**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e
Beauveria bassiana para o controle de pragas dos citros**

Marcos Roberto Conceschi

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2013**

Marcos Roberto Conceschi
Engenheiro Agrônomo

**Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana*
para o controle de pragas de citros**

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Conceschi, Marcos Roberto

Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana*
para o controle de pragas dos citros / Marcos Roberto Conceschi. - - Piracicaba, 2013.
104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Citricultura 2. Pragas 3. Controle microbiano 4. Fungos entomopatogênicos
I. Título

CDD 634.3
C215p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus,

AGRADEÇO

Aos meus pais João e Cleonice

À minha namorada Glaucia

Pelo apoio e incentivo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos em todas as etapas de minha vida.

À minha família pelo apoio que me faz a buscar meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Italo Delalibera Jr., pela orientação, atenção e confiança.

A Dra. Celeste Paola D' Alessandro pela orientação e amizade.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial aos professores e funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Dr. Everaldo Batista Alves e Ms. Odimar Zanuzo Zanardi pelo auxílio com a criação dos ácaros.

À Prof^a. Dra. Clarice Garcia Borges Demétrio e a Rafael Moral, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr Odair Aparecido Fernandes e Fernando Sujimoto pela ajuda na identificação das espécies de formigas.

Aos amigos e colegas do curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial a toda equipe do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, pelo apoio e convivência.

Aos amigos de república, Giovani Coura, Luiz Henrique Costa Mota, Vitor Beloti, pelos almoços e momentos de descontração.

Ao meu ex-orientador Prof. Dr Fábio Mazzonetto pelo incentivo e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Citros no Brasil	15
1.2 Características gerais das pragas de citros estudadas	16
1.2.1 <i>Diaphorina citri</i>	16
1.2.2 <i>Toxoptera citricida</i>	17
1.2.3 <i>Praelongorthezia praelonga</i>	18
1.2.4 <i>Aleurocanthus woglumi</i>	19
1.2.5 <i>Brevipalpus phoenicis</i>	20
1.2.6 <i>Panonychus citri</i>	21
1.3 Controle	22
1.3.1 Controle químico	22
1.3.2 Controle biológico	24
1.3.2.1 Parasitoides	25
1.3.2.2 Predador.....	26
1.3.2.3 Fungos entomopatogênicos	27
1.4 Objetivos.....	32
Referências	33
2 PATOGENICIDADE DOS FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS <i>Isaria fumosorosea</i> e <i>Beauveria bassiana</i> ASSOCIADOS COM ADJUVANTES PARA O CONTROLE DE PRAGAS DE CITROS.....	47
Resumo	47
Abstract.....	47
2.1 Introdução.....	48
2.2 Material e métodos	49
2.2.1 Criação de <i>Diaphorina citri</i>	49
2.2.2 Criação de <i>Toxoptera citricida</i>	50
2.2.3 Criação de <i>Brevipalpus phoenicis</i> e <i>Panonychus citri</i>	51
2.2.4 Coleta de <i>Aleurocanthus woglumi</i> e <i>Praelongorthezia praelonga</i>	52
2.2.5 Cultivo <i>in vitro</i> dos fungos entomopatogênicos e preparo das suspensões.....	53
2.2.6 Testes de patogenicidade	54

2.2.6.1 Testes de patogenicidade a <i>Diaphorina citri</i> , <i>Toxoptera citricida</i> e <i>Praelongorthezia praelonga</i>	54
2.2.6.1.1 Preparo do material e das plantas.....	54
2.2.6.1.2 Transferência dos insetos.....	55
2.2.6.1.3 Pulverização	55
2.2.6.1.4 Avaliação da mortalidade.....	56
2.2.6.2 Teste de patogenicidade a <i>Brevipalpus phoenicis</i> e <i>Panonychus citri</i>	57
2.2.6.3 Teste de patogenicidade a <i>Aleurocanthus woglumi</i>	58
2.2.7 Quantificação da esporulação	59
2.2.8 Análises estatísticas.....	59
2.3 Resultados e discussão	60
2.3.1 Patogenicidade de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 e <i>Beauveria bassiana</i> ESALQ-PL63 a pragas de citros	60
2.3.1.1 Patogenicidade a ninfas e adultos de <i>Diaphorina citri</i>	60
2.3.1.2 Patogenicidade a ninfas e adultos de <i>Toxoptera citricida</i>	64
2.3.1.3 Patogenicidade a ninfas e adultos de <i>Aleurocanthus woglumi</i>	67
2.3.1.4 Patogenicidade a ninfas e adultos de <i>Praelongorthezia praelonga</i>	70
2.3.1.5 Patogenicidade a adultos de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	72
2.3.1.6 Patogenicidade a adultos de <i>Panonychus citri</i>	74
2.3.2 Esporulação em cadáveres	75
2.3.3 Considerações	78
2.4 Conclusões	79
Referências.....	79
3 TRANSMISSÃO HORIZONTAL DE <i>Isaria fumosorosea</i> E <i>Beauveria bassiana</i> DE CADÁVERES ESPORULADOS DE <i>Diaphorina citri</i> E <i>Toxoptera citricida</i> PARA ADULTOS DE <i>Diaphorina citri</i> EM LABORATÓRIO E SEMI-CAMPO	85
Resumo	85
Abstract.....	85
3.1 Introdução	86
3.2 Material e métodos.....	89
3.2.1 Obtenção de cadáveres esporulados de <i>Diaphorina citri</i> e <i>Toxoptera citricida</i>	89
3.2.2 Teste de transmissão horizontal em laboratório.....	89
3.2.3 Teste de transmissão horizontal em semi-campo.....	90
3.2.4 Análises estatísticas	91

3.3 Resultados e discussão	92
3.3.1 Transmissão horizontal em laboratório	92
3.3.1.1 Transmissão horizontal intra-específica (<i>D citri</i> → <i>D. citri</i>) em laboratório	92
3.3.1.2 Transmissão horizontal inter-específica (<i>T. citricida</i> → <i>D. citri</i>) em laboratório	94
3.3.2 Transmissão horizontal em semi-campo	95
3.3.2.1 Transmissão horizontal intra-específica (<i>D citri</i> → <i>D. citri</i>) em semi-campo	95
3.3.2.2 Transmissão horizontal inter-específica (<i>T. citricida</i> → <i>D. citri</i>) em semi-campo	99
3.4 Conclusões	101
Referências	101

RESUMO

Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* E *Beauveria bassiana* para o controle de pragas de citros

A cultura dos citros é considerada de muita importância para a economia brasileira. Atualmente, o inseto *Diaphorina citri* tem sido considerado como o principal problema dessa cultura, por ser vetor da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (α -Proteobacteria) causadora da doença conhecida como *Greening*. Além de *D. citri*, a cultura dos citros apresenta inúmeras espécies de insetos e ácaros pragas que reduzem a qualidade e a produção dos frutos e requerem medidas de controle. O controle das espécies pragas tem sido realizado quase exclusivamente por aplicações frequentes de pesticidas químicos. Recentemente, isolados dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* foram selecionados para o controle de *D. citri*. Nesse estudo investigou-se a patogenicidade destes isolados associados a adjuvantes no controle de ninfas e adultos dos insetos *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida*, *Aleurocanthus woglumi*, *Praelongorthezia praelonga* e adultos dos ácaros *Brevipalpus phoenicis* e *Panonychus citri* em condições de laboratório. Notou-se que os fungos estudados foram patogênicos para quase todas as espécies de pragas, com a execução do fungo *B. bassiana* para ninfas e adultos de *P. praelonga*. As maiores mortalidade provocadas pelos fungos entomopatogênicos foram obtidas para ninfas e adultos de *D. citri* (>86% e 55,7%, respectivamente) e *T. citricida* (>90% e 90,8%, respectivamente), onde também foi encontrado o maior nível de esporulação por indivíduo. Essas duas espécies pragas foram selecionadas para os ensaios de transmissão horizontal, onde foi avaliada a transferência de conídios dos fungos entomopatogênicos entre indivíduos esporulados e não infectados. Nos experimentos de laboratório foi observado que *I. fumosorosea* e *B. bassiana* apresentaram transmissão horizontal entre cadáveres e adultos não infectados de *D. citri* (intra-específica) e adultos de *T. citricida* para *D. citri* (inter-específica). Os mesmos resultados foram obtidos nos experimentos em semi-campo com adultos de *D. citri*. Podemos concluir que os fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* e *B. bassiana* apresentam potencial como agentes de controle de *D. citri*, *T. citricida*, *A. woglumi*, *B. phoenicis*, *P. citri*. A transmissão horizontal dos fungos a partir de *T. citricida* e *D. citri* infectados para adultos sadios de *D. citri* pode contribuir para o controle desta praga em campo.

Palavras-chave: Citricultura; Pragas; Controle microbiano; Fungos entomopatogênicos

ABSTRACT

Potential of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* AND *Isaria fumosorosea* for the control of citrus pest

The citrus crops are considered of great importance to the Brazilian economy. Currently, the insect *Diaphorina citri* is considered as the major pest of this crop, as a vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (α - Proteobacteria) causing the disease known as *Greening*. Besides *D. citri*, the orange crop has numerous species of insect and mites pests that reduce the quality and yield of fruits and require control. The control of pest species is carried out almost exclusively by frequent applications of chemical pesticides. Recently, isolates of the entomopathogenic fungi *Isaria fumosorosea* and *Beauveria bassiana* were selected for the control of *D. citri*. This study investigated the pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* associated adjuvants on nymphs and adults of the insects *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida*, *Aleurocanthus woglumi*, *Praelongorthezia praelonga* and adult mites and *B. phoenicis*, *Panonychus citri* in laboratory conditions. The fungi studied were pathogenic to almost all pests species, with exception of the fungus *B. bassiana* against nymphs and adults of *P. praelonga*. The highest mortality caused by the entomopathogenic fungi were obtained for nymphs and adults of *D. citri* (> 86% and 55.7%, respectively) and *T. citricida* (> 90% and 90.8%, respectively), where we also found the highest level of sporulation per individual. These two pest species were selected to test horizontal transmission, which evaluated the transmission of disease between sporulated and healthy individuals. In the laboratory experiments, we observed that *I. fumosorosea* and *B. bassiana* showed horizontal transmission between cadavers and healthy adults of *D. citri* (intraspecific) and adults of *T. citricida* to *D. citri* (interspecific). Similar results were obtained in experiments in semi-field conditions with adults of *D. citri*. The results show that the potential of the entomopathogenic fungi *I. fumosorosea* and *B. bassiana* to control *D. citri*, *T. citricida*, *A. woglumi*, *B. phoenicis*, *P. citri*. Horizontal transmission of the disease from infected *T. citricida* and *D. citri* to health adults of *D. citri* may improve the control of *D. citri* in fields.

Keywords: Citrus crop; Pests; Microbial control; Entomopathogenic fungi

1 INTRODUÇÃO

1.1 Citros no Brasil

A importância da cultura dos citros para o estado de São Paulo pode ser demonstrada pelos dados econômicos. A região do cinturão Citrícola (São Paulo mais o Triângulo Mineiro) produz 80% da laranja do Brasil (FNP, 2013). Os setores de produção e industrialização da laranja são responsáveis por mais de US\$ 2 bilhões oriundos do mercado interno e externo, gerando cerca de 230 mil empregos, e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões (NEVES; KALAK; TROMBIN, 2010).

De acordo com FNP (2013) a safra de citros 2012/2013 apresentou uma redução de aproximadamente 8,9% na produção em relação à safra 2011/2012, obtendo 390 milhões de caixas em comparação com 428 milhões de caixas do ano anterior. Segundo Mendes, consultor do Agrianual, parte da redução tem sido provocada pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (α -Proteobacteria), causadora da doença intitulada “*Greening* dos citros” ou Huanglongbing (HLB), e transmitida pelo inseto vetor, *Diaphorina citri*.

Nos últimos oito anos, o *Greening* infectou mais da metade dos citros da Flórida e, entre 2006 e 2011, custou aos Estados Unidos da América 4,54 bilhões de dólares e mais de 8.200 empregos (KUCHMENT, 2013). No Brasil, um levantamento realizado pelo Fundecitrus em setembro de 2011 constatou que o *Greening* se encontrava presente em 53,3% dos talhões no estado de São Paulo, com 3,8% das plantas atacadas. No ano anterior, julho de 2010, a doença estava presente em 1,8% das plantas e em 38,8% dos talhões, mostrando a velocidade na disseminação dessa doença (FUNDECITRUS, 2013). A estratégia de controle utilizada até o presente momento vem elevando muito o custo de produção, principalmente com as despesas na compra de inseticidas para controle do inseto vetor (FNP, 2013).

O *Greening* é considerado a doença mais problemática no momento, no entanto, a cultura dos citros apresenta várias espécies de pragas e doenças com importância econômica (USP/PENSA, 2004). Com destaque ao ácaro-da-leprose (*Brevipalpus phoenicis*), ácaro da ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*), ácaro púrpuro (*Panonychus citri*), cochonilha ortézia (*Praelongorthezia praelonga*), pulgão preto (*Toxoptera citricida*), mosca negra dos citros (*Aleurocanthus woglumi*), moscas das frutas, entre outras espécies (GRAVENA, 2005). Nesse contexto, novas alternativas devem ser estudadas com finalidade de reduzir o custo da produção para a cultura dos citros.

1.2 Características gerais das pragas de citros estudadas

1.2.1 *Diaphorina citri*

Diaphorina citri Kuwayama (1907) (Hemiptera: Liviidae) é uma das pragas mais problemáticas para citricultura mundial, por ser vetor da bactéria causadora do *Greening*. Essa praga está amplamente disseminada pelas regiões tropicais e subtropicais Asiáticas, Afeganistão, Arábia Saudita, Argentina, Brasil, China, Cuba, Flórida, Jamaica, Honduras, Hong Kong, Ilhas Maurício, Índia, Indonésia, Ilhas Reunião, Ilhas Caimã, Malásia, México, Myanmar, Nepal, Paquistão, Porto Rico, República Dominicana, Sri Lanka, Tailândia, Venezuela (ABDULLAH et al., 2009, PADULLA, 2007; HALBERT; NUÑEZ, 2004; CERMELIN et al., 2000; REGMI; LAMA, 1988; WOOLER et al., 1974; COSTA LIMA, 1942).

O primeiro relato de *D. citri* no Brasil foi realizado por Costa Lima em 1942, entretanto, o primeiro relato da doença *Greening* no Brasil, foi feito em março de 2004, no município de Araraquara, Estado de São Paulo, sendo diagnosticada a bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Posteriormente, houve o descobrimento da nova espécie, até então desconhecida, *Candidatus Liberibacter americanus* (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). Essa doença nos anos de 2004 a 2006 promoveu a erradicação de mais de 600 mil árvores nos pomares do Estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2006). O mesmo vem ocorrendo na Flórida e Califórnia nos Estados Unidos, onde autores tem relatado que essas bactérias têm devastado as plantações de citros na região (KUCHMENT, 2013).

O desenvolvimento de *D. citri* ocorre preferencialmente em plantas da família Rutaceae (PARRA et al., 2010). As fêmeas põem os ovos em brotações jovens com no máximo 2 cm de tamanho, sendo o número de ovos variável dependendo da temperatura, umidade e fotoperíodo. Uma fêmea põe uma média de 800 ovos em condições de temperatura de 28 ± 1 °C, umidade 75-80% e 13 h fotofase. Os ovos são de coloração amarelo alaranjado e medem cerca de 0,31 mm de altura e 0,14 mm de largura. As ninfas passam por 5 ínstaes e geralmente se agregam nas folhas, ramos jovens e gema axilar onde se alimentam da seiva. Como consequência da alimentação, as ninfas liberam uma secreção açucarada *honeydew* que favorece o crescimento de fungos oportunistas como *Capnodium* sp. (nome popular fumagina) que reduz a taxa fotossintética e afeta a produtividade dos citros (TSAI; LIU, 2000). Os adultos recém-emergidos se concentram na parte abaxial da folha e, quando atingem a maturidade e reprodutividade, apresentam um comportamento dispersivo, saltando e voando em pequenos toques (PADULLA, 2009).

Em levantamentos da flutuação populacional de *D. citri* realizados por LEAL (2009) no município de Matão-SP, demonstraram que a população de adultos e ninfas se concentra da primavera ao verão, apresentando maior população de insetos em plantas jovens. Em condições de temperatura de 25-30 °C e umidade relativa próxima a 70%, este inseto pode causar danos diretos problemáticos, tais como deformações de folhas jovens, seca de brotações e presença de fumagina (AUBERT, 1987). Os sintomas causados pelas bactérias *Candidatus* incluem clorose foliar, queda de frutos, frutos disformes, pequenos, qualidade inferior dos frutos eventualmente a morte das árvores (BOVÉ, 2006).

1.2.2 *Toxoptera citricida*

O pulgão preto dos citros, *Toxoptera citricida*, foi descrito pela primeira vez por Kirkaldy (1907) (Hemiptera: Aphididae), é um inseto sugador e teve origem no Sudeste da Ásia (ROCHA-PEÑA et al., 1995). Atualmente é encontrado em toda a Ásia, incluindo China, Índia, Japão, Vietnã, Sumatra, Nepal, Sri Lanka, Malásia, Filipinas e Tailândia, além da Ilha do Pacífico, Austrália, Nova Zelândia, países da África, Itália, Espanha e Turquia (TOLEDO, 2006).

A introdução no Brasil ocorreu acidentalmente na década de 20, através da importação de materiais de propagação provenientes da Austrália e África do Sul (ROCHA- PEÑA et al., 1995). *T. citricida* apresenta hospedeiros restritos ao gênero *Citrus* e a maioria das Rutáceas, com preferência por brotações jovens como *D. citri*. Porém, foram observadas algumas exceções na Índia, alimentando-se de frutos de plantas *Rosaceas* (GHOSH; RAYCHAUDHURI, 1981).

O desenvolvimento dos pulgões varia de um local para outro. Em regiões tropicais e subtropicais ocorrem várias gerações anuais, de reprodução partenogenética, dando origem a fêmeas vivíparas aladas e ápteras (o desenvolvimento embrionário se processa dentro do corpo da fêmea, portanto, produz ninfas em lugar de ovos). Nas regiões temperadas, no final do outono e início do inverno, as fêmeas deixam de se reproduzir por partenogênese e ocorre a reprodução bissexuada, dando origem a machos e fêmeas ovíparas (BORROR; DELONG, 1970; ROQUIM, 1999). No Brasil os afídeos se reproduzem exclusivamente por partenogênese telítoca sem a necessidade do macho (GALLO et al., 2002). O tamanho do corpo de *T. citricida* varia de 1 a 2,4 mm de comprimento, passam por quatro estádios de ninfas, a fecundidade pode chegar 100 ninfas por fêmea, e cada ninfa pode iniciar a reprodução em 6 a 8 dias (GRAVENA, 2005; GALATOIRE, 1983). Em alguns casos pode produzir 30 gerações no ano, como acontece em regiões da Rodésia (SYMES, 1924).

Os danos diretos provocados por esses insetos são semelhantes aos descritos anteriormente para *D. citri* (item 2.2.1), onde provocam o atrofiamento e encarquilhamento das folhas e brotações, devido à sucção contínua de seiva, além de serem vetores de fitopatógenos (GRAVENA, 2005; GALLO et al., 2002). Durante a alimentação, os pulgões produzem o *honeydew*, onde dependendo da alta densidade populacional pode prejudicar a respiração e fotossíntese, de forma indireta pelo crescimento de fumagina (GRAVENA, 2005; GALLO et al., 2002). Além disso, é considerado uns dos principais transmissores do vírus CTV (*Citrus Tristeza Vírus*) (NG e FALK, 2006), que causou muitos prejuízos para citricultura brasileira na década de 1930-1940 (MÜLLER et al., 2002) e provocou a morte de mais de 16 milhões de plantas de citros no Brasil e na Argentina (GRAVENA, 2005).

Primiano (2005) verificou que *T. citricida* tem preferência pelo terço superior das árvores de citros. No Brasil, a população desse inseto é mais abundante durante a primavera devido à emissão de brotações jovens (GRAVENA, 2005). Isso foi relatado por Toledo et al. (2006), que observaram maiores infestações no período de setembro a dezembro, época que ocorreu as primeiras chuvas.

1.2.3 *Praelongorthezia praelonga*

A cochonilha ortézia, *Praelongorthezia praelonga* DOUGLAS (1891) (Hemiptera: Ortheziidae), chamada vulgarmente de “piolho branco”, é originária da região tropical americana, onde é constantemente referida como infestante de plantas silvestres e ornamentais (ROSAMIGLIA, 1998; MILLER et al., 2005). O primeiro registro dessa cochonilha no Brasil foi feito em 1900 no estado do Pará (NEVES et al., 2010), em seguida Pernambuco em 1938 (KOGAN, 1964). Desde 1954 foi considerada praga de importância econômica para a citricultura carioca, causando prejuízos da ordem de 50 a 90% na baixada fluminense (NASCIMENTO, 1980). A cochonilha chegou a São Paulo em 1978 no município de Severínia (GONÇALVES; CASSINO, 1978).

A cochonilha ortézia além do citros apresentam inúmeros hospedeiros alternativos, dentre eles estão os gêneros *Coleous* sp., *Acalupha* sp., *Hibiscus* sp., *Patchystachus* sp., *Croton* sp e *Bougainvillea* sp. (SUPLICY FILHO et al., 1983). *P. praelonga* encontra-se mais frequentemente nos galhos das árvores, concentrando-se na base dos galhos e outros lugares protegidos. Algumas espécies de *Orthezia* também habitam o solo, localizando-se no colo ou raízes das plantas de diversas espécies (SERMEÑO; NAVARRO, 2000).

As fêmeas maduras de *P. praelonga* apresentam o corpo levemente achatado, acinzentado, com 2 mm de comprimento e 1,25 mm de largura. Na parte posterior do

abdômen apresenta um ovissaco que mede cerca de 6 mm de comprimento formado por placas de ceras justapostas em formato de tubo, onde são alojados os ovos (GRAVENA, 2005). A fêmea pode armazenar até 100 ovos no interior do ovissaco, as ninfas que eclodem passam por quatro estádios até atingir a estágio adulto (GRAVENA, 2005). Neves (2004) descreve que esse inseto apresenta um período de vida entre 40 a 200 dias, durante esse período suga de maneira continua a seiva das plantas.

P. praelonga prejudica a planta de duas formas: direta e indireta. O dano direto consiste na sucção da seiva ou introdução de toxinas que provoca a desfolha. Dependendo da infestação da cochonilha pode provocar o enfraquecimento da árvore e queda dos frutos (MOLINA, 2007; GRAVENA, 2005). Os frutos que sobram, muitas vezes ficam sem sabor, com baixo teor de açúcar e ácido e, em casos mais graves, os frutos ficam muito pequenos e imprestáveis para o comércio (FUNDECITRUS, 2004). Os danos indiretos são causados pela fumagina, fungo o qual desenvolve sobre a secreção açucarada liberada pela cochonilha (MOLINA, 2007; GRAVENA, 2005).

A temperatura ótima de desenvolvimento de *P. praelonga* encontra-se próximo a 25 °C, porém sua incidência é mais intensa nos meses mais frios e secos do ano com menor precipitação pluviométrica e menor umidade relativa do ar (PRATES, 1987). No entanto, em algumas cidades da região Sudeste, a ocorrência dessa praga fugiu aos padrões habituais e se manifesta também na época de início das chuvas (FUNDECITRUS, 2003), época a qual ocorre a maior densidade populacional de *D. citri* e *T. citricida*. Resultados encontrados por Neves et al. (2010) mostram que algumas cidades do Estado de São Paulo com temperatura mais elevada (Bauru, Barretos, São José do Rio Preto e Bebedouro) apresentaram maior número de gerações, quando comparadas a cidades de clima mais ameno como Avaré, Araraquara, Itapetininga, etc.

1.2.4 *Aleurocanthus woglumi*

A mosca-negra dos citros, *Aleurocanthus woglumi* ASHBY (1915) (Hemiptera: Aleyrodidae), tem como centro de origem o Sudeste Asiáticos, e hoje se encontra amplamente disseminada nas Américas, África, Ásia e Oceania (OLIVEIRA et al., 2001). Foi relatada no Brasil primeiramente no estado do Pará, município de Belém em 2001 (MAIA et al., 2005; SILVA et al., 2011a). Após a descoberta, houve uma rápida dispersão para os polos produtivos do país, Maranhão (LEMOS et al., 2006), Amazonas (PENA; SILVA, 2007), São Paulo (PENA et al., 2008), Tocantins e Goiás (BRASIL, 2011).

A. woglumi é um inseto sugador, tanto os adultos quanto as ninfas se alimentam da seiva do floema de citros, podendo alimentar-se de mais de 300 espécies vegetais (OLIVEIRA et al., 1999). No Brasil a mosca negra tem como hospedeiro primário os citros, caju e abacate. Dentre as espécies cítricas, *A. woglumi* foram encontradas em laranja doce, tangerinas, limão, pomelo, limas ácidas tahiti e galego (CUNHA, 2003). As perdas de produção podem chegar até 80% (OLIVEIRA et al., 2001).

Os adultos de *A. woglumi* são pretos com tons cinza-azulados, as fêmeas geralmente maiores com 1,3 mm de comprimento e os machos com 0,9 mm (MAIA, 2006). Os ovos são depositados em espiral na face abaxial das folhas, em grupos de 35 a 50 ovos (HEU e NAGAMINE, 2001). Em média cada fêmea oviposita de 65 a 70 ovos (SILVA et al., 2011a), as ninfas passam por quatro instares, onde no último instar não se alimentam, e portanto, são denominadas de “pupário” (PENA, 2007).

Todas as fases imaturas de *A. woglumi* se encontram na parte abaxial da folha de citros, os adultos tem preferência por brotações jovens (SILVA et al., 2011b). Os danos diretos e indiretos provocados por *A. woglumi* se assemelham muito aos causados por *D. citri*, *T. citricida* e *P. praelonga* que são decorrentes da alimentação e da retirada de nutrientes da planta, e em algumas vezes pode levar até ao murchamento das folhas (SILVA et al., 2011a; PENNA, 2007; OLIVEIRA et al., 2001). Os danos indiretos iniciam a partir da secreção açucarada pelas ninfas ou adultos, meio onde desenvolve fungos saprofíticos que impede ou reduz a quantidade de luz que incide sobre os órgãos clorofilados da planta, reduzindo a capacidade de fotossíntese (CUNHA, 2003). Segundo Silva et al. (2011b) e Maia (2008) os maiores índices de infestação ocorreram no período da primavera e verão, podendo apresentar até 90% da área com infestação.

1.2.5 *Brevipalpus phoenicis*

O ácaro da leprose dos citros, *Brevipalpus phoenicis* GEIJSKES (1939) (Acari: Tenuipalpidae), é a principal espécie de ácaros praga na citricultura (GRAVENA, 2005). Esse ácaro foi descrito pela primeira vez na Holanda em 1939 por Geijskes, no entanto na Flórida em 1860 já tinham relatos da ocorrência da leprose. No Brasil o primeiro registro foi em 1933 (CZERMAINSKI, 2007), onde já se encontrava dispersos nos outros países das Américas, Ásia e África (CHILDERS et al., 2003).

Esse ácaro apresenta inúmeras plantas hospedeiras, sendo só no Brasil mais de 34 espécies (TRINDADE; CHIAVEGATO, 1994). Dentre as espécies, os citros (*C. sinensis*) e café (*Coffea arabica*) são as mais importantes. O adulto de *B. phoenicis* é um ácaro de corpo

vermelho-alaranjado, muito diminuto, medindo 0,28 mm de comprimento por 0,128 mm (GRAVENA, 2005).

Segundo Omoto et al. (2000) em citros são gastos cerca de 100 milhões de dólares por ano para o controle dos ácaros. Estimativas indicavam que mais de 53 % das plantas de citros do Estado de São Paulo apresentavam sintomas da doença transmitida pelo ácaro da leprose (BASSANEZI, 2004). *B. phoenicis* pode atacar as folhas, ramos e frutos, mas prefere se alimentar de frutos novos (GRAVENA, 2005). Os danos diretos causados por esse ácaro são decorrentes da alimentação, no entanto os sintomas são difíceis de serem observados (ROSSI-ZALAF, 2007). O principal dano é provocado indiretamente, devido ao fato de ser transmissor do vírus CiLV (*Citrus Leprosis Vírus*), que causa lesões esbranquiçadas e amareladas, com manchas marrons sobre o tecido vegetal. As folhas e frutos atacados caem, e os ramos com o passar do tempo acabam secando, diminuindo muito a produção (GRAVENA, 2005).

A ocorrência de *B. phoenicis* na cultura dos citros dá-se durante todo o ano; mas é nos meses secos, ou seja, baixa frequência e intensidade de chuva, que atingem os mais elevados níveis populacionais (YAMAMOTO, 2008). O decréscimo gradativo da população dá-se na medida em que a precipitação pluvial aumenta (OLIVEIRA, 1986). Isso também ocorre com demais espécies estudadas (REGMI; LAMA, 1988), isso se deve à eliminação de ovos e ninfas pela chuva. As maiores infestações na Bahia são encontradas na primavera e menores durante o inverno (SILVA et al., 2012).

1.2.6 *Panonychus citri*

O ácaro purpúreo ou vermelho, *Panonychus citri* (McGREGOR, 1916) (Acari: Tetranychidae), que vem se tornando problemático a plantações de citros. *P. citri* é encontrado em todos os países onde o citros é cultivado (MORAES; FLECHTMANN, 2008). No Brasil, o ácaro *P. citri* foi encontrado pela primeira vez em 1968 no estado de São Paulo colonizando limão siciliano, (*Citrus limon*) (PASCHOAL, 1970).

Esse ácaro ocorre quase que exclusivamente em citros (*Citrus* sp.) ou em outras rutáceas, porém já foi encontrado em *Melia azedarach* (MORAES; FLECHTMANN, 2008). O ácaro *P. citri* apresenta coloração avermelhada a púrpura com manchas escuras no dorso, medido 0,45 mm. A fecundidade pode chegar a 77 ovos por fêmea em plantas de *C. limon* (CHIAVEGATO, 1988). Moraes e Flechtmann (2008) descrevem que *P. citri* passa a ser uma praga séria principalmente quando agrotóxicos de amplo espectro são utilizados para controle

de outras pragas na cultura. Isso já tem sido relatado na China, onde tem apresentado alta resistência aos principais acaricidas e inseticidas aplicados (NIU et al., 2011; HU et al., 2010).

As folhas atacadas por *P. citri*, adquirem cor pálida ou esbranquiçada com pontuações mais claras na face superior, mas em infestações severas as manchas apresentam áreas necróticas e, eventualmente, as folhas podem cair e causar perda de vigor da planta. Também, *P. citri* promove o mosqueamento e prateamento dos frutos e encurvamento das folhas e brotos jovens provocando uma deformação da planta (VASCONCELOS, 2011; GRAVENA, 2005).

P. citri é um ácaro mais daninho em clima seco e quente, em plantas com “stress hídrico”. No entanto, as populações aumentam mais na primavera, final do verão e início do outono em resposta às novas brotações, pois eles preferem alimentar-se de folhas novas, completamente expandidas (recém-maduras), mas também podem infestar frutos e ramos verdes (MORAES; FLECHTMANN, 2008; GRAVENA, 2005).

1.3. Controle

O controle das espécies pragas dos citros tem sido realizado quase exclusivamente por químicos. No entanto, muitos países têm buscado implantar técnicas de manejo integrado utilizando medidas alternativas de controle, dentre elas se destaca o controle biológico realizado por parasitoide, predadores e por fungos entomopatogênicos.

1.3.1 Controle químico

O método de controle convencional para *D. citri*, *T. citricida*, *A. woglumi*, *P. praelonga*, *B. phoenicis* e *P. citri* é realizado basicamente por meio da aplicação de agroquímicos, geralmente utilizando inseticidas sistêmicos ou de contato (PADULLA, 2007). Os inseticidas e acaricidas registrados para o controle dessas pragas no Brasil estão apresentados na Tabela 1.

Os agroquímicos sistêmicos aplicados na forma de “drench” apresentam maior eficiência quando comparado com outros métodos, principalmente para pragas sugadoras de seiva (BRANDIMARTE, 2011). A eficácia desses produtos é maior devido seu longo período residual (meses), enquanto os de contato promovem proteção por período curto de tempo (semanas) (GRAFTON-CARDWELL et al., 2013). Yamamoto (2000) observou essa eficiência para controle de *T. citricida*, mostrando que todos os inseticidas testados foram promissores para o controle.

O uso de óleos minerais isoladamente, espalhantes adesivos, reguladores de crescimento, inibidores de síntese de lipídeos também têm promovido bons resultados no controle de ovos ou ninfas de *D. citri*, *T. citricida*, *A. woglumi*, *P. praelonga*, *B. phoenicis* e *P. citri* (BOINA et al., 2010; COCCO; HOY, 2008; GARCIA, 2004; RODRIGUES; CHILDERS, 2002). Alguns produtos botânicos formulados também têm sido estudados, destacando-se o Neem (WEATHERSBEE; MCKENZIE, 2005; TANG et al., 2002) e alguns óleos essenciais (MANN et al., 2012).

O nível populacional da praga, o período residual e a seletividade do produto aplicado são parâmetros importantes para determinar a frequência de aplicação e o impacto desses produtos sobre populações de inimigos naturais, como parasitóides, predadores e entomopatógenos (GRAFTON-CARDWELL et al., 2013; QURESHI e STANSLY, 2010). Com isso, a implantação de um programa de manejo integrado é de fundamental importância para o uso de agroquímicos seletivos ou compatíveis.

Tabela 1- Inseticidas e acaricidas registrados para o controle das espécies pragas estudadas segundo o AGROFIT (2013)

Grupos químicos	Ingredientes ativos	Pragas recomendadas
Antranilamida	Cloranthraniliprole	<i>A. woglumi</i> , <i>D. citri</i>
Benzoiluréia	Flufenoxurom	<i>B. phoenicis</i>
Bis-arifomamidina	Mitraz	<i>B. phoenicis</i>
Carbamato	Carbosulfano	<i>T. citricida</i>
Cetoenol	Espirodoclofeno	<i>B. phoenicis</i> , <i>P. citri</i>
Difenil axazolina	Etoxazol	<i>B. phoenicis</i>
Dinitrofenol	Dinocape	<i>B. phoenicis</i>
Éter difenilico	Etofenproxi	<i>D. citri</i> , <i>T. citricida</i>
Éter		
piridiloxipropólico	Piriproxi-fem	<i>D. citri</i> , <i>P. praelonga</i>
Neonicotinoide	Acetamipride	<i>T. citricida</i>
	Imidaclopride	<i>A. woglumi</i> , <i>D. citri</i> , <i>P. praelonga</i> , <i>T. citricida</i>
	Tiametoxam	<i>D. citri</i> , <i>P. praelonga</i> , <i>T. citricida</i>
Organoclorado	Dicofol	<i>A. woglumi</i> , <i>B. phoenicis</i> , <i>P. citri</i>
Orgaestânico	Azociclotina	<i>A. woglumi</i> , <i>B. phoenicis</i>
	Óxido de fembutatina	<i>A. woglumi</i> , <i>B. phoenicis</i> , <i>P. citri</i>
Organofosforado	Acefato	<i>P. praelonga</i>
	Clorpirifós	<i>D. citri</i> , <i>P. praelonga</i>
	Diazinona	<i>T. citricida</i>
	Dimetoato	<i>P. praelonga</i> , <i>T. citricida</i>
	Fosmete	<i>D. citri</i>
	Malationa	<i>D. citri</i>
	Metidationa	<i>P. praelonga</i> , <i>T. citricida</i>
Pirazol	Clorfenapir	<i>B. phoenicis</i>
	Fenpiroximato	<i>B. phoenicis</i>
Piridazinona	Piridabem	<i>B. phoenicis</i>
Piretróide	Acrinatrina	<i>B. phoenicis</i>
	Beta-ciflutrina	<i>P. praelonga</i>
	Bifentrina	<i>P. citri</i> , <i>P. praelonga</i>
	Deltametrina	<i>P. praelonga</i> , <i>T. citricida</i>
	Esfenvalerato	<i>D. citri</i> , <i>P. praelonga</i>
	Fenpropatrina	<i>B. phoenicis</i> , <i>P. praelonga</i> , <i>T. citricida</i>
	Lambda-cialotrina	<i>A. woglumi</i> , <i>D. citri</i> , <i>P. praelonga</i> , <i>T. citricida</i>
	Permetrina	<i>D. citri</i>

1.3.2 Controle biológico

O controle biológico natural das pragas de citros é realizado basicamente pelo uso de parasitóides, predadores e entomopatógenos.

1.3.2.1 Parasitoides

A fauna de insetos parasitoides no pomar cítrico é muito rica. Há parasitoides de pulgões, cochonilhas, lagartas minadoras, ovos de besouros de raiz, de cigarrinhas, do bicho furão, e muitas outras pragas (GRAVENA, 2005).

Existem algumas espécies que parasitam *D. citri*, como por exemplo, o ectoparasitoide *Tamarixia radiata* (WATERSTON, 1922) (Himenoptera: Eulophidae) e o endoparasitoide *Diaphorencyrtus aligarhensis* (SHAFEE; ALAN; ARGARWAL, 1975) (Himenoptera: Encyrtidae) que são considerados parasitoides primários de *D. citri* (GRAFTON-CARDWELL et al., 2013). *T. radiata* é considerada presumidamente superior a *D. aligarhensis* devido a sua alta taxa de parasitismo sobre as ninfas de *D. citri* e também pela capacidade de se estabelecer na área (SHELLY; HOY, 2004). O parasitismo de *T. radiata* sobre ninfas de *D. citri* foi estudada por Pluke et al. (2008) em Porto Rico, e as taxas de parasitismo encontradas ficaram entre 79% a 88% no outono. No Brasil, o parasitismo natural de ninfas de *D. citri* fica em torno de 25,7% no verão (PAIVA; PARRA, 2012). Outras espécies foram relatadas parasitando *D. citri*, no entanto, poucas delas são eficazes quando comparadas a *T. radiata* e *D. aligarhensis*.

Os principais parasitoides de *T. citricida* são: *Aphelinus gossypii*, *Aphelinus spiraecolae*, *Aphidus colemani*, *Aphidus matricariae*, *Aphidus brasiliensis*, *Lipolexis gracilis*, *Lipolexis scutellaris*, *Lysiphlebia japonica*, *Lysaphidus platensis*, *Lysiphlebus testaceipes*, *Trioxys indicus* (RODRIGUES, 2001; TANG et al., 1997). No Brasil, a principal espécie é *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphidiidae) (GRAVENA, 2005). Na Florida, Persad e Hoy (2003) encontraram que o parasitismo por *L. testaceipes* em condições de laboratório foi de 29 % para ninfas de terceiro instar de *T. citricida*.

Os parasitoides de *P. praelonga* são poucos, o único caso identificado é o descrito por Yamamoto e Parra (2005), o parasitóide *Cales noacki*. Esse parasitoide também tem sido frequentemente encontrado sobre ninfas de mosca negra dos citros *A. woglumi* no Brasil (MAIA, 2008).

O controle biológico de *A. woglumi* por parasitoides tem sido realizado utilizando as espécies, *Amitus hesperidum*, *Eretmocerus serius*, *Encarsia clypealis*, *E. opulenta* (OLIVEIRA et al., 1999; MEAGHER; FRENCH, 2004; WHITE et al., 2005). Na Índia, liberações do parasitoide *A. hesperidum* em pomares de citros proporcionou controle de 100% das ninfas de *A. woglumi* (WHITE et al., 2005). No Brasil, poucos são os estudos de parasitismo sobre *A. woglumi*.

Para os ácaros pragas, não são conhecidos nenhum parasito ou parasitoide, assim não existem relatos de insetos parasitoides de *B. phoenicis* e *P. citri* (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

1.3.2.2 Predadores

As espécies pragas de citros apresentam um grande número de predadores, onde se destacam as ordens Coleoptera, Diptera, Neuroptera, além de alguns aracnídeos (YAMAMOTO; PARRA; GRAVENA, 2005; MICHAUD, 2004; MICHAUD; RODRIGUES, 2001).

Os coleópteros que se destacam são: *Curinus coeruleus*, *Exochomus childreni*, *Harmonia axyridis*, *Olla v-nigrum*, *Cycloneda sanguínea*, *Coelophora inaequalis*, *Hippodamia convergens*, *Scymnus* spp. (YAMAMOTO; PARRA; GRAVENA, 2005). Algumas dessas espécies, entre elas *H. axyridis*, *C. sanguinea*, *O. v-nigrum*, *C. inaequalis* foram relatadas alimentando de ninfas ou adultos de *D. citri*, *T. citricida*, *P. praelonga* (RODRIGUES et al., 2010; YAMAMOTO; PARRA, 2005; MICHAUD, 1998). O coccinelídeo *Delphastus pusillus* é um importante controlador de *A. woglumi* no México, e pode provocar às vezes mortalidade de até 90% (SMITH; MALTBY, 1964). Os dípteros predadores mais encontrados são os sirfídeos, dentre eles as espécies *Allograpta obliqua* (MICHAUD, 2002), *Ocyptamus* sp., *Salpingogaster conopida* (RODRIGUES, 2001), *Allograpta* sp., *Ocyptamus gastrostactus*, *Pseudodorus clavatus*, *Toxomerus dispar* (YAMAMOTO; PARRA; GRAVENA, 2005).

As espécies de neuropteros encontrados são *Ceraeochrysa* sp., *C. everes*, *Chrysoperlla rufilabris*, *C. externa* (MICHAUD, 2004; GRAVENA, 2005), *Chrysopa boninensis*, *C. septempunctata* (YANG et al., 2006), *Chrysoperla* spp. (YAMAMOTO; PARRA; 2005).

Recentemente, ácaros predadores têm despertado ainda mais a atenção para controle de insetos. Juan-Blasco et al. (2012) observaram uma alta predação de ovos de *D. citri* pelo ácaro *Amblyseius swirskii*. Segundo os autores em oito semanas plantas contendo *A. swirskii* apresentaram 80% menos adultos do psilídeo do que plantas sem o ácaro. Os ácaros predadores são importantes agentes de controle de espécies pragas de citros, principalmente os que pertencem à família Phytoseiidae (MORAES; FLECHTMANN, 2008; GRAVENA, 2005). Os ácaros da família Phytoseiidae são ágeis e podem preda vários ácaros pragas dos citros, destacando os ácaros da leprose (*B. phoenicis*), o purpúreo (*P. citri*), o branco (*Polyphagotarsonemus latus*), entre outros. Dentre os Phytoseiidae mais importantes são os ácaros *Euseius citrifolius* e *Iphiseiodes zuluagai* que atua no controle de ninfas e adultos de *B.*

phoenicis e *P. citri* (GRAVENA, 2005). No Brasil, o ácaro *Euseius concordis*, *E. alatus* também foram relatados predando *B. phoenicis* (CARVALHO et al., 2008, SATO, 1994). Na Colômbia os ácaros *Amblyseius* sp. e *Phytoseiulus* spp são os mais importantes inimigos naturais de ácaros vetores dos citros (LEÓN, 2001).

No Japão, os ácaros Phytoseiidae foram encontrados suprimindo população de *P. citri*. Segundo Katawama et al. (2006) a espécie *Neoseiulus californicus* mantém a população de *P. citri* em níveis baixos. Xiao e Fadamiro (2010) avaliaram a predação de *Phytoseiulus persimilis*, *Galendromus occidentalis*, *N. californicus* sobre ninfas e ovos de *P. citri*, e verificaram que as três espécies foram eficazes no controle. O predador *Chrysoperla sinica* também é considerado um dos mais efetivos predadores de *P. citri* na China (PENG, 1985). A predação do ácaro *P. citri* foram avaliadas utilizando o coccinelídeo *Stethorus* sp e o ácaro *Agistemus longisetus*, segundo Jamieson et al. (2008) a combinação desses dois predadores foi mais eficaz do que a predação individual.

1.3.2.3 Fungos entomopatogênicos

Dentre os inimigos naturais, os fungos entomopatogênicos são considerados um dos mais importantes, porque são capazes de infectar um amplo número de insetos pragas e manter a população de pragas em equilíbrio através de epizootias no campo. Além disso, apresentam um grande número de espécies e isolados com ampla variabilidade genética, os quais podem atuar sobre artrópodes, destacando, insetos e ácaros (ALVES; BOUCIAS; PENDLAND, 1998).

Entre os fungos entomopatogênicos são conhecidas mais de 700 espécies (BLACKWEEL, 2010). A maioria das espécies de fungos entomopatogênicos são divididas nos filos, filo Ascomycota (ordem Hypocreales) e filo Entomophthoromycota (BLACKWEEL, 2010; ALVES, 1998). Esses fungos apresentam as formas sexuais (teleomórfica) e/ou assexuada (anamórfica) (HESKETH et al., 2010). Os fungos Hypocreales anamórficos são considerados patógenos generalistas, pois infectam uma ampla gama de hospedeiros, às vezes podem apresentar seu estilo de vida patogênico ou saprofítico, enquanto os fungos Entomophthorales são específicos (BLACKWEEL, 2010; ALVES, 1998).

Os fungos do filo Ascomycota são caracterizados por hifas septadas que se diferenciam em células conidiogênicas, conidióforos ou fiálides e os conídios, que são estruturas de reprodução assexuada. As células conidiogênicas emergem do micélio aéreo e são responsáveis pela produção dos conídios. A dispersão dessas estruturas é de forma passivamente pelo vento, chuva ou hospedeiros alternativos. Dentro do Filo Ascomycota, a

ordem Hypocreales, se divide em três famílias de fungos entomopatogênicos: A família Cordycipitaceae que apresentam os gêneros de maior importância agrícola, tais como *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Simplicillium* (LIU; CAI, 2012; HUMBER, 2012); a família Clavicipitaceae onde se encontram os gêneros *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Aschersonia* e *Pochonia* e a família Ophicordycipitaceae com os gêneros mais importantes *Hirsutella* e *Syngliocladium* (HUMBER, 2012).

Os fungos do filo Entomophthoromycota são divididos em diversas classes, dentre elas, Basidiobolimyces, Neozygitomyces, Entomophthoromyces. Fungos deste filo são caracterizados por apresentar hifas não septadas, as quais são produzidas assexuadamente ou sexuadamente (ALVES, 1998). A reprodução sexuada ocorre através da formação de conídio primário, que germinam e penetram no inseto ou podem gerar conídios secundário e terciário. Dentro do inseto o fungo produz corpos hifais, e se as condições não são favoráveis, alguns podem produzir esporos de resistência. Os principais gêneros pertencentes ao filo Entomophthoromycota são: *Basidiobolus*, *Conidiobolus*, *Batkoa*, *Entomophthora*, *Zoophthora*; *Neozygites*, *Massospora*, *Pandora*, etc (GRYGANSKI et al., 2013; HUMBER et al., 2012).

Todos os fungos entomopatogênicos apresentam conídios (esporos) infectivos que germinam e penetram na cutícula de seu hospedeiro (HESKETH et al., 2010). O processo de infecção dos fungos entomopatogênicos é iniciado pelos conídios, produzidos assexuadamente, que em contato com a cutícula do hospedeiro suscetível se fixam por interação hidrofóbica (ALVES, 1998) (Figura 1). A adesão dos conídios depende da presença de enzimas (proteases, quitinases e esterases) que ocorrem na superfície dos conídios e que alteram a superfície do tegumento do inseto, favorecendo a germinação e a nutrição do fungo (ST. LEGER et al., 1986a, 1986b). Após a adesão, ocorre a germinação dos conídios na superfície do inseto, nesta fase o conídio forma um tubo germinativo que posteriormente se diferencia em apressório (SMALL; BIDOCHKA, 2005). A fase de penetração envolve um processo físico, onde há pressão mecânica da hifa terminal através do apressório e grampo de penetração; e um processo químico, referente à produção de enzimas hidrolíticas (proteases, quitinases e lipases) que degradam a cutícula do inseto (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). St. Leger et al. (1986 b) verificaram que as enzimas proteases, aminopeptidases, esterases e quitinases foram produzidas em grandes quantidades por *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (= *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*), *B. bassiana* e *Lecanicillium lecanii* quando crescidos em cutícula do gafanhoto *Schistocerca gregaria* (Forsk.). Vencida a barreira do tegumento, as hifas se diferenciam em estruturas denominadas blastósporos,

corpos hifais ou protoplastos que se propagam pela cavidade do corpo do hospedeiro (SMALL; BIDOCHKA, 2005; ALVES, 1998). Em alguns fungos entomopatogênicos, ocorre a liberação de toxinas (dextruxinas e citocalasinas) que provavelmente causam a paralisação e morte do inseto (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). Após a morte, as hifas crescem invadindo os diversos órgãos internos e o micélio emerge do corpo do hospedeiro produzindo esporos que poderão ser disseminados para infectar outros indivíduos (ALVES, 1998).

No mercado mundial existem varias espécies de fungos entomopatogênicos produzidos comercialmente para controle de pragas de importância econômica, entre as quais se destacam *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium longisporum*, *L. muscarium*, *Hirsutella thompsonii*, *Nomuraea rileyi*, *Aschersonia aleyrodidis*, *Sporothrix insectorum*, *Conidiobolus thromboides*, *Lagenidium giganteum*. Esses fungos entomopatogênicos são comercializados na forma de conídios em substratos sólidos (arroz), conídios puros e formulados de diferentes tipos de propágulos (micélio blastósporos e conídios) (FARIA; WRIGHT, 2007).

No Brasil, o uso de fungos entomopatogênicos tem aumentado à medida que a população vem exigindo melhor qualidade nos alimentos. O principal programa de controle microbiano brasileiro é o emprego de *Metarhizium anisopliae* para o controle de cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (ALVES, 1998). Esse fungo no Brasil foi aplicado em 2 milhões de hectares na cultura da cana-de-açúcar em 2011, onde eram registrados três produtos a base de *M. anisopliae* e um de *B. bassiana* (BETTIOL, 2011). O número de registros no Ministério da Agricultura e Abastecimento no Brasil vem aumentando, sendo que em 2013 existem sete produtos registrados do fungo *M. anisopliae* e três do fungo *B. bassiana* (AGROFIT, 2013).

No mundo, o controle de pragas dos citros por fungos entomopatogênicos vem despertado muita a atenção de pesquisadores Tabela 1. Os estudos desses microrganismos têm contribuído em muito para o desenvolvimento de novos micoinseticidas ou micoacaricidas.

Tabela 2 - Descrição dos fungos entomopatogênicos que infectam diferentes pragas de citros no mundo

(continua)

Pragas	Espécie fúngica	Lugar	Referência
<i>A. woglumi</i>	<i>Aschersonia aleyrodis</i>	Brasil	Pena et al., 2009
		Costa Rica	Elizondo e Quezada, 1990
<i>B. phoenicis</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Brasil	Silva et al., 2010
	<i>Fusarium</i> sp.	Brasil	Batista et al., 2002
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Brasil	Silva et al., 2010
	<i>Beauveria bassiana</i>	Brasil	Cavalcanti et al., 2008
	<i>Hirsutella</i> sp.	Brasil	Rossi-Zalaf et al., 2007
	<i>Hirsutella thompsonii</i>	Brasil	Alves et al., 2004
		Brasil	Rossi-Zalaf et al., 2008
		México	Acevedo e Rosas, 2000
	<i>Isaria farinosa</i>	Brasil	Rossi-Zalaf et al., 2007
	<i>Isaria fumosorosea</i>	Brasil	Cavalcanti et al., 2008
		Brasil	Rossi-Zalaf et al., 2007
	<i>Lecanicillium</i> sp.	Brasil	Cavalcanti et al., 2008
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Brasil	Rossi-Zalaf et al., 2007
		Brasil	Magalhães et al., 2005
	<i>Purpureocillium lilacinus</i>	Brasil	Rossi-Zalaf et al., 2007
	<i>Sporothrix</i> sp.	Brasil	Rossi-Zalaf et al., 2007
	<i>Verticillium</i> sp.	Brasil	Rossi-Zalaf et al., 2007
<i>D. citri</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Brasil	Padulla e Alves, 2009
		Brasil	Pinto et al., 2012
		México	Gandarilha-Pacheco et al., 2013
		México	Lezama-Gutiérrez et al., 2012
	<i>Hirsutella citrifomis</i>	Estados Unidos da America	Hall et al., 2012
		Indonésia	Subandiyah et al., 2000
		México	Casique-Valdes et al., 2011
		Estados Unidos da America	
	<i>Hirsutella</i> sp.	America	Meyer et al., 2007
	<i>Hirsutella thompsonii</i>	Brasil	Padulla e Alves, 2009
	<i>Isaria farinosa</i>	Brasil	Padulla e Alves, 2009
	<i>Isaria fumosorosea</i>	Brasil	Padulla e Alves, 2009
		Estados Unidos da America	Avery et al., 2009
		Estados Unidos da America	Hoy et al., 2010
		Estados Unidos da America	Hunter et al., 2011
		Estados Unidos da America	Meyer et al., 2008
		Indonésia	Subandiyah et al., 2000
		México	Gandarilha-Pacheco et al., 2013
		México	Lezama-Gutiérrez et al., 2012

Tabela 2 - Descrição dos fungos entomopatogênicos que infectam diferentes pragas de citros no mundo
(conclusão)

Pragas	Espécie fúngica	Lugar	Referência
<i>D. citri</i>	<i>Lecanicillium longisporum</i>	Brasil	Padulla e Alves, 2009
	<i>Lecanicillium muscarium</i>	Brasil	Padulla e Alves, 2009
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Brasil	Padulla e Alves, 2009
		México	Lezama-Gutiérrez et al., 2012
	<i>Metarhizium brunneum</i>	México	Gandarilha-Pacheco et al., 2013
<i>P. citri</i>	<i>Syngliocladium spp</i>	Brasil	Padulla e Alves, 2009
	<i>Beauveria bassiana</i>	China	Shi e Feng, 2006
	<i>Hirsutella kirchneri</i>	Israel	Sztejnberg et al., 1997
<i>P. praelonga</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Brasil	Garcia e Alves, 2005
	<i>Beauveria brongniartii</i>	Brasil	Garcia e Alves, 2005
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Brasil	Garcia e Alves, 2005
	<i>Isaria fumosorosea</i>	Brasil	Garcia e Alves, 2005
	<i>Lecanicillium lecanii</i>	Brasil	Garcia e Alves, 2005
	<i>Lecanicillium longisporum</i>	Brasil	Molina, 2007
		Brasil	Garcia e Alves, 2005
		Brasil	Weiler et al., 2011
	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Brasil	Garcia e Alves, 2005
	<i>Sporothrix sp.</i>	Brasil	Garcia e Alves, 2005
<i>T. citricida</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	México	Hernández-Torrez et al., 2006
		Estados Unidos da America	Poprawski et al., 1999
	<i>Isaria fumosorosea</i>	Estados Unidos da America	Hunter et al., 2011
		Estados Unidos da America	Pick et al., 2012
		Estados Unidos da America	Poprawski et al., 1999
		México	Hernández-Torrez et al., 2006
	<i>Lecanicillium lecanii</i>	Índia	Balfour e Kitam, 2012
		México	Hernández-Torrez et al., 2006
		Venezuela	Rondón et al., 1980
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Estados Unidos da America	Poprawski et al., 1999

Figura 1 - Ciclo de infecção do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em ninfas de *Diaphorina citri*. Dispersão dos conídios de um cadáver esporulado (A), sua penetração na cutícula de um novo hospedeiro, proliferação nas formas de corpos hifais, germinação e crescimento micelial, extrusão dos micélios, formação de novos conídios (B) e dispersão para ninfas sadias (C). Figura modificada de APPLEBAUM et al. (2010)

1.4 Objetivos

Esta dissertação teve como objetivos: 1) avaliar a patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 e *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 associados aos adjuvantes para o controle das pragas dos citros: *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida*, *Aleurocanthus woglumi*, *Praelongorthezia praelonga*, *Brevipalpus phoenicis* e *Panonychus citri*. 2) avaliar a ocorrência de transmissão horizontal dos fungos entomopatogênicos entre adultos esporulados e não infectados para o controle de adultos de *D. citri*.

A determinação do espectro de pragas susceptíveis a um isolado de fungo entomopatogênico é um fator importante na estimativa do mercado potencial de um bioproduto. O uso do bioproduto para o controle de *D. citri* pode indiretamente reduzir a população de outras pragas ou este pode ser utilizado prioritariamente para estas pragas. Por

isso, foram realizados experimentos para investigar a ação dos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* e *B. bassiana* associados a adjuvantes sobre seis pragas de citros.

Outro fator importante seria a quantificação da produção de conídios por indivíduos e a contribuição desses propágulos infectivos no desenvolvimento de novos ciclos de infecção, o que indicaria o potencial de controle no longo prazo. Portanto, foram realizados ensaios em laboratório e semi-campo para investigar a capacidade de transmissão horizontal dos fungos entomopatogênicos entre diferentes espécies de pragas e sua contribuição no controle de adultos de *D. citri*.

Referências

ABDULLAH, T.L.; SHOKROLLAH, H.; SIJAM, K.; ABDULLAH, S.N.A. Control of huanglongbing (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 17, p. 4007-4015, 2009.

ACEVEDO, J.L.R.; ROSAS, L.S. Control biológico de *Brevipalpus* spp. em *Citrus aurantifolia* em Guerreiro, México. **Manejo Integrado de pragas**, Turrialba, v. 55, p. 56-59, 2000.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2013. Disponível em: <<http://www.agrofit.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 01 maio 2013.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

APPLEBAUM, S.W.; ICHELICZIK, D.; HUMBER, R.A. Three in a boat: host-plant, insect herbivore, and fungal entomopathogen. **Celular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**, Norwell, v. 17, p. 289-329, 2010.

AUBERT, B. *Trioza erytrae* del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. **Fruits**, Cirad, v. 42, p. 149-162, 1987.

AVERY, P.B.; HUNTER, W.B.; HALL, D.G.; JACKSON, M.A.; POWELL, C.A.; ROGERS, M.E. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) under laboratory conditions. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 92, p. 608-618, 2009.

BALFOUR, A.; KHAN, A. Effects of *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas on *Toxoptera citricida* Kirklady (Homoptera: Aphididae) and its parasitoid *Lysiphlebus testaceipes* Cresson (Hymenoptera: Braconidae). **Plant Protection Science**, Slezská, v. 48, n. 3, p. 123-130, 2012.

BASSANEZI, R.B. Leprose dos citros: foco no controle do ácaro vetor. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 2, p. 25-29, 2004.

BETTIOL, W. Biopesticide use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, Buckinghamshire, v. 22, n. 6, p. 280-283, 2011.

BLACKWHEEL, M. Fungal evolution and taxonomy. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, p. 7-16, 2010.

BOINA, D.R.; ROGERS, M.E.; WANG, N.; STELINSKI, L.L. Effect of pyriproxyfen, a juvenile hormone mimic, on egg hatch, nymph development, adult emergence and reproduction of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 349-357, 2010.

BORROR, D.J.; DELONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: USP, 1970. 635 p.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. **Principles of insect pathology**. Norwell: Klumer Academic, 1998. 537 p.

BOVÉ, J.M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 88, p. 7-37, 2006.

BRANDIMARTE, I. **Inseticidas sistêmicos, em diferentes modalidades de aplicação, no controle de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) em plantas cítricas em produção**. 2011. 29 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citros) - Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lista de pragas quarentenárias presentes (A2)**. 2011. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 01 jul. 2012.

CARVALHO, M.; JÉFERSON, L.; SATO, M; RAGA, A; ARTHUR, V. Population dynamics of phytophagous and predaceous mites on coffee in Brazil, with emphasis on *Brevipalpus phoenicis*. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 44, n. 4, p. 277-291, 2008.

CASIQUE-VALDES, R.; REYES-MARTINEZ, A.Y.; SANCHEZ-PEÑA, S.R.; BIDOCHKA M.J.; LOPEZ-ARROYO, J.I. Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Cordicipitaceae) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 94, n. 3, p. 703-705, 2011.

CAVALCANTI, R.S.; REIS, P.R.; MOINO JUNIOR, A.; ALTOÉ, B.F.; FRANCO, R.A.; CARVALHO, T.M.B. Patogenicidade de fungos entomopatogênicos a três espécies de ácaros em cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 68-75, 2008.

CERMELIN, M.; MORALES, P.; GODOY, F. Presencia del psíldeo asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em Venezuela. **Boletín de Entomología Venezolana**, Caraca, v. 2, n. 15, p. 235-243, 2000.

CHIAVEGATO, L.G. Biologia do ácaro *Panonychus citri* (McGregor, 1916) (Acari: Tetranychidae), praga dos citros. **Científica**, Jaboticabal, v. 16, n. 1, p. 79-84, 1988.

CHILDERS, C.C.; FRENCH, J.V.; RODRIGUES, J.C. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 30, p. 5-28, 2003.

CLARKSON J.M.; CHARNLEY, A.K. New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 4, n. 5, p. 197-203, 1996.

COCCO, A.; HOY, M.A. Toxicity of organosilicone adjuvants and selected pesticides to the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) and its parasitoid *Tamaraxia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 91, n. 4, p. 610-620, 2008.

COLETA-FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; DE NEGRI, J.D.; POMPEU JR., J.; MACHADO, M.A. First report of the causal agent of Huanglongbing ('*Candidatus Liberibacter asiaticus*') in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1382, 2004.

COSTA LIMA, A.M. **Insetos do Brasil**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. 327 p. (Homopteros, v. 3).

CUNHA, M.L.A. **Distribuição geográfica, aspectos biológicos e controle químico da mosca negra dos citros *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae), nas condições ambientais do Estado do Pará**. 2003. 57 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2003.

CZERMAINSKI, A.B.C.; BASSANEZI, R.B.; LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L. Dinâmica temporal da população do ácaro *Brevipalpus phoenicis* e da leprose dos citros sob condições naturais de epidemia. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 295-303, 2007.

ELIZONDO, J.M; QUEZADA, J.R. Identificación y evaluación de los enemigos naturales de la mosca prieta de los cítricos *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Homoptera: Aleyrodidae) en cuatro zonas citrícolas de Costa Rica. **Turrialba**, San Jose, v. 40, n. 2, p. 190-197, 1990.

FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, Orlando, v. 43, p. 237-256, 2007.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Tomada de decisão em laranjais pede cautela. In: _____. **AGRIANUAL 2013: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2013. p. 249-250.

FUNDECITRUS. Ortézia cresce. Ação rápida é a melhor saída para combater a praga. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, v. 29, n. 119, p. 15, 2003.

_____. Greening chega às regiões Norte e Sul do estado. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 20, n. 124, p. 8-11, 2004.

_____. O balanço do greening: 2 anos. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, n. 134, p. 1-16, 2006.

_____. **Levantamento de Greening ano de 2011**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 01 abr. 2013.

GALATOIRE, I. Vital statistics of *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Buenos Aires, v. 42, p. 353-368, 1983.

GANDARILLA-PACHECO, F.L.; GÁLÁN-WONG, L.J.; ARROYO, J.I.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; QUINTERO-ZAPATA, I. Optimization of pathogenicity tests for selection of native isolates of entomopathogenic fungi isolated from citrusgrowing areas of México on adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 96, n. 1, p. 187-195, 2013.

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

GARCIA, M.O. **Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga* (Sternorrhyncha: Ortheziidae)**. 2004. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga*. **Laranja**, Corderópolis, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2005.

GHOSH, M.R.; RAYCHAUDHURI, D.N. Aphids (Homoptera: Aphididae) feeding on rosaceous fruit plantas in Darjeeling District of West Bengal and Sikkim (Índia). **Entomon**, Trivandrum, v. 6, p. 61-68, 1981.

GONÇALVES, C.R.; CASSINO, P.C.R. O problema da *Orthezia praelonga* na citricultura. In: ENCONTRO NACIONAL DE CITRICULTURA, 1978, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Pesagro, 1978. p. 5-10.

GRAFTON-CARDWELL, E.E.; STELINSKI, L.L.; STANSLY, P.A. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 58, p. 413-432, 2013.

GRAVENA, S. **Manual prático de manejo ecológico de pragas dos citros**. Jaboticabal: Gravena, 2005. 372 p.

GRYGANSKI, A.P.; HUMBER, R.A.; SMITH, M.E.; HODGE, K.; HUANG, B.; VOIGT, K.; VILGALYS. Phylogenetic lineages in Entomophthromycota. **Persoonia**, Leiden, v. 30, p. 94-105, 2013.

HALBERT, S.E.; NÚÑEZ, C.A. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean Basin. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 87, n. 3, p. 401-402, 2004.

HALL, D.G.; HENTZ, M.G.; MEYER, J.M.; KRISS, A.B.; GOTTWALD, T.R.; BOUCIAS, D.G. Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citrififormis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. **BioControl**, Dordrecht, v. 57, p. 663-675, 2012.

- HERNÁNDEZ-TORREZ, I.; LÓPEZ-ARROYO, J.I; BERLANGA-PADILLA, A.; LOERA-GALLARDO, J.; ACOSTA-DÍAZ, E. Efectividad de hongos entomopatógenos y vehículos de aplicación para el control del pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Vedalia**, Berkeley, v. 13, n. 1, p. 17-26, 2006.
- HESKETH, H.; ROY, H.E.; EILENBERG, J.; PELL, J.K.; HAILS, R.S. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, p. 55-73, 2010.
- HEU, R.A.; NAGAMINE, W.T. Citrus blackfly, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Homoptera: Aleyrodidae). **Hawaii Department of Agriculture, Division of Plant Industry, New Pest Advisory**, Honolulu, v. 99, p. 1-3, 2001.
- HOY, M.J.; SINGH, R.; ROGERS, M.E. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 93, p. 24-32, 2010.
- HU, J.; WANG, C.; WANG, J.; YOU, Y.; CHEN, F. Monitoring of resistance to spiroadiclofen and five other acaricides in *Panonychus citri* collected from Chinese citrus orchards. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 1025-1030, 2010.
- HUMBER, R.A. Hurricane warning! How changed nomenclatural rules affect fungal entomopathogens. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 2012, Buenos Aires. **Proceedings...** 2012. Buenos Aires: SIP, 2012. p. 106-106.
- HUMBER, R.A.; GRYGANSKI, A. P.; VILGALYS, R. Phylogenetic reclassification raises new respect-and a new phylum!- for entomophthorales. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 2012, Buenos Aires. **Proceedings...** 2012. Buenos Aires: SIP, 2012. p. 106-106.
- HUNTER, W.B.; AVERY, P.B.; PICK, D.; POWELL, C.A. Broad spectrum potential of *Isaria fumosorosea* against insect pests of citrus. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 94, n. 4, p. 1051-1054, 2011.
- JAMIESON, L.E.; CHAGAN, A; CHARLLES, J.G. Predation of citrus red mite (*Panonychus citri*) by *Stethorus* sp. and *Agistemus longisetus*. **New Zealand Plant Protection**, Havelock, v. 61, p. 317-321, 2008.
- JUAN-BLASCO, M.; QURESHI, J.A.; URBANEJA, A.; STANSLY, P.A. Predatory mite, *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae), for biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 95, n. 3, p. 543-551, 2011.
- KATAYAMA, H.; MASUI, S.; TSUCHIYA, M.; TATARA, A.; DOI, M; KANEKO, S.; SAITO, T. Density suppression of the citrus red mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) due to the occurrence of *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) on Satsuma mandarin. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 41, n.4, p. 679-684, 2006.
- KOGAN, M. Nota sobre as espécies do gênero *Orthezia* Bosq d' Antic, 1784, de importância econômica e que ocorrem no Brasil. **Agronomia**, Itaguaí, v. 22, p. 134-144, 1964.

KUCHMENT, A. The end of orange juice. **Scientific American**, New York, v. 308, p. 52-59, 2013.

LEAL, R.M. **Distribuição espacial de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) e sua relação com a expansão do greening em laranjeira valência, utilizando geoestatística**. 2009. 97 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Unesp, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

LE MOS, W.P.; VELOSO, C.A.A.; RIBEIRO, S.I.R. **Identificação e controle das principais pragas em pomares de citros no Pará**. Belém: EMBRAPA, 4 p. (Comunicado Técnico, 119).

LEÓN, M.G. **Insectos de los cítricos: guía ilustrada de plagas y benéficos con técnicas para el manejo de los insectos dañinos**. Bogotá: Ed. Produmedios, 2001. 81 p.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; CHÁVEZ-FLORES, O.; ÁNGEL-SAHAGÚN, C. A.; SKODA, S.R.; REYES-MARTÍNEZ, G.; BARBA-REYNOSO, M.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O.; RUÍZ-AGUILAR, G.M.L.; FOSTER, J.E. Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 32, n. 1; p. 39-44, 2012.

MAIA, W.J.M.S.; SOUZA, J.C.; MARQUES, L.C.; SILVA, L.M.S.; BENADUCE, R.V.; GENTIL, R.M. Infestação em citros por *Aleurocanthus woglumi* (Ashby) e perspectivas de controle biológico aplicado no Pará. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., 2005, Belém, 2005. **Anais... Recife: SEB**, 2005, p.183-183.

MAIA, P.S.P. **Caracterização da distribuição espacial da mosca negra dos citros (*Aleurocanthus woglumi* Ashby, 1915) em pomar georreferenciado para determinar um plano de amostragem sequencial**. 2008. 77 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2008.

MAIA, W.J.M. **Mosca negra de los cítricos: aspectos biológicos de la mosca de los citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby 1913, y ocurrencia de enemigos naturales em el estado de Pará**. Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia, 2006, p. 17-18. (IOBCSRNT, Boletim).

MANN, R.S.; TIWARI, S.; SMOOT, J.M.; ROUSEFF, R.L.; STELINSKI, L.L. Repellency and toxicity of plant based essential oils and their constituents against *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 136, p. 87-96, 2012.

MEAGHER, R.L.; FRENCH, J.V. Augmentation of parasitoids for biological control of citrus blackfly in southern Texas. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 87, n. 2; p. 186-193, 2004.

MEYER, J.M.; HOY, M.A.; BOUCIAS, D.G. Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama

(Hemiptera: Psyllidae) in Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 95, p. 101-109, 2007.

_____. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 99, p. 96-102, 2008.

MICHAUD, J.P. A review of the literature on *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 81, n. 1, p. 37-61, 1998.

MICHAUD, J.P. Numerical response of *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae) to infestations of Asian psyllidae (Hemiptera: Psyllidae) in Florida. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 84, n. 4, p. 608-612, 2001.

_____. Biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), in Florida: a preliminary report. **Entomological News**, Philadelphia, v. 113, p. 216-222, 2002.

_____. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, Orlando, v.29, p. 260-269, 2004.

MILLER, D.R.; MILLER, G.L.; HODGES, G.S.; DAVIDSON, J.A. Introduced scale insect (Hemiptera: Coccoidea) of the United States and their impact on U. S. agriculture. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington, v. 107, p. 123-158, 2005.

MOLINA, J.H.G. **Efeito do controle microbiano em insetos sugadores em três sistemas de manejo de pragas de citros**. 2007. 106 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MORAES, G.J.; FLECHTMANN, C.H.W. **Manual de acarologia**: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 2008. 288 p.

MÜLLER, G.D.; DE NEGRI, J.T.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MATTOS JÚNIOR, D.; POMPEU JÚNIO, J.; SOBRINHO, J.T.; CARVALHO, S.A.; GIROTTO, L. F.; MACHADO, M.A. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 2, p. 371-386, 2002.

NASCIMENTO, A.S. **Ecologia da *Orthezia praelonga* Douglas, 1891 (Homoptera: Ortheziidae) na região de Cruz das Almas- BA**. Cruz das Almas : EMBRAPA, 1980. 4 p. (Comunicado Técnico, nº 9).

NEVES, A.D. **Estimativa do nível de dano de *Orthezia praelonga* Douglas, 1891 e de *Leucoptera coffeella* (Guéri-Mèneville, 1842) por variáveis fisiológicas vegetais**. 2004. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

NEVES, A.D.; HADDAD, M.L.; ZÉRIO, N.G.; PARRA, J.R.P. Exigências térmicas e estimativas do número de gerações de ortézia dos citros criadas em limão-cravo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 8, p. 791-796, 2010.

NEVES, M.F.; KALAK, R.B.; TROMBIN, V.B. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Citrus, 2010. 137 p.

NG, J.C.K.; FALK, B.W. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 183-212, 2006.

NIU, J.Z.; LIU, G.Y.; DOU, W.; WANG, J.J. Susceptibility and activity of glutathione S-Transferases in nine field populations of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) to pyridaben and Azocyclotin. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 94, n. 2, p. 321-329, 2011.

OLIVEIRA, C.A.L. Flutuação populacional e medidas de controle do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Laranja**, Cordeiropolis, v.6: p. 1-32, 1986.

OLIVEIRA, M.R.V.; SILVA, C.C.A.; NAVIA, D. **Praga quarentenária A1: a mosca negra dos citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae)**. Petrolina: EMBRAPA, 1999. 7 p. (Comunicado Técnico, 40).

_____. **Mosca negra dos citros *Aleurocanthus woglumi*: alerta quarentenário**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001. 12 p.

OMOTO, C.; ALVES, E.B.; RIBEIRO, P.C. Detecção e monitoramento da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) Acari: Tenuipalpidae) ao Dicofol. **Anuais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 4, p. 757-764, 2000.

PADULLA, L.F.L. **Estudos de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psilídio *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**. 2007. 92 p. Dissertação de (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PADULLA, L.F.L.; ALVES, S.B. Suscetibilidade de ninfas de *Diaphorina citri* a fungo entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, p. 297-302, 2009.

PAIVA, P.E.B.; PARRA, J.R.P. Natural parasitismo of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera, Psyllidae) nymphs by *Tamarixia radiata* Waterston (Hymenoptera, Eulophidae) in São Paulo orange groves. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 56, n.4, p. 499-503, 2012.

PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S.; TORRES, M.L.G.; NAVA, D.E.; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeiropolis, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.

PASCHOAL, A.D. Revisão da família *Tetranychidae* no Brasil (Arachnida: Acarina). **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, v. 17, p. 457-483, 1970.

PENA, M.R. **Biologia da mosca negra-dos-citros *Aleurocanthus woglumi* Ashby 1915 (Hemiptera: Aleyrodidae) em três hospedeiros e uso do fungo *Aschersonia* sp., como agente entomopatogênico**. 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Amazonas, Belém, 2007.

PENA, M.R.; SILVA, N.M. Sugadora negra. **Revista Cultivar: Hortalças e Frutas**, Pelotas, v. 41, p. 16-18, 2007.

PENA, M.R.; VENDRAMIM, J.D.; LOURENÇÃO, A.L.; SILVA, N.M.; YAMAMOTO, P. T.; GONÇALVES, M.S. Ocorrência da mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grnade, v. 83, p. 61-65, 2008.

PENA, M.R.; SILVA, N.M.; BENTES, J.L.S.; ALVES, S.B.; BEZERRA, E.J.S.; VENDRAMIM, J.D.; LOURENÇÃO, A.L.; HUMBER, R.A. Inibição do desenvolvimento de *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Hemiptera: Aleyrodidae) por *Aschersonia* cf. *aleyrodidis* Webber (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 619-625, 2009.

PENG, Y. Field release of *Chrysopa sinica* as a strategy in the integrated control of *Panonychus citri*. **Chinese Journal of Biological Control**, Hebei, v. 1, p. 2-7, 1985.

PERSAD, A.B.; HOY, M.A. Intra-and interspecific between *Lysiphlelus testaceipes* and *Lipolexis scutellaris* (Hymenoptera: Aphidiidae) reared on *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, n. 3, p. 564-569, 2003.

PICK, D.A.; AVERY, P.B.; HUNTER, W.B.; POWELL, C.A.; ARTHURS, S. Effect of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) and *Lysiphlebus testaceipes*, (Hymenoptera: Braconidae) on the brown citrus aphid: preliminar assessment of a compatibility study. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 95, n. 3, p. 764-766, 2012.

PINTO, A.P.F.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; WENZEL, I.M. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psilídeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1673-1680, 2012.

PLUKE, R.W.H.; QURESHI, J.A.; STANSKY, P.A. Citrus flushing patterns, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations and parasitism by *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Puerto Rico. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 91, p.36-42, 2008.

POPRAWSKI, T.J.; PARKEP, P.E.; TSAI, J.H. Laboratory and fiel evaluation of hyphomycete insect pathogenic fungi for control of brow citrus aphid (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 28, p. 315-321, 1999.

PRATES, H.S. Ortézia, uma praga especial. **Casa da Agricultura**, Campinas, v. 9, p. 16-19, 1987.

PRIMIANO, E.L.V. **Dinâmica populacional de afídeos (Hemiptera: Aphididae) em árvores cítricas no município de Nova Granada-SP**. 2005. 74p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

QURESHI, J.A.; STANSKY, P.A. Dormant season foliar sprays of broad-spectrum insecticides: an effective component of integrated management for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus orchards. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, p. 860-866, 2010.

REGMI, C.; LAMA, T.K. Greening incidence and Greening vector population dynamics in Pokhara. In: CONFERENCE.INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Riverside. **Proceedings...** Riverside: IOCV Conference, 1988. p. 238-242.

ROCHA-PEÑA, M.A.; LEE, R.F.; LASTRA, R.; NIBLETT, C.L.; OCHOA-CORONA, F.M.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, R.K. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 437-443, 1995.

RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C. Óleos no manejo de pragas e doenças em citros. **Laranja**, Cordeiropolis, v. 23, n. 1, p. 77-100, 2002.

RODRIGUES, W.C. Inimigos naturais de pragas de plantas cítricas no estado do Rio de Janeiro. **Informativo dos Entomologistas do Brasil**, Rio de Janeiro, n. 1, p. 1-7, 2001.

RODRIGUES, W.C.; SPOLIDORO, M.V.; ZINGER, K.; CASSIANO, P.C.R. Dinâmica populacional de pulgão preto dos citros (Sternorrhyncha) em cultivo orgânico de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) em Seropédica, RJ. **EntomoBrasilis**, Vassouras, v. 3, n. 2, p. 38-44, 2010.

RONDÓN, A.G.; ARNAL, E.; GODOY, Y.F. Comportamiento del *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas, patógeno del afido *Toxoptera citricidus* (Kirk.) en fincas citricolas de Venezuela. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 30, n. 1/6, p. 201-202, 1980.

ROQUIM, J.C. **Comportamento, ocorrência e parasitismo de afídeos (Hemiptera: Aphididae) em cultivares de aveia forrageira (*Avena ssp*) irrigada na região de São Carlos**. 1999. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

ROSAMIGLIA, A.C. **Caracterização morfológica e bioquímica de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz); agente de controle da *Orthezia praelonga* Douglas, 1891**. 1998. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Unesp, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1998.

ROSSI-ZALAF, L.S. **Controle microbiano de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) com *Hirsutella thompsonii* Fisher**. 2007.125 p. Tese (Doutorado em Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B.; VIEIRA, S.A. Efeito de meios de cultura na virulência de *Hirsutella thompsonii* (Fischer)(Deuteromycetes) para o controle *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)(Acari: Tenuipalpidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 312-320, 2008.

SATO, M.E.; RAGA, A; CERÁVOLO, L.C.; ROSSI, A.C; POTENZA, M.R. Ácaros em pomar cítrico de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 23, p. 435-441, 1994.

SERMEÑO, J.M.; NAVARRO, J.A. Manual Técnico. **Identificación de insectos de La Superfamilia coccoidea, com esecial énfasis em cochinita rosada del hibisco *Maconellicoccus hirsutus* (Green)**. San Salvador: Orisa, 2000. 31 p.

SHELLEY, L.H.; HOY, M. A. A synchronomus rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 14-23, 2004.

SHI, W.B.; FENG, M.G. Field efficacy of application of *Beauveria bassiana* formulation and low rate pyridaben for sustainable control of citrus red mites *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) in orchards. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 210-217, 2006.

SILVA, A.G.; FARIAS, P.R.S.; BOIÇA JUNIOR, A.L.; SOUZA, B. H. S. Mosca-negra-dos-citros: Características gerais, bioecologia e métodos de controle dessa importante praga quarentenária da citricultura brasileira. **EntomoBrasilis**, Vassouras, v. 4, n. 3, p. 85-91, 2011a.

SILVA, A.G.; BOIÇA JUNIOR, A.L.; FARIAS, P.R.S.; RODRIGUES, N.E.L.; MONTEIRO, B.S.; SANTOS, N.A. Influência de fatores abióticos na infestação de mosca-negra-dos citros (*Aleurocanthus woglumi* Ashby) em plantio de citros em sistema agroflorestal no Estado do Pará. **EntomoBrasilis**, Vassouras, v. 4; n. 1; p. 1-6, 2011b.

SILVA, L.B.; RONCHI-TELES, B.; PENA, M.R. Avaliação do efeito de diferentes concentrações de inóculo de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre a mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* (Hemiptera: Aleyrodidae) em laboratório. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC INPA - CNPQ/FAPEAM, 19., 2010, Manaus. **Anais...** Manaus: XIX CNPQ/FAPEAM, 2010. p. 1-4.

SILVA, S.X.B.; LARANJEIRA, F.F.; ANDRADE, E.C.; ALMEIDA, D.O. Dinâmica da infestação de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em pomares cítricos da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 34, n. 1, p. 77-83, 2012.

SMALL, C.L.N.; BIDOCHKA, M.J. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 3, p. 307-313, 2005.

ST. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 47, p. 295-302, 1986a.

_____. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 48, n. 1, p. 85-95, 1986b.

SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; WAGIMAN, F.; TSUYUMU, S.; FUKATSU, T. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonésia. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, p. 509-513, 2000.

SUPLICY FILHO, N.; SAMPAIO, A.S.; MYAZAKI, I. Considerações sobre o coccídeo *Orthezia praelonga* Douglas, 1891, importante praga da citricultura brasileira. **O Biológico**, São Paulo, v. 49, p. 19-24, 1983.

SYMES, C.B. Notes on the black citrus aphids. **Rhodesia Agricultural Journal**, Salisbury, v. 11, p. 612-626, 1924.

SZTEJNBERG, A.; SHLOUSH, D.; GERSON, U. The biology of the acaropathogenic fungus *Hirsutella kirchneri*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 7, p. 577-590, 1997.

TANG, Y.Q.; WEATHERSBEE, A.A.; MAYER, R.T. Effect of neem seed extract on the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) and its parasitoid *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphididae). **Biological Control**, Orlando, v. 31, n. 1, p. 172-176, 2002.

TANG, Y.Q.; YOKOMI, R.K.; BROWN, L.G. Parasitoids for biological control of brown citrus aphid: recent observations. In: IOC CONFERENCE, RIVERSIDE, 13., 1997., Riverside: IOC Conference, 1997. p. 130-138.

TEIXEIRA, D.C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANNED, J.L.; COSTA, P.I.; AYRES, A.J.; BOVÉ, J. 'Candidatus Liberibacter americanus', associated with citrus huanglongbing (greening disease in São Paulo State, Brazil). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Basingstoke, v. 55, p. 1857-1862, 2005.

TOLEDO, F.R.; BARBOSA, J.C.; YAMAMOTO, P.T. Distribuição espacial de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Hemiptera: Aphididae) na cultura de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 2, p. 194-198, 2006.

TRINDADE, M.L.B.; CHIAVEGATO, L.G. Caracterização biológica dos ácaros *Brevipalpus obovatus* D., *B. californicus* B. e *B. phoenicis* G. (Acari: Tenuipalpidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 189-195, 1994.

TSAI, J.H.; LIU, Y.H. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 6, p. 1721-1725, 2000.

USP/PENSA Conference. Citros colorem sudeste brasileiro de verde e laranja. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 1, n. 2, p. 90-92, 2004.

VASCONCELOS, G J.N. **Diversidade de ácaros em agroecossistemas e testes para controle alternativo do ácaro branco, *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae), na região de Manaus, Amazonas**. 2011. 59 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

WEATHERSBEE, A.A.; MCKENZIE, C.L. Effect of a neem biopesticide on repellency, mortality, oviposition, and development of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 88, n.4, p. 401-407, 2005.

WHITE, G.L.; KAIRO, M.T.K.; LOPEZ, V. Classical biological control of the citrus blackfly *Aleurocanthus woglumi* by *Amitus hesperidum* in Trinidad. **BioControl**, Dordrecht, v. 50, p. 751-759, 2005.

WOOLER, A.; PADGHAM, D.; ARAFAT, A. Outbreaks and new records. Saudi Arabia. *Diaphorina citri* on citrus. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 22, p. 93-94, 1974.

XIAO, Y.; FANDAMIRO, H.Y. Functional responses and prey-stage preferences of three species of predacious mites (Acari: Phytoseiidae) on citrus red mite, *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). **Biological Control**, Orlando, v. 53, p. 345-352, 2010.

YAMAMOTO, P.T. **Manejo integrado de pragas dos citros**. Araraquara: FUNDECITRUS, 2008. 336 p.

YAMAMOTO, P.T.; PARRA, J.R.P. Manejo integrado de pragas dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Org.). **Citros**. Campinas: Centro Apta Citros, 2005. p.729-768.

YAMAMOTO, P.T.; ROBERTO, S.R, PRIA JR.; W.D. Inseticidas sistêmicos aplicados via tronco para controle de *Oncometopia facialis*, *Phylocnistis citrella* e *Toxoptera citricida* em citros. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 415-420, 2000.

YANG, Y.; HUANG, M.; ANDREW, G.; BEATTIE, C.; XIA, Y.; OUYANG, G.; XIONG, J. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: A status report for China. **International Journal of Pest Management**, London, v. 52, n. 4, p. 343-352, 2006.

2 PATOGENICIDADE DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* ASSOCIADOS A ADJUVANTES PARA O CONTROLE DE PRAGAS DE CITROS

Resumo

Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* têm sido considerados como agentes promissores para o controle de diversas pragas agrícolas. As pragas, tais como *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida*, *Aleurocanthus woglumi*, *Praelongortezia praelonga* e os ácaros *Brevipalpus phoenicis* e *Panonychus citri* são de grande importância para a cultura do citros, pois algumas delas além de sugar seiva ou conteúdo celular podem ser vetores de fitopatógenos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a patogenicidade de *B. bassiana* ESALQ-PL63 (*Bb*) e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (*If*) associados a adjuvantes no controle de ninfas e adultos de *D. citri*, *T. citricida*, *A. woglumi*, *P. praelonga* e adultos de *B. phoenicis* e *P. citri* em laboratório, além de quantificar a esporulação dos fungos entomopatogênicos em indivíduos mortos. Os tratamentos testados foram: 1- Controle (sem aplicação), 2- Tween 80 0,01%, 3- KBRAdj 0,075%, 4- Silwet L-77 0,1%, 5- *If* + Tween 80 0,01%, 6- *If* + KBRAdj 0,075%, 7- *If* + Silwet L-77 0,1%, 8- *Bb* + Tween 80 0,01%, 9- *Bb* + KBRAdj 0,075%, 10- *Bb* + Silwet L-77 0,1%. Todos os tratamentos contendo fungo foram ajustados para a concentração de 5×10^6 conídios. mL⁻¹. Os fungos *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foram patogênicos para todas as espécies de pragas com a exceção de *B. bassiana* para os adultos e ninfas de *P. praelonga*. A adição do KBRAdj aos fungos entomopatogênicos incrementou o efeito do patógeno sobre as pragas *D. citri* e *T. citricida*, obtendo com o fungo *I. fumosorosea* um aumento de 36,6% e 50% respectivamente, e com *B. bassiana* um aumento de 17,6% e 23,3%, respectivamente, em relação aos mesmos tratamentos com Tween 80. Os adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 foram considerados tóxicos para os ácaros e para a maioria das ninfas das espécies em estudo, com a exceção das ninfas de *P. praelonga*. As pragas que apresentaram maior mortalidade confirmada e esporulação foram adultos *D. citri* e *T. citricida*, com esporulação média de $3,02 \times 10^6$ e $3,29 \times 10^6$ conídios/cadáver para *I. fumosorosea* e $4,14 \times 10^6$ e $1,06 \times 10^6$ conídios/cadáver para *B. bassiana*. Tais resultados sugerem que *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 associado com adjuvantes são considerados como bons agentes de controle especialmente para *D. citri*, *T. citricida* e *A. woglumi*, sendo o isolado de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 o melhor deles.

Palavras-chave: Insetos e ácaros pragas; Entomopatógenos; Virulência; Esporulação

Abstract

The entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* are considered promising agents for the control of several agricultural pests. Pests such as *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida*, *Aleurocanthus woglumi*, *Praelongortezia praelonga* and the mites *B. phoenicis* and *Panonychus citri* are of great importance to citrus, because in addition to sucking sap or cell contents, they can vector plant pathogens. In this context, the aim of this study was to evaluate the pathogenicity of *B. bassiana* ESALQ-PL63 (*Bb*) and *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (*If*) associated with adjuvants to nymphs and adults of *D. citri*, *T. citricida*, *A. woglumi*, *P. praelonga* and adults of *B. phoenicis* and *P. citri* in laboratory condition, besides the quantification of the sporulation of the entomopathogenic fungi in the insect cadavers. The treatments comprised: 1 – Control (without application), 2 – Tween 80 0.01%; 3 - KBRAdj 0.075%; 4 – Silwet L- 77 0.1%; 5 – *If* + Tween 80 0.01%; 6 – *If* +

KBRAdj 0.075%; 7 – If + Silwet L – 77 0.1%; 8 – Bb + Tween 80 0.01%; 9 – Bb + KBRAdj 0.075% and 10 – Bb + Silwet L – 77 0.1%. All treatments containing the fungus were adjusted to a concentration of 5×10^6 conidia. mL⁻¹. The fungi *B. bassiana* ESALQ - PL63 and *I. fumosorosea* ESALQ -1296 were pathogenic to all pest species with the exception of *B. bassiana* for adults and nymphs of *P. praelonga*. The association of KBRAdj with entomopathogenic fungi increased the effect of the pathogen on *D. citri* and *T. citricida*, obtaining for the fungus *I. fumosorosea* an increase of 36.6% and 50%, respectively, and *B. bassiana* an increase of 17.6% and 23.3%, respectively, in relation to the same treatments with Tween 80. KBRAdj and Silwet L-77 were considered toxic to mites and nymphs of most species studied, with the exception of the nymphs of *P. praelonga*. The pests that had higher confirmed mortality and sporulation were the adult *D. citri* and *T. citricida* with average numbers of 3.02×10^6 and 3.29×10^6 conidia/cadaver to *I. fumosorosea* and 4.14×10^6 and 1.06×10^6 conidia/cadaver to *B. bassiana*. These results suggest that *I. fumosorosea* ESALQ-1296 and *B. bassiana* ESALQ-PL63 associated with adjuvant are considered as good control agents specially of *D. citri*, *T. citricida* and *A. woglumi*, the isolated of *I. fumosorosea* was the best of them.

Keywords: Insect and mite pests; Entomopathogens, Virulence; Sporulation

2.1 Introdução

Estudos recentes vêm demonstrando o potencial dos fungos entomopatogênicos para regulação e controle das pragas de citros, por exemplo, *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida*, *Aleurocanthus woglumi*, *Brevipalpus phoenicis*, *Panonychus citri* (AVERY et al., HUNTER et al., 2011; SILVA et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2008; SHI; FENG, 2006).

Lezama-Gutiérrez et al. (2012) verificaram a ação micoinseticida de diferentes isolados de *M. anisopliae*, *B. bassiana* (= *Cordyceps bassiana*) e *I. fumosorosea* sobre ninfas e adultos de *D. citri* no México, obtendo uma mortalidade em ninfas de 60%, 50% e 30%, respectivamente, e em adultos de 50%, 50% e 22%, respectivamente. Hoy et al. (2010) determinaram que a concentração letal média (CL₅₀) de *I. fumosorosea* para o em adultos de *D. citri* foi de $6,8 \times 10^5$ esporos. mL⁻¹. Avery et al. (2011) e Hunter et al. (2011) avaliaram o potencial de controle de *I. fumosorosea* sobre cinco espécies pragas de citros, dentre elas *D. citri* e *T. citricida*, obtendo porcentagem de mortalidade de até 100% em sete e oito dias após aplicação deste patógeno. De mesma forma, foram relatados os efeitos de fungos entomopatogênicos para *P. praelonga*. Garcia (2005) estudaram a patogenicidade e virulência de isolados de *B. bassiana*, *L. lecani*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* sobre ninfas de segundo e terceiro ínstar de *P. praelonga*, observando que os isolados de *L. lecani* apresentaram os maiores valores de virulência (46,6%) em comparação com os demais fungos (0 a 20%). Produtos biológicos formulados a base de conídios de *B. bassiana* vem sendo recomendado e utilizados na proporção de 2 Kg/ 2000 litros de água (concentração média estimada de $1 \times$

10¹² conídios/hectare), juntamente com óleo vegetal a 0,5% ou óleo mineral a 1,0%, para o controle de *P. praelonga* (YAMAMOTO, 2008; FUNDECITRUS, 2004). Um único relato demonstrou que os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são promissores para o controle de ovos e ninfas de *A. woglumi* (SILVA et al., 2010). Os principais fungos entomopatogênicos testados para o controle dos ácaros fitófagos *B. phoenicis* e *P. citri* foram *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Lecanicillium* sp., *H. thompsonii*, *Hirsutella* spp., e *I. fumosorosea*, (CAVALCANTI et al., 2008; ROSSI-ZALAF, 2007; GRAVENA, MAGALHÃES et al., 2005; SHI; FENG, 2006; SZTEJNBERG et al., 1997).

No Brasil, são escassos os estudos sobre a potencialidade dos fungos entomopatogênicos em *D. citri* e o efeito de um mesmo isolado fúngico para o controle simultâneo de várias pragas dos citros. Esses estudos viabilizariam a utilização desses microrganismos em pomares de citros, principalmente por reduzirem o número de aplicações, além de favorecer a transmissão natural e a persistência do fungo na cultura. Portanto, o desenvolvimento de um micoinseticida para *D. citri*, que seja eficaz sobre outras espécies pragas dos citros assume um papel importante no manejo integrado de pragas, porque poderia ser utilizado em rotação com os inseticidas químicos, a fim de minimizar os impactos negativos dos agroquímicos de amplo espectro sobre os inimigos naturais, sendo mais uma ferramenta de controle. Assim, esse estudo buscou avaliar a patogenicidade dos fungos *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 e *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 para o controle de ninfas e adultos dos insetos *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida*, *Aleurocanthus woglumi*, *Praelongorthezia praelonga* e no controle de adultos dos ácaros *Brevipalpus phoenicis* e *Panonychus citri*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Criação de *Diaphorina citri*

A criação foi iniciada utilizando adultos de *D. citri* coletados em plantas de murta, *Murraya paniculata* (L.) JACK (Rutaceae) situadas no campus da ESALQ-USP em Piracicaba-SP. A criação foi mantida em sala climatizada em temperatura de 25 ± 2 °C; 65-80% de UR e 12 h de fotofase.

A técnica de criação de *D. citri* utilizada foi semelhante à metodologia descrita por Gómez-Torres (2009), onde mudas de murta de 25 a 30 cm de altura, provenientes de casa de vegetação foram acondicionadas dentro de gaiolas de aço galvanizado ou madeira de (60 x 60 x 50 cm) com laterais cobertas com tela antiafídicas, contendo quatro a seis mudas com

brotações jovens (Figura 2). Essas plantas foram infestadas com 30 adultos de *D. citri* por muda para oviposição. Após período de cinco a sete dias, os adultos foram retirados e as plantas foram mantidas nas mesmas gaiolas de 15 a 25 dias para o desenvolvimento das ninfas até a obtenção dos adultos. Semanalmente, as gaiolas foram renovadas, utilizando mudas de murta podadas e adubadas com nitrogênio que foram mantidas em casa de vegetação até obtenção das brotações.

Figura 2 - Mudas de murta (*Murraya paniculata*) com *Diaphorina citri*

2.2.2 Criação de *Toxoptera citricida*

A criação de *T. citricida* foi iniciada utilizando adultos coletados de planta de limão cravo, localizada nas coordenadas geográficas, latitude 22° 40' 56" sul, longitude 47° 26' 02" oeste, no campus da ESALQ. Após a coleta, os insetos foram identificados utilizando a chave de identificação de Stoetzel (1994). No laboratório, plantas de citros (*C. limonica* L.) de 0,4 a 1 metro de altura com brotações jovens (variedade Natal) provenientes da casa de vegetação foram infestadas com 40 adultos/planta. Após quatro dias, os adultos foram retirados, deixando apenas as ninfas em desenvolvimento. As brotações foram cobertas com sacos de tecido tipo *voile* amarrados com arame para evitar fuga dos insetos (Figura 2). Novas mudas foram podadas e adubadas semanalmente, visando estimular as brotações para criação.

A criação foi mantida em sala climatizada em temperatura de 25 ± 2 °C; 65-80% de UR e 12 h de fotofase. A infestação das plantas foi realizada semanalmente para assegurar o número suficiente de insetos para os bioensaios.

Figura 3 - Planta de citros com pulgões confinados

2.2.3 Criação de *Brevipalpus phoenicis* e *Panonychus citri*

O ácaro-praga *B. phoenicis* foi criado no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle da ESALQ-USP. Para criação utilizou-se frutos de laranja *Citrus sinensis* variedade ‘Pera’ contendo alguns sintomas de verrugose, conforme metodologia sugerida por Chiavegato (1986). Os frutos foram lavados com água corrente e posteriormente parafinados, deixando uma área de aproximadamente 10 a 16 cm² sem parafina para criação, que também foi circundado com cola adesiva (marca Tanglefoot®) para evitar a fuga dos ácaros (Figura 4a). Para cada fruto foram transferidos aproximadamente 100 ácaros com auxílio de um pincel com apenas um pelo em microscópio estereoscópico. Esses frutos foram colocados em caixas plásticas de (28 x 43 x 12 cm) e substituídos mensalmente por frutos novos. A criação foi mantida em bandejas plásticas em sala climatizadas à temperatura de 25 ± 2 °C; 65-75% de UR e 14 h de fotofase.

O ácaro fitófago *P. citri* foi coletado em plantas de citros de pomares localizados no campus da ESALQ, Piracicaba-SP e foi criado sobre folhas completamente expandidas de laranja, variedade ‘Pera’, acondicionadas em bandejas plásticas de (28 x 43 x 12 cm), contendo no fundo uma fina camada de algodão hidrófilo umedecido (Figura 4b). Foram transferidos para cada folha aproximadamente 40 ácaros, e as folhas foram trocadas quando necessário. A criação desse ácaro foi realizada no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da ESALQ-USP, acondicionadas em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C, 70-80% UR e 14 h de fotofase.

Figura 4 - Frutos utilizados na criação de *Brevipalpus phoenicis* (A), bandeja com folhas para criação de *Panonychus citri* (B)

2.2.4 Coleta de *Aleurocanthus woglumi* e *Praelongorthezia praelonga*

A criação de *A. woglumi* e *P. praelonga* foi iniciada no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, na ESALQ-USP. No entanto, em virtude das dificuldades do estabelecimento da criação, devido a contaminações com fungos, coletou-se diretamente do campo ninfas e adultos das espécies para montagem dos estudos.

Folhas contendo ninfas de segundo ou terceiro ínstar de *A. woglumi* foram coletadas utilizando uma tesoura. As folhas foram coletadas de uma planta situada na coordenada, latitude 22° 40' 56" sul, longitude 47° 26' 02" oeste, no município de Piracicaba-SP. No laboratório, as ninfas foram selecionadas para montagem dos ensaios.

Para obtenção dos adultos de *A. woglumi*, ninfas de quarto ínstar foram coletadas do campo na mesma planta de limão cravo (*C. limonica* L.) que coletou as ninfas de segundo instar para os outros ensaios. No laboratório as folhas foram colocadas em bandejas plásticas de (28 x 43 x 12 cm), fechadas com plásticos do tipo parafilme contendo pequenos furos pra troca de oxigênio. Diariamente, se coletou os adultos emergidos com auxílio de um aspirador, buscando se unificar a idade dos adultos para execução dos bioensaios.

As ninfas e adultos de *P. praelonga* foram coletados de uma planta de cróton (*Codiaeum* sp) na cidade de Piracicaba-SP, localizada na coordenada latitude 22° 43' 52" sul e longitude 47° 37' 31" oeste. No laboratório, as folhas coletadas foram cortadas com uma tesoura e, posteriormente, colocadas sobre mudas de limão cravo plantadas em tubetes pretos de plástico, de 20 cm de comprimento por 1,5 cm. Após 24 horas, ninfas de segundo e terceiro instares foram selecionadas e utilizadas nos experimentos.

Os adultos da cochonilha ortézia, *P. praelonga*, foram transferidos para muda de limão cravo (*C. limonica*) utilizando um pincel de ponta fina. (Figura 5). Após 24 horas da infestação, os adultos foram tratados com os fungos entomopatogênicos.

Figura 5 – Planta de limão cravo com adultos de *Praelongorthezia praelonga*

2.2.5 Cultivos *in vitro* dos fungos entomopatogênicos e preparo das suspensões

Os isolados *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 foram obtidos do banco de entomopatógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, ESALQ-USP, Piracicaba-SP, armazenados na forma de conídios puros em criotubos dentro de freezer (-80 °C). Os fungos foram cultivados em placas de Petri de vidro de 9 cm de diâmetro previamente esterilizadas, contendo meio Sabouraud Dextrose enriquecido com extrato de levedura (SDYA: 2,5 g.L⁻¹ de peptona bacteriológica, 10 g.L⁻¹ de dextrose, 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura) previamente autoclavado a 120 °C por 20 minutos. O inóculo foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalsky e as placas mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. (Biological Oxygen Demand), a 26 ± 1 °C e 14 horas de fotofase por 10 dias.

As suspensões fúngicas foram preparadas a partir da raspagem dos conídios produzidos sobre meio de cultura SDYA, utilizando uma espátula metálica esterilizada. Três diluições em série foram feitas para possibilitar a contagem dos mesmos em câmara de Neubauer, e a concentração foi ajustada em 5 × 10⁶ conídios. mL⁻¹. Devido à hidrofobicidade dos conídios optou-se também por misturar a suspensão fúngica com solubilizantes ou espalhantes adesivos, tais como o Tween 80 USP (Oxiten®), Brasil) de composição Monooleato de Sorbitan 80, o adjuvante (KBRAdj) sem composição registrada e Silwet L-77 (Momentive Performance Materials Industria de Silicones LTDA®, Brasil) de composição formada de Copolímero de poliéter e silicone (1000 g.L⁻¹).

Os tratamentos utilizados foram: 1- Controle (Sem aplicação), 2- Tween 80 0,01%, 3- KBRAdj 0,075%, 4- Silwet L-77 0,1%, 5- *I. fumosorosea* + Tween 80 0,01%, 6- *I. fumosorosea* + KBRAdj, 7- *I. fumosorosea* + Silwet, 8- *B. bassiana* + Tween 80 0,01%, 9- *B. bassiana* + KBRAdj, 10- *B. bassiana* + Silwet. Para simplificar a denominação dos

adjuvantes e dos fungos entomopatogênicos adotou-se: (KBRAdj 0,075%) como “KBRAdj” e Silwet L-77 0,1% como “Silwet”, *I. fumosorosea* ESALQ-1296 como “If” e *B. bassiana* ESALQ-PL63 como “Bb”.

2.2.6 Testes de patogenicidade

Os isolados de *I. fumosorosea* e *B. bassiana* utilizados foram selecionados em estudos prévios para o controle de *D. citri*. Os ensaios de patogenicidade foram realizados no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ-USP, acondicionados em sala climatizada sob temperatura de 25 ± 2 °C, 75-80% UR e 12h de fotofase. Nos testes de patogenicidade com as espécies de insetos pragas utilizou-se três repetições e nos testes com ácaros utilizou-se quatro repetições, sendo todos os ensaios repetidos três vezes no tempo, exceto para os adultos de *A. woglumi* que foi repetido duas vezes.

2.2.6.1 Teste de patogenicidade a *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida* e *Praelongorthezia praelonga*

2.2.6.1.1 Preparo do material e das plantas

As plantas utilizadas nos ensaios foram mantidas em casa de vegetação, cada planta apresentava 20 cm de altura plantada em tubetes pretos de plástico, de 20 cm de comprimento por 1,5 cm. Já as plantas utilizadas nos experimentos com adultos de *T. citricida* apresentavam 1 metro de altura, plantada em vasos de oito litros.

Os bioensaios de patogenicidade com *I. fumosorosea* e *B. bassiana* sobre adultos e ninfas de *D. citri*, *P. praelonga* e ninfas de *T. citricida* foram conduzidos sobre plantas de limão cravo *C. limonia* em tubetes, os quais foram colocados dentro de copos plásticos com tampa de 500 mL e de dimensões de 13,5 cm x 8,5 cm x 5,5 cm, contendo tecido *voile* com velcro, para facilitar as avaliações e a ventilação interna (Figura 6a e 6b). Os copos utilizados nos ensaios com adultos de *T. citricida* apresentaram volume e dimensões semelhantes, no entanto, esses foram montados de forma diferente. Na base do copo foi cortado e colado um saco plástico transparente e no ápice colocado *voile* fixados com elástico e cola quente (Figura 6b).

Figura 6 - Copo utilizado nos ensaios com *Diaphorina citri*, *Praelongorthezia praelonga* e ninfas de *Toxoptera citricida* (A), copo do experimento de adultos de *Toxoptera citricida* (B)

2.2.6.1.2 Transferência dos insetos

A transferência dos adultos de *P. praelonga* foi realizada utilizando um pincel de ponta fina e as ninfas pela transferência natural (item 2.2.4), e os adultos de *D. citri* utilizando um sugador. Para conseguir a sincronização das etapas de desenvolvimento das ninfas de *D. citri*, cinco fêmeas contendo ovos foram colocadas por planta com brotações para oviposição, que foram deixadas por um dia. Posteriormente, os adultos foram retirados com ajuda do sugador e as plantas nos tubetes foram mantidas em salas climatizadas a 26 °C, umidade de 70-80% e fotofase de 12 horas até a obtenção das ninfas de primeiro estágio. Já para montagem dos bioensaios com ninfas de *T. citricida* foi necessário a transferência de 10 adultos por planta contendo brotações, que permaneceram por dois dias. Posteriormente, os adultos foram retirados, e as plantas com ninfas foram utilizadas para os ensaios.

Nos experimentos com adultos de *T. citricida* as transferências foram realizadas utilizando folhas de citros infestadas com ninfas de terceiro ínstar. Pedacos dessas folhas com pulgões foram colocados sobre as brotações das mudas de limão cravo de 1 metro de altura, deixadas por período de um dia para transferência. A seguir, os copos foram colocados, e as ninfas foram diariamente monitoradas até a obtenção dos adultos.

2.2.6.1.3 Pulverização

As pulverizações das suspensões fúngicas sobre as espécies de *D. citri*, *T. citricida*, *P. praelonga* foram realizadas utilizando o pulverizador do tipo *airbrush* em pressão de 10 PSI em distância de 5 a 10 cm do bico para a planta (Figura 7a). O volume aplicado foi de 400 µL por planta, o qual permitiu o molhamento completo das plantas sem escorrimento. Posteriormente, as mudas tratadas foram colocadas sobre uma estrutura de isopor em bandejas

plásticas em sala climatizada, com temperatura de 25 ± 2 °C, 70-80% UR e 14h de fotofase (Figura 7b). Cada tratamento conteve três repetições totalizando de 60 a 90 insetos.

Figura 7 - Pulverizador *airbrush* (A), bandeja plástica com isopor e plantas (B)

2.2.6.1.4 Avaliações da mortalidade

As avaliações da mortalidade foram realizadas diariamente, anotando a porcentagem de adultos ou ninfas mortas, com o auxílio de microscópio estereoscópico e os insetos mortos foram colocados em placas de cultura de células de 24 poços (EASYPATH, Brasil) estéreis contendo algodão umedecido com água destilada (câmara úmida) para favorecer o desenvolvimento do micélio externo e esporulação dos fungos entomopatogênicos (Figura 8).

Para adultos de *D. citri* as avaliações foram realizadas até o décimo dia após aplicação, entretanto para *T. citricida*, *P. praelonga* e ninfas de *D. citri* as avaliações foram feitas até o sexto dia. Esse período foi estipulado conforme testes preliminares de mortalidade e longevidade da praga.

Figura 8 – Câmara úmida utilizada para confirmação de esporulação

2.2.6.2 Teste de patogenicidade a *Brevipalpus phoenicis* e *Panonychus citri*

Os bioensaios de patogenicidade com *I. fumosorosea* e *B. bassiana* sobre os ácaros *B. phoenicis* e *P. citri* foram realizados utilizando-se folhas de laranja (*C. sinensis*) da variedade ‘Pera’ coletadas em um pomar da ESALQ, sem aplicação de defensivos. Após a coleta das folhas, elas foram trazidas para laboratório, onde foram individualmente lavadas em água corrente para a eliminação das impurezas e, posteriormente, secas em papel toalha.

As folhas foram recortadas em discos utilizando um vazador de 3,4 cm de diâmetro e os discos de folhas foram colocados em placas acrílicas de 3,5 cm de diâmetro x 1,5 cm altura contendo 4 mL de ágar-água 2,5% solidificado. Para os ensaios com *B. phoenicis* foi utilizada a face abaxial das folhas e para *P. citri* a face adaxial. Em cada placa, foram transferidas 10 fêmeas adultas e vigorosas de *B. phoenicis* ou *P. citri* provenientes da criação, apresentando quatro repetições por tratamento, totalizando 40 ácaros (Figura 9 a e b).

O pulverizador e os tratamentos foram os mesmos utilizados para os ensaios com *D. citri* e as demais pragas item 2.2.6.1.3. O volume de suspensão aplicado foi de 125 µL por disco em pressão de 10 PSI, aplicados a 15 cm de distância das placas. Após a pulverização, as placas foram vedadas com plástico “parafilme” contendo pequenos furos e depois colocadas sobre bandejas plásticas de 28 x 43 x 12 cm e acondicionadas em sala climatizada, temperatura de 25 ± 2 °C, 70-80% UR e 14h de fotofase.

As avaliações foram realizadas diariamente, contando os ácaros mortos em cada disco de folha por períodos de cinco dias. Posteriormente, as placas foram abertas e colocadas dentro de bandeja contendo algodão hidrófilo umedecido, a qual foi fechada com “parafilme” para que os cadáveres pudessem esporular. As quantificações de mortalidade confirmada e esporulação foram realizadas cinco dias após as placas serem colocadas em câmara úmida, utilizando a mesma metodologia descrita no item 2.2.6.1.4.

Figura 9 - Placas com discos de citros para ensaios com ácaros (A e B)

2.2.6.3 Teste de patogenicidade a *Aleurocanthus woglumi*

Devido às dificuldades na criação de *A. woglumi*, os bioensaios foram realizados com ninfas coletadas em campo, item 2.2.4. Os adultos de *A. woglumi* foram confinados em número de 20 insetos/muda de limão cravo (*C. limonica*) em copos de 500 mL, metodologia semelhante à utilizada para adultos de *D. citri*, (item 2.2.6.1.1), contendo três repetições por tratamento.

Para os ensaios com ninfas, as folhas foram coletadas no campo conforme descrito no item 2.2.4, posteriormente a região contendo as ninfas selecionadas foi demarcada com caneta de ponta de 1 mm, para facilitar a avaliação da mortalidade. As ninfas foram selecionadas de forma que cada folha apresentou de 30 a 40 ninfas. Para cada tratamento três folhas foram colocadas sobre placas de vidro de 14 cm de diâmetro por 2 cm de altura, contendo algodão umedecido no pecíolo para manter a turgidez das folhas (Figura 10a). Os tratamentos foram constituídos de três repetições tendo aproximadamente 120 ninfas por tratamento.

As suspensões foram preparadas conforme descrito no item 2.2.5, pulverizadas com o *airbrush* em volume de 150 µL por folha sobre pressão de 10 PSI com distância de 5 a 10 cm. Após as aplicações, as placas foram fechadas deixando uma pequena abertura para troca de gases e colocadas em salas climatizadas a 25 ± 2 °C, 70-80% UR e 14h de fotofase.

As avaliações foram realizadas até o terceiro dia para adultos devido à suscetibilidade dessa aplicação e até o sexto dia para ninfas. A mortalidade foi anotada com base nos insetos que apresentaram crescimento micelial externo ou esporulação (Figura 10b). Pelo fato de não ser possível quantificar as ninfas mortas e não esporuladas, por falta de mobilidade e também porque elas não apresentam diferenciação na cor quando mortas, optou-se por avaliar apenas a mortalidade confirmada (Figura 10b), seguindo a metodologia utilizada por PENA (2007) para o fungo *Aschersonia* sp.

Figura 10 - Placa de vidro e folhas com ninfas de *Aleurocanthus woglumi* (A), folhas com ninfas esporuladas (B)

2.2.7 Quantificação da esporulação

Transcorridos cinco dias após os cadáveres serem colocados em câmara úmida foi quantificada a produção de conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 por indivíduo. Para os adultos de *D. citri*, *T. citricida* e *P. praelonga* necessitou de um a cinco cadáveres para a quantificação. Em contraste, para ninfas e ácaros devido ao seu tamanho diminuto, foram necessárias maiores quantidades (10 a 20 indivíduos). Os cadáveres foram colocados em tubos de ependorff com 1 mL de solução a 0,005% de Tween 80, seguida de uma agitação no vortex para favorecer a ruptura dos cadáveres e remoção dos conídios. A quantificação da concentração de conídios por indivíduos foi feita por contagem na câmara de Neubauer. Embora tenha sido quantificado o número diferente de cadáveres por espécie praga, as quantificações foram padronizadas de forma que cada espécie apresentasse quatro repetições.

2.2.8 Análises estatísticas

Os bioensaios de laboratório foram conduzidos no delineamento inteiramente aleatorizado. Nos ensaios com *D. citri*, *T. citricida*, *A. woglumi*, *P. praelonga*, *B. phoenicis*, *P. citri* foram ajustados um modelo que incluía a interação bloco e tratamento, onde bloco foram os experimentos no tempo. Como não foi observada interação significativa, os dados foram analisados conjuntamente. Os dados de mortalidade e confirmação foram submetidos a análises estatísticas utilizando modelos lineares generalizados (NELDER; WEDDERBURN, 1972) do tipo binomial com ajuste quasibinomial.

Os dados de esporulação dos adultos por apresentarem superdispersão (HINDE; DEMÉTRIO, 1998) foram ajustados modelos lineares generalizados do tipo binomial negativo. Por se tratar de um ensaio com número diferentes de cadáveres quantificados, fez-se uma análise fatorial incompleto ajustando o modelo $\eta_{ij} = t_i + offset(\log x_i)$, sendo $t_i = 1, 2, \dots, 9$ o efeito do i -ésimo tratamento (combinação entre os níveis dos fatores “praga” e “fungo”) e x_j , $j = 1, 2, 3, 4$ o número de cadáveres utilizadas para quantificação da esporulação. Nos dados de esporulação de ninfas não foi possível o ajuste de modelo para análise, onde ainda estamos estudando os dados para ajuste de algum modelo.

Quando houve diferença significativa entre os tratamentos para mortalidade total, mortalidade confirmada e esporulação foram realizados testes de comparações múltiplas (teste de Tukey, $P < 0,05$) por meio da função `glht` do pacote `multcomp` com ajuste em função dos valores de “ P ”. Todas as análises foram realizadas no software estatístico “R”, versão 3.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Patogenicidade de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 e *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 às pragas de citros

2.3.1.1 Patogenicidade a ninfas e adultos de *Diaphorina citri*

Os dados de mortalidade de ninfas de primeiro ínstar e de adultos de *D. citri* não apresentaram diferenças significativas entre as repetições no tempo, portanto os dados de mortalidade foram analisados conjuntamente. Os tratamentos foram estatisticamente diferentes ($F_{9, 80}=31,87$; $P<0,05$), observando maiores valores de mortalidade total nos tratamentos: Silwet (99,5%), *If* + Silwet (98,9%), *If* + KBRAdj (98,5%), *Bb* + Silwet (97,8%), *Bb* + KBRAdj (97,4%), KBRAdj (90,5%), *Bb* + Tween (86,1%) (Figura 11). Os adjuvantes contribuíram significativamente para a mortalidade das ninfas, sendo que o KBRAdj e Silwet não diferiram entre si, mas foram superiores ao Tween.

A manutenção dos cadáveres na câmara úmida propiciou a formação de micélio externo e esporulação de ambos dos fungos entomopatogênicos (Figura 12 a e b). Os dados de mortalidade confirmada para as ninfas de *D. citri* não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos ($F_{5, 48}= 1,38$; $P>0,05$) obtendo os valores de 43,3% a 74,2% (Figura 11). As ninfas foram muito sensíveis aos KBRAdj e Silwet sendo que a adição dos fungos a estes adjuvantes não aumentou a mortalidade total em laboratório. Entretanto, as ninfas mortas nos tratamentos com adjuvante e fungo apresentaram uma alta confirmação da doença, indicando que o fungo foi capaz de colonizar os insetos mortos pela ação do adjuvante.

Os adultos de *D. citri* foram susceptíveis para *I. fumosorosea* e *B. bassiana*, entretanto, os valores de mortalidade total foram menores do que para ninfas sendo os tratamentos mais eficientes com *If* + KBRAdj (73,3%) e *If* + Silwet (59%) ($F_{9,80}=6,13$; $P<0,05$) (Figura 13). A maior mortalidade confirmada também foi encontrada para os tratamentos com *If* + KBRAdj (64,1%) e *If* + Silwet (54,8%), os quais divergiram estatisticamente dos demais tratamentos ($F_{5,48}=5,02$; $P<0,05$) (Figura 13).

De acordo com os resultados, pode se indicar que os fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 mostraram ser eficientes para o uso no controle microbiano de ninfas e adultos de *D. citri*. O controle apresentado por esses fungos com os adjuvantes foram superiores aos resultados apresentados com os isolados de *I. fumosorosea* (*Ifr* ASCP, *Ifr* PFR 97 e 3581) da Flórida (MEYER et al., 2008; HUNTER et al., 2011), e o isolado *B. bassiana* ESALQ-PL63 do Brasil (PADULLA, 2009).

Segundo Avery et al. (2008) os isolados de *I. fumosorosea* tem várias características positivas que confirmam sua candidatura como um futuro agente de biocontrole de *D. citri*, pois pode infectar uma grande gama de pragas de citros e é seguro para artrópodes não-alvos. Outros autores demonstraram que o fungo *B. bassiana* aplicado na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ também foram efetivos para controle de ninfas de *D. citri* (PINTO 2012; PADULLA; ALVES 2009).

Uma característica importante para se avaliar em relação aos fungos entomopatogênicos é a concentração letal média (CL₅₀) e o tempo letal médio (TL₅₀), porque permite comparar a virulência dos isolados fúngicos e selecionar os mais virulentos. Hoy et al. (2010) determinaram a relação de concentração-mortalidade (CL₅₀) e tempo-resposta (TL₅₀) para o isolado de *I. fumosorosea* (IfrAsCP) em adultos de *D. citri* encontrados na Flórida. Quando adultos foram pulverizados com conídios de IfrAsCP a 28 °C, os valores de tempo de resposta (TL₅₀) foram de 111 e 102,5 horas na concentração de 1×10^7 e 1×10^8 conídios.mL⁻¹, respectivamente. A concentração letal (CL₅₀) obtida nesse mesmo experimento para adultos de *D. citri* foi de $6,8 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹. Resultados obtidos em nosso laboratório com adultos de *D. citri* demonstraram que os isolados *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 apresentaram o tempo letal 50 (TL₅₀) de 5,12 e 6 dias, respectivamente. Quando são comparados os dados de virulência do isolado (IfrAsCP) obtidos por Hoy et al. (2010) e o isolado *I. fumosorosea* ESALQ-1296, ambos isolados provocaram mortalidade parecidas, apesar de apresentar diferenças na concentração de conídios e no volume aplicado (400 µL de uma suspensão de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ para ESALQ-1296 e 2 mL de uma suspensão de $6,8 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹ para o isolado IfrAsCP).

Padulla e Alves (2009) havia verificado que a concentração letal de (CL₅₀) do fungo entomopatogênico *B. bassiana*-PL63 para controle de ninfas de terceiro instar de *D. citri* foi de $2,3 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹ e tempo letal (TL₅₀) 4,71 dias.

Nossos resultados demonstraram que ambos os fungos entomopatogênicos apresentaram elevados níveis de mortalidade tanto para ninfas quanto para adultos, sendo as ninfas mais suscetíveis. Essa diferença de suscetibilidade pode ter sido aumentada pelo fato das ninfas apresentarem corpo mais exposto ou menos esclerotizado, os quais facilitam a ação do patógeno. Assim mesmo, a composição cuticular dos insetos também poderia estar afetando na adesão e germinação dos conídios, onde os lipídeos cuticulares dos adultos poderiam interferir no processo de infecção. Segundo James et al. (2003) os conídios de *I. fumosorosea* e *B. bassiana* foram afetados após serem submetidos ao contato com os lipídeos cuticulares C42 e C54 presentes nos diferentes estádios de ninfas de *B. argentifolii*.

O isolado ESALQ-1296 quando aplicado com Tween 80 0,01% provocou mortalidade de 46,8% dos adultos, apresentando resultados parecidos com aqueles obtidos por Gandarilha-Pacheco et al. (2013) para a concentração de 1×10^8 conídios.mL⁻¹. Com a adição dos adjuvantes na suspensão fúngica foi observada uma maior eficácia dos fungos entomopatogênicos para essa praga de citros. Esse efeito pode ter sido causado pelo fato dos adjuvantes melhorarem a distribuição e adesão dos conídios sobre o corpo dos insetos. Efeito semelhante foi comprovado por Malsam et al. (2002) para ninfas de duas espécies de mosca branca, *Trialeurodes vaporariorum* e *Bemisia tabaci*, após a introdução de óleo na suspensão de *M. anisopliae*. Segundo esses autores, os óleos melhoram a distribuição e adesão dos conídios na superfície dos insetos, aumentando a probabilidade de infecção. Os óleos podem por si só também interferir na defesa natural da cutícula dos insetos, aumentando a mortalidade (VIMALIA DEVI; PRASAD, 1996).

Embora os adjuvantes tenham provocado alta mortalidade das ninfas, observou-se que os cadáveres apresentaram alta confirmação de infecção pelos fungos, não sendo afetadas pela presença dos adjuvantes. Já para adultos a aplicação isolada dos adjuvantes não diferiu do controle. O isolado *B. bassiana* ESALQ-PL63 apresentou elevados níveis de esporulação sobre os cadáveres de ninfa de *D. citri*, o qual difere do observado por Padulla e Alves (2009) que relataram a ausência de esporulação dada por esse fungo.

Figura 11 - Mortalidade total e confirmada (%) $\pm$ EP de ninfas de primeiro instar de *Diaphorina citri*, após a aplicação dos adjuvantes (Tween, KBRAdj e Silwet) isoladamente e associados aos fungos *I. fumosorosea* (If) e *B. bassiana* (Bb) a 25 ± 2 °C, 75-80% UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Figura 12 - Ninfas de *Diaphorina citri* com crescimento micelial e esporulação de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 (A e B)

Figura 13 - Mortalidade total e confirmada (%) $\pm$ EP de adultos de *Diaphorina citri*, após a aplicação dos adjuvantes (Tween, KBRAdj e Silwet) isoladamente e associados aos fungos *I. fumosorosea* (If) e *B. bassiana* (Bb) a 25 ± 2 °C, 75-80% UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

2.3.1.2 Patogenicidade a ninfas e adultos de *Toxoptera citricida*

Após aplicação dos fungos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 em ninfas de *T. citricida* foram observados os valores máximos de mortalidade no segundo dia da aplicação, onde as ninfas ficaram aderidas nas brotações pelo aparato bucal e após a transferência dessas para câmaras úmidas com alta umidade foi observado o desenvolvimento ou crescimento micelial e esporulação dos fungos (Figura 14 a e b).

Os valores de mortalidade total de ninfas de *T. citricida* foram maiores nos tratamentos com Silwet, If + Silwet e Bb + Silwet, apresentando valores de mortalidade de 91%, 90,6% e 89,5%, respectivamente. Esses tratamentos diferiram estatisticamente dos demais ($F_{9,80} = 36,46$; $P < 0,05$), principalmente do controle que apresentou mortalidade total de 6,2%. Os tratamentos Adj1, If + KBRAdj e Bb + KBRAdj apresentaram mortalidade $> 50\%$ e diferiram estatisticamente dos tratamentos Bb + Tween (15,2%), If + Tween (13,1%), água (10,3%) e controle (6,2%) (Figura 15).

A mortalidade confirmada das ninfas de *T. citricida* foi maior nos tratamentos com Bb + Silwet (85,4%) e If + Silwet (83,5%) que diferiram estatisticamente dos outros tratamentos

($F_{5,48}=33,01$; $P<0,05\%$). Os tratamentos seguintes foram *If* + KBRAdj (48,8%) e *Bb* + KBRAdj (47,5%), os quais foram significativamente diferentes dos tratamentos *If*+ Tween (4%) e *Bb* + Tween (3,7%) (Figura 15).

Do mesmo modo, os fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 também desenvolveram micélio externo e esporulação sobre os adultos de *T. citricida*.

Os tratamentos que apresentaram maior mortalidade total de adultos de *T. citricida* foram *Bb* + Silwet (99%); Silwet (96,3%); *If* + Silwet (90,8%) e *If* + KBRAdj (65,4 %) que foram significativamente semelhantes entre si ($F_{9,80}=41,23$; $P<0,05$) (Figura 16). O tratamento *If* + KBRAdj foi significativamente superior a *Bb* + Tween (12,1%); água + Tween (6,6%) e controle (2,9%). O mesmo foi encontrado para a aplicação de *Bb* + KBRAdj (42,7%) que diferiu de: *Bb* + Tween ; água + Tween e controle (Figura 16).

Na mortalidade confirmada foi observado que o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foi significativamente superior a *B. bassiana* ESALQ-PL63 ($F_{5,48}=33,013$; $P<0,05$), obtendo valores de 89,3% e 64,2% para os tratamentos com Silwet e KBRAdj, respectivamente. Entretanto, a mortalidade confirmada de *B. bassiana* ESALQ-PL63 com KBRAdj, Silwet e Tween foram de 26%, 16,1% e 2,7%, respectivamente (Figura 16).

Os resultados obtidos para ninfas de primeiro ínstar de *T. citricida* são condizentes com os resultados apresentados por Hernández-Torrez et al. (2006) que observaram que os fungos entomopatogênicos *Paecilomyces fumosoroseus* (= *I. fumosorosea*) e *B. bassiana* foram os mais virulentos para esse inseto. Resultados semelhantes também foram encontrados por Loureiro e Moino Jr. (2006) para o controle de ninfas de terceiro ínstar dos afídeos *Aphis gossypii* e *Myzus persicae*, onde foi verificado que a concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* provocou a morte de mais de 70% das ninfas dos afídeos após seis dias da aplicação.

Os resultados de mortalidade total obtidos para adultos de *T. citricida* mostraram ser semelhantes aos dados obtidos para ninfas, principalmente para os tratamentos que foram utilizados o Silwet. Entretanto, o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 apresentou elevados níveis de confirmação para ninfas e adultos de *T. citricida* em comparação com *B. bassiana* ESALQ-PL63. Essa diferença de confirmação e esporulação pode ter sido influenciada pelo estágio de desenvolvimento do inseto. Esse fato foi descrito por Sosa-Gómez e Alves (2000) para *B. bassiana* infectando ninfas e adultos de *Piezodorus guildini*. Os autores quantificaram a formação de conídios de *B. bassiana* em cadáveres de *Piezodorus guildini* submetidos a diferentes níveis de umidade e temperatura. Quando as ninfas e adultos mortos pelo patógeno

foram acondicionados a uma temperatura de 26 °C e 90% de umidade relativa, todas as ninfas de quinto ínstar apresentaram extrusão dos micélios e formaram conídios, contudo apenas 62% dos adultos apresentaram a conidiogênese. Assim os autores sugerem que a esporulação dos cadáveres pode ser depende de um grande número de fatores, entre eles, a espécie hospedeira, fase do hospedeiro, composição do hospedeiro, o teor de água e a área sem esclerotização, a qual facilita a extrusão micelial e esporulação.

Figura 14 - Ninfas de *Toxoptera citricida* com crescimento micelial e esporulação de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (A e B)

Figura 15 - Mortalidade total e confirmada (%) $\pm$ EP de ninfas de primeiro instar de *Toxoptera citricida*, após a aplicação dos adjuvantes (Tween, KBRAdj e Silwet) isoladamente e associados aos fungos *I. fumosorosea* (If) e *B. bassiana* (Bb) a 25 $\pm$ 2 °C, 75-80% UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Figura 16 - Mortalidade total e confirmada (%) $\pm$ EP de adultos de *Toxoptera citricida*, após a aplicação dos adjuvantes (Tween, KBRAdj e Silwet) isoladamente e associados aos fungos *I. fumosorosea* (If) e *B. bassiana* (Bb) a 25 ± 2 °C, 75-80% UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

2.3.1.3 Patogenicidade a ninfas e adultos de *Aleurocanthus woglumi*

Nesses experimentos só foi possível realizar a avaliação da mortalidade confirmada sobre as ninfas e adultos de *A. woglumi* através da observação do desenvolvimento externo do micélio e esporos do fungo devido à falta de mobilidade das ninfas e fragilidade dos adultos. .

Durante os ensaios com ninfas não foi observada nenhuma mudança na cor do corpo e o único sintoma de micoses foi o desenvolvimento de micélio externo sobre os cadáveres após o quarto dia da aplicação (Figura 17 a e b). As ninfas de *A. woglumi* apresentaram maior mortalidade confirmada quando foram pulverizadas com o tratamento If + Silwet (66,1%), o qual diferiu significativamente de todos os demais tratamentos ($F_{5,48}=12,39$; $P < 0,05$) (Figura 18).

Nos ensaios com adultos de *A. woglumi* foi possível observar a fragilidade dos adultos de *A. woglumi* para todos os tratamentos aplicados, obtendo elevada mortalidade total no período inferior a três dias. Os tratamentos que apresentaram maior mortalidade confirmada

foram *If* + KBRAdj (84,8%), *If* + Silwet (64,8%) e *If* + Tween (64,5%), os quais foram estatisticamente semelhantes aos tratamentos *Bb* + Tween (39,6%) e *Bb* + KBRAdj (50,1%) sendo superiores a *Bb* + Silwet (12,4%) ($F_{5,48}=4,85$; $P<0,05$) (Figura 19).

O fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 provocou maior mortalidade confirmada para ninfas e adultos de *A. woglumi* em comparação com *B. bassiana* ESALQ-PL63. Reduzidos valores de mortalidade devido a *B. bassiana* também foram relatados por Silva et al. (2010), onde após a aplicação da concentração de $1,2 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹ foram obtidos valores de aproximadamente 30% de mortalidade para ninfas de segundo ínstar.

Os adultos de *A. woglumi* apresentaram maior suscetibilidade às aplicações dos fungos entomopatogênicos em comparação com as ninfas. Isso foi evidenciado pelo fato de que grande parte dos adultos ficaram com as asas aderidas na planta após a aplicação, com alta mortalidade já no primeiro dia de avaliação. Outros adultos de aleirodídeos também foram considerados mais suscetíveis do que as ninfas, como foi reportado por Mascarin et al. (2013) para *Bemisia tabaci* biótipo B. Neste caso o fungo *I. fumosorosea* CG 1228, foi aplicado na concentração de 1×10^7 conídios.mL⁻¹ (150 conídios. mm⁻²) sobre ninfas de segundo ínstar e os adultos de *Bemisia tabaci* biótipo B causando mortalidade de 93% em adultos e aproximadamente 75% para ninfas. Diante disso, os resultados obtidos por Mascarin et al. (2013) para o fungo *I. fumosorosea* reforçam ainda mais a eficiência deste fungo entomopatogênicos para o controle microbiano de aleirodídeos, como *A. woglumi*.

Figura 17 - Ninfas de *Aleurocanthus woglumi* esporuladas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (A) e *B. bassiana* ESALQ-PL63 (B)

Figura 18 - Mortalidade confirmada (%) $\pm$ EP de ninfas de segundo e terceiro instar de *Aleurocanthus woglumi*, após a aplicação dos adjuvantes (Tween, KBRAdj e Silwet) isoladamente e associados aos fungos *I. fumosorosea* (If) e *B. basssiana* (Bb) a 25 ± 2 °C, 75-80% UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Figura 19 - Mortalidade confirmada (%) $\pm$ EP de adultos de *Aleurocanthus woglumi*, após a aplicação dos adjuvantes (Tween, KBRAdj e Silwet) isoladamente e associados aos fungos *I. fumosorosea* (If) e *B. basssiana* (Bb) a 25 ± 2 °C, 75-80% UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

2.3.1.4 Patogenicidade sobre ninfas e adultos de *Praelongorthezia praelonga*

Após a aplicação dos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* e *B. bassiana* nas ninfas de segundo ou terceiro instar de *P. praelonga* foi observado os maiores valores de mortalidade total nos tratamentos com *Bb* + Silwet (66,9%), *If* + Silwet (56,4%) e Silwet (49,9%), os quais diferiram estatisticamente dos demais tratamentos ($F_{9,80}=56,35$; $P<0,05$). Apenas o tratamento *If* + Silwet apresentou mortalidade confirmada (1,3%), o qual foi significativamente semelhante aos demais tratamentos ($F_{5,48}=10,65$; $P>0,05$) (Figura 20).

Os valores de mortalidade total e confirmada para adultos de *P. praelonga* foram estatisticamente semelhantes para todos os tratamentos, tanto para mortalidade total ($F_{9,80}=4,04$; $P>0,05$) quanto para confirmada ($F_{5,48}=7,46$; $P>0,05$). Os únicos tratamentos que apresentaram confirmação foram *I. fumosorosea* + Tween (1%) e *I. fumosorosea* + Silwet (4,6%) (Figura 22).

Os tratamentos contendo Silwet foram os que mais se destacaram. O fungo *B. bassiana* ESALQ-PL63 não foi patogênico para ninfas e adultos *P. praelonga*, entretanto, *I. fumosorosea* ESALQ-1296 apesar de apresentar baixa virulência, mostrou ser patogênico para ninfas e adultos de *P. praelonga*. Tanto ninfas como adultos de *P. praelonga* infectados com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 apresentaram desenvolvimento externo do fungo com a observação de estruturas reprodutivas sobre o corpo (Figura 21 a e b).

Apesar do fungo entomopatogênico *B. bassiana* ser patogênico para muitas espécies de insetos pragas, Garcia (2005) relatou que 16 dos isolados testados não foram patogênicos para *P. praelonga*, dentre eles, o isolado *B. bassiana* ESALQ-PL63. A ausência de patogenicidade do isolado *B. bassiana* ESALQ-PL63 e a baixa virulência do isolado *I. fumosorosea* ESALQ-1296 pode ser resultante das características próprias do isolado como também, pela estruturação da cutícula do corpo dos insetos.

Estes insetos apresentam uma grande camada cerosa que serve como barreira física e dificulta a penetração do tubo germinativo ou germinação dos conídios desses fungos. Esse efeito na germinação já foi relatado para várias espécies de insetos, por exemplo, ninfas de *Bemisia tabaci* (JAMES et al., 2003), e lagartas de lepidópteros (SAITO; AOKI, 1983). Em contrapartida, outros fungos entomopatogênicos destacando isolado de *Lecanicillium spp.* são capazes de provocar elevada mortalidade de *P. praelonga* (GARCIA, 2004). Uma das alternativas para o desenvolvimento do fungo sobre o corpo de *P. praelonga* vista por Garcia (2004), seria a penetração do patógeno via tegumento do tarso.

A combinação dos fungos com os adjuvantes poderia ser alternativa para potencializar a ação dos fungos através da remoção das ceras, favorecendo a penetração do tubo germinativo. Contudo, neste estudo não foi observado que os KBRAdj e Silwet foram capazes de aumentar a infecção e esporulação dos fungos entomopatogênicos, sugerindo assim que os fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 não são bons agentes de controle para *P. praelonga*.

Figura 20 - Mortalidade total e confirmada (%) $\pm$ EP de ninfas de segundo e terceiro instar de *Praelongorthezia praelonga*, após a aplicação dos adjuvantes (Tween, KBRAdj e Silwet) isoladamente e associados aos dos fungos *I. fumosorosea* (If) e *B. bassiana* (Bb) a 25 ± 2 °C, 75-80% UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Figura 21 - Ninfas (A) e adulto (B) de *Praelongorthezia praelonga* esporulada(s) com *I. fumosorosea* ESALQ-1296

Figura 22 - Mortalidade total e confirmada (%) $\pm$ EP de adultos de *Praelongorthezia praelonga*, após a aplicação dos adjuvantes (Tween, KBRAdj e Silwet) isoladamente e associados aos fungos *I. fumosorosea* (If) e *B. bassiana* (Bb) a 25 ± 2 °C, 75-80% UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P<0,05$)

2.3.1.5 Patogenicidade a adultos de *Brevipalpus phoenicis*

A mortalidade total de adultos de *B. phoenicis* foi maior para os tratamentos com Silwet (95,8%), *Bb* + Silwet (95,8%) e *If* + Silwet (92,5%), os quais foram significativamente diferentes dos tratamentos *If* + Tween (61,7%), Água + Tween (57,5%), *Bb* + Tween (55%) e controle (9,2%), não diferindo dos demais tratamentos ($F_{9,110}=17,10$; $P<0,05$) (Figura 23). Os maiores valores de mortalidade confirmada foram relatados na aplicação com *Bb* + Silwet (41,7%), *Bb*+ KBRAdj (26,7%) e *Bb* + Tween 80 (25%), os quais diferiram estatisticamente dos tratamentos onde foi aplicado *I. fumosorosea* ESALQ-1296, ($F_{5,66}=7,82$; $P<0,05$) (Figura 23).

Com os resultados obtidos, foi possível verificar que para cada adjuvante utilizado foram encontrados resultados diferentes de mortalidade, possibilitando afirmar que os adjuvantes foram os principais causadores da mortalidade dos ácaros. Apesar da confirmação satisfatória da esporulação dos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 sobre os cadáveres de *B. phoenicis* (Figura 24), os níveis de

esporulação não foram tão expressivos (<10% e 42%, respectivamente) quando comparado com os insetos *D. citri* e *T. citricida*.

A maioria dos indivíduos mortos foi encontrada no primeiro dia após a aplicação, onde os ácaros que sobreviveram apresentaram alguns sintomas visuais de infecção fúngica, como por exemplo, alteração na coloração do tegumento e redução na movimentação com enrijecimento ventral das pernas. No último dia de avaliação (quinto) alguns ácaros apresentaram o desenvolvimento micelial e início de conidiogênese (Figura 24).

Resultados similares foram encontrados por Rossi-Zalaf e Alves (2006) avaliando a patogenicidade de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos dos gêneros *Beauveria* e *Isaria* sobre adultos de *B. phoenicis*. Esses autores relataram que os isolados fúngicos apresentaram valores inferiores a 22,45% para a mortalidade corrigida e o isolado ESALQ-PL63 apresentou apenas 7,5% de mortalidade confirmada no sexto dia de avaliação. Cavalcanti et al. (2008) também reportaram valores similares para esse ácaro utilizando concentração de 10^8 conídios. ml^{-1} de *B. bassiana*. Em contrapartida, o fungo *B. bassiana* foi considerado por Alves et al. (2005) como promissor para o controle microbiano do ácaro da ferrugem dos citros *Phyllocoptruta oleivora*, onde na concentração de 5×10^6 conídios. mL^{-1} provocou valores de mortalidade de 62% nestes ácaros. Eficácia semelhante foi encontrada por Nugroho e Ibrahim (2004) para o ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* também importante praga dos citros.

Além das espécies de fungos *I. fumosorosea* e *B. bassiana*, outras espécies tem apresentado ótimos resultados para o controle do ácaro *B. phoenicis*, destacando-se o gêneros *Lecanicillium* e *Hirsutella* (ROSSI-ZALAF et al., 2008; CAVALCANTI et al., 2008). No entanto, uma das principais dificuldades desses gêneros, segundo esses autores, é a produção dos propágulos infectivos em grande escala.

Apesar do número reduzido de ácaros de *B. phoenicis* com esporulação dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296, os cadáveres esporulados de *B. phoenicis* poderiam ser uma importante fonte de inóculo para ocorrência de novos ciclos de infecção e transmissão horizontal entre indivíduos esporulados e não infectados. Podendo também favorecer a transmissão horizontal para outras espécies de ácaros pragas que vivem no mesmo nicho como o caso de *P. oleivora* e *P. latus*.

Figura 23 - Mortalidade total e confirmada (%) $\pm$ EP de adultos de *Brevipalpus phoenicis*, após a aplicação dos adjuvantes (Tween, KBRAdj e Silwet) isoladamente e associados aos fungos *I. fumosorosea* (If) e *B. bassiana* (Bb) a 25 ± 2 °C, 75-80% UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Figura 24 - Adulto de *Brevipalpus phoenicis* esporulado com *B. bassiana* ESALQ-PL63

2.3.1.6 Patogenicidade a adultos de *Panonychus citri*

As maiores porcentagens de mortalidade total foram encontradas nos tratamentos com Silwet (99,2%), If + Silwet (98,3%), If + KBRAdj (96,7%), KBRAdj (93,3%), Bb + Silwet (92,7%) e Bb + KBRAdj (80,9%), que diferiram estatisticamente dos tratamentos If + Tween (53,3%), água + Tween (41,7%), Bb + Tween (55,8%) e controle (22,5%) ($F_{9, 110} = 22,84$; $P < 0,05$) (Figura 25). Os valores de mortalidade confirmada dos tratamentos não diferiram estatisticamente entre eles ($F_{5, 66} = 5,13$; $P > 0,05$), embora o tratamento If + KBRAdj tenha apresentado o maior valor de mortalidade (23,3%) (Figura 25).

Apesar da baixa confirmação apresentada pelos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296, os autores SHI e FENG, (2006) observaram bons resultados para os adultos de *P. citri* com os isolados de *B. bassiana* provenientes da China. Além desse ácaro, o fungo *B. bassiana* tem sido eficaz no controle de outros ácaros tetranychideos, entre eles *Tetranychus cinnabarinus* (SHI e FENG, 2004), *Tetranychus urticae* (DRAGAHOVA; SIMOVA, 2010; TAMAI et al., 2002), e *Tetranychus evansi* (WEKESA et al., 2006). Resultados promissores também foram observados para *I. fumosorosea* no controle de ovos e adultos de *Tetranychus cinnabarinus* (SHI; FENG, 2004; SHI et al., 2008).

Figura 25 - Mortalidade total e confirmada (%) $\pm$ EP de adultos de *Panonychus citri*, após a aplicação dos adjuvantes (Tween, KBRAdj e Silwet) isoladamente e associados aos fungos *I. fumosorosea* (If) e *B. bassiana* (Bb) a 25 ± 2 °C, 75-80% UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

2.3.2 Esporulação dos cadáveres

A capacidade de crescer e esporular dos isolados *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 foi avaliada nas seis espécies de pragas estudadas. A quantidade de conídios nos cadáveres diferiram significativamente de acordo com os isolados e as espécies de pragas ($F_{8, 27}=87,49$; $P < 0,05$) (Tabelas 3 e 4). O fungo entomopatogênico *B. bassiana* ESALQ-PL63 apresentou maior produção de conídios quando comparado com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 para adultos de *A. woglumi* e *B. phoenicis*, como assim também para ninfas de

T. citricida. Entretanto, o fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 causou maior esporulação em adultos de *T. citricida*, *P. praelonga* e *P. citri*. A esporulação de *I. fumosorosea* embora não analisado estatisticamente correspondeu a 74%, 43% e 169% de *B. bassiana* para ninfas de *T. citricida*, *A. woglumi* e *D. citri*.

Além da capacidade de produção de conídios dos fungos entomopatogênicos, o tamanho da espécie praga pode ter sido um dos fatores que determinaram a esporulação, devido à quantidade de nutrientes e água disponível em cada cadáver para o desenvolvimento dos entomopatógenos. Luz e Fargues (1998) constatou isso na esporulação de *B. bassiana* sobre cadáveres de *Rhodnius prolixus*, onde o tamanho e os estágios de desenvolvimento do inseto influenciaram na esporulação desse fungo entomopatogênico. O mesmo foi descrito por Sosa-Gómez e Alves (2000) para o inseto *Piezodorus guildini* e Santiago-Álvarez et al. (2006) para *Bemisia tabaci*, sendo demonstrado que além da espécie hospedeira e fase do hospedeiro, muito outros fatores podem afetar na esporulação de fungos entomopatogênicos, destacando-se a composição do hospedeiro, teor de água e área não esclerotizada.

A quantificação da esporulação de fungos entomopatogênicos em um hospedeiro é fundamental para simulação de modelos epizooticos (SUJII et al., 2002), fator que interfere na disseminação, transmissão horizontal dos conídios e desenvolvimento do ciclos secundários de infecção. De acordo com Thomas et al. (1995) o potencial epizootico dos fungos entomopatogênicos não depende apenas da capacidade infectiva, mas também da intensidade de esporulação no cadáver do hospedeiro. Portanto, se várias espécies de pragas são afetadas pelo mesmo fungo entomopatogênico e os cadáveres dessas espécies apresentarem esporulação no campo, potencializariam ainda mais a ocorrência de epizootias e o controle natural dessa praga na plantação citrícola.

Hunter et al (2011) verificou que *I. fumosorosea* apresenta um grande potencial para controle de alguns insetos pragas de citros, principalmente para hemípteros e coleópteros. Além do mais, descreveram que todos os insetos pragas avaliados apresentaram elevados níveis de esporulação quando submetidos à alta umidade relativa.

Os cadáveres esporulados de todas as espécies estudadas neste trabalho podem ser uma importante fonte de conídios para transmissão e o desenvolvimento de epizootias em plantações de citros, principalmente os adultos de *D. citri* e *T. citricida* os quais apresentaram maior produção de conídios por cadáver.

Tabela 3 - Esporulação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 e *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 em adultos *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida*, *Aleurocanthus woglumi*, *Praelongorthezia praelonga*, *Brevipalpus phoenicis* e *Panonychus citri*, após colocados por cinco dias em câmara úmida a 26 ± 1 °C, 100% de UR e fotofase de 12 h

Fungos	Praga	E. M x 10 ⁴ / cadáver ± EP*	Tamanho da praga (mm)
<i>B. bassiana</i>	<i>D. citri</i>	414,63 ± 44,83 a	3-4 ⁽¹⁾
	<i>T. citricida</i>	106,62 ± 3,72 c	1,1 -2,8 ⁽²⁾
	<i>A.woglumi</i>	35,00 ± 2,69 c	1,03-1,44 ⁽³⁾
	<i>B. phoenicis</i>	2,29 ± 0,16 f	0,28 ⁽¹⁾
	<i>P. praelonga</i>	-	2,5-4,5 ⁽⁴⁾
	<i>P. citri</i>	-	0,45 ⁽¹⁾
<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. citricida</i>	319,74 ± 26,75 b	3-4 ⁽²⁾
	<i>D. citri</i>	302,36 ± 22,15 ab	1,1 -2,8 ⁽¹⁾
	<i>P. praelonga</i>	182, 31 ± 27,76 bc	2,5-4,5 ⁽⁴⁾
	<i>A. woglumi</i>	16,34 ± 1,70 d	1,03-1,44 ⁽³⁾
	<i>P. citri</i>	8,30 ± 0,51 e	0,28 ⁽¹⁾
	<i>B. phoenicis</i>	-	0,45 ⁽¹⁾

* Esporulação média (E.M) x 10⁴ conídios/ cadáver ± Erro Padrão (EP). Médias seguidas pela mesma letra não diferiram estaticamente (teste de Tukey, $P < 0,05$)

“-“ Número de cadáveres esporulados insuficiente para quantificação

⁽¹⁾ Gravena, 2005; ⁽²⁾ Yokomi, 2009; ⁽³⁾ Pena, 2007; ⁽⁴⁾ Carvalho, 2006

Tabela 4 - Esporulação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 e *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 em cadáveres de ninfas *Diaphorina citri*, *Toxoptera citricida*, *Aleurocanthus woglumi*, após colocados por cinco dias em câmara úmida a 26 ± 1 °C, 100% de UR e fotofase de 12 h

Fungos	Praga	E. M x 10 ⁴ / cadáver ± EP*	Tamanho da praga (mm)
<i>B. bassiana</i>	<i>T. citricida</i>	9 ± 1,83	0,6 ⁽¹⁾
	<i>A. woglumi</i>	4,11 ± 0,48	0,4 ⁽²⁾
	<i>D. citri</i>	0,91 ± 0,05	0,25 ⁽³⁾
<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. citricida</i>	6,71 ± 0,18	0,6 ⁽¹⁾
	<i>A. woglumi</i>	1,78 ± 0,07	0,4 ⁽²⁾
	<i>D. citri</i>	1,54 ± 0,01	0,25 ⁽³⁾

* Esporulação média (E.M) x 10⁴ conídios/ cadáver ± Erro Padrão (EP)

⁽¹⁾ Conceschi, 2006; ⁽²⁾ Pena, 2007; ⁽³⁾ Gravena, 2005

2.3.3 Considerações finais

Os fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 foram patogênicos para todas as espécies de pragas estudadas, com a exceção de *B.*

bassiana ESALQ-PL63 para ninfas e adultos de *P. praelonga*. Estes fungos associados ao KBRAAdj e Silwet L-77 podem ser considerados bons agentes de controle dos insetos *D. citri*, *T. citricida* e *A. woglumi*, pois apesar de os adjuvantes isoladamente apresentarem mortalidade significativa, os fungos colonizaram os hospedeiros e produziram grande quantidade de conídios. Os adjuvantes KBRAAdj e Silwet L-77 provocaram alta mortalidade, principalmente para as ninfas e as espécies de ácaros *B. phoenicis* e *P. citri*. As mortalidades dos ácaros causadas pelos fungos com adjuvantes foram semelhantes as mortalidades causadas somente pelos adjuvantes.

Já foi reportado altas mortalidades de ninfas de *D. citri* pulverizados com óleos minerais (RAE et al., 1997), adjuvantes organosiliconados como Silwet L-77 (SRINIVASON et al., 2008) e com a mistura de 0,05% de Silwet L-77 mais 2% de óleo mineral (COCCO et al., 2008), demonstrando que o adjuvante Silwet L-77 por si só apresenta elevado efeito inseticida para ninfas de *D. citri*. Segundo Purcell e Schroeder (1996), Stark e Walthall (2003) a aplicação de adjuvantes siliconados promovem a asfixia dos insetos, e esse é o principal modo de ação desses adjuvantes.

Os ácaros também são suscetíveis ao adjuvante organosiliconado Silwet L-77. Um exemplo disso foi descrito por Cowles et al. (2000), onde esse adjuvante apresentou alta toxicidade para o ácaro *T. urticae*, sendo a concentração letal (CL₅₀) de 8,61 ppm, concentrações semelhantes às utilizadas para o acaricida Abamectina que é aplicado na concentração de 5,6 a 45 ppm para o controle dessa praga. Resultados semelhantes também foram obtidos por Tipping et al. (2003) para o ácaro *T. pacificus* e pulgão *A. gossypii*, quando o Silwet L-77 foi aplicado na concentração de 0,1% provocou mortalidade superior a 93% dessas duas espécies pragas, indicando alta toxidez para diferentes espécies de pragas.

Os resultados de mortalidade de *T. citricida* pelos adjuvantes condizem com os resultados encontrados por Imai et al. (1995) para adultos *Myzus persicae*, onde foi relatada elevada mortalidade quando foi aplicado o adjuvante organosiliconado Silwet L-77 na concentração de 0,1% e acondicionados em diferentes umidades. As maiores mortalidades (99%) foram observadas quando os adultos de *M. persicae* foram acondicionados em altas umidades (90%), entretanto, menores mortalidades foram observadas quando os insetos eram submetidos à umidade relativa baixa (30%), resultando em 23,7% de mortalidade. Esses autores descrevem que o composto químico de Silwet L-77 inibe a evaporação de água do corpo do inseto e quando são mantidos em alta umidade os afídeos morrem por sufocamento. Desta forma, não se espera que a mortalidade por Silwet L-77 em campo seja significativa para a maioria destes insetos, considerando que na maioria do tempo as umidades relativas

não sejam elevadas. Isto foi confirmado por aplicações em campo de Silwet L-77 isoladamente que não resultaram em mortalidades consideráveis para adultos de *D. citri* (dados não publicados). Da mesma forma, não foram observadas mortalidades consideráveis para adultos de *D. citri* pelo KBRAdj em campo. Não há nenhum estudo sobre o efeito deste adjuvante sobre insetos. Entretanto, a combinação de KBRAdj com os fungos têm resultado em controle satisfatórios em campo para *D. citri*. Espera-se que esta combinação de KBRAdj com os fungos também tenham um efeito sinérgico para outras pragas especialmente *T. citricida* e *A. woglumi*. Além disto, os adjuvantes utilizados não afetaram a esporulação dos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 sobre os cadáveres das pragas de citros, indicando que os adjuvantes podem ser associados a esses agentes, melhorando assim a eficiência de controle. Embora muitas das comparações da mortalidade total ou confirmada não tenham sido significativamente diferentes, em geral, o isolado de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foi superior a *B. bassiana* ESALQ-PL63 para pragas importantes como *D. citri*, *T. citricida*, *A. woglumi* e *Panonychus citri*.

2.4 Conclusões

* *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foi patogênico a todas as espécies de pragas, entretanto, *B. bassiana* ESALQ-PL63 não foi patogênico somente às ninfas e adultos de *P. praelonga*;

* Os adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 foram muito tóxicos às ninfas de *D. citri*, *T. citricida* e adultos de *T. citricida*, *B. phoenicis* e *P. citri* em laboratório;

* Os fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 apresentaram alta esporulação em cadáveres adultos de *D. citri* e *T. citricida*

Referências

ALVES, S.B.; TAMAI, M.A; ROSSI, L.S.; CASTIGLIONI, E. *Beuaveria bassiana* pathogenicity to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 37, p. 117-122, 2005.

AVERY, P.B.; WEKESA, V.W.; HUNTER, W.B.; HALL, D.G.; MCKENZIE, C.L.; OSBORNE, L.S.; POWELL, C.A.; ROGERS, M.E. Effects of the *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) on reduced feeding and mortality of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, v. 21, n. 9, p. 1065-1078, 2011.

CARVALHO, R.S. Disseminação da ortézia em pomares e hortos comerciais. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 2, p. 22-28, 2006.

CAVALCANTI, R.S.; REIS, P.R.; MOINO JUNIOR, A.; ALTOÉ, B.F.; FRANCO, R.A.; CARVALHO, T.M.B. Patogenicidade de fungos entomopatogênicos a três espécies de ácaros em cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 68-75, 2008.

CHIASSEON, H.; VINCENT, C.; BOSTANIAN, N.J. Insecticidal properties of a *Chenopodium* based botanical. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v. 97, p. 1378-1383, 2004.

CHIAVEGATO, L.G. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 813-816, 1986.

COCCO, A.; HOY, M.A. Toxicity of organosilicone adjuvants and selected pesticides to the Asian citrus psyllid (Hemiptera: psyllidae) and its parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 91, p. 4, p. 610-620, 2008.

COWLES, R.S.; COWLES, E.A.; McDERMOTT, A.M.; RAMOUTAR, D. "Inert" formulation ingredients with activity: toxicity of trisiloxane surfactante solutions to twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham v. 93, n. 2, p. 180-188, 2000.

DRAGAHOVA, S.A.; SIMOVA, S.A. Susceptibility of *Tetranychus urticae* Koch. (Acari: Tetranychidae) to isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Pesticides and Phytomedicine**, Banatska, v. 24, n. 1, p. 51-57, 2010.

FUNDECITRUS. Greening chega às regiões Norte e Sul do estado. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 20, n. 124, p. 8-11, 2004.

GANDARILLA-PACHECO, F.L.; GÁLÁN-WONG, L.J.; ARROYO, J.I.; RODRÍGUEZ-GUERRA, R.; QUINTERO-ZAPATA, I. Optimization of pathogenicity tests for selection of native isolates of entomopathogenic fungi isolated from citrusgrowing areas of México on adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 96, n. 1, p. 187-195, 2013.

GARCIA, M.O.; ALVES, S.B. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga*. **Laranja**, Corderópolis, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2005.

GÓMEZ-TORRES, M.L.; NAVA, D.E.; PARRA, J.R.P., CÔNSOLI, F.L. Porcentagem de parasitismo sobre *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) e detecção de *Wolbachia* em populações de *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 21., 2006, Recife. **Resumo...** Recife: SEB, 2006. p. 82-82.

GRAVENA, S. **Manual prático de manejo ecológico de pragas dos citros**. Jaboticabal: Gravena, 2005. 372 p.

HERNÁNDEZ-TORREZ, I.; LÓPEZ-ARROYO, J.I.; BERLANGA-PADILLA, A.; LOERA-GALLARDO, J.; ACOSTA-DÍAZ, E. Efectividad de hongos entomopatógenos y vehículos de aplicación para el control del pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Vedalia**, Berkeley, v. 13, n. 1, p. 17-26, 2006.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. **Computational Statistics & Data Analysis**, Amsterdam, v. 27, p. 151-170, 1998.

HOY, M.J.; SINGH, R.; ROGERS, M.E. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v.93, p. 24-32, 2010.

HUNTER, W.B.; AVERY, P.B.; PICK, D.; POWELL, C.A. Broad spectrum potential of *Isaria fumosorosea* against insect pests of citrus. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 94, n. 4, p. 1051-1054, 2011.

JAMES, R.R.; BUCKNER J.S., FREEMAN, T.P. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 84, p. 67-74, 2003.

LEZAMA-GUITIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; CHÁVEZ-FLORES, O.; ÁNGEL-SAHAGÚN, C. A.; SKODA, S.R.; REYES-MARTÍNEZ, G.; BARBA-REYNOSO, M.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O.; RUÍZ-AGUILAR, G.M.L.; FOSTER, J.E. Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, Wallingford, v. 32, n. 1; p. 39-44, 2012.

LOUREIRO, E.S.; MOINO JR., A. Patogenicidade de fungos hifomicetos aos pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 5, p. 660-665, 2006.

LUZ, C.; FARGUES, J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 72, p. 97-103, 1998.

MAGALHÃES, B.P.; RODRIGUES, J.C.V.; BOUCIAS, D.G.; CHILDERS, C.C. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* to the false spider mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 88, n. 2, p. 195-198, 2005.

MALSAM, O.; KILIAN, M.; OERKE, E.C.; DEHNE, H.W. Oils for increased efficacy of *Metarhizium anisopliae* to control whiteflies. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 12, p. 337-348, 2002.

MASCARIN, G.M.; KOBORI, N.N.; QUINTELA, E.D.; DELALIBERA JÚNIOR, I. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera; Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 66, p. 209-218, 2013.

MEYER, J.M.; HOY, M.A.; BOUCIAS, D.G. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 99, p. 96-102, 2008.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society Series A (General)**, London, v. 135, n. 3, p. 370-384, 1972.

NUGROHO, I.; IBRAHIM, Y.B. Laboratory bioassay of some entomopathogenic fungi against broad mite (*Polyphagotarsonemus latus* Bank). **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 6, n. 2, p. 223, 225, 2004.

PADULLA, L.F.L.; ALVES, S.B. Suscetibilidade de ninfas de *Diaphorina citri* a fungo entomopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, p. 297-302, 2009.

PENA, M.R. **Biologia da mosca negra-dos- citros *Aleurocanthus woglumi* Ashby 1915 (Hemiptera: Aleyrodidae) em três hospedeiros e uso do fungo *Aschersonia* sp., como agente entomopatogênico**. 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Sustentabilidade na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

PINTO, A.P.F.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; WENZEL, I.M. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psíldeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1673-1680, 2012.

PURCELL, M.F.; SCHROEDER, W.J. Effect of Silwet L-77 and Diazinon on three tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae) and associated endoparasitoids. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, p. 1566-1570, 1996.

R DEVELOPMENT CORE TEAM: versão 3.0. 2013. Disponível em: <<http://r-development-core-team.software.informer.com>>. Acesso: 10 mar. 2013.

RAE, D.J.; LIANG, W.G.; WATSON, D.M.; BEATTIE, G.A; HUANG, M.D. Evaluation of petroleum spray oils for control of the Asian citrus psylla, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae), in China. **International Journal of Pest Management**, London, v. 43, n. 1, p. 71- 75, 1997.

ROSSI-ZALAF, L.S. **Controle microbiano de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) com *Hirsutella thompsonii* Fisher**. 2007. 125 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B. Susceptibility of *Brevipalpus phoenicis* to entomopathogenic fungi. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 40, p. 37-47, 2006.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B.; VIEIRA, S.A. Efeito de meios de cultura na virulência de *Hirsutella thompsonii* (Fischer) (Deuteromycetes) para o controle *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)(Acari: Tenuipalpidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 312-320, 2008.

SAITO, T.; AOKI, J. Toxicity of free fatty acids on the larval surfaces of two lepidopterous insects towards *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill. and *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize) brown et Smith (Deuteromycetes: Moniliales). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 18, n. 2, p. 225-233, 1983.

SANTIAGO-ÁLVAREZ, A.; MARANHÃO, E.A.; MARANHÃO, E.; QUESADA-MORAGA, E.A. Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Bemisia tabaci* and its sporulation on cadavers. **BioControl**, Dordrecht, v. 51, p. 519-532, 2006.

SHI, W.B.; FENG, M.G. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. **Biological Control**, Orlando, v. 30, p. 165-173, 2004.

_____. Field efficacy of application of *Beauveria bassiana* formulation and low rate pyridaben for sustainable control of citrus red mites *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) in orchards. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 210-217, 2006.

SHI, W.B.; ZHANG, L.; FENG, M.G. Time-concentration-mortality responses of carmine spider mite (Acari: Tetranychidae) females to three hypocrealean fungi as biocontrol agents. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 495-501, 2008.

SILVA, L.B.; RONCHI-TELES, B.; PENA, M.R. Avaliação do efeito de diferentes concentrações de inóculo de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre a mosca-negra-dos-citros, *Aleurocanthus woglumi* (Hemiptera: Aleyrodidae) em laboratório. XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM, 2010.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B. Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 515-521, 2000.

SRINIVASAN, R.; HOY, M.A.; SINGH, R.; ROGERS, M.E. Laboratory and field evaluations of Silwet L-77 and kinetichalone and in combination with imidacloprid and abamectin for the management of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 91, p. 1, p. 87-100, 2008.

STARK, J.D.; WALTHALL, W.K. Agricultural adjuvants: acute mortality and effects on population growth rate of *Daphnia pulex* after chronic exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 22, n. 12, p. 3056-3061, 2003.

STOETZEL, M.B. Aphids (Homoptera: Aphididae) of potential importance on Citrus in the United States with illustrated keys to species. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, Washington, v. 96, p. 74-90, 1994.

SUJII, E.R.; CARVALHO, V.A.; TIGANO, M.S. Cinética da esporulação e viabilidade de conídios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre cadáveres da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), em condições de campo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 85-90, 2002.

TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M., FAION, M. Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae* Kock (Acari: Tetranychidae). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 77-84, 2002.

THOMAS, M.B.; WOOD, S.N.; LOMER, C.J. Biological control of locusts and grasshoppers using a fungal pathogen: the importance of secondary cycling. **Proceedings of the Royal Society London**, London, v. 259, p. 265-270, 1995.

TIPPING, C; BIKOBA, V.; CHANDER, G.J.; MITCHAM, E. J. Efficacy of Silwet L-77 against several arthropod pests of table grape. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, n. 1, p. 246-250, 2003.

VIMALA DEVI, P.S.; PRASAD, Y.G. Compatibility of oils and antifeedants of plant origin with the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 68, p. 91-93, 1996.

WEKESA, V.W.; KNAPP, M.; MANIANIA, N.K.; BOGA, H.I. Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 130, n. 3, p. 155-159, 2006.

YAMAMOTO, P.T. **Manejo integrado de pragas dos citros**. Araraquara: FUNDECITRUS, 2008. 336 p.

YOKOMI, R.K. The brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. **Options Méditerranéennes**, Bari, n. 65, p. 35-46, 2009.

3 TRANSMISSÃO HORIZONTAL DE *Isaria fumosorosea* E *Beauveria bassiana* DE CADÁVERES ESPORULADOS DE *Diaphorina citri* E *Toxoptera citricida* PARA ADULTOS DE *Diaphorina citri* EM LABORATÓRIO E SEMI-CAMPO

Resumo

Os fungos entomopatogênicos destacam-se pela capacidade de infectar e desenvolver epizootias naturais sobre artrópodes. A transmissão de conídios entre indivíduos é uma característica importante dos fungos entomopatogênicos para o estabelecimento de novos ciclos de infecção. Estudos recentes têm mostrado que *Beauveria bassiana* (Bb) e *Isaria fumosorosea* (If) são promissores para o controle de *Diaphorina citri*. Esse trabalho avaliou a capacidade de transmissão horizontal de *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 entre adultos esporulados e sadios de *D. citri* (intra-específica) e entre cadáveres de *T. citricida* e adultos sadios de *D. citri* (inter-específica) em condições de laboratório e semi-campo. No experimento de laboratório, foram utilizadas plantas de citros de 20 cm de altura plantadas em tubetes, as quais foram colocadas dentro de copos plásticos transparentes. Os experimentos de semi-campo foram conduzidos sobre plantas de citros de 55 cm de altura colocadas em gaiolas. A capacidade de transmissão foi avaliada após a introdução de diferentes quantidades de insetos esporulados (0, 1, 3, 5 e 10 cadáveres) com 20 adultos não infectados por planta, tendo três repetições cada tratamento. No décimo dia da introdução dos insetos, foi avaliado o número de insetos mortos e infectados. Nos experimentos de laboratório foi comprovada a transmissão intra e inter-específica, obtendo um aumento gradual na mortalidade total e confirmada passando de 51,2% para 81,9% de mortalidade para *B. bassiana* ESALQ-PL63 e de 36,2% para 68% para *I. fumosorosea* ESALQ-1296, nos tratamentos com 1 e 10 cadáveres esporulados respectivamente. Nos experimentos de semi-campo também foi observada transmissão horizontal intra-específica, apresentando uma mortalidade média de 56,7% para ambos os fungos entomopatogênicos na proporção 10:20 esporulados:não infectados. De acordo com os resultados, é possível concluir que os cadáveres esporulados de *D. citri* ou de *T. citricida* são uma importante fonte de conídios para o desenvolvimento de novos ciclos de infecção, e reciclagem dos fungos nos pomares de citros.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; Transmissão horizontal; Epizootias

Abstract

The entomopathogenic fungi stand out for their ability to infect and develop natural epizootics on arthropods. The transmission of conidia among individuals is an important feature of the entomopathogenic fungi to establish new infection cycles. Recent studies show that *Beauveria bassiana* (Bb) ESALQ-PL63 and *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 (If) are promising for the control of *Diaphorina citri*. This study evaluated the ability of horizontal transmission of these isolates between sporulated and healthy adults of *D. citri* (intraspecific) and between cadavers of *T. citricida* and healthy adults of *D. citri* (interspecific) in laboratory and semi-field conditions. In the laboratory experiment, we used citrus plants of 20 cm high, planted in tubes, which were placed in transparent plastic cups. The semi-field experiments were conducted on citrus plants with 55 cm high placed in cages. The transmission capacity was measured after the introduction of different numbers of sporulating insects (0, 1, 3, 5 and 10 cadavers) with 20 healthy adults per plant, with three replicates per treatment. On the 10th day after the introduction of insects, we evaluated the number of infected and dead insects. In

the laboratory experiments, the intra and interspecific transmission was proven, obtaining a gradual increase in total mortality and confirmed from 51.2% to 81.9% mortality to *B. bassiana* ESALQ-PL63 and from 36.2% to 68% for *I. fumosorosea* ESALQ-1296. In the semi-field experiments, we also observed intraspecific horizontal transmission, with an average mortality of 56.7% for both entomopathogenic fungi at the ratio 10:20 sporulated: uninfected. The results show that the sporulated cadavers of *D. citri* and *T. citricida* are an important source of conidia for the development of a new infection cycle, and recycling in citrus orchards.

Keywords: Entomopathogenic fungi; Horizontal transmission; epizootic

3.1 Introdução

Os fungos entomopatogênicos num habitat semi-natural ou agrossistema podem persistir em forma de conídios ou estruturas de resistência, sobre cadáveres esporulados de hospedeiros primários ou alternativos, como também, na parte aérea das plantas, no solo e na rizosfera (HESKETH et al., 2010). Entretanto, diversos fatores bióticos e abióticos podem influenciar de forma conjunta na persistência e sobrevivência dos fungos entomopatogênicos no ambiente. Dentre os fatores bióticos se encontram os microrganismos (FARGUES et al., 1983) e artrópodes (McCOY et al., 1992), e dentre os fatores abióticos se destacam a temperatura, umidade, radiação, chuva, etc (GOBLE, 2009). Os sistemas de produção agrícola (convencional ou orgânico), bem como as características do solo, também podem influenciar na sobrevivência e persistência desses patógenos no ambiente (McCOY et al., 1992). No Brasil, isso foi observado para sistemas de produção convencional e orgânico de morango (SILVA et al., 2009). Vänninen et al. (2002) avaliaram a persistência dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em diferentes tipos de solos, constatando que após três anos da aplicação do inóculo fúngico, os propágulos de *M. anisopliae* permaneceram ativos no solo, apresentando mortalidade de 80% em *Tenebrio molitor* colocados nesses solos, em contrapartida, os propágulos de *B. bassiana* desapareceram nesses solos. Hesketh et al. (2010) descreveu que os fungos entomopatogênicos e seus hospedeiros vivem em ambiente muito complexo e são influenciados por relações multitróficas, moduladas por fatores abióticos.

Umas das etapas mais importantes do ciclo de vida dos fungos entomopatogênicos, é a dispersão de seus propágulos infectivos no ambiente após a morte do hospedeiro (HAJEK; ST. LEGER, 1994). Essa capacidade de disseminação e transmissão horizontal de forma natural no ambiente é muito importante para desencadeamento das epizootias (ALVES, 1998).

A disseminação se caracteriza pela distribuição do inóculo no ambiente em todas as direções (ALVES, 1998). Os fungos Entomophthorales se caracterizam por apresentar

dispersão ativa de conídios, porque estes apresentam estruturas específicas que propagam os conídios para fora do cadáver. Em contraste, os fungos Hypocreales necessitam de agentes de disseminação externos, tais como fatores abióticos (vento, chuva ou orvalho) e fatores bióticos (hospedeiro primário ou secundário, parasitos, predadores, aves, mamíferos) (HESKETH et al., 2010; ALVES, 1998).

A transmissão de um patógeno consiste na passagem deste de uma fonte de inóculo ou de um hospedeiro infectado para outro inseto sadio ocorrendo de maneira direta ou indireta com a ajuda de agentes de disseminação (ROSSI, 2002; ALVES, 1998). Métodos alternativos para melhorar a disseminação e persistência do inóculo no campo vêm sendo estudados, principalmente para insetos, utilizando cartões coloridos (AVERY et al., 2009) ou armadilhas de auto-inoculação com atraente químico e/ou alimentar (MOTA; BALACHANDER et al., 2013). Essas técnicas visam reduzir o custo da aplicação realizada mediante a pulverização tradicional de conídios nas plantações. A técnica de auto-inoculação de entomopatógenos é de baixo custo e se baseia na disseminação e transmissão horizontal do fungo entre indivíduos co-específicos, em outras palavras, o próprio inseto ao entrar em contato com a armadilha, é contaminado com o patógeno e durante os eventos de cópula ou agregação pode transmitir o patógeno ao seu parceiro.

A disseminação e transmissão horizontal de fungos entomopatogênicos por insetos não alvos também vem sendo muito estudado. Down et al. (2009) comprovou que ocorre a disseminação dos fungos *L. longisporum* e *L. muscarium* pelo predador *Orius laevigatus* para três espécies pragas da planta de *Capsicum annuum*, e encontraram que mais de 98% dos pulgão *Myzus persicae* foram contaminados quando mantidos em discos de folhas contendo o inseto predador contaminados com conídios das duas espécies de fungos. Carrack et al. (2007) relataram que abelhas *Apis mellifera* podem ser utilizadas como transportadoras do fungo *M. anisopliae* para flores, onde os adultos do besouro *Meligethes aeneus* podem se infectar com os conídios de *M. anisopliae*. Resultados semelhantes foram encontrados por Kevan et al. (2008) para o controle de pragas das flores em canola *Brassica napus* com a utilização de *B. bassiana*.

Em citros, Avery et al. (2009) estudaram a disseminação de blastósporos de *I. fumosorosea* pulverizadas em folhas de citros ou cartões amarelos sobre *D. citri* e encontraram até 94% de mortalidade em condições laboratoriais. Moran et al. (2011) estudaram a auto-inoculação e disseminação de *I. fumosorosea* para o controle de adultos de *D. citri* utilizando cartões amarelos com blastósporos em casa de vegetação, nesses ensaios a mortalidade encontrada foi inferior a 40%.

Segundo Rossi (2002) o desencadeamento da doença em uma população de insetos ou ácaros está relacionado a fatores interdependentes, como a densidade e a distribuição espacial do hospedeiro e do patógeno, além dos aspectos intrínsecos do patógeno (infectividade, virulência e capacidade de sobrevivência) e as condições de ambiente. Outros fatores que podem influenciar na taxa de transmissão são os métodos de inoculação e as condições do inóculo (seco ou úmido) (QUESADA-MORANA et al., 2008). Em afídeos os fatores que influenciam são a movimentação do afídeo infectado, a planta hospedeira e o vento (STEINKRAUS, 2006). Molina (2007) descreveu que a movimentação de insetos visitantes, predadores e parasitóides podem favorecer a transmissão horizontal dos propágulos do fungo num sistema de produção. Esses fatores são fundamentais para promover um ciclo secundário do fungo no ambiente e aumentar a eficácia de transmissão horizontal do entomopatógeno (AVERY et al., 2010).

Em algumas espécies pragas a transmissão horizontal ocorre no solo. Um exemplo disso é a transmissão horizontal de *B. bassiana* para besouro da batata *Leptinotarsa decemlineata* (KLINGER et al., 2006; LONG et al., 2000). Segundo esses autores, as larvas de *L. decemlineata* passam sua fase imatura alimentando das folhas de batata, e no estágio prepulpa descem para superfície do solo para pupação. Nessa ocasião, as prepulpas entram em contato com cadáveres esporulados, os quais foram mortos a partir da pulverização foliar dos fungos entomopatogênicos.

A densidade populacional de indivíduos esporulados e não infectados também podem influenciar diretamente na taxa de transmissão do patógeno por meio do contato ou cópula (SVEDESE et al., 2013; QUESADA-MORAGA et al., 2008; ALVES, 1998). Furlong e Pell (2001) avaliaram a capacidade de transmissão horizontal de *B. bassiana* para adultos do lepidóptero *Plutela xylostella* e observaram que as concentrações (0,24; 2,4 e 6,2 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$) foram capazes de promover 100% de mortalidade nos adultos. No Brasil, Lopes et al. (2011) avaliaram a virulência e transmissão horizontal de *B. bassiana* sobre *Cosmopolites sordidus* e observaram que a temperatura é um fator limitante da virulência do fungo e a taxa de transmissão horizontal, obtendo 34% de mortalidade para o isolado CG-1013 após 20 dias.

A transmissão horizontal em ácaros pragas está sendo amplamente estudada. Sanjaya et al. (2013) avaliaram a transmissão horizontal em ácaros de *Tetranychus kanzawai* em mamoeiro e observaram que os fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. lilacinus* apresentaram potencial para controle e transmissão. Brooks e Wall (2005) demonstraram a transmissão horizontal do fungo *M. anisopliae* no ácaro parasita *Psoroptes*.

No Brasil há reduzido número de referências sobre a transmissão horizontal de fungos entomopatogênicos empregados para pragas de citros. Apenas Rossi (2002) avaliou a transmissão horizontal do fungo *Hirsutella* sp. de cadáveres esporulados do ácaro da leprose *B. phoenicis* para adultos sadios em condições de laboratório, e comprovaram que 93% dos ácaros introduzidos foram infectados após seis dias de exposição. A avaliação da capacidade de transmissão dos fungos entomopatogênicos entre indivíduos de uma população ou de espécies distintas é fundamental para o entendimento da ocorrência das epizootias no ambiente. Portanto, neste estudo avaliou-se a ocorrência de transmissão horizontal dos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 a partir de cadáveres esporulados de *D. citri* e *T. citricida* para adultos sadios de *D. citri* em condições de laboratório e semi-campo.

3.2. Material e Métodos

Os ensaios de patogenicidade permitiram selecionar duas espécies de pragas de citros, *D. citri* e *T. citricida*, as quais apresentaram maior mortalidade e esporulação pelos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63. Assim, optou-se por selecionar essas duas espécies pragas para os testes de transmissão horizontal em sala climatizada.

3.2.1 Obtenção de cadáveres esporulados de *Diaphorina citri* e *Toxoptera citricida*

Para a realização dos testes de transmissão horizontal necessitou-se de um número elevado de cadáveres infectados por *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63. Portanto, adultos de *D. citri* ou *T. citricida* foram colocados em plantas de laranja da variedade ‘Pera’ de um metro de altura com brotação e pulverizados com uma suspensão de 5×10^8 conídios.mL⁻¹ de cada fungo conforme descrito no item 2.2.6.1.3. Após cinco dias da aplicação, os insetos mortos foram colocados em câmara úmida para favorecer a esporulação (item 2.2.6.1.4) e os cadáveres esporulados foram utilizados nos ensaios.

3.2.2. Teste de transmissão horizontal em laboratório

Os cadáveres esporulados de adultos de *D. citri* ou de *T. citricida* foram transferidos para plantas de limão cravo (*C. limonia*) dentro de copos plásticos de 500 mL contendo *voile* utilizando agulha de insulina. Posteriormente, adultos de *D. citri* sadios foram introduzidos nas plantas com auxílio de um sugador. A capacidade de transmissão dos conídios foi avaliada após a introdução de diferentes quantidades de cadáveres de adultos esporulados 1, 3,

5 e 10 cadáver(es) com 20 insetos sadios por planta nas proporção de (1:20, 3:20, 5:20, 10:20). Os copos foram colocados sobre bandeja plástica contendo isopor (item 2.2.6.1.3), e mantidos em salas climatizadas em temperatura de 25 ± 2 °C, 80 ± 10 % UR e 12 h de fotofase.

No décimo dia após a introdução dos insetos nos copos, foi avaliado o número de insetos mortos, e posteriormente, esses foram colocados em câmara úmida para confirmar a infecção pelos patógenos. O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado com três repetições por tratamento, e repetido três vezes no tempo para os testes de transmissão entre cadáveres de *D. citri* e adultos sadios de *D. citri* e cinco vezes no tempo para os ensaios com cadáveres de *T. citricida* e adultos de *D. citri*.

3.2.3. Testes de transmissão horizontal em semi-campo

Os testes de semi-campo foram montados em plantas de laranja *Citrus sinensis*, variedade ‘Natal’ de aproximadamente 55 cm de altura, contendo sobre o substrato uma pequena camada de areia branca, para facilitar a visualização dos insetos mortos. Cada muda de laranja foi colocada sobre uma bandeja branca de 43 x 43 x 12 cm e, posteriormente, coberta com uma gaiola de arame de 62 x 31 x 31 cm contendo *voile* para que não ocorresse a fuga dos insetos. As gaiolas foram amarradas em arames de aço fixadas no solo para evitar a queda (Figura 26 a e b).

Os cadáveres esporulados de *D. citri* ou *T. citricida* foram colocados sobre as plantas, juntamente com 20 insetos sadios. As proporções utilizadas foram as mesmas empregadas nos ensaios de laboratório (1:20, 3:20, 5:20: 10:20 esporulado(s): não infectados), utilizando uma agulha de insulina para a transferência dos insetos esporulados e um sugador para os sadios. Desde o início do ensaio, foi colocado um termohigrógrafo do tipo “datalogger” para aferição da temperatura e umidade no estudo em semi-campo. Também foram observados os dados pluviométricos da estação meteorológica que se encontrava na localidade, latitude 22° 42’ 30” sul e longitude 47° 38’ 00” oeste, distante 650 metros do local do experimento. Após 10 dias da montagem dos ensaios, foram avaliados o número de insetos mortos e os aderidos na planta, tomando os mesmos procedimentos de confirmação da infecção descritos no item anterior.

Os delineamentos dos tratamentos foram inteiramente aleatorizados sendo representado por três plantas por tratamento. Cada ensaio foi montado três vezes no tempo para cadáveres de *D. citri* e duas vezes nos ensaios com cadáveres de *T. citricida* para adultos de *D. citri*.

Figura 26 – Gaiola com muda de citros utilizadas nos ensaios de transmissão horizontal de semi-campo (A e B)

3.2.4. Análises estatísticas

Nos ensaios de transmissão no laboratório e semi-campo, os dados de mortalidade e confirmação foram submetidos a análises estatísticas utilizando modelos lineares generalizados (NELDER; WEDDERBURN, 1972) do tipo binomial com ajuste quasibinomial.

Nos ensaios com *D. citri* de laboratório, foi ajustado um modelo que incluía a interação bloco e tratamento, onde os blocos consistiram nas repetições dos experimentos no tempo. Como não foi observada interação significativa, os dados foram analisados conjuntamente. Quando houve diferença significativa entre os tratamentos, foram realizados testes de comparações múltiplas (teste de Tukey, $P < 0,05$) realizados por meio da função `glht` do pacote `multcomp` com ajuste em função dos valores de “ P ”.

Para observar o comportamento de transmissão dos fungos entomopatogênicos produzidos em cadáveres de *D. citri* e *T. citricida* foram ajustados diferentes preditores lineares e o modelo mais parcimonioso foi escolhido por meio do teste de razão de verossimilhanças. O preditor linear utilizado foi o de retas coincidentes, podendo ser escrito como $\eta = \beta_0 + \beta_1 x$, sendo β_0 o intercepto, β_1 o coeficiente linear e x o número de cadáveres esporulados. A qualidade do ajuste foi verificada por meio de gráficos meio-normais com envelope simulado (HINDE; DEMÉTRIO, 1998). Todas as análises foram realizadas no software estatístico “R”, versão 3.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Transmissão horizontal em laboratório

3.3.1.1 Transmissão horizontal intra-específica (*D citri* → *D. citri*) em laboratório

Os valores de mortalidade total ($F_{8,72} = 5,516$; $P < 0,05$) e mortalidade confirmada ($F_{7,64} = 2,875$; $P < 0,05$) diferiram significativamente entre as proporções de indivíduos esporulados e sadios de *D. citri*. Após a introdução de 1, 3, 5 e 10 cadáveres esporulados pelo isolado *I. fumosorosea* ESALQ-1296 observou-se mortalidade total de 36,2% a 68%. Entretanto, quando foram introduzidos 1, 3, 5 e 10 cadáveres esporulados com *B. bassiana* ESALQ-PL63 se obtiveram valores de mortalidade total de 51,2% a 81,9%. O tratamento sem a introdução de cadáveres esporulados (controle) apresentou uma mortalidade total de 12% (Figura 27).

Os valores de mortalidade confirmada foram similares aos apresentados na mortalidade total, indicando que a maioria dos insetos mortos de *D. citri* foram infectados pelos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63. A transmissão horizontal de conídios entre indivíduos de *D. citri* foi crescente de acordo com o número de insetos esporulados introduzidos, observando que este comportamento foi igual para ambos os fungos entomopatogênicos (Figura 28).

Além dos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* e *B. bassiana* terem sido relatados como importantes agentes de controle sobre várias pragas (AVERY et al., 2010; TOLEDO, 2007; KREUTZ et al., 2004; FURLONG; PELL, 2001; LONG et al., 2000), os resultados obtidos nesta seção demonstraram que esses patógenos apresentam transmissão horizontal entre adultos de *D. citri*, sendo uma característica importante que poderia favorecer o desenvolvimento de epizootias no campo.

Figura 27 - Mortalidade total e confirmada de *Diaphorina citri* após 10 dias da introdução de diferentes números de cadáveres esporulados de *Diaphorina citri* com *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* a 25 ± 2 °C, $80 \pm 10\%$ UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Figura 28 - Modelo de ajuste para mortalidade total e *Diaphorina citri* após 10 dias da introdução de diferentes números de cadáveres esporulados de *Diaphorina citri* com *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* em temperatura de 25 ± 2 °C, $80 \pm 10\%$ UR e 12 h de fotofase

3.3.1.2 Transmissão horizontal inter-específica (*T. citricida* → *D. citri*) em laboratório

Após a introdução de 1, 3, 5 e 10 cadáveres esporulados de *T. citricida* foram obtidos valores de mortalidade total ($F_{8,18} = 4,76$; $P < 0,05$) e confirmada ($F_{7,16} = 4,40$; $P < 0,05$) que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. O isolado de *B. bassiana* ESALQ-PL63 provocou mortalidade total de 35,4% a 87,72% nas proporções de 1:20 a 10:20 esporulado:não infectado. O isolado *I. fumosorosea* ESALQ-1296 causou mortalidade total de 41,67% a 80,37% nas proporções de 1:20 a 10:20 esporulado:não infectado (Figura 29). As mortalidades confirmadas para os fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* e *B. bassiana* variaram de 38,33% a 77% e 14,52% a 65,27% respectivamente (Figura 29).

Os fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 apresentaram um comportamento semelhante de transmissão horizontal de conídios entre indivíduos de *T. citricida* e *D. citri*, observando um aumento gradual na mortalidade em função do incremento no número de cadáveres esporulados (Figura 30).

Na literatura não existem relatos de transmissão horizontal dos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* e *B. bassiana* entre duas espécies de pragas de citros, especificamente entre cadáveres de pulgões *T. citricida* e adultos de *D. citri*. Os resultados obtidos neste trabalho são relevantes e promissores porque confirmam a transferência de conídios entre duas espécies de pragas que compartilham o mesmo nicho ecológico, podendo favorecer o desenvolvimento de novos ciclos de infecção e a ocorrência de epizootias na cultura dos citros.

Figura 29 - Mortalidade total e confirmada de *Diaphorina citri* após 10 dias da introdução de diferentes números de cadáveres esporulados de *Toxoptera citricida* com *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* em temperatura de 25 ± 2 °C, $80 \pm 10\%$ UR e 12 h de fotofase (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Figura 30 - Modelo de ajuste para mortalidade de adultos de *Diaphorina citri* após 10 dias da introdução de números diferentes de cadáveres esporulados de *Toxoptera citricida* com *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* em temperatura de 25 ± 2 °C, $80 \pm 10\%$ UR e 12 h de fotofase

3.3.2 Transmissão horizontal em semi-campo

3.3.2.1 Transmissão horizontal intra-específica (*D citri* → *D. citri*) em semi-campo

Nos ensaios de semi-campo, os fungos *I. fumosorosea* e *B. bassiana* foram transmitidos horizontalmente entre cadáveres esporulados e adultos sadios de *D. citri* (Tabela 5). Esse fato foi comprovado pela presença de adultos esporulados nas plantas (Figura 31 a e b), o qual foi favorecido pela elevada umidade durante todo o período do experimento.

No primeiro (15/03/2013) e segundo (27/03/2013) ensaio, os valores de mortalidade total provocado pelos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *I. fumosorosea* foram semelhantes em todas as proporções de insetos, não obtendo diferença estatística (primeiro ensaio: $F_{8,18}=1,55$; $P>0,05$; segundo ensaio $F_{8,18}=0,58$; $P>0,05$) (Tabela 5). Nesses ensaios também foi observado alta mortalidade no controle, provocado possivelmente pelas altas temperaturas máximas no primeiro ensaio e elevadas precipitações no segundo ensaio.

O terceiro ensaio (12/04/2013) foi o que expressou melhores resultados, obtendo uma mortalidade total no controle de 8,3%. Os tratamentos com 3, 5 e 10 cadáveres esporulados com *B. bassiana* provocaram uma mortalidade total de 53,3%, 58,3%, 56,7%,

respectivamente. Da mesma forma, nos tratamentos com 3, 5 e 10 cadáveres esporulados com *I. fumosorosea* foi observado porcentagem de mortalidade total de 51,7%, 31,7%, 56,7%, respectivamente (Tabela 5). Os valores de mortalidade total para cada proporção de insetos não foram significativamente diferente em ambos os fungos ($F_{8, 18} = 2,28$; $P > 0,05$), isso pode ser explicado pela alta variabilidade dos resultados dentro de cada tratamento. Nos tratamentos com só um cadáver, foi observada baixa transmissão horizontal para *B. bassiana* (26,7%) e *I. fumosorosea* (16,7%).

Diferentemente dos ensaios em laboratório, em semi-campo parte dos insetos mortos não ficaram aderidos a planta e não foi possível determinar a mortalidade confirmada. Desta forma, apresentamos somente a mortalidade confirmada parcial com os indivíduos que ficaram aderidos a planta. As porcentagens de insetos mortos e aderidos nas plantas foram crescentes quando introduzido um maior número de cadáveres esporulados (Tabela 5), entretanto, todos os tratamentos foram semelhantes estatisticamente nos ensaios do dia 15/03/2013 ($F_{7, 16} = 3,41$; $P > 0,05$), do dia 27/03/2013 ($F_{7, 16} = 1,28$; $P > 0,05$) e do dia 12/04/2013 ($F_{7, 16} = 1,69$; $P > 0,05$).

Os dados aqui obtidos, foram similares aos encontrados CHOW et al. (2013), único trabalho que demonstrou a transmissão horizontal de *I. fumosorosea* sobre adultos e ninfas de *D. citri* em casa de vegetação. De acordo com os autores quando foi introduzido 1 ou 2 cadáveres esporulados de adultos de *D. citri* por *voile* contendo adultos não infectados de *D. citri*, obtiveram média de 39% de mortalidade para as duas proporções. Mortalidade superior foi encontrada em ninfas de *D. citri* (entre 50 a 83%). Segundo esses autores tanto para os adultos quando para as ninfas não foi observada nenhuma diferença na mortalidade ou na transmissão para as duas proporções de cadáveres esporulados com o fungo entomopatogênico *I. fumosorosea*, mostrando a similaridade que obtivemos para as proporções de 1 e 3 cadáveres.

Os cadáveres aderidos nas plantas são considerados de suma importância para a transmissão e desenvolvimento de novos ciclos de infecção pelos fungos entomopatogênicos em adultos de *D. citri*. Portanto, cadáveres esporulados aumentam a probabilidade dos insetos não infectados entrarem em contato com os propágulos do entomopatógeno através do contato direto ou disseminação pelo vento, e assim, aumentar a incidência da doença no campo.

O potencial de transmissão horizontal dos fungos entomopatogênicos aqui estudados ressalta ainda mais a sua importância para as aplicações desses fungos em larga escala. Embora ainda necessite de mais estudos, principalmente para avaliar as contribuições que os propágulos desses fungos entomopatogênicos possam ter em grandes cultivos citrícolas onde

aplicações de pesticidas químicos especialmente fungicidas são feitas com frequência, aqui revelamos que os fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* e *B. bassiana* podem apresentar papel importante como agente regulador de populações de *D. citri*.

Figura 31 - Adultos de *Diaphorina citri* mortos por *B. bassiana* transmitidos horizontalmente em semi-campo, mortos e aderidos pelo aparato bucal (A) e esporulado (B)

Tabela 5 - Experimentos de transmissão horizontal entre cadáveres esporulados e adultos não infectados de *Diaphorina citri* em semi-campo

Experimentos	Tratamentos	Nº de Cadáveres	Mortalidade (%) $\pm$ (EP) [#]	Insetos mortos na planta (%) $\pm$ (EP) [#]	T(°C) *			U.R (%)**			P (mm)***
					Mín.	Med.	Máx.	Mín.	Med.	Máx.	
15/03/2013	Controle	0	46,5 $\pm$ 11,3	0							
		1	58,3 $\pm$ 8,36	3,3 $\pm$ 1,9							
	<i>I. fumosorosea</i>	3	48,3 $\pm$ 8,4	16,7 $\pm$ 2,5							
		5	56,7 $\pm$ 3,5	20 $\pm$ 2,9							
		10	63,3 $\pm$ 2,5	20 $\pm$ 4,4	15,4	25,1	43,5	34,7	74,7	96,8	15,5
	<i>B. bassiana</i>	1	76,7 $\pm$ 6,9	0							
		3	75,7 $\pm$ 7,5	15 $\pm$ 3,3							
		5	81,7 $\pm$ 3,5	13,3 $\pm$ 3,5							
		10	88,3 $\pm$ 4,2	21,7 $\pm$ 3,5							
27/03/2013	Controle	0	66,7 $\pm$ 7,7	0							
		1	83,3 $\pm$ 4,8	5 $\pm$ 0							
	<i>I. fumosorosea</i>	3	63,3 $\pm$ 5,9	26,7 $\pm$ 5,4							
		5	80 $\pm$ 1,7	5 $\pm$ 2,9							
		10	78,3 $\pm$ 1,9	25 $\pm$ 6	17	23,4	39	40,9	81,6	96,7	129,5
	<i>B. bassiana</i>	1	66,7 $\pm$ 8,4	6,7 $\pm$ 1,9							
		3	76,7 $\pm$ 5,1	8,3 $\pm$ 3,5							
		5	73,3 $\pm$ 9,2	11,7 $\pm$ 5,4							
		10	61,7 $\pm$ 8,1	15 $\pm$ 0							
12/04/2013	Controle	0	8,3 $\pm$ 4,8	0							
		1	16,7 $\pm$ 4,2	5 $\pm$ 2,9							
	<i>I. fumosorosea</i>	3	51,7 $\pm$ 12,6	11,7 $\pm$ 4,2							
		5	31,7 $\pm$ 6,9	11,7 $\pm$ 4,2							
		10	56,7 $\pm$ 1	18,3 $\pm$ 7,7	9,8	22,4	38,9	34,4	78,4	97,2	35,01
	<i>B. bassiana</i>	1	26,7 $\pm$ 5,1	1,7 $\pm$ 1,1							
		3	53,3 $\pm$ 10,6	3,3 $\pm$ 1,9							
		5	58,3 $\pm$ 8,2	8,3 $\pm$ 1							
		10	56,7 $\pm$ 4,8	20 $\pm$ 1,7							

[#] Porcentagem de insetos aderidos na planta e esporulados, sendo que os insetos que não ficaram aderidos após a morte não foi possível confirmar a esporulação pelo fungo. Média não diferiram estaticamente pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

* Temperatura (T°C); ** Umidade Relativa (UR); *** Precipitação de chuva (P)

3.3.2.2 Transmissão horizontal inter-específica (*T. citricida* → *D. citri*) em campo

A mortalidade total de adultos de *D. citri* ocasionada pela introdução dos cadáveres de *T. citricida* não apresentou diferença estatística entre os tratamentos no primeiro ensaio (20/04/2013) ($F_{8, 18}=0,7016$; $P>0,05$) e no segundo ensaio (03/05/2013) ($F_{8, 18}=1,3791$; $P>0,05$) (Tabela 6). A transmissão dos fungos *I. fumosorosea* e *B. bassiana* não foi observada, pelo fato dos insetos mortos não serem encontrados aderidos à planta ou na gaiola de confinamento.

Em todos os experimentos de semi-campo foram encontradas duas espécies de formigas, a *Brachymyrmex* sp. (Figura 32 b) e a *Dorymyrmex* sp. (Figura 32 c) que permaneceram sobre as plantas durante o período dos experimentos (Figura 32 a). Essas formigas foram encontradas carregando insetos de *D. citri* mortos sem esporular, e no final do experimento foram observadas algumas delas mortas na gaiola. Assim, as formigas mortas foram colocadas em câmara úmida, e foi comprovada a infecção pelos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* e *B. bassiana* (Figura 32 b e c).

Figura 32 - Adultos de formigas em torno do cadáver esporulado de *D. citri* (A), formiga *Brachymyrmex* sp. esporulada por *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 (B) e a formiga *Dorymyrmex* sp. por *Beauveria bassiana* (C)

Tabela 6 - Experimentos de transmissão horizontal dos fungos *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 e *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 com cadáveres de *Toxoptera citricida* e adultos sádios de *Diaphorina citri*

Experimentos	Tratamentos	Nº de Cadáveres	Mortalidade (%) $\pm$ (EP) [#]	T(°C) *			U.R (%)**			P (mm)***
				Mín.	Med.	Máx.	Mín.	Med.	Máx.	
20/04/2013	Controle	0	35 $\pm$ 13							
		1	56,7 $\pm$ 11,1							
	<i>I. fumosorosea</i>	3	60 $\pm$ 13,2							
		5	30 $\pm$ 6,7							
		10	46,7 $\pm$ 5,9	10,8	22,1	41,4	27,2	74,3	96,1	0
	<i>B. bassiana</i>	1	68,3 $\pm$ 15,5							
		3	48,3 $\pm$ 5,4							
		5	63,3 $\pm$ 10,2							
		10	76,7 $\pm$ 5,1							
03/05/2013	Controle	0	26,7 $\pm$ 15,4							
		1	71,7 $\pm$ 10							
	<i>I. fumosorosea</i>	3	11,7 $\pm$ 6,7							
		5	65 $\pm$ 10,1							
		10	56,7 $\pm$ 15,5	4,7	19,9	41,1	25	74,3	96,4	0
	<i>B. bassiana</i>	1	61,7 $\pm$ 12,7							
		3	10 $\pm$ 2,9							
		5	48,3 $\pm$ 11,3							
		10	61,7 $\pm$ 11,1							

[#] Mortalidade média após 10 dias. Os dados não diferiram estaticamente teste de Tukey, ($P>0,05$)

* Temperatura (T°C); ** Umidade Relativa (UR); *** Precipitação de chuva (P)

3.4 Conclusões

*Os fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 foram transferidos horizontalmente de cadáveres esporulados de *D. citri* e *T. citricida* para adultos não infectados de *D. citri* em laboratório, atingindo até 81,9% de mortalidade na transmissão intra-específica e até 87% de mortalidade na transmissão inter-específica;

**I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 foram transferidos horizontalmente entre cadáveres esporulados e adultos não infectados de *D. citri* em semi-campo, apresentando mortalidade de até 58,3% para *B. bassiana* e 56,7% para *I. fumosorosea*.

Referências

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

AVERY, P.B.; QUEELY, G.L.; FAULL, J.; SIMMONDS, S.J. Effect of photoperiod and host distribution on the horizontal transmission of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) in greenhouse whitefly assessed using a novel model bioassay. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 1097-1111, 2010.

AVERY, P.B.; HUNTER, W.B.; HALL, D.G.; JACKSON, M.A.; POWELL, C.A.; ROGERS, M.E. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) under laboratory conditions. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 92, p. 608-618, 2009.

BALACHANDER, M.; REMADEVI, O.K.; SASIDHARAN, T.O. Dissemination of *Metarhizium anisopliae* infection among the population of *Odontotermes obesus* (Isoptera: Termitidae) by augmenting the fungal conidia with attractants. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, v. 16, p. 199-208, 2013.

BROOKS, A.; WALL, R. Horizontal transmission of fungal infection by *Metarhizium anisopliae* in parasitic *Psoroptes* mites (Acari: Psoroptidae). **Biological Control**, Orlando, v. 34, p. 58-65, 2005.

CARRACK, N.L.; BUTT, T.M.; CLARK, S.J.; IBRAHIM, L.; ISGER, E.A.; PELL, J.K.; WILLIAMS, I.H. Honey bees can disseminate a microbial control agent to more than one inflorescence pest of oilseed rape. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 179-191, 2007.

CHOW, A.; DULANP, C.; FLORES, D.; JACKSON, M.; MEIKE, W.; SÉTAMOU, M.; PATT, J. M. Development of a pathogen dispenser to control Asian citrus psyllid in residential and organic citrus. **Citrograph**, Fresno, v. 4, n. 1, p. 32-37, 2013.

DOWN, R.E.; CUTHBERTSON, A.G.S.; MATHERS, J.J.; WALTERS, K.F.A. Dissemination of the entomopathogenic fungi, *Lecanicillium longisporum* and *Lecanicillium muscarium*, by predatory bug, *Orius laevigatus*, to provide concurrent control of *Myzus persicae*, *Frankliniella occidentalis* and *Bemisia tabaci*. **Biological Control**, Orlando, v. 50, p. 172-178, 2009.

FARGUES, J.; REISINGER, O.; ROBERT, P.H.; AUBART, C. Biodegradation of entomopathogenic Hyphomycetes: Influence of clay coating on *Beauveria bassiana* blastospore survival in soil. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 41, p. 131-142, 1983.

FURLONG, M.J.; PELL, J.K. Horizontal transmission of entomopathogenic fungi by the Diamondback moth. **Biological Control**, Orlando, v. 22, p. 288-299, 2001.

GOBLE, T.A. **Investigation of entomopathogenic fungi for control of false codling moth, *Thaumatotibia leucotreta*, mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* and Natal fruit fly, *C. rosa* in South African Citrus**. 2009. 147 p. Tese (Master of Science) - Rhodes University, Grahamstown, 2009.

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

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

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. **Computational Statistics & Data Analysis**, Amsterdam, v. 27, p. 151-170, 1998.

KEVAN, P.G.; KAPONGO, J.P.; AL-MAZRA'AWI, M.; SHIPP, L. Honey bees, bumble bees, and biocontrol. In: JAMES, R e PITTS-SINGER, T. L. **Bee pollination in agricultural ecosystems**. Oxford: Oxford Scholarship Online, 2008. p. 64-79.

KLINGER, E.; GRODEN, E.; DRUMMOND, F. *Beauveria bassiana* horizontal infection between cadavers and adults of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **Environmental Entomology**, Lanham v. 35, n. 4, p. 992-1000, 2006.

KREUTZ, J.; ZIMMERMANN, G.; VAUPLE, O. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* among the spruce bark beetle, *Ips typographus* (Col. Scolytidae) in the laboratory and under field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 837-848, 2004.

LONG, D.W.; DRUMMOND, F.A.; GRODEN, E.; DONAHUE, D.W. Modelling *Beauveria bassiana* horizontal transmission. **Agricultural and Forest Entomology**, Oxford, v. 2, p. 19-32, 2000.

LOPES, R.B.; MICHERREFF-FILHO, M.; TIGANO, M.S.; NEVES, P.M.O.J.; LÓPEZ, E.L.; FANCELLI, M.; SILVA, J.P. Virulence and horizontal transmission of selected Brazilian strains of *Beauveria bassiana* against *Cosmopolites sordidus* under laboratory conditions. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 64, n. 2, p. 201-208, 2011.

McCOY, C.W.; STOREY, G.K.; TIGANO-MILANI, M.S. Environment factorial affecting entomopathogenic fungi in the soil. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v.27, p. 107-111, 1992.

MOLINA, J.H.G. **Efeito do controle microbiano em insetos sugadores em três sistemas de manejo de pragas de citros**. 2007. 106 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MORAN, P.J.; PATT, J.M.; CABANILLAS, H.E.; ADAMECZYK, J.L.; JACKSON, M.A.; DUNLAP, C.A.; HUNTER, W.B.; AVERY, P.B. Localized autoinoculation and dissemination of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid in south Texas. **Subtropical Plant Science**, Weslaco, v. 63, p. 23-35, 2011.

MOTA, L.H. **Desenvolvimento de armadilha de auto-inoculação para o controle de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil (Ascomycota: Hypocreales) em tecido sintético**. 2013. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

NELDER, J.A; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized Linear Models. **Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)**, London, v. 135, n. 3, p. 370-384, 1972.

QUESADA-MORAGA, E.; MARTIN-CARBALLO, I.; GARRIDO-JURADO, I.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, Orlando, v. 47, p. 115-124, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM: versão 3.0. 2013. Disponível em: <<http://r-development-core-team.software.informer.com>>. Acesso: 10 mar. 2013.

ROSSI, L.S. **Seleção de fungos entomopatogênicos e infecção de *Hirsutella* sp. em *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939)**. 2002. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SANJAYA, Y.; OCAMPO, V.R.; CAOILI, B.L. Transmission effect of entomopathogenic fungi on population of *Tetanychus kanzawai* (Kishida) (Tetranychidae: Acarina). **Arthropods**, Wanchai, v. 2, n. 1, p. 36-41, 2013.

SILVA, K.F.A.S.; MICHERREFF FILHO, M.; SILVA, J.B.T.; MARTINS, I.; ISAIAS, C.O.; RESENDE, F.V.; LIZ, R.S; BARBOZA, E.A.; MELLO, S.C.M. Dinâmica Populacional de Fungos Benéficos em Solos nos Sistemas de Cultivo Convencional e Orgânico de Morangueiro. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 5 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 60).

STEINKRAUS, D.C. Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 92, p. 125-131, 2006.

SVEDESE, V. M.; LIMA, E. A. L. A.; FIGUEIREDO, A. L. Horizontal transmission and effect of the temperature in pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 56, n. 3, p. 413-419, 2013.

TOLEDO, J.; CAMPOS, S. E.; FLORES, S.; LIEDO, P.; BARRERA, J. F.; VILLASEÑOR, A.; MONTOYA, P. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 2, p. 291-297, 2007.

VÄNNINEN, I.; TYNI-JUSLIN, J; HOKKANEN, H. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in finnish agricultural soils. **BioControl**, Dordrecht, v. 45, p. 201-222, 2000.