfurada e identificados com numerais cardinais.

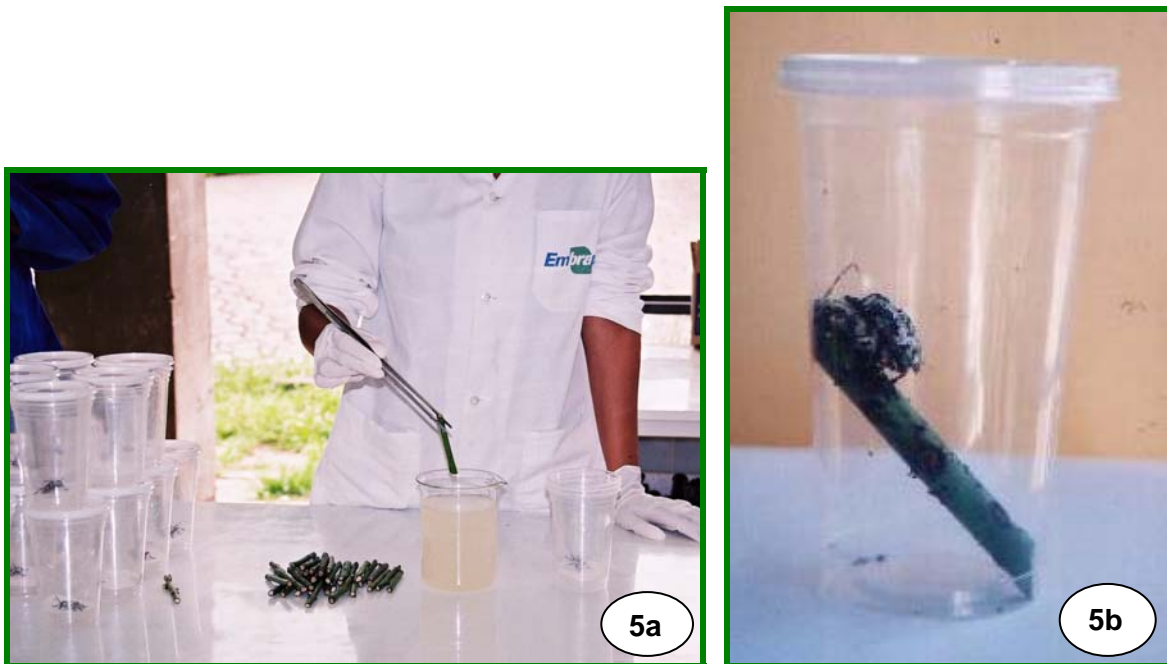
O bioensaio foi conduzido em sala sem temperatura e umidade controladas, e com auxílio de termohigrômetro digital estes fatores foram anotados diariamente. A inoculação de *B. bassiana* foi realizada em ramos de erva-mate, de aproximadamente 6 cm, os quais foram imersos por três segundos da suspensão fúngica na concentração  $3,5 \times 10^7$  conídios/mL formulada em 0,5% de óleo emulsionável acrescido de água destilada (Figura 5a).

Para o grupo das 50 fêmeas que compunham a amostra a ser contaminada, (fêmeas C) foi oferecido um ramo de erva-mate contaminado para servir de alimento e substrato para locomoção por 24 horas. Após este tempo de contato com o fungo, estas fêmeas foram transferidas para novos copos plásticos com ramos sem suspensão fúngica onde permaneceram por 24 horas. Após um dia de contaminação das fêmeas, colocou-se 50 machos (designados como machos C) em contato com cada uma destas fêmeas durante 24 horas. Após este período, os machos foram individualizados em outros copos plásticos (Figura 5b).

As 25 fêmeas que compunham a testemunha (fêmeas T) passaram pelo mesmo procedimento, entretanto com ramos sem suspensão fúngica. Machos foram colocados em contato com estas fêmeas para cópula durante 24 horas (machos T).

As observações foram realizadas diariamente até a morte de todos os insetos (machos e fêmeas) para se verificar o tempo médio de mortalidade. Para confirmação da porcentagem de infecção todos os insetos foram individualizados em câmaras úmidas até à extrusão do fungo.





**Figura 5.** Avaliação da infectividade de *B. bassiana*, na concentração de  $3,5 \times 10^7$  conídios/mL. **5a.** imersão de ramos de erva-mate no formulado fúngico; **5b.** macho copulando com fêmea infectada.

### 3.13. Coleta das amostras de solo

Os tratamentos amostrados foram:

- T1: sem trato cultural contra *H. betulinus* (testemunha);
- TIII: duas aplicações anuais com formulado fúngico de *B. bassiana* nos meses de novembro e fevereiro;
- TIV: três aplicações anuais com formulado fúngico de *B. bassiana* nos meses de novembro, janeiro e fevereiro.

Nestes tratamentos, foram coletadas amostras mensais de solo no período de novembro/2005 a outubro/2006. A primeira pulverização com o micopatógeno nos tratamentos TIII e TIV foi realizada após a primeira amostragem.

A amostragem de solo foi feita coletando-se três amostras simples, aleatoriamente, a uma profundidade aproximada de 0-5 cm, em cada parcela. Para tanto, utilizou-se colheres descartáveis para coleta de aproximadamente 50 gramas de solo e sacos plásticos etiquetados para armazenagem e transporte. As amostras foram conservadas em geladeira por aproximadamente 18 horas até a realização das análises no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

### **3.13.1. Preparo das amostras compostas**

Cada amostra simples foi dividida em três sub-amostras visando minimizar a heterogeneidade e obter uma melhor representação dos táxons fúngicos presentes no solo de cada um dos tratamentos. Para o isolamento dos fungos, utilizou-se a técnica de diluição sucessiva (Clark 1965, modificado).

Cada uma das sub-amostras de trabalho foi composta por 9 g de solo suspenso em frascos de vidro contendo 90 mL de solução salina (NaCl 0,9%) previamente esterilizada. A suspensão resultante foi agitada manualmente durante 3 minutos. Desta primeira diluição, 1 mL foi acrescido a 9 mL de água destilada esterilizada obtendo-se a diluição de  $10^2$ , repetiu-se este procedimento para se obter as diluições  $10^3$  e  $10^4$ . Das diluições  $10^3$  e  $10^4$  retirou-se 0,1 mL que foram colocados em placas de Petri contendo 20 mL do meio seletivo Batata Dextrose Ágar (BDA) (Anexo 1.1) acrescidos de estreptomicina (0,03 g/L), em três repetições por diluição.

Em função do baixo número de UFC observado na primeira coleta optou-se por utilizar as diluições  $10^2$  e  $10^3$ , sendo estas adotadas até o final do experimento. As placas foram inoculadas e incubadas a  $26\pm 1^\circ\text{C}$  em BOD por um período de três a cinco dias e, posteriormente, todas as unidades formadoras de colônias (UFC/g) foram contadas.



### **3.13.2. Isolamento de colônias**

Foi realizado o isolamento dos fungos pelo seu aspecto macroscópico, retirando-se pequenos fragmentos de ágar da placa, contendo pontas de hifas, e transferindo-os para tubos contendo meio BDA inclinado. Os tubos foram incubados a  $28\pm 1^\circ\text{C}$  e, após o crescimento, foram mantidos sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$ , até o momento da identificação.

### **3.13.3. Identificação dos isolados**

A identificação foi realizada com base nas estruturas macroscópica e microscópica de reprodução (sexual e assexual), utilizando o Método de Cultura em Lâmina ou Microcultivo (Kern e Blevins 1999) (3.13.4) e de acordo com literatura especializada (Ellis 1976; Barnett e Hunter 1972; Koneman e Roberts 1987; Larone 1987; Alves 1998).

As lâminas foram fixadas em Lactofenol de Amman (Anexo 2) e analisadas ao microscópio ótico, sob aumento de 100X.

### **3.13.4. Método de Cultura em Lâmina ou Microcultivo**

Utilizou-se placas de Petri esterilizadas contendo em seu interior duas lâminas cruzadas e pedaço de algodão. Cortou-se um cubo de  $1\text{ cm}^2$  do meio BDA e colocou-se sobre a lâmina no interior da placa, repicou-se um pedaço do crescimento micelial retirado do tubo estoque em todos os lados do cubo, colocou-se uma lamínula sobre o cubo inoculado, o algodão foi umedecido com auxílio de pipeta com água destilada esterilizada. Incubou-se à temperatura de  $28\pm 1^\circ\text{C}$ . Periodicamente, as lâminas foram examinadas em microscópio ótico (M.O) e, quando o desenvolvimento foi evidente, a lamínula foi retirada e colocada sobre uma lâmina limpa com uma gota de clareador lactofenol de Amann e observada

ao M.O. As margens das lamínulas foram vedadas com parafina para torná-las semipermanentes.

### **3.14. Análises Estatísticas**

Os dados numéricos obtidos foram tabulados e/ou representados graficamente, sendo estes submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando apropriado, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a avaliação dos inóculos no solo, as análises foram realizadas após a identificação dos fungos, ao nível de gênero. Sempre que foi encontrado um valor significativo em relação ao Teste F para gêneros, aplicou-se o teste de Tukey a 5% para comparação de médias. Os dados relativos à análise de variância, considerando os gêneros identificados, foram transformados para  $\log(x+2)$  ou  $\log x+2$ .

### **3.15. Dados meteorológicos**

Os dados meteorológicos, como precipitação pluviométrica, umidade relativa e temperatura média foram obtidos da Empresa Modo Battistella Indústria e Comércio S.A. na localidade de Rio Negrinho – SC. As médias mensais foram submetidas à análise de regressão e correlação com o número médio mensal de besouros capturados.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Avaliação quantitativa de *Hedypathes betulinus*

Em função da grande perda econômica de safras anteriores, o proprietário do erval realizou, no período de dezembro/2004 a março/2005, a retirada, por catação, dos adultos de *H. betulinus* ao redor das áreas experimentais, totalizando cerca de 10.100 insetos adultos. Entre os meses de dezembro/2005 e março/2006 foram realizadas novas retiradas, totalizando 4.050 insetos.

O período experimental totalizou 30 meses no intervalo entre novembro/2004 e abril/2007. Das 47 coletas previstas, foram realizadas 45, tendo sido perdidas duas, nos meses de janeiro e agosto de 2005, em função de más condições climáticas.

A média mensal dos adultos de *H. betulinus* encontrados em cada uma das avaliações pode ser observada na Tabela 2 (Anexo 3). O total de insetos registrados durante todo o período experimental foi de 8.574, sendo que 3.369 (39,28%) foram observados no tratamento TI; 2.111 (24,62%) para TII; 1.581 (18,43%) para TIII e 1.513 (17,67%) para TIV. Foi observada diferença significativa, a 1% de probabilidade, nos blocos (coletas) e nos tratamentos: entre a testemunha (TI) e a catação (TII) e entre a catação (TII) e os tratamentos com aplicação (TIII e TIV), porém não houve diferença entre os tratamentos TIII e TIV, conforme confirmado pelo teste de Tukey (Anexo 4 e 5). Estes resultados indicaram que os tratamentos com aplicação do formulado fúngico à base de *B. bassiana* são os mais eficazes para o controle de *H. betulinus*, sendo que duas aplicações anuais consecutivas e um ano sem aplicação foram suficientes para reduzir significativamente o número destes insetos a campo.

Os valores, a partir de janeiro de 2006, indicaram um decréscimo populacional, ao longo dos trinta meses para todos os tratamentos. O tratamento TI (testemunha) decresceu, no total 4,51 vezes, sendo 1,97 do primeiro para o segundo e 2,29 do segundo para o terceiro ano; o tratamento TII (catação) totalizou queda de 8,4 vezes sendo 3,5 do primeiro para o segundo e 2,4 do

segundo para o terceiro. Atribui-se a diminuição populacional da praga, principalmente na testemunha nestes tratamentos (TI e TII), em grande parte, à coleta dos insetos na área ao redor dos tratamentos, evitando-se a entrada de novos indivíduos e favorecendo a saída de vários insetos nos tratamentos antes da sua inclusão nos dados das coletas. Além disto, a queda no tratamento da testemunha também pode ser decorrente da disseminação do fungo por insetos contaminados ou pelo vento.

Ao contrário, Soares (1998), em trabalho realizado em erval sem tratamentos culturais, observou um aumento populacional em três quadrimestres analisados (de janeiro a abril de cada um dos anos). Os valores encontrados, por este autor, foram 3,2 vezes de aumento no quadrimestre do primeiro para o segundo ano e 2,1 no quadrimestre do segundo para o terceiro, totalizando um aumento populacional de 6,9 vezes.

No tratamento TIII (duas aplicações fúngicas) houve uma redução populacional de 7,8 vezes, sendo 3,4 do primeiro para o segundo ano e 2,3 do segundo para o terceiro ano. No TIV (três aplicações fúngicas) a redução foi de 7,1 vezes, sendo 3,4 do primeiro para o segundo e 2,1 do segundo para o terceiro ano. A grande redução populacional de *H. betulinus* nas áreas TIII e TIV (duas e três aplicações anuais com *B. bassiana*) entre os anos de 2005 e 2006 pode ter sido influenciada parcialmente pela remoção dos insetos ao redor da área experimental, mas a principal causa foram as aplicações do fungo realizadas no período, conforme comprovam os dados estatísticos. Entretanto, para o ano de 2007, observou-se uma redução menor no número de indivíduos quando comparado aos anos anteriores, indicando que se não for realizada nova aplicação em novembro/2007 e fevereiro/2008, haverá uma tendência ao aumento do número de indivíduos na população da praga.

**Tabela 2.** Média de adultos de *H. betulinus*, obtidos em cada uma das avaliações para os tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

<i>MESES</i>	<i>TI</i>	<i>TII</i>	<i>TIII</i>	<i>TIV</i>
Nov/04*	51,5	44,0	27,0	41,0
Dez/04	117,5	96,0	70,5	53,5
Jan/05*	187,0	177,0	110,0	109,0
Fev/05*	200,5	195,0	146,0	169,5
Mar/05	215,0	160,5	142,5	87,5
Abr/05**	105,0	45,5	37,5	50,0
Mai/05	62,0	34,0	19,0	22,0
Jun/05	34,0	18,0	6,0	10,0
Jul/05	27,0	10,0	11,0	6,0
Set/05	7,0	6,0	4,0	1,0
Out/05	9,0	8,0	6,0	5,0
Nov/05*	43,5	20,5	34,0	17,5
Dez/05	75,5	55,5	41,0	36,5
Jan/06*	119,5	42,5	32,5	42,0
Fev/06*	95,5	32,5	20,0	29,5
Mar/06	69,0	25,0	12,5	11,0
Abr/06**	50,5	21,5	12,0	8,5
Mai/06	43,0	12,0	8,0	6,0
Jun/06	38,0	11,0	7,0	4,0
Jul/06	27,0	7,0	5,0	3,0
Ago/06	9,0	6,0	7,0	6,0
Set/06	6,0	3,0	3,0	3,0
Out/06	11,0	3,0	3,0	2,0
Nov/06*	18,5	5,5	5,0	6,5
Dez/06	28,5	13,5	7,5	11,5
Jan/07*	62,0	20,0	12,5	14,5
Fev/07*/**	47,5	18,0	23,5	14,0
Mar/07	27,5	15,0	12,0	12,5
Abr/07	14,0	9,0	5,0	8,0

\* dados referentes as aplicações anuais de *B. bassiana*

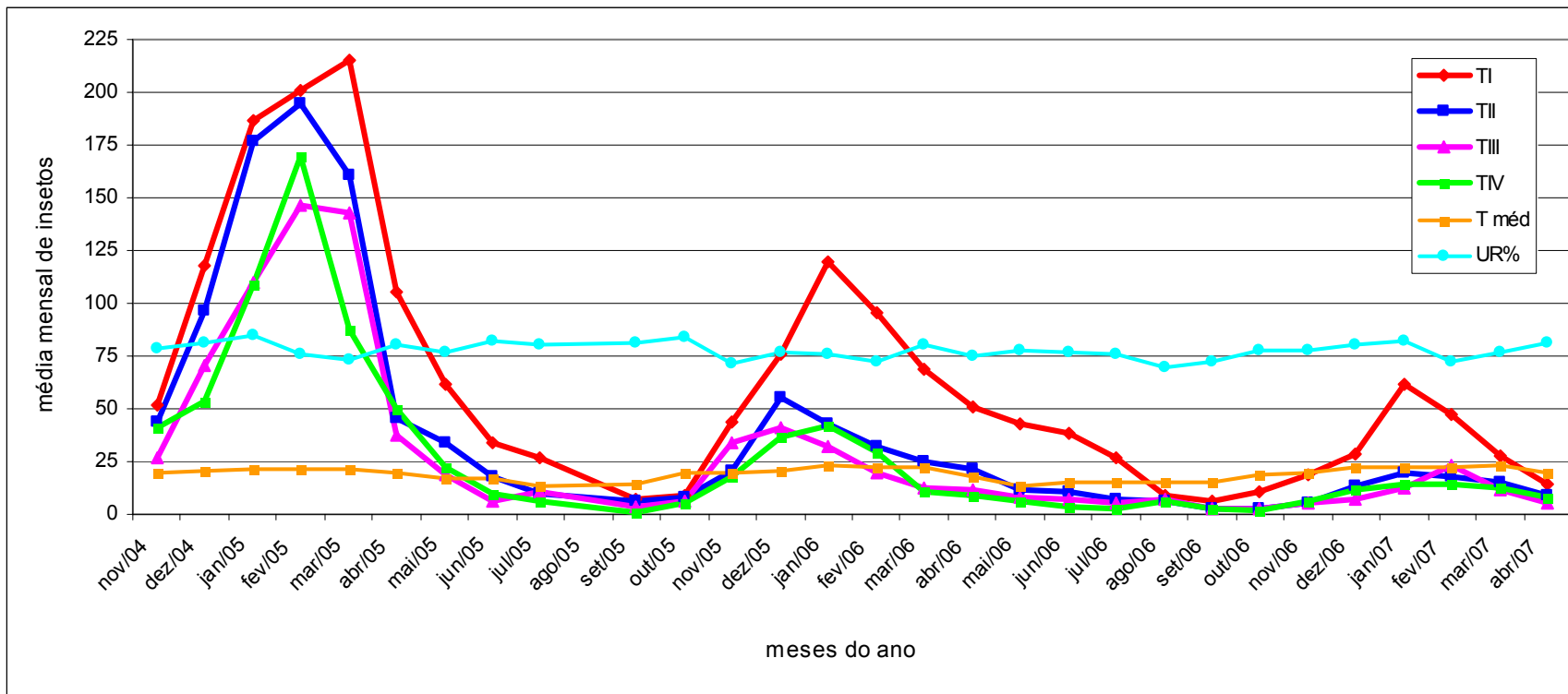
\*\* coleta de insetos após 60 dias da aplicação (abr/05 e abr/06) e 12 meses após última aplicação (fev/07).

## 4.2. Flutuação populacional de *Hedypathes betulinus*

A flutuação populacional média mensal de *H. betulinus*, referente aos quatro tratamentos, encontra-se na Figura 6. Observa-se a emergência de novas populações de insetos entre os meses de novembro e março em todas as áreas, e conseqüente aumento populacional nesse período.

Para a constatação do pico populacional para a espécie, levou-se em consideração apenas os valores observados para a testemunha (TI), por não se utilizar neste tratamento nenhuma medida de controle populacional da praga. No ano de 2005, o pico populacional observado em março, foi atribuído à coleta intensiva de insetos na área ao redor do tratamento entre os meses de novembro e dezembro/2004. Entretanto, as catações de *H. betulinus* ao redor dos tratamentos, em 2006, resultaram na retirada de um número menor de insetos, de forma que os valores refletiram melhor a flutuação populacional, mostrando que o pico da população ocorre normalmente no mês de janeiro, concordando com os resultados obtidos no ano de 2007.

Os estudos de Penteado (1995) indicam a ocorrência de um pico mais cedo, em dezembro, com a presença dos insetos apenas entre setembro e março. Soares (1998) e Soares et al. (2000) relataram o pico populacional mais tardio, entre os meses de fevereiro e março, com um grande número de insetos no período de outubro até final de junho. Os dados obtidos neste estudo concordam com a segunda citação em relação à presença destes insetos durante todo o ano no erval.



**Figura 6.** Flutuação populacional de adultos de *H. betulinus* para os tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

### **4.3. Mortalidade de adultos de *H. betulinus* coletados a campo após aplicação fúngica**

Na área da testemunha (TI) foram detectados 8,3% dos insetos do grupo A (aplicação fúngica do mês de fevereiro) infectados naturalmente com *B. bassiana*, não havendo contaminação deste tratamento no segundo e terceiro ano para os grupos A e/ou B (insetos registrados na área do tratamento posteriormente à aplicação fúngica).

No tratamento TII (catação) onde só existia o grupo B, a contaminação dos insetos com infecção de *B. bassiana* foi de 10,0; 7,1 e 5,0% para o primeiro, segundo e terceiro anos, respectivamente, resultante de contaminação natural pelo fungo.

Para o tratamento TIII (duas aplicações anuais), a porcentagem de insetos contaminados para o grupo A foi de 62,5 e 57,2%, respectivamente, em 2005 e 2006. Para o grupo B, os valores observados foram de 41,7; 33,3 e 18,2% para 2005, 2006 e 2007, respectivamente.

No TIV (três aplicações), a porcentagem de insetos contaminados para o grupo A foram 36,3 e 33,3% para o primeiro e segundo ano, respectivamente; para o grupo B foi 22,2% no primeiro, 36,4% no segundo e 7,7% no terceiro ano. Leite et al. (2000), avaliando a persistência da mesma linhagem de *B. bassiana* utilizada neste estudo, observaram mortalidade de 50% dos insetos coletados a campo após 60 dias da aplicação fúngica. Alguns fatores contribuem para esta persistência, como o fato do fungo ser formulado à base de óleo, que segundo Leite et al. (2006b) auxilia na sobrevivência do conídio e na sua aderência à cutícula do inseto. Além disso, a aplicação no período vespertino, sem incidência solar, evita os efeitos deletérios da luz ultravioleta sobre os conídios.

Em função da natureza dos dados obtidos, optou-se por realizar o teste de  $\chi^2$  (Anexos 6 a 8), pelo teste da independência. A hipótese testada foi que a variação do número de insetos contaminados e não contaminados era independente do tratamento utilizado. No ano de 2005, observou-se que o número de insetos contaminados e não contaminados foi dependente do tratamento



efetuado, aceitando-se a hipótese alternativa; entretanto para 2006 e 2007 o número de insetos contaminados e não contaminados foi independente do tratamento utilizado. Esperava-se, que o resultado obtido para o ano de 2006 fosse o mesmo observado em 2005, onde os diferentes tratamentos influenciaram nos percentuais descritos acima. Porém, uma das justificativas foi o grande decréscimo populacional de *H. betulinus* a campo nos meses de abril de 2005 e 2006 e fevereiro de 2007 (Tabela 3 e 4), em função principalmente das aplicações do inseticida fúngico. O resultado obtido para o ano de 2007 era esperado, pois não houve aplicação fúngica em nenhum dos tratamentos (Tabela 5).

**Tabela 3.** Número de insetos capturados após 60 dias da última aplicação de 2005 para verificação da mortalidade de adultos de *H. betulinus* por *B. bassiana*, no grupo A, com aplicação fúngica no mês de fevereiro e no B, insetos registrados na área do tratamento posteriormente à aplicação fúngica.

<b>Tratamento</b>	<b>GRUPO A</b>		<b>GRUPO B</b>	
	<u>contaminados</u>	<u>não cont.*</u>	<u>contaminados</u>	<u>não cont.*</u>
<b>TI</b>	1,0 (8,3%)	11,0 (91,7%)	0,0 (0,0%)	8,0 (100%)
<b>TII**</b>	-	-	2,0 (10,0%)	18,0 (90,0%)
<b>TIII</b>	5,0 (62,5%)	3,0 (37,5%)	5,0 (41,7%)	7,0 (58,3%)
<b>TIV</b>	4,0 (36,3%)	7,0 (63,7%)	2,0 (22,2%)	7,0 (77,8%)

\* insetos não contaminados; \*\* não havia insetos marcados neste tratamento

**Tabela 4.** Número de insetos capturados após 60 dias da última aplicação de 2006 para verificação da mortalidade de adultos de *H. betulinus* por *B. bassiana*, no grupo A, com aplicação fúngica no mês de fevereiro e no B, insetos registrados na área do tratamento posteriormente à aplicação fúngica.

<b>Tratamento</b>	<b>GRUPO A</b>		<b>GRUPO B</b>	
	<i>contaminados</i>	<i>não cont.*</i>	<i>contaminados</i>	<i>não cont.*</i>
<b>TI</b>	0,0 (0,0%)	6,0 (100%)	0,0 (0,0%)	8,0 (100%)
<b>TII**</b>	-	-	1,0 (7,1%)	13 (92,9%)
<b>TIII</b>	4,0 (57,2%)	3,0 (42,8%)	3,0 (33,3%)	6,0 (66,7%)
<b>TIV</b>	2,0 (33,3%)	4,0 (66,7%)	4,0 (36,4%)	7,0 (63,6%)

\* - insetos não contaminados; \*\* - não há insetos marcados neste tratamento

**Tabela 5.** Número de insetos capturados em fevereiro de 2007 para verificação da mortalidade de adultos de *H. betulinus* por *B. bassiana*, no grupo de insetos registrados na área do tratamento posteriormente à aplicação fúngica.

<b>Tratamento</b>	<b>GRUPO B</b>	
	<i>contaminados</i>	<i>não cont.*</i>
<b>TI</b>	0,0 (0,0%)	20,0 (100%)
<b>TII**</b>	1,0 (5,0%)	19,0 (95,0%)
<b>TIII</b>	2,0 (18,2 %)	9,0 (81,8%)
<b>TIV</b>	1,0 (7,7 %)	12,0 (92,3%)

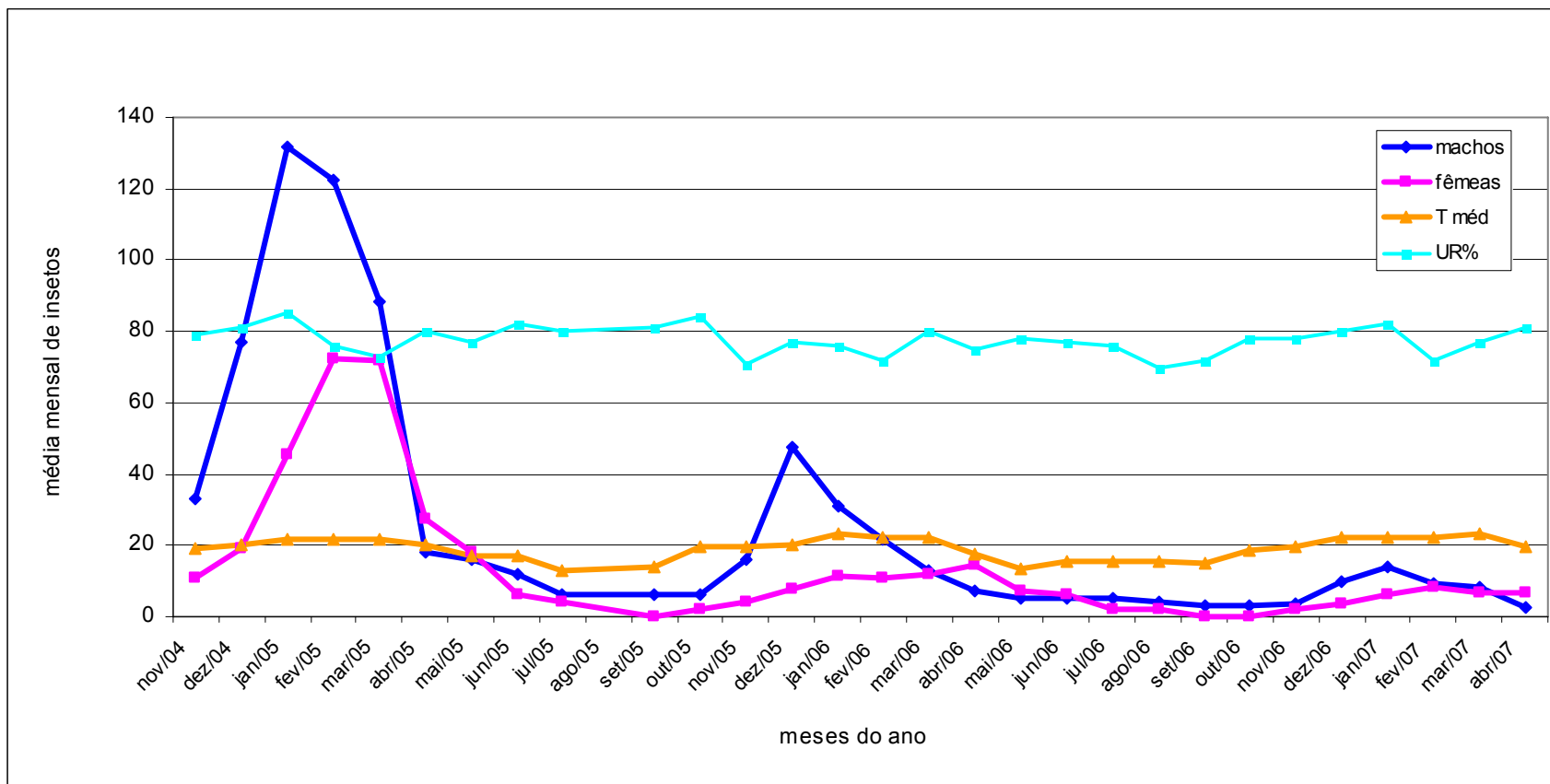
\* - insetos não contaminados; \*\* - não há insetos marcados neste tratamento

#### **4.4. Proporção sexual de adultos de *Hedypathes betulinus***

Dos 2.111 insetos registrados no tratamento TII (catação), 1.381 eram machos e 730 fêmeas, correspondendo a uma proporção média de 1,89 machos para cada fêmea (Anexo 9). A proporção encontrada por Cassanello (1993) foi semelhante, sendo em média 2,25 machos por fêmea.

Ao longo de 30 meses, observaram-se variações na proporção sexual embora com predominância dos machos praticamente todo o ano (período de maio a março). A proporção sexual chegou a ultrapassar quatro machos para cada fêmea, em novembro de 2005; contudo, em abril de 2006, registrou-se duas fêmeas para cada macho. Estes dados são corroborados por Soares (1998), que também observou alternância na proporção de sexos ao longo do ano, com predominância de machos entre agosto e março, e das fêmeas entre abril e julho.

Neste estudo, o pico populacional de machos ocorreu entre os meses de dezembro e janeiro e o das fêmeas entre fevereiro e abril (Figura 7). Soares (1998) registrou mais machos entre os meses de fevereiro e março; enquanto o pico de ocorrência das fêmeas foi em abril, ou seja, com uma defasagem temporal entre os sexos, indicando que a maioria dos machos se fazem presentes no erval cerca de um mês antes das fêmeas.



**Figura 7.** Flutuação populacional de machos e fêmeas de *H. betulinus*, obtidos no tratamento TII (catação) em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

#### **4.5. Distribuição dos adultos de *Hedypathes betulinus* nos estratos da erva**

Nas coletas realizadas em janeiro de 2005 e 2007, nos tratamentos TI (testemunha) e TII (catação), observou-se uma tendência dos insetos em se concentrarem no estrato médio da planta. Esta preferência pelo estrato médio pode ser associada a fatores fisiológicos e comportamentais, pois segundo Pizzamiglio (1991), a maioria dos insetos evita a exposição excessiva ao sol e a dessecação, principalmente no verão, procurando ambientes menos expostos à radiação solar. Entretanto, em função do baixo número de repetições, não se pode afirmar que este comportamento ocorra durante todo o dia ou nos outros meses do ano.

Soares (1998) constatou uma tendência dos insetos em se concentrarem no estrato superior da planta de janeiro a junho, e no estrato médio no período de agosto a outubro. O autor sugere que este comportamento se deu em razão da poda em seu campo experimental, que reduziu substancialmente a copa das plantas. Guedes et al. (2000) também observaram uma preferência do inseto em ocupar os extremos dos ramos, associando este comportamento aos vãos de dispersão, o que não foi observado nesta pesquisa.

Para os tratamentos com aplicação fúngica TIII e TIV (duas e três aplicações, respectivamente) houve uma preferência pelo estrato superior em 2005. Este resultado parece ser influenciado pela aplicação do fungo *B. bassiana* no mês de novembro, pois segundo Alves (1998) insetos com sintoma de contaminação fúngica apresentam o comportamento de ocupar locais de maior exposição ao sol, tentando elevar a temperatura corpórea para matar o fungo (Alves 1998). Estes dados são corroborados pela amostragem realizada no ano de 2007, onde não houve aplicação fúngica nestes tratamentos, e a maioria dos insetos demonstrou preferência pelo estrato médio, novamente.

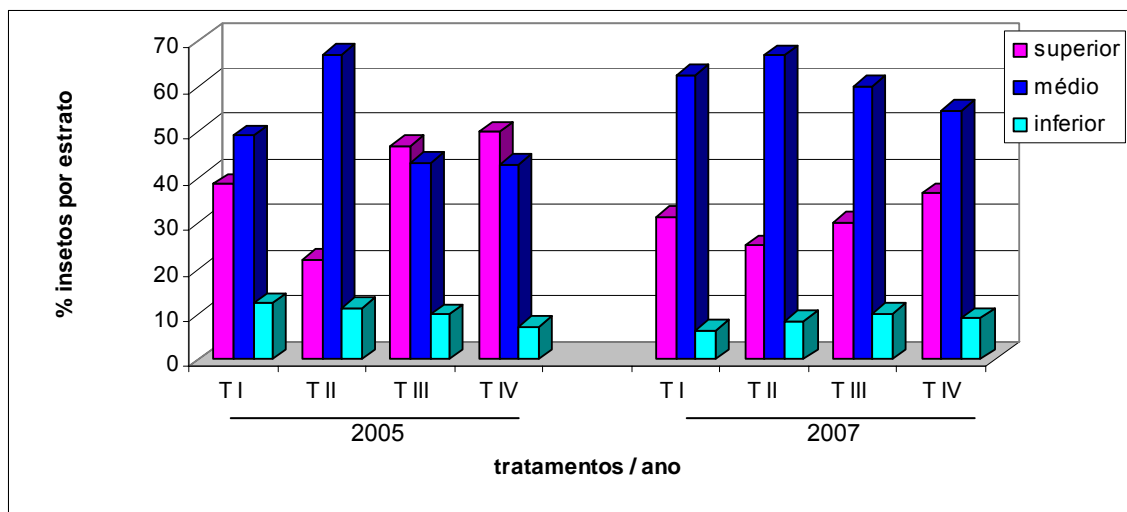
No estrato inferior foram observados apenas 9,3% dos insetos, sendo geralmente fêmeas no colo da erva em busca de local para realização da postura (Tabela 6 e Figura 8). A menor incidência de insetos neste estrato também

é corroborada por Soares (1998) e Guedes et al. (2000). Galileo et al. (1993) e d'Ávila (2002) observaram que a maioria das fêmeas buscam o colo das mudas apenas no momento da postura, tanto em laboratório quanto no erval.

Desde que o adulto da broca-da-erva-mate demonstra preferência pelo estrato médio da planta, as amostragens podem ser direcionadas para esta região. Entretanto, como os insetos com sintomas de contaminação fúngica modificam seu comportamento, podendo preferir o estrato superior, a amostragem dos insetos pode se direcionada para o estrato médio com eventuais observações no superior, não necessitando proceder à amostragem em toda a planta, o que torna o processo de monitoramento mais rápido, eficiente e menos dispendioso.

Tabela 6. Distribuição (%) de *H. betulinus* nos estratos da erva para os tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), nos meses de janeiro de 2005 e 2007, em um povoamento puro de erva-mate no município de Campo Alegre – SC.

<i>Tratamento</i>	<i>Ano</i>	<i>Estratos (%)</i>		
		<i>superior</i>	<i>médio</i>	<i>inferior</i>
T I	2005	38,50	49,12	12,28
	2007	31,25	62,50	06,25
T II	2005	21,80	66,90	11,30
	2007	25,00	66,67	08,33
T III	2005	46,90	43,23	09,87
	2007	30,00	60,00	10,00
T IV	2005	50,00	42,86	07,14
	2007	36,36	54,54	09,09
<b><i>Média final por estratos</i></b>		<b>31,22</b>	<b>59,49</b>	<b>09,29</b>



**Figura 8.** Distribuição (%) de *H. betulinus* nos estratos da planta nos tratamentos T I (testemunha), T II (catação), T III (duas aplicações anuais) e T IV (três aplicações anuais de *B. bassiana*) em povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no mês de janeiro de 2005 e 2007 no município de Campo Alegre – SC.

#### 4.6. Distribuição espacial de *Hedypathes betulinus* nos tratamentos

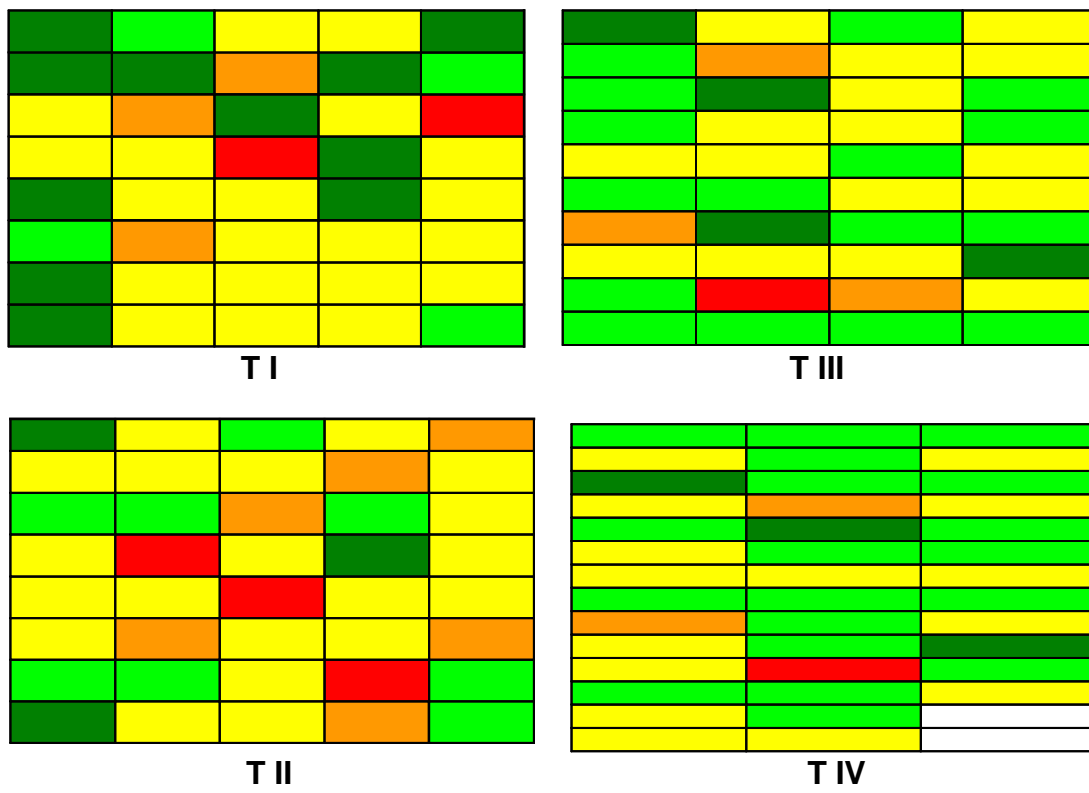
A distribuição espacial do inseto, ao longo dos três anos de observação, foi casualizada e independente do tratamento utilizado, como se observa nas Figuras 9 a 11. Em nenhuma das parcelas dos tratamentos foram registradas áreas de maior densidade populacional, fato que pode estar relacionado à homogeneidade do plantio (árvores com mais de cinco anos de idade, no início do experimento).

Os resultados da análise estatística, relativa à distribuição espacial dos adultos de *H. betulinus* nas áreas experimentais, estão apresentados nos Anexos 10 a 12. Observou-se diferença significativa, a 1%, no número de insetos entre os tratamentos T I (testemunha), T II (catação), T III (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), T IV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), entre os três anos (2005, 2006 e 2007) amostrados, assim como na interação entre eles. Em função das

diferenças significativas nessas interações, foi realizado o teste de Tukey a 5%, resultando na diferença significativa entre os tratamentos da testemunha (TI), catação (TII) e dos tratamentos com aplicação fúngica (TIII e TIV), que não diferiram entre si.

Soares (1998), observou uma heterogeneidade na distribuição dos insetos em erval com plantas de aproximadamente cinco anos. Este autor cita, como possível influência, a reposição de falhas no erval com mudas de aproximadamente três anos, as quais não parecem ser muito atrativas para os insetos. A preferência dos insetos por plantas mais velhas (acima de cinco anos) e já bem estabelecidas, pode ser relacionada ao vigor destas, exercendo maior atratividade para a broca-da-erva-mate.

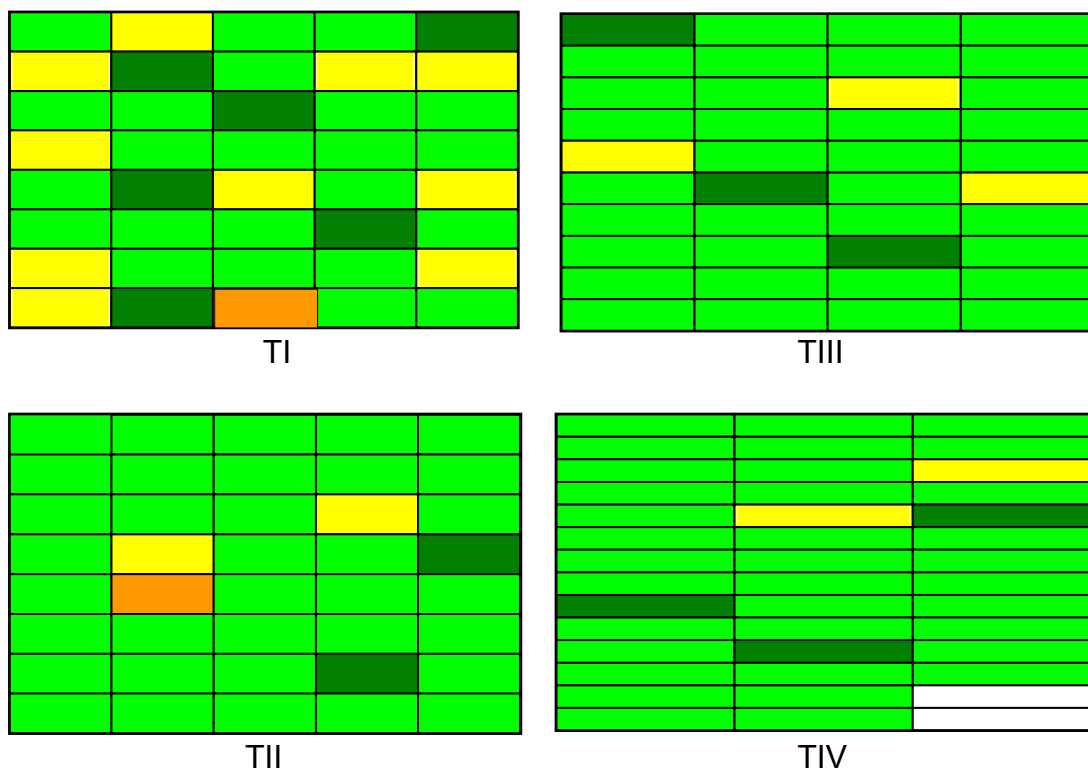




**LEGENDA:** cada quadrado representa um grupo de 5 plantas

□ = árvores excedentes (não observadas)	■ (green) = sem insetos	■ (dark green) = 1 inseto
■ (yellow) = 2-3 insetos	■ (orange) = 4-5 insetos	■ (red) = 6-10 insetos

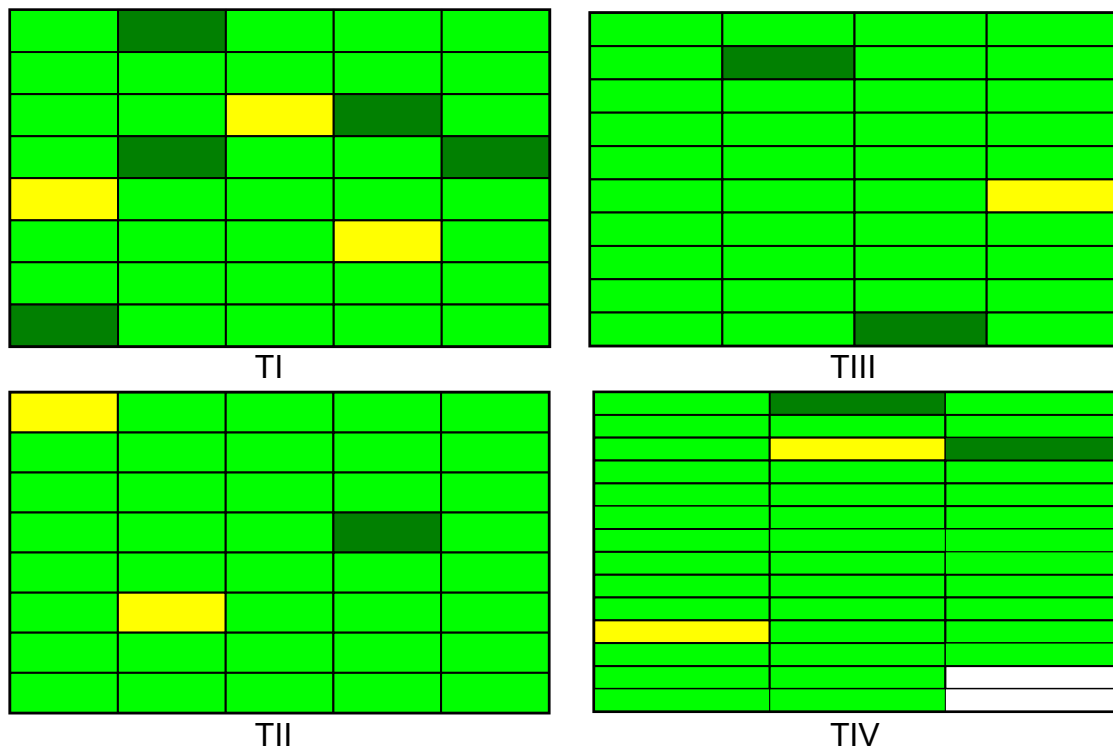
**Figura 9.** Distribuição de *H. betulinus* nos tratamentos T I (testemunha), T II (catação), T III (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), T IV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em janeiro de 2005, em um povoamento de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.



**LEGENDA:** cada quadrado representa um grupo de 5 plantas

□ = árvores excedentes (não observadas)	■ (verde) = sem insetos	■ (verde escuro) = 1 inseto
■ (amarelo) = 2-3 insetos	■ (laranja) = 4-5 insetos	■ (vermelho) = 6-10 insetos

**Figura 10.** Distribuição de *H. betulinus* nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em janeiro de 2006, em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.



**LEGENDA:** cada quadrado representa um grupo de 5 plantas

□ = árvores excedentes (não observadas)	■ (light green) = sem insetos	■ (dark green) = 1 inseto
■ (yellow) = 2-3 insetos	■ (orange) = 4-5 insetos	■ (red) = 6-10 insetos

**Figura 11.** Distribuição de *H. betulinus* nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em janeiro de 2007, em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

#### 4.7. Intensidade do ataque de *Hedypathes betulinus* nas árvores

No início do experimento, em janeiro de 2005, praticamente 100% das plantas em todos os tratamentos, apresentavam os sinais de ataque (orifícios com serragem na base do tronco) provocados por larvas de *H. betulinus*. Após 15 meses do início do experimento, realizou-se uma nova amostragem visando quantificar a percentagem de árvores que apresentavam sintomas de ataque recente pelo inseto em todas as parcelas (Figuras 12 e 13).

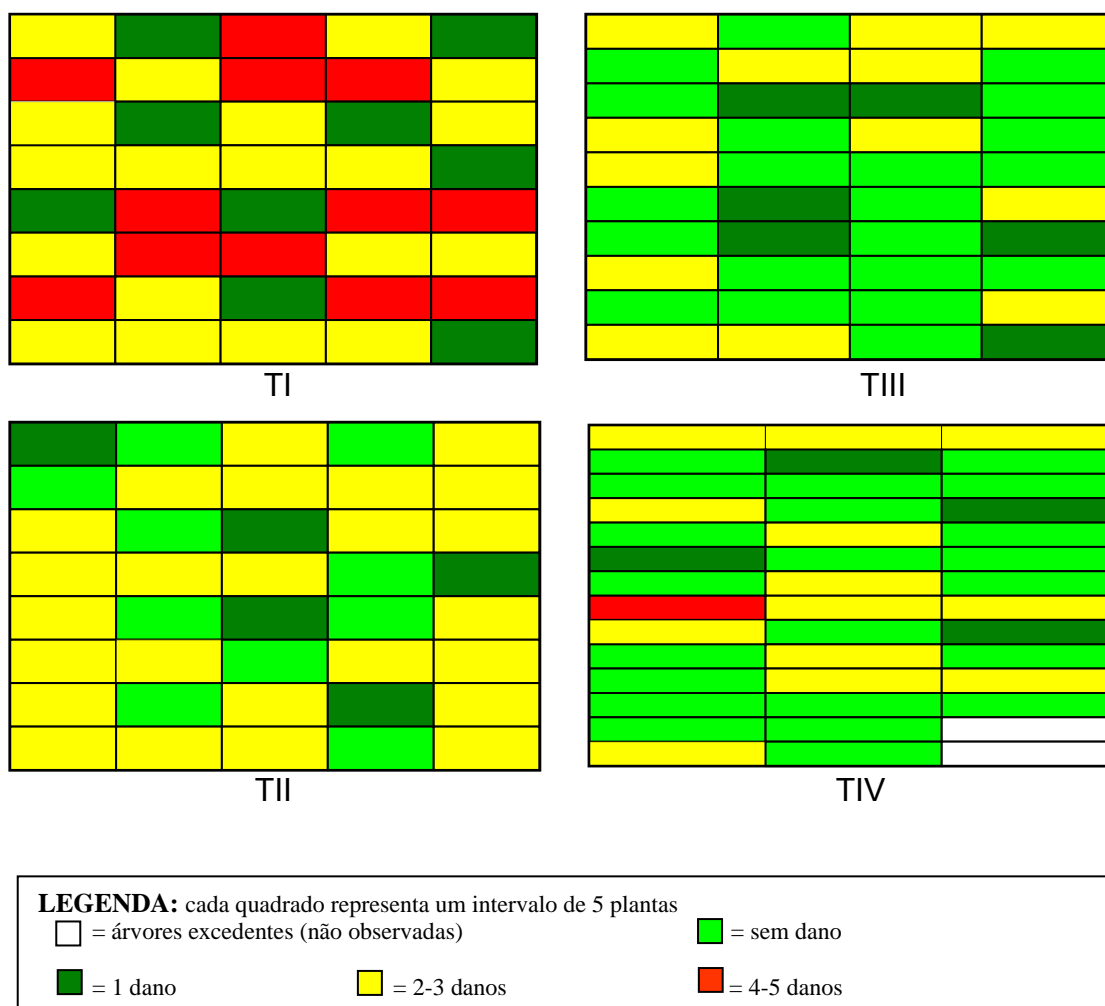
Os dados estatísticos relativos à distribuição espacial das árvores atacadas por *H. betulinus* estão apresentados nos Anexos 13 a 15. Foi observada diferença significativa, a 1%, entre os tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), e entre os anos (2006 e 2007). Comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5%, confirmou-se que a intensidade do dano foi significativamente maior nas áreas não tratadas com o fungo, e também no primeiro ano, com relação ao segundo ano.

Na amostragem realizada em janeiro/2006, a percentagem de árvores que apresentavam sintomas de ataque pelo inseto na testemunha (TI) foi de 80,5% (queda de 19,5%), caindo para 59,0% no ano seguinte (queda de 21,5%). Em trabalho realizado por Soares (1998), em monocultivo de erva-mate, o índice de danos foi igualmente alto, aproximadamente 91,0%, acarretando na morte de várias erva-mates. Em contraste, Borges et al. (2003) observaram que a percentagem de árvores atacadas em erval nativo e adensado, em São Mateus do Sul – SC, não ultrapassou 11,0%.

No tratamento TII (catação), a percentagem de árvores com dano foi de 60,5% (queda de 39,5%) e no ano de 2007 de 37,0% (queda de 23,5%). Em TIII (duas aplicações) a percentagem foi de 36,5% e 21,0%, respectivamente para 2006 e 2007 (queda de 63,5% e 15,5%). No tratamento com três aplicações (TIV) a percentagem foi de 42,8% e 24,7%, respectivamente para 2006 e 2007 (queda de 57,2% e 18,1%).

Na área TIII, observou-se um menor número de plantas atacadas, embora sem diferença estatística, em relação a TIV. Este fato pode ser influenciado pelo maior número de árvores no tratamento TIV que apresentavam folhagem escassa e amarelada. Segundo Cassanello (1993) e Soares (1998), estes são sintomas de erveiras infestadas, estando estas mais propensas à ação de agentes fitopatogênicos. No presente estudo, observou-se estas características principalmente em árvores que apresentavam acúmulo de dano, ou seja, mais de um orifício de emergência do adulto. Para Borsoi e Costa (2001) deficiências nutricionais interferem na resistência da planta, favorecendo a ação de agentes fitopatogênicos e podendo conseqüentemente, acarretar na morte ou deterioração das erveiras.





**Figura 13.** Distribuição espacial de árvores atacadas por *H. betulinus* nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em janeiro de 2007 (após 26 meses do início das aplicações), em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

#### **4.8. Infectividade e transmissão de *B. bassiana* em adultos de *H. betulinus* em laboratório**

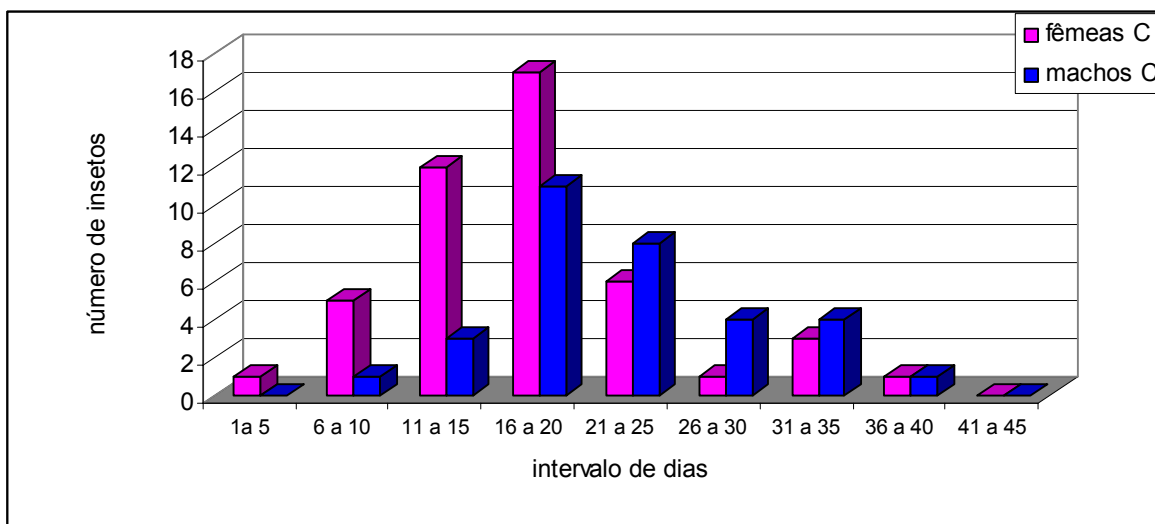
A infectividade das fêmeas foi de 84,0%, com tempo médio de 17,6 dias, e de 62,0% para os machos, com tempo médio 23,8 dias (Tabela 7). Sendo que a maioria das fêmeas morreu no intervalo entre 11 e 20 dias e os machos entre 16 e 25 dias (Figura 14). A testemunha apresentou mortalidade de 12,0% e 8,0% em razão da infecção fúngica para fêmeas e machos, respectivamente. A mortalidade dos insetos foi confirmada em câmara úmida pela extrusão do fungo no inseto (Figura 15).

Os resultados confirmam os dados de campo de que a linhagem CG 716 de *B. bassiana* apresenta um potencial elevado para o controle de *H. betulinus*, principalmente para os insetos que entram em contato com o fungo. Observou-se também uma alta mortalidade em machos que entram em contato com fêmeas contaminadas. Estes resultados sugerem que este fungo dissemina-se eficazmente na população da praga principalmente durante a cópula. Segundo observações realizadas por Cassanello (1993), o macho permanece por longos períodos sobre a fêmea (mais de quatro horas) e o mesmo macho pode copular com diversas fêmeas. d'Avila e Costa (2005), em estudo dos aspectos comportamentais de *H. betulinus*, também observaram o comportamento do macho montado ou guardando a fêmea, após a cópula, praticamente ao longo de todo o dia.

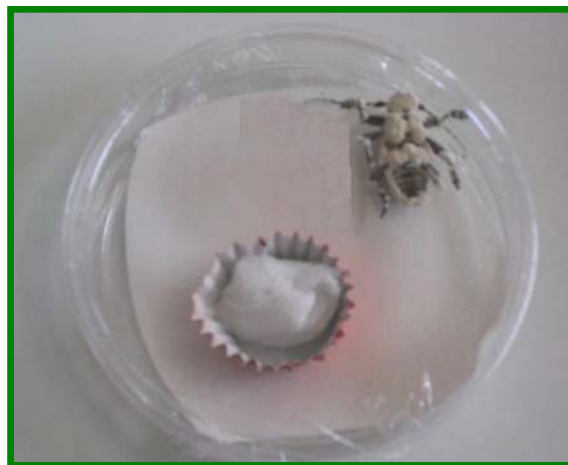


**Tabela 7.** Mortalidade de adultos de *H. betulinus* (fêmeas T e machos T), fêmeas contaminada (fêmeas C) e machos que copularam com as fêmeas contaminadas (machos C) com formulado de *B. bassiana*, em laboratório.

<b>Grupos</b>	<b>Número de insetos</b>	<b>% mortalidade por <i>B. bassiana</i></b>	<b>Tempo médio (dias)</b>
Fêmeas T	25	3,0 (12,0%)	28,7
Machos T	25	2,0 (8,0%)	37,5
Fêmeas C	50	42,0 (84,0%)	17,6
Machos C	50	31,0 (62,0%)	23,8



**Figura 14.** Intervalo de dias da mortalidade em fêmeas de *H. betulinus* contaminadas com formulado de *B. bassiana* (fêmeas C) e dos machos colocados em contato com estas fêmeas (machos C), em laboratório.



**Figura 15.** Adulto de *H. betulinus*, em laboratório, apresentando extrusão do fungo *B. bassiana* em câmara úmida.

#### **4.9. Inóculos de fungos nas amostras de solo**

Após três coletas utilizando os meios de cultura BDA e MM, o primeiro meio apresentou diferença qualitativa e quantitativa significativa em relação ao número de UFCs, em função disto, optou-se pela utilização do BDA para as demais coletas.

#### **4.10. *Beauveria bassiana***

A ocorrência natural de *B. bassiana* não foi observado na área da testemunha (TI) durante o período experimental. Nos tratamentos com duas (TIII) e três aplicações (TIV) do fungo, este não foi observado no solo antes da sua inoculação (Tabela 8).

Soares e Iede (1997) detectaram a ocorrência natural deste fungo em adultos de *H. betulinus* em monocultura de erva-mate, e Guinossi (1997) verificou sua presença em culturas comerciais de milho e soja. Entretanto, neste estudo,

alguns fatores discutidos a seguir podem ter contribuído para a ausência do fungo no local experimental.

Em trabalhos realizados com isolamento de fungos do solo nos estados de Goiás (Quintela et al. 1992); São Paulo (Garlipp 1995; Tauk-Tornisielo et al. 2005); e Alagoas e Sergipe (Cavalcanti et al. 2006) também não se recuperou este gênero.

Penna (2000) e Pimentel et al. (2006), realizando pesquisas com fungos endofíticos de erva-mate, não observaram *B. bassiana* habitando o interior dos tecidos da planta. Os fungos endofíticos habitam pelo menos uma fase de seu ciclo de desenvolvimento no interior do vegetal sem causar doença ou danos. Este fungo também é capaz de extrusar, por ocasião da poda, sendo disseminado para o solo servindo como fonte de inóculo para o controle biológico de várias ordens de insetos.

Após a aplicação a campo, o fungo *B. bassiana* persistiu no solo no tratamento TIII de dezembro de 2005 a maio de 2006 e, no tratamento TIV, até junho de 2006 (Figuras 16 e 17).

Os dados estatísticos relativos ao número de colônias de *B. bassiana* isolados do solo estão apresentados nos Anexos 16 e 17. Observou-se significância de 1% entre os tratamentos TI (testemunha), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), e entre os meses de coleta (novembro/2005 a outubro/2006), bem como entre as interações envolvendo tratamentos x meses. Em função das diferenças significativas entre as interações, foi realizado o teste de Tukey a 5%, demonstrando que a testemunha (TI) diferiu dos tratamentos com aplicação (TIII e TIV), que não diferiram entre si. Segundo Fargues e Roberts (1985), avaliando a persistência de *B. bassiana* no solo, este gênero é degradado em média após seis meses de inoculação, corroborando com os dados obtidos nesta pesquisa.

Leite et al. (2000), em estudo com a mesma linhagem de *B. bassiana*, observaram alto índice de infecção e uma redução de 50% da população do inseto após dois meses de sua aplicação. É importante considerar que a formulação à base de óleo, utilizada neste experimento, contribui para a estabilidade e eficiência

do fungo, auxiliando na sobrevivência dos conídios e sua aderência à cutícula do inseto (Prior et al. 1988; Leite et al. 2006b). Além disto, sua aplicação no período vespertino ou sem incidência solar evita os efeitos deletérios da luz ultravioleta sobre os conídios (Inglis et al. 1995).

O isolado CG716 de *B. bassiana* reduziu em 8,5 vezes e 5,8 vezes a população do inseto nos tratamentos TIII e TIV respectivamente, entre os meses de novembro/05 e maio/06. Entretanto, durante todo o período de coleta, não foram observados insetos mortos (carcaças) no campo experimental, podendo este fato, dificultar a permanência do patógeno em campo. De acordo com Kessler et al. (2004), a ausência do hospedeiro pode afetar a persistência do micopatógenos no solo. Para Keller e Zimmermann (1989), a relação estreita entre patógeno-hospedeiro leva a um controle mútuo, expresso na flutuação da população do hospedeiro. Segundo Keller et al. (2002; 2003), a redução da população do hospedeiro pode reduzir a densidade do patógeno no solo podendo, contudo, continuar presente em baixos níveis.

Os dados estatísticos da correlação entre o número de colônias de *B. bassiana* com fatores abióticos (Anexo 18), indicaram que a UR% e a precipitação pluviométrica não interferiram na persistência do fungo no solo, sendo influenciado apenas pela temperatura média. Provavelmente este resultado foi devido ao fato dos valores de umidade relativa e precipitação não sofrerem grandes variações ao longo de todo o período experimental.

Epizootias deste fungo, geralmente, são influenciadas por fatores abióticos, principalmente em testes em laboratório. Quintela et al. (1992) e Lingg e Donaldson (1981) também observaram maior persistência de conídios de *B. bassiana* no solo em temperaturas mais baixas (17 e 24°C) do que em altas (30°C).

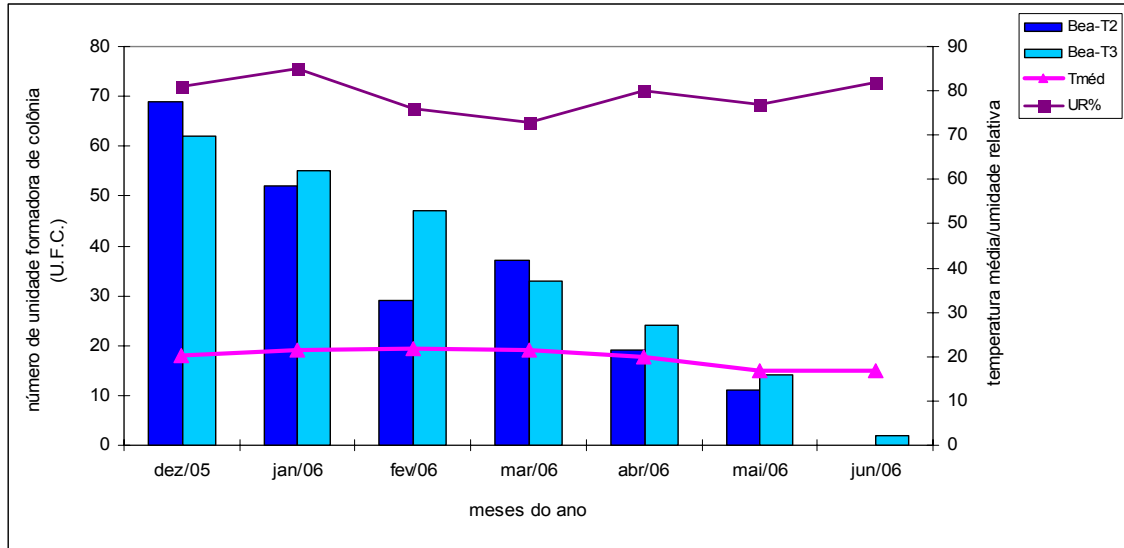
Em testes realizados em laboratório, utilizando grandes variações de umidade relativa e temperatura, Sosa-Gómez e Alves (2000), concluíram que o número de conídios de *B. bassiana* é influenciado por estes fatores, assim como pelas diferentes cepas da mesma espécie de fungo. Luz et al. (1998) também

encontraram, em laboratório, diferenças significativas na virulência de *B. bassiana* quando submetida a grandes diferenças na umidade relativa.

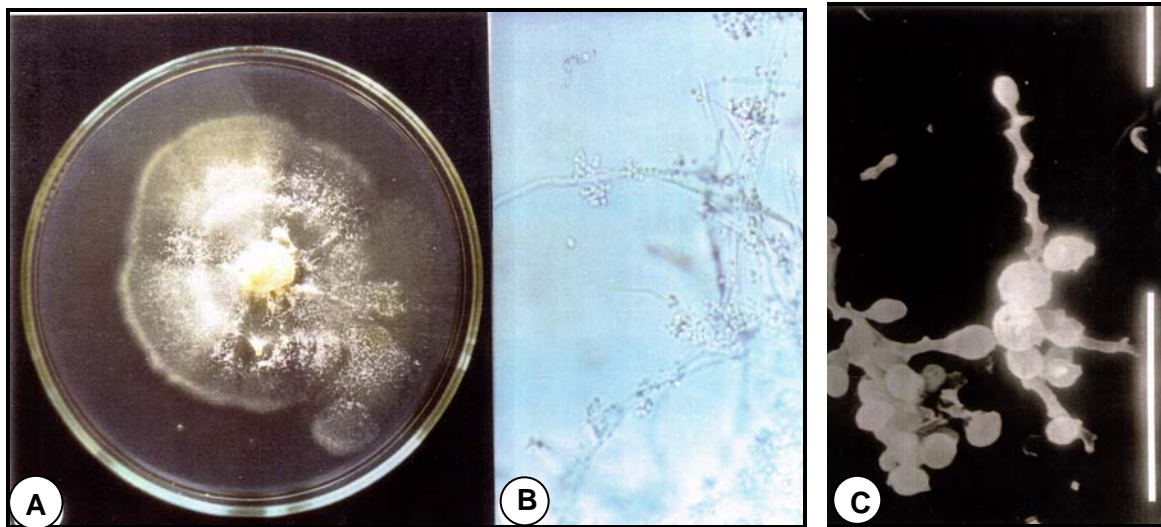
**Tabela 8.** Número total de colônias de *B. bassiana* isoladas do solo e fatores abióticos registrados nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais) e TIV (três aplicações anuais do patógeno) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

<b>Meses</b>	<b>Fatores abióticos</b>			<b><i>B. bassiana</i></b>		
	<b>Temperatura</b>	<b>UR%</b>	<b>Precipitação</b>	<b>TI</b>	<b>TIII</b>	<b>TIV</b>
Nov/05	19,5	71	95,8	-	-	-
Dez/05	20,1	77	98,7	-	69	62
Jan/06	23,2	76	204,7	-	52	55
Fev/06	22,3	72	143,0	-	29	47
Mar/06	22,0	80	164,1	-	37	33
Abr/06	17,7	75	14,8	-	19	24
Mai/06	13,5	78	18,2	-	11	14
Jun/06	15,6	77	35,0	-	-	02
Jul/06	15,5	76	67,0	-	-	-
Ago/06	15,4	70	85,3	-	-	-
Set/06	15,2	72	147,5	-	-	-
Out/06	18,4	78	105,6	-	-	-
<b>Total</b>	<b>18,2</b>	<b>75,16</b>	<b>98,30</b>	<b>00</b>	<b>217</b>	<b>237</b>

(-) = ausência do fungo



**Figura 16.** Número total de colônias de *B. bassiana* isoladas do solo registradas nos tratamentos TIII (duas aplicações anuais do patógeno) e TIV (três aplicações anuais com *B. bassiana*) correlacionado com temperatura média (Tméd °C) e umidade relativa (UR%) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.



**Figura 17.** *Beauveria bassiana*. **17a.** colônia; **17b.** conídios; **17c.** conídios com conidióforos formando cachos, fiáldes com parte basal dilatada terminando em zigue-zague em microscopia eletrônica de varredura (M.E.V), aumento de 4985X (Fotos: Pimentel 2001).

#### 4.11. Outros fungos isolados do solo

Foram identificados 11 gêneros de fungos nas amostras de solo em todos os tratamentos, sendo estes: Filo Ascomycota - *Metarhizium* sp., *Paecilomyces* sp., *Lecanicillium* sp. e *Gliocladium* sp.; Filo Zygomycota - *Rhizopus* sp. e Filo Deuteromycota - *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp.; e *Trichoderma* sp.

Dentre os fungos observados, os gêneros do grupo 1 (Tabela 9 e Figura 18) permaneceram no solo praticamente durante todo o período experimental; os fungos do grupo 2 ocorreram durante o verão e o outono (Tabela 10 e Figura 19); e os do grupo 3 ocorreram entre o inverno e a primavera (Tabela 11 e Figura 20).

No grupo 1, os gêneros mais freqüentes foram: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acremonium*, ocorrendo em todos os tratamentos, representando 72,7%; 75,7% e 73,7%, respectivamente, para os tratamentos TI (testemunha), TIII (duas aplicações do formulado de *B. bassiana*) e TIV (três aplicações do formulado). O principal motivo da predominância dos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. se deve principalmente ao fato de que estes gêneros apresentam uma alta taxa de esporulação.

Garlipp (1995) e Tauk-Tornisielo et al. (2005) também registraram alguns destes mesmos gêneros de fungos em amostras coletadas no estado de São Paulo, sendo que as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* ocorreram principalmente nos meses de inverno (agosto) e verão (fevereiro), enquanto que *Acremonium* apenas no verão. Cavalcanti et al. (2006) observaram que os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram dominantes nos estados de Alagoas e Sergipe nos meses de julho e março, mas *Acremonium* apresentou sempre baixo número de UFC.

Os fungos do grupo 2 foram *Cladosporium* sp.; *Fusarium* sp.; *Metarhizium* sp., nas freqüências de 18,6%; 12,9% e 16,1% nos tratamentos TI, TIII e TIV, respectivamente. Garlipp (1995) e Tauk-Tornisielo (2005) observaram estes gêneros no mesmo período, entretanto o segundo autor não recuperou o gênero *Cladosporium* em nenhuma das coletas.

Os fungos do grupo 3: *Lecanicillium*; *Trichoderma*; *Gliocladium* e *Paecilomyces* foram os que apresentaram menor frequência, 8,6; 11,4 e 10,2% para os tratamentos TI, TIII e TIV, respectivamente. Em trabalho realizado por Garlipp (1995), estes fungos também só foram observados em coleta realizada no mês de agosto. Segundo Tauk-Tornisielo et al. (2005), todos os fungos foram registrados nas coletas de inverno e verão, em São Paulo.

Os resultados na frequência dos gêneros encontrados em todos os tratamentos indicam que a aplicação de *B. bassiana* não afetou antagonicamente a microbiota fúngica do solo, ao contrário das observações de Quintela et al. (1992), que constataram que a inoculação com este fungo inibiu as colônias de bactérias e actinomicetos.

Entre os gêneros observados, vários foram anteriormente associados à erva-mate como entomopatogênicos, endofíticos, contaminantes de erva-mate industrializada, patógenos ou saprófitas de diversas partes da planta. Entre os fungos relatados como endofíticos estão: *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Verticillium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., e *Acremonium* sp. (Penna 2000; Pimentel et al. 2006). Os fungos endofíticos também podem habitar naturalmente o solo e são de grande importância ecológica para a erva-mate em função do controle natural que podem exercer sobre microrganismos fitopatogênicos, e conferir maior resistência à planta contra predadores e/ou algumas doenças (Pimentel et al. 2006).

Os fungos associados à contaminação fúngica em erva-mate industrializada são *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. (Auer e Grigoletti Jr. 1995, 2002; Borges et al. 2002; Bernardi et al. 2005). A alta ocorrência de alguns destes gêneros pode sugerir uma contaminação fúngica proveniente do solo no erval durante a poda e/ou colheita das folhas.

Os fungos entomopatogênicos registrados foram: *Acremonium* sp., observado colonizando hemípteros, himenópteros e coleópteros (Alves 1998; Azevedo et al. 2000a,b); *Aspergillus* sp., comumente relatado como agente secundário, que ocorre principalmente sobre insetos doentes, colonizados por



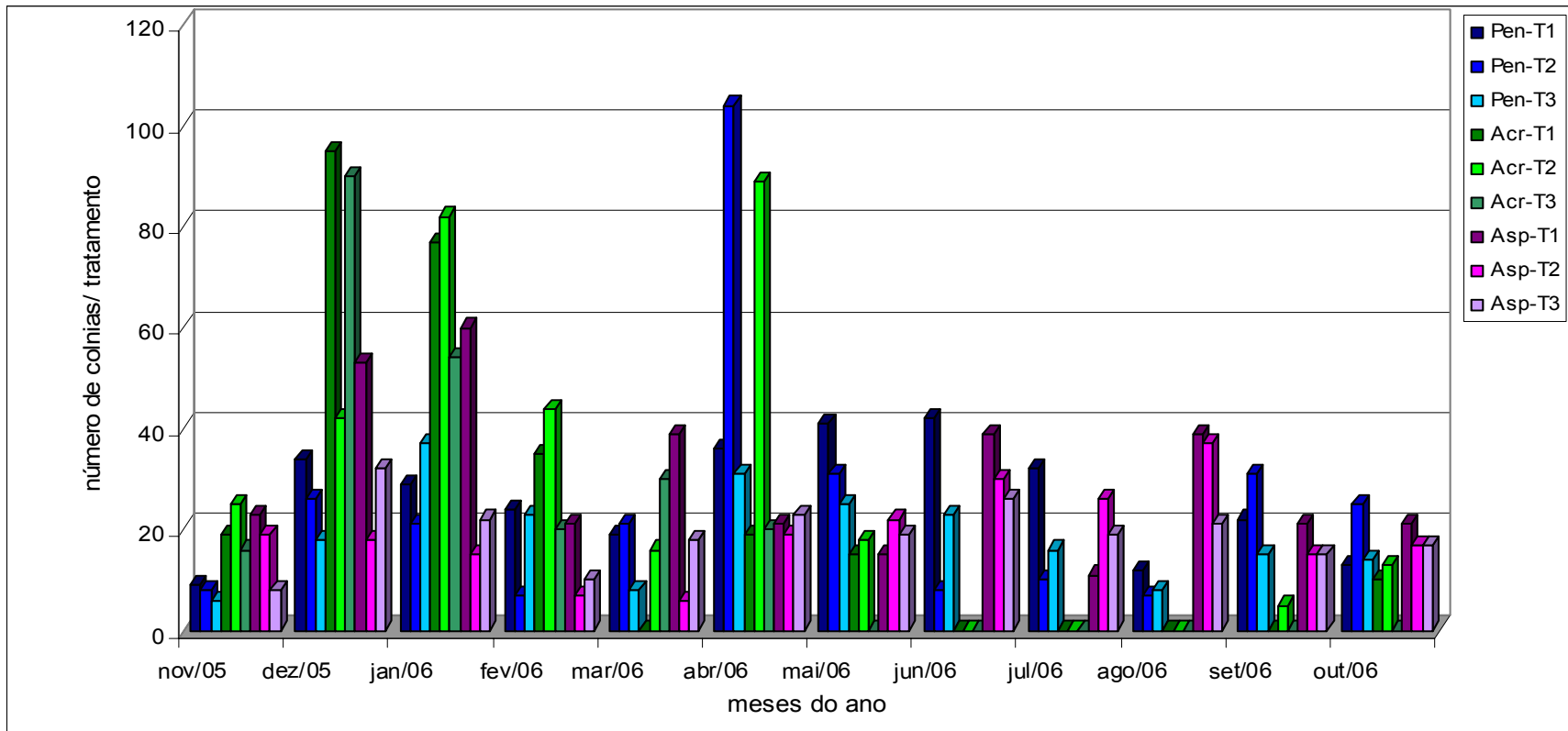
outros patógenos ou submetidos a diferentes tipos de estresse, provocando inibição do crescimento no hospedeiro, e acarretando posteriormente a sua morte (Alves 1998).

O gênero *Fusarium* sp. pode ocorrer sobre plantas e insetos, atuando com agente secundário de doenças; tem sido relatado, principalmente, como patógeno de hemípteros (Arantes e Correia 1999; Poletto et al. 2006) coccídeos e cochonilhas em algumas frutíferas (Alves 1998; Azevedo et al. 2000b); *Lecanicillium* sp. ocorre freqüentemente sobre homópteros (Loureiro et al. 2003; Leite et al. 2003), himenópteros (Loureiro et al. 2004) e coleópteros (Bautista 2004), sendo também relatado sobre várias outras ordens (Alves 1998). *Metarhizium anisopliae* ataca diversas espécies de hemípteros (Athayde 2001; Batista Filho et al. 2003), coleópteros (Bautista 2004), isópteros (Barreto 2004), himenópteros (Loureiro et al. 2005); além disto, é amplamente distribuído na natureza, podendo ser facilmente encontrado no solo onde sobrevive por longos períodos (Alves 1998). O gênero *Paecilomyces* reúne diversas espécies entomopatogênicas e já foi relatado provocando epizootias sobre himenópteros (Loureiro et al. 2005); lepidópteros, coleópteros, homópteros e ortópteros (Alves 1998).

Os fungos entomopatogênicos coletados no solo podem ser utilizados em pesquisas futuras visando o potencial destes inóculos para o controle biológico de pragas em erva-mate. Além disto, alguns fungos endofíticos de erva-mate como *Acremonium* sp. e *Lecanicillium* sp., (Pimentel et al. 2006) são entomopatogênicos de insetos-praga, podendo ser inoculados em plantas livres de endófitos, transmitindo a elas a capacidade de se protegerem do ataque de diversos insetos (Pimentel 2001).

**Tabela 9.** Número total de colônias isoladas do solo do grupo 1 - *Penicillium* sp., *Acremonium* sp. e *Aspergillus* sp. encontradas nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais com *B. bassiana*) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

<b>Meses</b>	<b><i>Penicillium</i> sp.</b>			<b><i>Acremonium</i> sp.</b>			<b><i>Aspergillus</i> sp.</b>		
	<b>TI</b>	<b>TIII</b>	<b>TIV</b>	<b>TI</b>	<b>TIII</b>	<b>TIV</b>	<b>TI</b>	<b>TIII</b>	<b>TIV</b>
Nov/05	09	08	06	19	25	16	23	19	08
Dez/05	34	26	18	95	42	90	53	18	32
Jan/06	29	21	37	77	82	54	60	15	22
Fev/06	24	07	23	35	44	20	21	07	10
Mar/06	19	21	08	-	16	30	39	06	18
Abr/06	36	104	31	19	89	20	21	19	23
Mai/06	41	31	25	15	18	-	15	22	19
Jun/06	42	08	23	-	-	-	39	30	26
Jul/06	32	10	16	-	-	-	11	26	19
Ago/06	12	07	08	-	-	-	39	37	21
Set/06	22	31	15	-	05	-	21	15	15
Out/06	13	25	14	10	13	-	21	17	17
<b>Total</b>	<b>313</b>	<b>299</b>	<b>224</b>	<b>270</b>	<b>334</b>	<b>230</b>	<b>363</b>	<b>231</b>	<b>230</b>



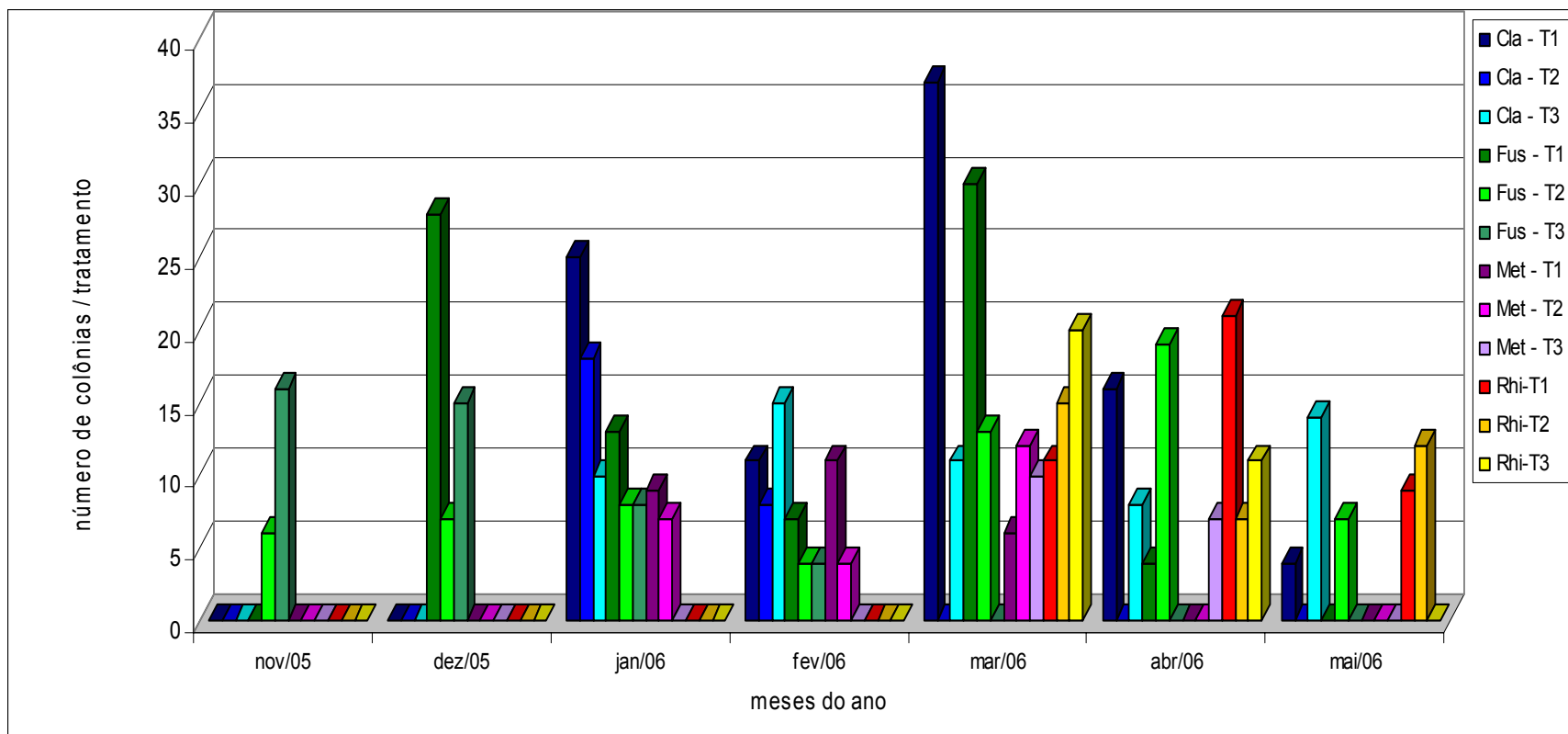
**Figura 18.** Número total de colônias de fungos filamentosos de *Penicillium* sp. (Pen), *Acremonium* sp. (Acr) e *Aspergillus* sp. (Asp) encontradas nos tratamentos T1 (testemunha); T2 (duas aplicações anuais com *B. bassiana*) e T3 (três aplicações anuais com *B. bassiana*) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

**Tabela 10.** Número total de colônias isoladas do solo do grupo 2 - *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Metarhizium* sp. e *Rhizopus* sp. encontradas nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais com *B. bassiana*) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

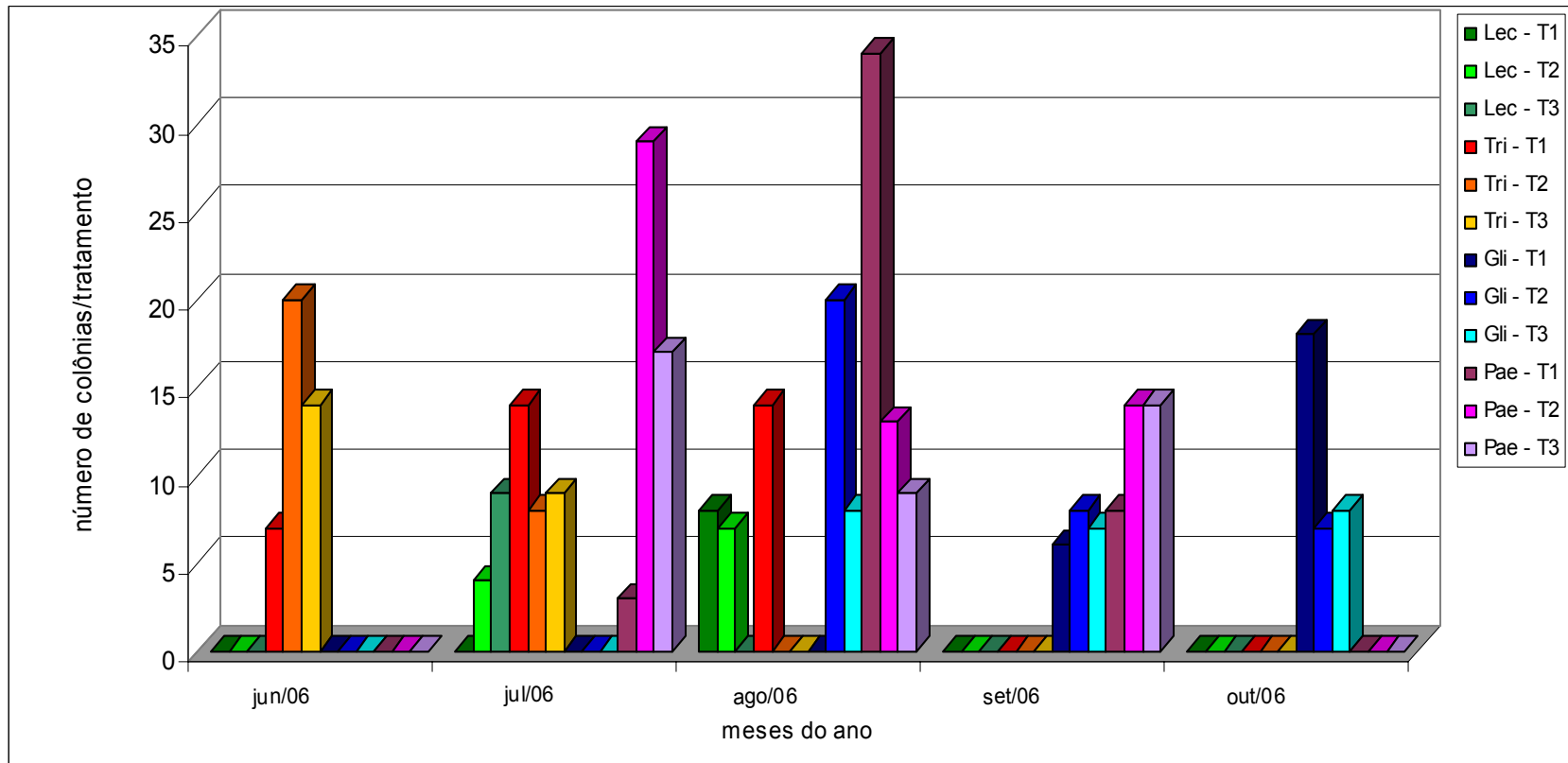
Meses	<i>Cladosporium</i> sp.			<i>Fusarium</i> sp.			<i>Metarhizium</i> sp.			<i>Rhizopus</i> sp.		
	TI	TIII	TIV	TI	TIII	TIV	TI	TIII	TIV	TI	TIII	TIV
Nov/05	-	-	-	-	06	16	-	-	-	-	-	-
Dez/05	-	-	-	28	07	15	-	-	-	-	-	-
Jan/06	25	18	10	13	08	08	09	07	-	-	-	-
Fev/06	11	08	15	07	04	04	11	04	-	-	-	-
Mar/06	37	-	11	30	13	-	06	12	10	11	-	20
Abr/06	16	-	08	04	19	-	-	-	07	21	07	11
Mai/06	04	-	14	-	07	-	-	-	-	09	12	-
<b>Total</b>	<b>93</b>	<b>26</b>	<b>58</b>	<b>82</b>	<b>64</b>	<b>43</b>	<b>26</b>	<b>23</b>	<b>17</b>	<b>41</b>	<b>34</b>	<b>31</b>

**Tabela 11.** Número total de colônias isoladas do solo do grupo 3 - *Lecanicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp. e *Paecilomyces* sp. encontradas nos tratamentos TI (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais com *B. bassiana*) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

Meses	<i>Lecanicilium</i> sp.			<i>Trichoderma</i> sp.			<i>Gliocladium</i> sp.			<i>Paecilomyces</i> sp.		
	TI	TIII	TIV	TI	TIII	TIV	TI	TIII	TIV	TI	TIII	TIV
Jun/06	-	-	-	07	20	14	-	-	-	-	-	-
Jul/06	-	04	09	14	08	09	-	-	-	03	29	17
Ago/06	08	07	-	14	-	-	-	20	08	34	13	09
Set/06	-	-	-	-	-	-	06	08	07	08	14	14
Out/06	-	-	-	-	-	-	18	07	08	-	-	-
<b>Total</b>	<b>08</b>	<b>11</b>	<b>09</b>	<b>35</b>	<b>28</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>35</b>	<b>23</b>	<b>45</b>	<b>56</b>	<b>40</b>



**Figura 19.** Número total de colônias de fungos entomopatogênicos de *Cladosporium* sp. (Cla), *Fusarium* sp. (Fus), *Metarhizium* sp. (Met) e *Rhizopus* sp. (Rhi) encontradas nos tratamentos T1 (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais com *B. bassiana*) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.



**Figura 20.** Número total de colônias isoladas do solo de fungos filamentosos de *Lecanicillium* sp. (Lec), *Trichoderma* sp. (Tri), *Gliocladium* sp. (Gli) e *Paecilomyces* sp. (Pae) encontradas nos tratamentos T1 (testemunha); TIII (duas aplicações anuais com *B. bassiana*) e TIV (três aplicações anuais com *B. bassiana*) no período de novembro/2005 a outubro/2006 em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

Para finalizar, considera-se que a utilização de *B. bassiana* representa uma medida bem sucedida para o manejo das populações de *H. betulinus* em áreas de cultivo intensivo de erva-mate, visando a manutenção deste agroecossistema exclusivo do sul do Brasil e Argentina. Os dados sobre a persistência de fungos entomopatogênicos no solo podem ser usados para determinar qual é o melhor isolado para ambientes diferentes; contudo, para se ter uma avaliação mais precisa da persistência enzoótica de *B. bassiana* é necessário que os estudos sejam conduzidos por pelo menos dois anos, em função de diversos fatores que podem influenciar sua persistência. A microbiota do solo deve ser pesquisada em diversas outras áreas e regiões ervateiras para o conhecimento da diversidade dos microorganismos e seleção de raças virulentas para o controle de *H. betulinus* e de outras pragas. Também são necessárias mais pesquisas visando à compreensão dos efeitos dos fatores bióticos e abióticos nas espécies de entomopatógenos passíveis de prejudicar sua disseminação, germinação e colonização do hospedeiro.

## 5. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, nas condições experimentais e climáticas da área de estudo, conclui-se que:

- O tratamento com duas aplicações anuais do formulado fúngico à base de *B. bassiana* na concentração de  $10^7$  conídios/mL no tronco da erva é o mais eficaz para o controle de *H. betulinus*;
- A aplicação do formulado nos meses de novembro e fevereiro é o esquema de controle mais adequado;
- A persistência do formulado fúngico, no primeiro ano, por meio dos insetos infectados, prolonga-se por quatro meses após a última aplicação;
- O adulto da broca-da-erva-mate demonstra preferência pelo estrato médio da planta, entretanto, nos tratamentos com aplicação fúngica, o estrato preferencial tende a ser o superior;
- Há redução significativa na intensidade do ataque de *H. betulinus*, nas ervas, em função da aplicação com o formulado de *B. bassiana*;
- Não há diferença significativa na persistência de *B. bassiana* no solo entre os tratamentos com duas e três pulverizações;
- A persistência de *B. bassiana* no solo é afetada apenas pela temperatura;
- *B. bassiana* pode disseminar-se na população da praga por contato;



- Não são detectados inóculos naturais de *B. bassiana* em amostras do solo na área;
- Ocorrem 11 gêneros de fungos filamentosos no solo da área experimental, alguns com atividade entomopatogênica; outros endofíticos ou ainda contaminantes de erva-mate industrializada, patógenos ou saprófitas de diversas partes da planta.

## 6. Referências Bibliográficas

**Alencar, F.R. 1960.** Erva-mate. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola. p. 19-23.

**Almeida, J.E.M.; Alves, S.B.; Moino Jr., A.E.; Lopes, R.B. 1998.** Controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen) com iscas Termitrap impregnadas com inseticidas e associadas ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. An. Soc. Entomol. Bras., v.27, n.4, p. 639-644.

**Alves, S.B. 1998.** Controle microbiano de insetos. Piracicaba, SP: FEALQ, 1163p.

**Alves, S.B.; Lecuona, R.E. 1998.** Epizootiologia aplicada ao controle microbiano In: Controle microbiano de insetos. 2ª ed. Piracicaba, SP: FEALQ, p. 97-170.

**Alves, S.B.; Morales, S.A. 1979.** Influência da luz sobre o crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* (Bals.). Ecosistema, v. 4, p. 43-50.

**Arantes, A.M.V.T.; Correia, A.C.B. 1999.** Diversidade de fungos associados a *Parlatoria ziziphus* (Lucas) (Hemiptera: Diaspididae) em Citros. An. Soc. Entomol. Bras., vol. 28, no.3, p.477-483.

**Athayde, A. C. R. 2001.** Fungos entomopatogênicos. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, Brasília, v. 21, p. 12-15.

**Auer, C.G.; Grigoletti Jr., A. 1995.** Doenças da erva-mate. Summa Phytopathologica, Jaguariúna, v. 21, n. 3-4, p. 195-198.

**Auer, C.G.; Grigoletti Jr., A. 2002.** Associação de fungos com *Ilex* spp. Bol. Pesq. Fl., Colombo, n. 45, p. 109-124.

**Azevedo, J.L. 1998.** Controle microbiano de insetos-pragas e seu melhoramento genético. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. Pragas – Controle biológico. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, v.1, p. 69-95.

**Azevedo, J. L; Macheroni Jr., W; Pereira, J. O; Araújo, W. L. 2000a.** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 3, p. 01-36.

**Azevedo, J. L; De, Araújo, W. L; Jr, Maccheroni, W. 2000b.** Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: Controle Biológico, MELO, I. S; de, AZEVEDO, J. L. (Ed.) Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, 338p.

**Barnett, H. L.; Hunter, B. B. 1972.** Illustrated genera of imperfect fungi.

**Barreto, R. S. 2004.** Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. for the control of the mite *Mononychellus tanajoa* (Bondar). *Sci. agric.* , vol.61, no.6, p.659-664.

**Batista Filho, A.; Almeida, J.E.M.; Santos, A.S.; Machado, L.A.; Alves, S.B. 2003.** Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle de cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.: Cercopidae). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.70, n.3, p.309-314.

**Bautista, L. 2004.** Hongos entomopatogenos parasitando em estado natural la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera:Scolytidae) en el estado Tachira Venezuela. Disponível em: <<http://www.unet.edu.ve/~frey/varios/decinv/>

**Bell, J.V. 1974.** Mycoses. In: Cantwell, G.E. Insects diseases. New York: M. Dekker, p. 185-230.

**Bellows, T.S. 2001.** Restoring population balance through natural enemy introductions. *Biological Control*, v.21, p. 199-2005.

**Bernardi, E., Caldeira, M.F.; Nascimento, J.S. 2005.** Identificação de fungos filamentosos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.72, n.4, p.489-493.

**Borges, L.R.; Pimentel, I.C.; Beux, M.R.; Talamini, A. 2002.** Contagem de fungos no controle de qualidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e isolamento de gêneros potencialmente toxigênicos. Boletim do Ceppa, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 103-110.

**Borges, L.R.; Lazzari, S.M.N.; Lazzari, F.A. 2003.** Comparação dos sistemas de cultivo nativo e adensado de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., quanto a ocorrência e flutuação populacional de insetos. Revista Brasileira de Entomologia, v. 47, n. 4, p. 563-568.

**Borsoi, G.A.; Costa, E.C. 2001.** Avaliação nutricional de plantas de erva-mate atacadas e não atacadas pelo *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825). Ciência Florestal, Santa Maria, v.11, n.2, p. 131-142.

**Cavalcanti, M.A.Q.; Oliveira, L.G.; Fernandes, M.J.; Lima, D.M. 2006.** Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região do Xingo – Brasil. Acta Bot. Bras. V. 20, n. 4, p. 831-837.

**Carpanezi, A.A. 1995.** Cultura do mate no Brasil: conflitos e lacunas. In: H. Winge, A. G. Ferreira, J. E. A. Mariath e L. C. Tarasconi (ed.), Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul. Porto Alegre, Ed. Universidade, p. 43-47.

**Cassanello, A.M.L. 1993.** Ciclo de vida e aspectos morfológicos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae) em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) Tese de Mestrado em Entomologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 61p.

**Clark, F.E. 1965.** Agar-plate method for total microbial count. pp. 1460-1466. In: C.A. Black; D.D. Evans; J.L. White; L.E. Ensminger; F.E. Clark e R.C. Dinaver (eds.). Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and microbiological properties. New York, Madson Inc.

**Corrêa, G.S.; Azevedo, J.L. 1986.** Efeito do solo na germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. O Solo, v.78, n.1, p. 39-41.

**Couch T.L.; Ignoffo, C.M. 1981.** Formulation of insect pathogens. In Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970-1980. Ed. Burges, H.D. Academic Press, London, pp. 621-634.

**Crocomo, W.B. 1990.** Manejo de pragas. Botucatu, SP: Ed. Universidade Estadual Paulista. 157p.

**d'Avila, M. 2002.** Influência de alguns fatores ambientais sobre o comportamento de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.). Santa Maria, Dissertação de Mestrado em Engenharia Florestal – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 142p.

**d'Avila, M.; Costa, E.C. 2005.** Aspectos comportamentais de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) em erva-mate. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 233-239.

**d'Avila, M.; Costa, E.C. Guedes, J.V.C. 2006.** 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.

**Da Croce, D.M. 2002.** Características físico-químicas de estratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no estado de Santa Catarina. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 12, n. 2, p. 107-113.

**Dalla Santa, H. S. 2000.** Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin em resíduos agroindustriais para controle biológico de *Thelesia camina* (Shaus, 1920) e *Hylesia* sp.; pragas da erva-mate. Curitiba. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 96p.

**De Coll, O.R.; Saini, E.D. 1992.** Insetos y ácaros perjudiciales al cultivo de la yerba mate en la Republica Argentina. INTA, E.E.A. Montecarlo, Argentina, 48p.

**De Coll, O.R.; Saini, E.D. 1993.** Enemigos naturales de los insectos y acaros perjudiciales al cultivo de la Yerba Mate em la Republica Argentina. INTA, E.E.A. Montecarlo, Argentina, 31p.

**Diaz, C.I.F. 1997.** Perspectivas del manejo integrado de plagas em yerba mate. In: I Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e II Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da Erva-mate. Curitiba, Ed. dos Organizadores, p.371-390.

**Ellis, M. B. 1976.** More dematiaceous hyphomycetes. Surrey, Commonwealth Mycological Institut, 507p.

**Fargues, J.; Reisinger, O.; Robert, P.H.; Aubart, C. 1983.** Biodegradation of entomopathogenic hyphomycetes: Influence of clay coating on *Beauveria bassiana* blastospores survival in soil. J. Invertebr. Pathol. 41: 131- 142.

**Fargues, J.; Roberts, P.H. 1985.** Persistence dos conidiospores des hyphomycetes entomopathogenes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Nomurea rileyi* (F.) Sanson et *Paecilomyces fumoroseus*. Wige dans le sol, en conditions controlees. Agronomie, v.5, p. 73-80.

**Ferron, P. 1977.** Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* in imagos of *Acanthoscelides obtectus* (Col: Bruchidae). Entomophaga, Paris, v. 22, n. 4, p. 393-396.

**Fiorentino D.C.; Diodato, L. 1997.** Manejo de plagas producidas por insectos forestales. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Ed. El Liberal, Santiago del Estero, Argentina.

**Furlong, M.J.; Groden, E. 2003.** Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, Imidacloprid, and Cyromazine. J. Econ. Entomol., v. 94, n.2, p. 344-356.

**Galileo, M.H.M.; Martins, U.R.; Moura, L.A. 1993.** Sobre o comportamento, ontogenia e morfologia do aparelho reprodutor de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae) a broca-da-erva-mate. Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 705-715.

**Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C. de V.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. 2002.** Entomologia Agrícola. 2ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 649p.

**Gama, F.C.; Teixeira, C.A.D.; Garcia, A.; Costa, J.N.M.; Limav, D.K.S. 2005.** Influência do ambiente na diversidade de fungos associados a *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera, Scolytidae) e frutos de *Coffea canephora*. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.72, n.3, p.359-364.

**Garlipp, A.B. 1995.** Isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo do Banhado Grande, na Estação Ecológica de Juréia-Martins, SP. UNESP, 94p. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Bio-Ciencias, UNESP).

**Gaugler, R.; Costa, S.D.; Lashomb, J. 1989.** Stability and efficacy of *Beauveria bassiana* soil inoculations. Environ. Entomol. 18: 412-417.

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

**Guinossi, H.M. 1997.** Disseminação e persistência dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. nas culturas de soja e trigo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 86p.

**Headrick, D.H.; Groeden, R.D. 2001.** Biological control as a tool for ecosystem management. *Biological Control*, v.21, p.249-257.

**Iede, E.T. 1985** Considerações sobre a entomofauna da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais – Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). EMBRAPA/CNPQ. 146p.

**Iede, E.T.; Machado, D.C. 1989.** Pragas da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e seu controle. EMBRAPA/CNPQ. Colombo. Bol. Pesq. Flor. 18/19, p. 51-60.

**Iede, E.T.; Soares, C.M.S.; Grigoletti Jr., A.; Auer, C.G. 2000.** de identificação de pragas e doenças da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) Embrapa/CNPQ. Colombo. 24 p.

**Ignoffo C.M.; Garcia, C.; Hostetter, D.L.; Pinell, R.E. 1978.** Stability of conidia of an entomopathogenic fungus *Nomureae rileyi*, in and on soil. *Environ. Entomol.* v.7: 724-727.

**Inglis, G.D.; Johnson, D.L.; Goettal, M.S. 1995.** 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.



**Keller, S.; Zimmermann, G. 1989.** Mycopathogens of soil insects. In: N., Wilding, N.M. Collins, P.M. Hammond and J.F. Webber (eds.) Insect- Fungus Interactions. Academic Press, London, p. 239-270.

**Keller, S.; Kessler, P.; Jensen, D.B.; Schweizer, C. 2002.** How many spores of *Beauveria brongniartii* are needed to control *Melolontha melolontha* IOBC/wprs Bulletin, n. 25, p. 59-64

**Keller, S.; Kessler, P.; Schweizer, C. 2003.** Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. BioControl 48: 307-319.

**Kern, M. E.; Blevins, K. S. 1999.** Micologia Médica. 2ª ed. São Paulo: Editora Premier. p. 256.

**Kessler, P.; Matzke, M.H.; Keller, S. 2003.** The effect of application time and soil factors on the occurrence of *Beauveria brongniartii* applied as biological control agent in soil. J. Invertebrate Pathol. 84: 15-23.

**Kessler, P.; Enkerli, J.; Schweizer, C.; Keller, S. 2004.** Survival of *Beauveria brongniartii* in the soil after application as biocontrol agent against the European cockchafer *Melolontha melolontha*. BioControl, v. 59, p. 563-581.

**Koneman, E. W. ; Roberts, G. D. 1987.** Micologia Prática de Laboratório. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. 221p.

**Lacey, L.A.; Frutos, R.; Kaya, H.K.; Vails, P. 2001.** Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? Biological Control., v. 21 p. 230-248.

**Lanza, L.M.; Monteiro, A.C.; Malheiros, E.B. 2004.** População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.6, p. 1757-62.

**Larone, D. H. 1987.** Medically important fungi: a guide to identification. New York, Elsevier. 230p.

**Leite, M.S.P.; Soares, C.M.S.; Iede, E.T.; Penteado, S.R.C.; Castellano, C. 2000.** 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.

**Leite, M.S.P.; Zaleski, S.R.M.; Penteado, S.R.C.; Camargo, J.M.M.; Ribeiro, R.D. 2003.** Patogenicidade de cepas do fungo *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas no controle de *Cinara atlantica* (Wilson, 1919) (Hemíptera: Aphididae). In: Simpósio sobre cinara em Pinus, 1. 2003, Curitiba. Anais... Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1 Cd-Rom.

**Leite, M.S.P.; Penteado, S.R.M.; Zaleski, S.M.R.; Camargo, J.M.M.; Ribeiro, R.D. 2005.** Determinação da CL<sub>50</sub> do Formulado CG 716 de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill para o controle de adultos de *Hedypathes betulinus* (Klug) em laboratório. In: IX Siconbiol – Simpósio de Controle Biológico. Recife- PE, p. 98.

**Leite, M.S.P.; Iede, E.T., Penteado, S.R.C. 2006a.** Manejo Integrado de Pragas em erva-mate para o controle da broca-da-erva-mate, com ênfase ao uso de entomopatógenos. 2006. In: IV Congresso Sudamericano de la Yerba Mate. Cd-Rom.

**Leite, M.S.P.; Iede, E.T., Penteado, S.R.C.; Zaleski, S.R.M.; Camargo, J.M.M.; Ribeiro, R.D. 2006b.** Eficiência de *Beauveria bassiana* (BALS) Vuill formulado em óleo no controle de *Hedypathes betulinus* (Klug) (Coleoptera: Cerambycidae) em campo. In: IV Congresso Sudamericano de la Yerba Mate. p. 269-272.

**Lingg, A.J.; Donaldson, M. D. 1981.** Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. Journal of Invertebrate Pathology, v.39, p. 191-200.

**Linhares, T. 1969.** História econômica do mate. Rio de Janeiro: José Olympio: Editora Coleção documentos brasileiro, 522p.

**Loureiro, E. S.; Oliveira, N. C.; Wilcken, C. F. 2003.** Avaliação da patogenicidade do fungo *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas (Deuteromicotina: Hypomycetes) ao pulgão-gigante-do-pinus *Cinara atlantica* (Hemiptera: Aphididae). In: Simpósio Sobre cinara em Pinus, 1. 2003, Curitiba. Anais... Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1 Cd-Rom.

**Loureiro, E.S.2, Oliveira, N.C.; Wilcken, C.F.; Batista Filho, A. 2004.** Patogenicidade de *Verticillium lecanii* ao pulgão-do-pinus. Revista Árvore, Viçosa-MG, v.28, n.5, p.765-770, 2004

**Loureiro, E. S.; Monteiro, A. Carlos. 2005.** Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera : Formicidae). Revista Árvore, vol.29, no.4, p.553-561

**Luz, C., Tigano, M.S.; Silva, I.G.; Cordeiro, C.M.T.; Aljanabi, S.M. 1998.** Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.93, p. 839-846.

**Martins, R.G. 1949.** O problema econômico do mate. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. 43p.

**Mazuchowski, J.Z. 1991.** da Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Curitiba, EMATER, 104p.

**Miranda, N.; Urban, T. 1998.** Engenhos e barbaquás. Curitiba, Ed. Posigraf, 120p.

**Oliveira, M.Y.M.; Rotta, E. 1985.** Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: Seminário sobre Atualidades e Perspectivas Florestais - Silvicultura da Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). EMBRAPA/CNPF. 146 p.

**Oliveira, R.C.; Alves, L.F.A; Neves, P.M.O.J. 2000.** Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* ao ácaro vermelho da erva-mate. II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica da Erva-mate. Encantado, Ed. dos Organizadores, p. 318- 321.

**Pachamuthu, P.; Kamble, S.T. 2000.** In vitro study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos and cyfluthrin against german cochroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol., v. 93 p. 60-70.

**Pagliosa, M.M.R.; Santos, H.R.; Diodato, M.A. 1994.** Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., em *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) praga da erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hill. Agrárias, Curitiba, 13 (1-2) p. 229-231.

**Penna, E.B.S. 2000.** Microrganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. por RAPD. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

**Penteado, S.R.C. 1995.** Principais pragas da erva-mate e medidas alternativas para o seu controle. In: H. Winge, A.G. Ferreira, J. E. A. Mariath e L. C. Tarasconi (ed.), Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul. Porto Alegre, Ed. Universidade, 356 p.

**Penteado, S.R.C.; Iede, E.T.; Leite, M.S.P. 2000.** Pragas da erva-mate: perspectivas de controle. In: II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica da Erva-mate. Encantado, Ed. dos Organizadores. p. 27-38.

**Pereira, R.M., Alves, S.B., Sosa-Gómez, D.R. 1998.** Utilização de entomopatógenos no manejo integrado de pragas. In: Alves, S.B. 1998, Controle Microbiano de Insetos. 2 ed. Piracicaba, SP: FEALQ.

**Pimentel, I. C. 2001.** Fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e seu potencial biotecnológico no controle de pragas agrícolas. 153f. Tese (Doutorado) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

**Pimentel, I.C.; Kuczkowski, F.R.; Chime, M.A.; Auer, C.G.; Grigoletti Jr., A. 2006.** Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) Revista Floresta, Curitiba, v. 36, n. 1. p. 123-128.

**Pizzamiglio, M.A. 1991.** Ecología das interações inseto/planta. In: PANIZZZI, A.R.; PARRA, J.R. Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. São Paulo: Manole, cap. 4, p. 101-129.

**Poletto, I.; Muniz, M.F.B.; Ceconi, D.E.; Santin, D.; Weber, M.N.D.; Blume, E. 2006.** Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do Vale do Taquarí, RS. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1-10.

**Prado, H. 2001.** Solos do Brasil. 2.ed. Piracicaba : H. Prado. 220p.

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

**Quintela, E.D. 1986.** Estabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes) no solo e sua patogenicidade ao *Chalcodermus aeneus* Boheman (Col: Curculionidae), praga do caupi. Dissertação de Mestrado, ESALQ/ USP, Piracicaba, 101p.

**Quintela, E.D.; Lord, J.C.; Alves, S.B.; Roberts, D.W. 1992.** Persistência de *Beauveria bassiana* em solo de cerrado e sua interação com microorganismos do solo. *An. Soc. Entomol. Brasil.* v. 21, n. 1. p. 69-81.

**Rath, A.C.; Koen, T.B.; Yip, H.Y. 1992.** The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pastures soils. *Mycological Research*, 96: 378-384.

**Ribeiro, M.M. 1993.** 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.

**Roberts, D.W.; Campbel, A.S. 1977.** Stability of entomopathogenic fungi. In: Ignoffo, C.M.; Hostetter, D.L. *Environmental stability of microbial insecticides*. 3 ed. New York: Entomological Society of America. 10p.

**Shah, P.A.; Pell, J.K. 2003.** Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, v. 61, p. 413-423.

**Sharapov, V.M.; Kalvish, T.K. 1984.** Effect of soil fungistasis on zoopathogenic fungi. *Mycopathology*, v.85, n.2, p.121-128.

**Shields, M.S. 1981.** Identification of a *Penicillium urticae* metabolite which inhibits *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.38, n.3, p.374-377.

**Soares, C.M.S. 1996.** Levantamento de insetos predadores de adultos da broca-da-erva-mate (*Hedypathes betulinus*) (Klug, 1825) (Col: Cerambycidae) In: V Siconbiol – Simpósio de Controle Biológico. Foz do Iguaçu – PR.

**Soares, C.M.S. 1998.** 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.). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 73p.

**Soares, C.M.S.; Iede, E.T. 1997.** 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.

**Soares, C. M. S.; Iede, E. T.; Santos, H.R. 1995.** Ocorrência natural dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre *Hedypathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae). In: V Siconbiol – Simpósio de Controle Biológico. Foz do Iguaçu, Ed. Embrapa, p.81.

**Soares C.M.; Iede, E.T.; Santos, H.R. 2000.** Flutuação populacional de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) em um erval estreme. In: II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da Erva-mate. Encantado. Ed. dos Organizadores, p. 325-326.

**Sosa-Gómez, D.R.; Alves, S.B. 2000.** Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deutermycetes: Moniliaceae). An. Soc. Entomol. Brasil., v. 29, p. 515-521.

**Sosa-Gómez, D.R.; Boucias, D.G.; Nation, J.L. 1997.** Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. J. Invert. Pathol., v. 69, p. 31-39.

**Sousa, N.J. 1999.** Aspectos biológicos, ecológicos de microorganismos. In: Memórias seminário: Possibilidades del control biológico en plantaciones forestales de Colômbia – Programa de proteccion forestal. CONIF – MINAMBIENTE – BIRIF, Santafé de Bogotá, Colômbia.

**Storey, G.K.; Gardner, W.A.; Tollner, E.W. 1989.** Penetration and persistence of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia in soil of two tillage systems. Environ. Entomol, n. 18, p. 835-839.

**Studdert, J.P.; Kaya, H.K. 1990.** Water potencial, temperature and soil type on theation of *Beauveria bassiana* soil colonies. Jounal of Invertebrate Pathology, v.56, n.3, p. 380-383.

**Tauk-Tornisielo, S.M.; Garlipp, A.; Ruegger, M.; Attili, D.S.; Malagutti, E. 2005.** Soilborne filamentous fungi in Brasil. J. Brasil. Microbiol. v. 45, n. 1, p. 72-82.

**Vänninen, I; Tyni-Juslin, J; Hokkanen, H. 2000.** Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in finish agricultural soils. Biocontrol, v.45, p. 201-222.

**Valduga, E. 1995.** Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 97p.



## ANEXOS



## **Anexo 1. Meios de Cultura**

### 1.1. Meio Batata Dextrose Ágar (BDA)

Batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL

Após a preparação, o meio de cultura deve ser autoclavado a 1 atmosfera (atm) durante 20 minutos.

### 1.2. Meio de Martin (MM)

Dextrose	10 g
Peptona	5,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Agar	20 g
$\text{H}_2\text{O}$	1000 mL
Rosa bengala	0,033 g
Água destilada	1000 mL

Após a preparação, o meio de cultura deve ser autoclavado a 1 atm durante 20 minutos.

## **Anexo 2. Clareador Lactofenol de Amann**

Ácido láctico	10 g
Ácido fênico	10 g
Glicerina	20 g
Água destilada	10 mL

**Anexo 3.** Número de adultos de *H. betulinus*, obtidos em cada uma das avaliações para os tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

<i>MESES</i>	<i>COLETAS</i>	<i>TI</i>	<i>TII</i>	<i>TIII</i>	<i>TIV</i>
Nov/04*	1 <sup>a</sup>	48,0	41,0	25,0	39,0
	2 <sup>a</sup>	55,0	47,0	29,0	43,0
Dez/04	1 <sup>a</sup>	110,0	92,0	80,0	52,0
	2 <sup>a</sup>	125,0	100,0	61,0	55,0
Jan/05*	1 <sup>a</sup>	374,0	354,0	220,0	218,0
Fev/05*	1 <sup>a</sup>	196,0	226,0	132,0	164,0
	2 <sup>a</sup>	245,0	164,0	160,0	175,0
Mar/05	1 <sup>a</sup>	240,0	154,0	145,0	90,0
	2 <sup>a</sup>	190,0	167,0	140,0	85,0
Abr/05**	1 <sup>a</sup>	125,0	53,0	45,0	60,0
	2 <sup>a</sup>	85,0	38,0	30,0	40,0
Mai/05	1 <sup>a</sup>	62,0	34,0	19,0	22,0
Jun/05	1 <sup>a</sup>	34,0	18,0	6,0	10,0
Jul/05	1 <sup>a</sup>	27,0	10,0	11,0	6,0
Set/05	1 <sup>a</sup>	7,0	6,0	4,0	1,0
Out/05	1 <sup>a</sup>	9,0	8,0	6,0	5,0
Nov/05*	1 <sup>a</sup>	33,0	9,0	24,0	12,0
	2 <sup>a</sup>	54,0	32,0	44,0	23,0
Dez/05	1 <sup>a</sup>	86,0	39,0	33,0	43,0
	2 <sup>a</sup>	65,0	72,0	49,0	30,0
Jan/06*	1 <sup>a</sup>	108,0	50,0	38,0	45,0
	2 <sup>a</sup>	131,0	35,0	27,0	39,0
Fev/06*	1 <sup>a</sup>	88,0	32,0	25,0	38,0
	2 <sup>a</sup>	103,0	33,0	15,0	21,0
Mar/06	1 <sup>a</sup>	89,0	23,0	14,0	15,0
	2 <sup>a</sup>	49,0	27,0	11,0	7,0
Abr/06**	1 <sup>a</sup>	51,0	18,0	16,0	8,0
	2 <sup>a</sup>	50,0	25,0	8,0	9,0
Mai/06	1 <sup>a</sup>	43,0	12,0	8,0	6,0
Jun/06	1 <sup>a</sup>	38,0	11,0	7,0	4,0
Jul/06	1 <sup>a</sup>	27,0	7,0	5,0	3,0
Ago/06	1 <sup>a</sup>	9,0	6,0	7,0	6,0

continua...

### Anexo 3. (continuação)

<b>MESES</b>	<b>COLETAS</b>	<b>TI</b>	<b>TII</b>	<b>TIII</b>	<b>TIV</b>
Set/06	1 <sup>a</sup>	6,0	3,0	3,0	3,0
Out/06	1 <sup>a</sup>	11,0	3,0	3,0	2,0
Nov/06*	1 <sup>a</sup>	17,0	5,0	5,0	6,0
	2 <sup>a</sup>	20,0	6,0	5,0	7,0
Dez/06	1 <sup>a</sup>	26,0	14,0	8,0	9,0
	2 <sup>a</sup>	31,0	13,0	7,0	14,0
Jan/07*	1 <sup>a</sup>	65,0	24,0	11,0	13,0
	2 <sup>a</sup>	59,0	16,0	14,0	16,0
Fev/07* <sup>/</sup> **	1 <sup>a</sup>	52,0	19,0	23,0	15,0
	2 <sup>a</sup>	43,0	17,0	24,0	13,0
Mar/07	1 <sup>a</sup>	30,0	15,0	13,0	12,0
	2 <sup>a</sup>	25,0	15,0	11,0	13,0
Abr/07	1 <sup>a</sup>	18,0	11,0	8,0	10,0
	2 <sup>a</sup>	10,0	7,0	2,0	6,0
<b>TOTAL</b>		<b>3.369</b>	<b>2.111</b>	<b>1.581</b>	<b>1.513</b>

\* dados referentes as aplicações anuais de *B. bassiana*

\*\* coleta de insetos após 60 dias da aplicação (abr/05 e abr/06) e 12 meses após última aplicação (fev/07).

**Anexo 4.** Anova referente à média mensal de adultos de *H. betulinus*, obtidos em cada uma das avaliações para os tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em um povoamento puro de erva-mate (*I. paraguariensis*) no município de Campo Alegre – SC (Dados transformados para log x+2).

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F</b>
Blocos (meses)	28	19.78631	0.70665	53.3570 **
tratamentos	3	3.16236	1.05412	79.5929 **
Resíduo	84	1.11249	0.01324	
<b>Total</b>	<b>115</b>	<b>24.06115</b>		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ );

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL: 28, 84 F-krit (1%) = 1.9574 F = 83.7507  $p < .00100$

GL: 3, 84 F-krit (1%) = 4.0237 F = 85.9329  $p < .00100$

**Anexo 5.** Representação das médias das coletas nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em um povoamento puro de erva-mate (*I. paraguariensis*) no município de Campo Alegre – SC.

<b>Tratamentos</b>	<b>média</b>	<b>significância</b>
TI	1.63842	a
TII	1.36293	b
TIII	1.24932	c
TIV	1.22032	c
<b>DMS = 0.07931 MG = 1.36775 CV% = 8.41399</b>		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Anexo 6.** Avaliação da mortalidade de adultos de *H. betulinus* coletados a campo após 60 dias da última aplicação de 2005 para verificação da mortalidade por *B. bassiana*.

		<i>tratamentos</i>	<i>Obs.</i>	<i>Esp.</i>	<i>d</i>	<i>d</i> <sup>2</sup>	<i>d</i> <sup>2</sup> / <i>esp.</i>
<b>Grupo A</b>	contaminados	TI	1	3,87	-2,87	8,24	2,13
		TIII	5	2,58	2,42	5,85	2,27
		TIV	4	3,55	0,45	0,20	0,06
	não contaminados	TI	11	8,13	2,87	8,24	1,01
		TIII	3	5,42	-2,42	5,85	1,08
		TIV	7	7,45	-0,45	0,20	0,03
						<sup>2</sup> χcalculado	6,58
						<sup>2</sup> χTabelado	5,99

		<i>tratamentos</i>	<i>Obs.</i>	<i>Esp.</i>	<i>d</i>	<i>d</i> <sup>2</sup>	<i>d</i> <sup>2</sup> / <i>esp.</i>
<b>Grupo B</b>	contaminados	TI	0	1,47	-1,47	2,16	1,47
		TII	2	3,67	-1,67	2,80	0,76
		TIII	5	2,20	2,80	7,82	3,55
		TIV	2	1,65	0,35	0,12	0,07
	não contaminados	TI	8	6,53	1,47	2,16	0,33
		TII	18	16,33	1,67	2,80	0,17
		TIII	7	9,80	-2,80	7,82	0,80
		TIV	7	7,35	-0,35	0,12	0,02
						<sup>2</sup> χcalculado	7,17
						<sup>2</sup> χTabelado	7,81

**Anexo 7.** Avaliação da mortalidade de adultos de *H. betulinus* coletados a campo após 60 dias da última aplicação de 2006 para verificação da mortalidade por *B. bassiana*.

		<i>Tratamentos</i>	<i>Obs.</i>	<i>Esp.</i>	<i>d</i>	<i>d</i> <sup>2</sup>	<i>d</i> <sup>2</sup> / <i>esp.</i>
<b>Grupo A</b>	contaminados	TI	0	1,89	-1,89	3,59	1,89
		TIII	4	2,21	1,79	3,20	1,45
		TIV	2	1,89	0,11	0,01	0,01
	não contaminados	TI	6	4,11	1,89	3,59	0,87
		TIII	3	4,79	-1,79	3,20	0,67
		TIV	4	4,11	-0,11	0,01	0,00
						<sup>2</sup> $\chi$ calculado	4,89
						<sup>2</sup> $\chi$ Tabelado	5,99

		<i>Tratamentos</i>	<i>Obs.</i>	<i>Esp.</i>	<i>d</i>	<i>d</i> <sup>2</sup>	<i>d</i> <sup>2</sup> / <i>esp.</i>
<b>Grupo B</b>	contaminados	TI	0	1,52	-1,52	2,32	1,52
		TII	1	2,67	-1,67	2,78	1,04
		TIII	3	1,71	1,29	1,65	0,96
		TIV	4	2,10	1,90	3,63	1,73
	não contaminados	TI	8	6,48	1,52	2,32	0,36
		TII	13	11,33	1,67	2,78	0,25
		TIII	6	7,29	-1,29	1,65	0,23
		TIV	7	8,90	-1,90	3,63	0,41
						<sup>2</sup> $\chi$ calculado	6,50
						<sup>2</sup> $\chi$ Tabelado	7,81

**Anexo 8.** Avaliação da mortalidade de adultos de *H. betulinus* coletados a campo em fevereiro de 2007 (12 meses após a última aplicação) para verificação da mortalidade por *B. bassiana*.

		<i>tratamentos</i>	<i>Obs.</i>	<i>Esp.</i>	<i>d</i>	<i>d</i> <sup>2</sup>	<i>d</i> <sup>2</sup> / <i>esp.</i>
<b>Grupo B</b>	contaminados	TI	0	1,25	-1,25	1,56	1,25
		TII	1	1,25	-0,25	0,06	0,05
		TIII	2	0,69	1,31	1,72	2,51
		TIV	1	0,81	0,19	0,04	0,04
	não contaminados	TI	20	18,75	1,25	1,56	0,08
		TII	19	18,75	0,25	0,06	0,00
		TIII	9	10,31	-1,31	1,72	0,17
		TIV	12	12,19	-0,19	0,04	0,00
					<sup>2</sup> $\chi$ calculado	4,11	
					<sup>2</sup> $\chi$ Tabelado	7,81	



**Anexo 9.** Número de machos e fêmeas de *H. betulinus* registrados no tratamento TII (catação), em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

<b>Meses</b>	<b>Sexo</b>	<b>Contagens</b>		<b>Total</b>	<b>Média</b>
		<b>1<sup>a</sup></b>	<b>2<sup>a</sup></b>		
Nov/04	♂	31,0	35,0	66,0	33,0
	♀	10,0	12,0	22,0	11,0
Dez/04	♂	75,0	79,0	154,0	77,0
	♀	17,0	21,0	38,0	19,0
Jan/05	♂	263,0	-	263,0	131,5
	♀	91,0	-	91,0	45,5
Fev/05	♂	146,0	99,0	245,0	122,5
	♀	80,0	65,0	145,0	72,5
Mar/05	♂	92,0	85,0	177,0	88,5
	♀	62,0	82,0	144,0	72,0
Abr/05	♂	23,0	13,0	36,0	18,0
	♀	30,0	25,0	55,0	27,5
Mai/05	♂	16,0	-	16,0	-
	♀	18,0	-	18,0	-
Jun/05	♂	12,0	-	12,0	-
	♀	6,0	-	6,0	-
Jul/05	♂	6,0	-	6,0	-
	♀	4,0	-	4,0	-
Set/05	♂	6,0	-	6,0	-
	♀	0,0	-	0,0	-
Out/05	♂	6,0	-	6,0	-
	♀	2,0	-	2,0	-
Nov/05	♂	8,0	25,0	33,0	16,5
	♀	1,0	7,0	8,0	4,0
Dez/05	♂	35,0	60,0	95,0	47,5
	♀	4,0	12,0	16,0	8,0
Jan/06	♂	37,0	25,0	62,0	31,0
	♀	13,0	10,0	23,0	11,5
Fev/06	♂	27,0	16,0	43,0	21,5
	♀	11,0	11,0	22,0	11,0

Continua...

**Anexo 9. (continuação)**

<b>Meses</b>	<b>Sexo</b>	<b>Contagens</b>		<b>Total</b>	<b>Média</b>
		<b>1ª</b>	<b>2ª</b>		
Mar/06	♂	16,0	10,0	26,0	13,0
	♀	11,0	13,0	24,0	12,0
Abr/06	♂	6,0	8,0	14,0	7,0
	♀	12,0	17,0	29,0	14,5
Mai/06	♂	5,0	-	5,0	-
	♀	7,0	-	7,0	-
Jun/05	♂	5,0	-	5,0	-
	♀	6,0	-	6,0	-
Jul/06	♂	5,0	-	5,0	-
	♀	2,0	-	2,0	-
Ago/06	♂	4,0	-	4,0	-
	♀	2,0	-	2,0	-
Set/06	♂	3,0	-	3,0	-
	♀	0,0	-	0,0	-
Out/06	♂	3,0	-	3,0	-
	♀	0,0	-	0,0	-
Nov/06	♂	3,0	4,0	7,0	3,5
	♀	2,0	2,0	4,0	2,0
Dez/06	♂	11,0	9,0	20,0	10,0
	♀	3,0	4,0	7,0	3,5
Jan/07	♂	17,0	11,0	28,0	14,0
	♀	7,0	5,0	12,0	6,0
Fev/07	♂	10,0	9,0	19,0	9,5
	♀	9,0	8,0	17,0	8,5
Mar/07	♂	9,0	8,0	17,0	8,5
	♀	6,0	7,0	13,0	6,5
Abr/07	♂	3,0	2,0	5,0	2,5
	♀	8,0	5,0	13,0	6,5
<b>TOTAL</b>	♂			<b>1.381</b>	
	♀			<b>730</b>	
	<b>TOTAL</b>			<b>2.111</b>	

(-) = não houve coleta nesta data

**Anexo 10.** Distribuição espacial de adultos de *H. betulinus* nas parcelas A, B, C e D (cada uma representando 50 árvores), dos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em 2005, 2006 e 2007, em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

**Ano 2005**

<b>Parcela</b>	<b>TI</b>	<b>TII</b>	<b>TIII</b>	<b>TIV</b>
A	23	24	18	12
B	22	26	16	13
C	24	25	17	17
D	23	26	17	15
<b>TOTAL</b>	<b>92</b>	<b>101</b>	<b>58</b>	<b>47</b>

**Ano 2006**

<b>Parcela</b>	<b>TI</b>	<b>TII</b>	<b>TIII</b>	<b>TIV</b>
A	11	5	3	2
B	11	1	1	1
C	9	3	2	3
D	8	2	3	1
<b>TOTAL</b>	<b>39</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>7</b>

**Ano 2007**

<b>Parcela</b>	<b>TI</b>	<b>TII</b>	<b>TIII</b>	<b>TIV</b>
A	2	2	1	3
B	3	2	0	0
C	3	0	0	2
D	4	1	3	1
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	

**Anexo 11.** Anova relativa a distribuição espacial de adultos de *H. betulinus* nos blocos (tratamentos) TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em 2005, 2006 e 2007 em um povoamento de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F.</b>
Blocos	3	5.22917	1.74306	1.0849 ns
Fator 1 (F1)	3	280.72917	93.57639	58.2417 **
Fator 2 (F2)	2	3118.87500	1559.43750	970.5890 **
Int. F1XF2	6	213.95833	35.65972	22.1945 **
Resíduo	33	53.02083	1.60669	
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>3671.81250</b>		

Fator 1 = tratamento Fator 2 = ano

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL: 3, 33 F-krit(5%) = 2.8916 F = 1.0849  $p > .10000$

GL: 3, 33 F-krit(1%) = 4.4368 F = 58.2417  $p < .00100$

GL: 2, 33 F-krit(1%) = 5.312 F = 970.589  $p < .00100$

GL: 6, 33 F-krit(1%) = 3.4059 F = 22.1945  $p < .00100$

**Anexo 12.** Representação das médias relativas a distribuição espacial de adultos de *H. betulinus* nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações) e TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em 2005, 2006 e 2007 em um povoamento de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

	<b>Médias dos tratamentos (bloco)</b>	<b>Médias do fator 1</b>	<b>Médias do fator 2</b>	<b>Médias Fator 1 x Fator 2</b>		
				<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
TI	8.83333 a	11.91667 a	19.87500 a	23.0000 aA	9.7500 aB	3.0000 aC
TII	8.00000 a	9.75000 b	4.12500 b	25.2500 aA	2.7500 bB	1.2500 aB
TIII	8.75000 a	6.75000 c	1.68750 c	17.0000 bA	2.2500 bB	1.0000 aB
TIV	8.66667 a	5.83333 c		14.2500 cA	1.7500 bB	1.5000 aB
	<b>DMSB = 1.39845</b>	<b>DMS1 = 1.39845</b>	<b>DMS2 = 1.09816</b>	<b>DMS para colunas* = 2.4222</b>		
				<b>DMS para linhas** = 2.1963</b>		
		<b>MG = 8.56250</b>		<b>CV% = 14.80354</b>		

Fator 1 = tratamento Fator 2 = ano

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade \* colunas = letras minúsculas \*\* linhas = letras maiúsculas

Quando o F fica muito próximo, mas não atinge a significância poderá haver diferença significativa entre a maior e a menor média. Também poderá não haver diferença significativa entre médias quando o F é significativo, porém muito próximo da não significância. Isso é limitação da aplicação conjunta dos testes F e de Tukey

**Anexo 13.** Distribuição espacial dos danos de *H. betulinus* nas parcelas A, B, C e D (cada uma representando 50 árvores), dos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações) e TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em 2006 e 2007, em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

**Ano 2006**

<b>Parcelas</b>	<b>TI</b>	<b>TII</b>	<b>TIII</b>	<b>TIV</b>
<b>A</b>	39	31	17	20
<b>B</b>	38	32	20	24
<b>C</b>	38	29	17	23
<b>D</b>	41	30	19	22
<b>TOTAL</b>	156	122	73	89

**Ano 2007**

<b>Parcelas</b>	<b>TI</b>	<b>TII</b>	<b>TIII</b>	<b>TIV</b>
<b>A</b>	24	15	12	13
<b>B</b>	30	20	10	16
<b>C</b>	29	22	11	11
<b>D</b>	34	17	11	12
<b>TOTAL</b>	117	74	44	52

**Anexo 14.** Anova relativa a distribuição espacial dos danos causados por *H. betulinus* nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações anuais de *B. bassiana*), TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em um povoamento puro de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F.</b>
Blocos	3	25.59375	8.53125	1.8535 ns
Fator 1 (F1)	3	1797.84375	599.28125	130.2027 **
Fator 2 (F2)	1	731.53125	731.53125	158.9360 **
Int. F1XF2	3	22.84375	7.61458	1.6544 ns
Resíduo	21	96.65625	4.60268	
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>2674.46875</b>		

Fator 1 = tratamento      Fator 2 = ano

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ );      \* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 = < p < .05$ )  
 ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL: 3, 21    F-krit(5%) = 3.0725    F = 1.8535     $p > .10000$

GL: 3, 21    F-krit(1%) = 4.874    F = 130.2027     $p < .00100$

GL: 1, 21    F-krit(1%) = 8.0166    F = 158.936     $p < .00100$

GL: 3, 21    F-krit(5%) = 3.0725    F = 1.6544     $p > .10000$

**Anexo 15.** Representação das médias relativas a distribuição espacial dos danos causados por adultos de *H. betulinus* nos tratamentos TI (testemunha), TII (catação), TIII (duas aplicações) e TIV (três aplicações anuais de *B. bassiana*), em um povoamento de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

	<b>Médias de bloco</b>	<b>Médias do fator 1</b>	<b>Médias do fator 2</b>	<b>Médias Fator 1 x Fator 2</b>	
				<b>1</b>	<b>2</b>
TI	21.37500 a	34.12500 a	27.50000 a	39.0000	29.2500
TII	23.75000 a	24.50000 b	17.93750 b	30.5000	18.5000
TIII	22.50000 a	14.62500 d		18.2500	11.0000
TIV	23.25000 a	17.62500 c		22.2500	13.0000
	<b>DMSB = 2.99069</b>	<b>DMS1 = 2.99069</b>	<b>DMS2 = 1.57763</b>		
	<b>MG = 22.71875</b>			<b>CV% = 9.44324</b>	

fator 1 = tratamento      fator 2 = ano

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Não foi aplicado o teste de comparação de médias por que o F de interação não foi significativo

**Anexo 16.** Anova referente ao número total de colônias de *B. bassiana* isoladas do solo para a testemunha (TI); duas e três aplicações anuais (TIII e TIV, respectivamente) em um povoamento de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC. Dados transformados para log (x+2).

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F.</b>
Fator 1 (F1)	11	8.83682	0.80335	227.2345 **
Fator 2 (F2)	2	3.82667	1.91334	541.2059 **
Int. F1XF2	22	4.53203	0.20600	58.2694 **
Resíduo	288	1.01817	0.00354	
<b>Total</b>	<b>323</b>	<b>18.21369</b>		

Fator 1 = coleta Fator 2 = aplicação

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL: 11, 288 F-krit(1%) = 2.3097 F = 227.2345  $p < .00100$

GL: 2, 288 F-krit(1%) = 4.6796 F = 541.2059  $p < .00100$

GL: 22, 288 F-krit(1%) = 1.8963 F = 58.2695  $p < .00100$

**Anexo 17.** Representação das médias relativas ao número total de colônias de *B. bassiana* isoladas do solo para a testemunha (TI) duas e três aplicações anuais (TIII e TIV, respectivamente), em um povoamento de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

	Médias do fator 1	Médias do fator 2	Médias Fator 1 x Fator 2		
			1	2	3
1	0.30100 e	0.30100 b	0.3010 aA	0.3010 eA	0.3010 dA
2	0.73411 a	0.52205 a	0.3010 aB	0.9733 aA	0.9281 aA
3	0.69497 a	0.53998 a	0.3010 aB	0.8846 aA	0.8993 aA
4	0.62076 b		0.3010 aC	0.7133 bB	0.8480 aA
5	0.60661 b		0.3010 aB	0.7698 bA	0.7491 bA
6	0.52412 c		0.3010 aB	0.6047 cA	0.6667 bA
7	0.44598 d		0.3010 aB	0.4935 dA	0.5434 cA
8	0.31404 e		0.3010 aA	0.3010 eA	0.3401 dA
9	0.30100 e		0.3010 aA	0.3010 eA	0.3010 dA
10	0.30752 e		0.3010 aA	0.3206 eA	0.3010 dA
11	0.30100 e		0.3010 aA	0.3010 eA	0.3010 dA
12	0.30100 e		0.3010 aA	0.3010 eA	0.3010 dA
	<b>DMS1 = 0.05321</b>	<b>DMS2 = 0.01903</b>	<b>DMS para colunas = 0.0922 DMS para linhas = 0.0659</b>		
	MG = 0.45434		CV% = 13.08669		

Fator 1 = coleta Fator 2 = aplicação \* colunas = letras minúsculas \*\* linhas = letras maiúsculas  
As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**Anexo 18.** Correlação do número de colônias de *B. bassiana* com os fatores abióticos temperatura média, umidade relativa (UR%) e precipitação (mm) nos tratamentos com duas e três aplicações anuais (TIII e TIV, respectivamente), em um povoamento de erva-mate, *I. paraguariensis*, no município de Campo Alegre – SC.

<b>Correlação</b>			
Tratamentos	Temperatura	UR%	Precipitação
<b>TIII</b>	0,696715865	0,341415612	0,439395861
<b>TIV</b>	0,740485419	0,250528449	0,443071429