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

Parâmetros a serem considerados nas pulverizações do fungo *Isaria fumosorosea* para o manejo de *Diaphorina citri*

Marcos Roberto Conceschi

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2017**

Marcos Roberto Conceschi
Engenheiro Agrônomo

Parâmetros a serem considerados nas pulverizações do fungo *Isaria fumosorosea*
para o manejo de *Diaphorina citri*
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Conceschil, Marcos Roberto

Parâmetros a serem considerados nas pulverizações do fungo *Isaria fumosorosea* para o manejo de *Diaphorina citri* / Marcos Roberto Conceschi. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

134 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2017.

1. Pragas de citros 2. Controle microbiano 3. Tecnologia de aplicação 4. Fungo entomopatogênico I. Título

A Deus,

AGRADEÇO

Aos meus pais João e Cleonice

À minha noiva Glaucia

Pelo apoio e incentivo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar em todas os momentos da minha vida.

À minha família pelo apoio e incentivo. A minha noiva Glaucia pelo companheirismo, paciência e dedicação em todos os momentos.

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

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

Aos amigos Hendrie Ferreira Nunes, Fernando Martin e André Arnosti pessoas que tive a alegria de conhecer e conviver, pela sua generosidade e companheirismo.

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

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de estudo.

À Prof^ª. Dra. Clarice Garcia Borges Demétrio, Ricardo Klein pelo auxílio nas análises estatísticas e ao Prof. Dr. Wesley Augusto Conde de Godoy, José Bruno Malaquias pela colaboração nos experimentos.

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

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.

À Citrosuco, Fazenda da Toca e Fundecitrus pela parceria e apoio nos experimentos. Aos estagiários: Rodrigo Uemura, Marcos Paulo Marcuz Venier e Lucas Sartori e ex-funcionários do Fundecitrus Carlos Aberto da Silva e Rodrigo Ferreira pelo auxílio na condução dos experimentos. Ao Dr. André Arnosti pelos auxílios nos experimentos de microscopia.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 A cultura do citros no Brasil	11
1.2 Aspectos gerais de <i>Diaphorina citri</i>	12
1.3 Inimigos naturais de <i>Diaphorina citri</i>	13
1.3.1 Os fungos entomopatogênicos e sua importância no controle de <i>Diaphorina citri</i>	14
1.3.2 Potencial do fungo <i>Isaria fumosorosea</i> para o controle de <i>Diaphorina citri</i>	16
1.3.3 Importância da umidade relativa (UR) e radiação ultravioleta UV-B para os fungos entomopatogênicos	17
1.3.4 Compatibilidade de adjuvantes e fungicidas aos fungos entomopatogênicos	19
1.3.5. Seletividade de fungos entomopatogênicos a parasitoides e predadores	20
1.4 Objetivos.....	21
Referências	22
2 AÇÃO DE ADJUVANTES NA ADESÃO E GERMINAÇÃO DE <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 EM NINFAS E ADULTOS DE <i>Diaphorina citri</i>	33
Resumo	33
Abstract	33
2.1 Introdução	34
2.2 Material E Métodos.....	35
2.2.1 Criação de <i>Diaphorina citri</i>	35
2.2.2 Produção do fungo entomopatogênico <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ 1296 e preparo das suspensões fúngicas	36
2.2.3 Pulverizações e preparação de <i>Diaphorina citri</i> para a observação no microscópio eletrônico de varredura.....	37
2.2.4 Avaliação da deposição de conídios de <i>Isaria fumosorosea</i> sobre <i>Diaphorina citri</i>	38
2.3 Resultados E Discussão	38
2.3.1 Caracterização cuticular de ninfas de 1º e 3º instares e adultos de <i>Diaphorina citri</i>	38

2.3.2 Efeito dos adjuvantes sobre a cutícula de adultos e de ninfas de 1° e 3° instares de <i>Diaphorina citri</i>	41
2.3.3 Adesão e germinação de conídios de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 na mistura com diferentes adjuvantes sobre ninfas de 1° instar de <i>Diaphorina citri</i>	43
2.3.4 Adesão e germinação de conídios de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 na mistura com diferentes adjuvantes sobre ninfas de 3° instar de <i>Diaphorina citri</i>	47
2.3.5 Adesão e germinação de conídios de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 na mistura com diferentes adjuvantes sobre adultos de <i>Diaphorina citri</i>	50
2.3.6 Deposição de conídios em ninfas e adultos de <i>Diaphorina citri</i>	54
2.4 Conclusões	55
Referências	56
3 IMPORTÂNCIA DA CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE DE CONÍDIOS, RADIAÇÃO UV-B, UMIDADE RELATIVA DO AR E FUNGICIDAS NA EFICÁCIA DE <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 SOBRE <i>Diaphorina citri</i>	59
Resumo	59
Abstract	59
3.1 Introdução	60
3.2. Material E Métodos	61
3.2.1 Relação entre a viabilidade dos conídios de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 e a mortalidade de <i>Diaphorina citri</i>	61
3.2.2 Efeito da umidade relativa do ar na eficácia de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296, adjuvante KBRAdj e óleo no controle de <i>Diaphorina citri</i>	63
3.2.3 Influência da radiação ultravioleta UV-B na eficiência de controle de <i>Diaphorina citri</i> pelo fungo <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296	64
3.2.4 Determinação do período entre as aplicações de fungicidas químicos e o fungo entomopatogênico <i>Isaria fumosorosea</i> em campo	66
3.2.6 Análises estatísticas	68
3.3 Resultados E Discussão	69
3.3.1 Relação entre a viabilidade dos conídios de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 e a mortalidade de <i>Diaphorina citri</i>	69

3.3.2 Efeito da umidade relativa do ar na eficácia de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296, adjuvante KBRAdj e óleo no controle de <i>Diaphorina citri</i>	73
3.3.3 Influência da radiação ultravioleta UV-B na eficiência de controle de <i>Diaphorina citri</i> pelo fungo <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296.....	79
3.3.4 Período entre as aplicações de fungicidas químicos e o fungo entomopatogênico <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 em campo	82
3.4 Conclusões.....	85
Referências	85
4 SELETIVIDADE DE <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 SOBRE <i>Tamarixia radiata</i> E <i>Ceraeochrysa cincta</i> EM LABORATÓRIO	89
Resumo	89
Abstract	89
4.1 Introdução.....	90
4.2. Material E Métodos.....	91
4.3 Resultados E Discussão.....	92
4.4 Conclusão	94
Referências	95
5 ADEQUAÇÃO DO VOLUME DE CALDA E MONITORAMENTO DA EFICIÊNCIA DE APLICAÇÕES DE <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 NO CONTROLE DE <i>Diaphorina citri</i> E OUTRAS PRAGAS EM PRODUÇÃO ORGÂNICA E CONVENCIONAL DE CITROS	99
Resumo	99
Abstract	99
5.1 Introdução.....	100
5.2 Material E Métodos.....	101
5.2.1 Testes de adequação do volume de calda para <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 no controle de <i>Diaphorina citri</i> em campo	101
5.2.2 Monitoramento das populações de <i>Diaphorina citri</i> , outras pragas de citros e inimigos naturais em áreas pulverizadas com <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296.....	103
5.2.2.1 Áreas experimentais	103
5.2.2.2 Tratamentos e pulverizações.....	103

5.2.2.3 Amostragens para avaliação da eficiência das aplicações de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 sobre adultos de <i>Diaphorina citri</i> confinados em <i>voile</i>	106
5.2.2.4 Amostragens e monitoramento das populações de pragas e inimigos naturais	107
5.2.3 Análises estatísticas	108
5.3. Resultados E Discussão	109
5.3.1 Testes de adequação do volume de calda para <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 no controle de <i>Diaphorina citri</i> em campo	109
5.3.2 Eficiência das aplicações de <i>Isaria fumosorosea</i> ESALQ-1296 sobre adultos de <i>Diaphorina citri</i> confinados em sacos de tecido tipo <i>voile</i>	111
5.3.3 Monitoramento das populações de espécies pragas e inimigos naturais na área orgânica (Fazenda da Toca).....	115
5.3.3.1 Monitoramento da população de pragas	115
5.3.3.2 Monitoramento da população de inimigos naturais	123
5.3.4 Monitoramento das populações de espécies pragas e inimigos naturais na área convencional (Fazenda São Carlos)	126
5.3.4.1 Monitoramento da população de pragas	126
5.3.4.2 Monitoramento da população de inimigos naturais	128
5.4 Conclusões	129
Referências	129
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	133

RESUMO

Parâmetros a serem considerados nas pulverizações do fungo *Isaria fumosorosea* para o manejo de *Diaphorina citri*

O inseto vetor *Diaphorina citri* Kuwayama 1907 (Hemiptera: Liviidae) é considerado a principal praga da citricultura mundial. O controle desta praga é feito quase exclusivamente com inseticidas químicos, existindo a demanda por alternativas mais sustentáveis de controle. O desenvolvimento de um bioproduto a base de fungo entomopatogênico pode ser uma alternativa promissora para o manejo integrado de *D. citri* em pomares comerciais de citros. Assim, esse estudo teve como objetivo viabilizar a utilização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 para o controle de *D. citri*, avaliando: 1- a ação de adjuvantes na adesão e germinação de *I. fumosorosea* em ninfas e adultos de *D. citri*; 2- a relação entre a viabilidade dos conídios e a mortalidade de *D. citri*; 3- o efeito da umidade relativa do ar e da radiação ultravioleta na eficácia de *I. fumosorosea* em condições de laboratório; 4- o período entre a aplicação de fungicidas químicos e *I. fumosorosea* em campo; 5- a seletividade de *I. fumosorosea* aos inimigos naturais *Tamarixia radiata* e *Ceraeochrysa cincta* em condições de laboratório; 6- o volume de calda adequado para as aplicações de *I. fumosorosea* para o controle de *D. citri* em pomares comerciais; 7- a eficiência de *I. fumosorosea* no manejo de *D. citri* e seu efeito em outras espécies de artrópodes em dois sistemas de produção de citros. Análises por microscopia eletrônica de varredura revelaram que a adição dos adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 acelerou o desenvolvimento dos conídios de *I. fumosorosea* na cutícula de todos os estágios do inseto em comparação com o Tween 80. As formulações de *I. fumosorosea* com KBRAdj 0,075% apresentaram melhor desempenho no controle de *D. citri* em todos os níveis de umidade, mas especialmente em períodos de baixa umidade relativas ($\leq 50\%$) e sob exposição à radiação UV-B (> 2 horas) em relação a aplicação com Tween. Os fungicidas Kumus[®] DF, Kocide[®] WDG, Nativo[®], Flint 500[®] WG não influenciaram no desempenho do entomopatógeno quando esses foram pulverizados um dia antes ou após a aplicação do fungo sobre os adultos de *D. citri*. Nos estudos de seletividade foi demonstrado que a maioria das misturas de *I. fumosorosea* com os adjuvantes foi inócua para os adultos de *T. radiata* e as larvas neonatas de *C. cincta*. Em pomares comerciais, foi demonstrado que as aplicações de *I. fumosorosea* foram mais eficientes no volume de 60 mL.m⁻³ de área de copa. Na área com produção orgânica de citros foi verificado que as aplicações de *I. fumosorosea* reduziram significativamente a população natural de *D. citri* e do ácaro da leprose (*Brevipalpus* spp.). Já na área com produção convencional de citros foi observado que as pulverizações de *I. fumosorosea* reduziram significativamente a população do ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*) e a população de *D. citri* foi extremamente baixa em todos os tratamentos. As aplicações de *I. fumosorosea* não apresentaram efeitos negativos nas populações dos predadores joaninhas, crisopídeos e hemeróbídeos. Portanto, conclui-se que a utilização do fungo *I. fumosorosea* no manejo de *D. citri* pode ser uma tática sustentável para minimizar as aplicações sistemáticas de pesticidas, diminuindo seus impactos no agroecossistema.

Palavras-chave: Pragas de citros; Controle microbiano; Tecnologia de aplicação; Fungo entomopatogênico

ABSTRACT

Parameters to be considered in the pulverization of the fungus *Isaria fumosorosea* for the management of *Diaphorina citri*

The insect vector *Diaphorina citri* Kuwayama 1907 (Hemiptera: Liviidae) is the main citrus pest in the world. The control of this pest is done almost exclusively with chemical insecticides, and there is a demand for more sustainable control alternatives. The development of a bioproduct based on entomopathogenic fungi may be a promising alternative for the integrated management of *D. citri* in commercial citrus orchards. The objective of this study was to evaluate important parameters to increase efficiency of applications of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 for the control of *D. citri*. The following studies have been developed: 1- the action of adjuvants on adhesion and germination of *I. fumosorosea* on nymphs and adults of *D. citri*; 2- the relationship between the conidia viability and the mortality of *D. citri*; 3- the effect of relative air humidity and ultraviolet radiation on the efficacy of *I. fumosorosea* under laboratory conditions; 4 - the period between the application of chemical fungicides and *I. fumosorosea* in field; 5- the selectivity of *I. fumosorosea* to the natural enemies *Tamarixia radiata* and *Ceraeochrysa cincta* under laboratory conditions; 6 - the volume of syrup suitable for *I. fumosorosea* applications for the control of *D. citri* in commercial orchards; 7- the efficiency of *I. fumosorosea* to management of *D. citri* and its effect against other species of arthropods in two systems of citrus production. Scanning electron microscopy analysis revealed that the addition of the adjuvants KBRAdj and Silwet L-77 accelerated the development of *I. fumosorosea* conidia on the cuticle of all stages of the insect compared to Tween 80. The formulations of *I. fumosorosea* with KBRAdj 0.075% showed better performance in controlling *D. citri* at all moisture levels, but especially in periods of low relative humidity ($\leq 50\%$) and exposure to UV-B radiation (> 2 hours) compared to Tween application. The fungicides Kumus[®] DF, Kocide[®] WDG, Nativo[®], Flint 500[®] WG did not influence the performance of the entomopathogen when they were sprayed the day before or after application of the fungus on *D. citri* adults. In the selectivity studies, it was shown that most of the mixtures of *I. fumosorosea* with the adjuvants were innocuous for the adults of *T. radiata* and the neonates of *C. cincta*. In commercial orchards, it was demonstrated that *I. fumosorosea* applications were more efficient in the volume of 60 mL.m⁻³ of leaves. In the area with organic citrus production it was verified that *I. fumosorosea* applications significantly reduced the natural population of *D. citri* and the false spider mite (*Brevipalpus* spp.). In the area with conventional citrus production it was observed that sprays of *I. fumosorosea* significantly reduced the population of the false rust mite (*Phyllocoptruta oleivora*) and *D. citri* population was extremely low in all treatments. The applications of *I. fumosorosea* did not present negative effects in the populations of the ladybirds, lacewings and hemerobide predators. Therefore, it is concluded that the use of *I. fumosorosea* fungus in the management of *D. citri* can be a sustainable tactic to minimize the systematic applications of pesticides, reducing their impacts on the agroecosystem.

Keywords: Citrus pests; Microbial control; Application technology; Entomopathogenic fungus

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cultura dos citros no Brasil

A cultura dos citros apresenta grande importância econômica para o Brasil. A região de São Paulo é considerada a maior produtora de citros do mundo, tendo oscilação nas colheitas entre 250 e 400 milhões de caixas por ano (FNP, 2015). Em 2015, o levantamento realizado pelo Fundecitrus indicou que o parque citrícola de plantas produtivas do estado de São Paulo e Triângulo Mineiro foi de 174,13 milhões de árvores (FUNDECITRUS, 2015). Os setores de produção e industrialização da laranja nessas regiões 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).

Nas últimas safras de citros, 2013/2014 e 2014/2015, foi observado uma redução consecutiva na produtividade brasileira, ficando abaixo dos 300 milhões de caixas, sendo bem inferior a safra do ano 2012/2013 que foi de 385 milhões de caixas FNP (2015). A doença “Greening dos citros” ou Huanglongbing (HLB), que é transmitida pelo inseto vetor *Diaphorina citri* tem causado grandes preocupações para a citricultura paulista, pois tem apresentado perspectiva de redução de produtividade nas próximas safras.

No Brasil, um levantamento realizado pelo Fundecitrus em julho de 2010 mostrou que a doença HLB estava presente em 1,8% das plantas e em 38,8% dos talhões do estado de São Paulo, já em setembro de 2011, foi constatado que esses valores tinham aumentando para 53,3% dos talhões e 3,8% das plantas atacadas (FUNDECITRUS, 2013). Segundo o Fundecitrus foram erradicadas até 2014 cerca de 38,8 milhões de árvores com HLB, no entanto, ainda existem no campo cerca de 35 milhões de árvores com sintomas da doença (FUNDECITRUS, 2015). Em 2016, o Fundecitrus verificou que o HLB aumentou em 159% quando comparado ao levantamento anterior (2012), passando de 6,91% das plantas atacadas em 2012 para 16,92% em 2016 (FUNDECITRUS, 2016). 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 HLB é considerado a doença mais séria dos citros atualmente, no entanto, a cultura apresenta diversas espécies de pragas e doenças com importância econômica (USP/PENSA, 2004). Merecem destaque os ácaros: Ácaro-da-leprose, *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (1939) (Acari: Tenuipalpidae) transmissor do vírus da leprose (Citrus leprosis vírus-CiLV); o ácaro da falsa ferrugem, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmed, 1879) (Acari: Eriophyidae); ácaro

púrpuro, *Panonychus citri* (McGregor, 1916) (Acari: Tetranychidae); moscas das frutas, entre outras espécies (GRAVENA, 2005). Nessa situação, novas alternativas devem ser buscadas para reduzir o custo de produção citrícola e manter a sustentabilidade do agroecossistema.

1.2 Aspectos gerais de *Diaphorina citri*

Diaphorina citri Kuwayama 1907 (Hemiptera: Liviidae) é considerado o principal inseto vetor da citricultura. Os danos diretos provocados por esse inseto nas plantas de citros são baixos, ocorrendo somente quando a população do inseto está em nível elevado. Os principais prejuízos são causados porque esse inseto é vetor da bactéria '*Candidatus Liberibacter*' que é causadora da doença conhecida como HLB. Essas bactérias obstruem os vasos do floema e têm afetado as plantações de citros na região da Flórida e Califórnia nos Estados Unidos (KUCHMENT, 2013) e Brasil (FUNDECITRUS, 2015).

O primeiro registro de *D. citri* no Brasil foi em 1942, por COSTA LIMA, entretanto, o primeiro relato do HLB no Brasil foi feito em março de 2004, no município de Araraquara, Estado de São Paulo, sendo diagnosticada a bactéria '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. Posteriormente, outra espécie de bactéria foi descoberta, '*Candidatus Liberibacter americanus*' (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005). Essa doença nos últimos anos levou à erradicação de plantas citrícolas do Estado de São Paulo, sendo 7,2 milhões de plantas em 2013 e 4,5 milhões em 2014 (FUNDECITRUS, 2015).

D. citri apresenta preferência por plantas pertencentes à família Rutaceae, e é sabido que o desenvolvimento desse inseto é favorecido por condições subtropicais (PARRA et al., 2010). A fêmea põe em média de 800 ovos sobre brotações jovens a 28 ± 1 °C, 75-80% de umidade relativa e 13h de fotofase. Essa espécie apresenta o ciclo de vida composto por três estágios, ovo, ninfa e adulto (GALLO et al., 2002). Os ovos tem o tamanho aproximado de 0,31mm de altura e 0,14mm de largura (TSAI; LIU, 2000), são alongados, engrossados na base, cônicos na parte distal e à medida que são ovipositados apresentam coloração pálida tornando-se amarelo-alaranjados com o tempo (MEAD; FASULO, 2002). Após a eclosão, as ninfas passam por cinco instares, geralmente se agregam nas folhas, ramos jovens e gema axilar onde se alimentam da seiva (TSAI e LIU, 2000, PADULLA, 2007). Os adultos medem cerca de 3 mm de comprimento, sendo o corpo mosqueado de marrom, cabeça marrom claro, ligeiramente mais estreita que o tórax, as asas dianteiras são alargadas da metade até o ápice, as antenas apresentam dois segmentos, com o ápice preto e duas pequenas manchas marrons

claros no meio dos segmentos. O corpo do adulto apresenta cobertura por secreção cerosa sob a forma de um pó esbranquiçado. O abdômen dorsalmente é preto e branco, e esverdeado ventralmente e as pernas metatorácicas são modificadas para saltar (BLACKWELL, 2005; PADULLA, 2007; HALL et al., 2012). *D. citri* pode apresentar modificações na coloração e no tamanho do corpo (WENNINGER et al., 2009), sendo essas características morfológicas afetada por fatores como a espécie de planta hospedeira, conforme observado por Garcia-Pérez et al. (2013) no México.

O uso desordenado de pesticidas químicos para o controle dessa praga tem influenciado negativamente no manejo de outras pragas em citros, devido principalmente ao desequilíbrio provocado no agroecossistema, o qual tem aumento os danos causados por outras pragas até então consideradas secundárias.

1.3 Inimigos naturais de *Diaphorina citri*

A fauna de insetos parasitóides nos pomares cítricos é muito rica (GRAVENA, 2005). Existem várias espécies que parasitam *Diaphorina citri*, dentre elas, o ectoparasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) e o endoparasitoide *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Shafee; Alan; Argarwal, 1975) (Hymenoptera: Encyrtidae) apresentam maior importância para controle de *D. citri* (GRAFTON-CARDWELL et al., 2013, KONDO et al., 2015). Nos estudos conduzidos por SHELLEY; HOY (2004) foi demonstrado que a importância de *T. radiata* é bem superior a *D. aligarhensis* porque sua taxa de parasitismo é alta sobre as ninfas de *D. citri*, e tem melhor capacidade de se estabelecer nas áreas citricolas. As taxas de parasitismo encontradas para *T. radiata* ficaram entre 79% a 88% no outono em Porto Rico, México (PLUKE et al., 2008). Entretanto, no Brasil, o parasitismo natural de ninfas de *D. citri* por *T. radiata* fica em torno de 25,7% (PAIVA; PARRA, 2012), sendo 22,2% no município de Rincão-SP (DINIZ, 2013).

Os predadores de maior relevância para a cultura dos citros são os insetos pertencentes às ordens Coleoptera, Diptera e Neuroptera, além de alguns aracnídeos (MICHAUD; RODRIGUES, 2001; MICHAUD, 2004; YAMAMOTO, PARRA, 2005; GRAVENA, 2005). Os coleópteros *Azya orbiger* Mulsant, 1850, *Brachiacantha dentipes* (Fabricius, 1801), *Brumus suturalis* (Fabricius, 1798), *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763), *Coelophora inaequalis* (Fabricius, 1775), *Chilocorus cacti* (Linnaeus, 1767), *Chilocorus nigritus* (Fabricius, 1798), *Chilocorus stigma* (Say, 1835), *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773),

Hippodamia convergens Guérin-Méneville, 1842, *Olla v-nigrum* (Mulsant, 1866) foram relatados alimentando-se de ninfas ou adultos de *D. citri*, (MICHAUD, 1998; YAMAMOTO; PARRA, 2005; RODRIGUES et al., 2010; KONDO et al., 2015). As espécies de dípteros que alimentam se de *D. citri* são; *Allograpta obliqua* (Say, 1823), *Ocyptamus fuscipennis* (Say, 1823) (KONDO et al., 2015). Os neuropteros encontrados com maior frequência atacando *D. citri* são *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911), *Ceraeochrysa cubana* (Hagen, 1861), *Ceraeochrysa cincta* (Schneider, 1851), *Ceraeochrysa everes* Banks, 1920, *Ceraeochrysa valida* (Banks, 1895), *Chrysoperlla rufilabris* (Bumeister, 1839), *Chrysoperlla externa* (Hagen, 1861) (MICHAUD, 2004; GRAVENA, 2005; RUGNO, 2013; KONDO et al., 2015), *Chrysopa boninensis* (Okamoto, 1914), *Chrysopa septempunctata* (Wesmael, 1841) (YANG et al., 2006), *Chrysoperla spp.* (YAMAMOTO; PARRA; 2005). No estado de São Paulo a espécie mais encontrada na cultura dos citros é *C. cincta* (RUGNO, 2013). Além dos insetos, recentemente os ácaros predadores têm despertado a atenção para controle de *D. citri*. Segundo Juan-Blasco et al. (2012) o ácaro *Amblyseius swirskii* apresenta alta capacidade de predação de ovos de *D. citri*.

Os entomopatógenos têm sido as espécies de inimigos naturais que mais são encontradas causando mortalidade natural de *D. citri* no campo (MEYER et al., 2007; 2008; HALL et al., 2012). Os fungos entomopatogênicos foram os únicos patógenos relatados como causadores de mortalidade natural de *D. citri*, e apresentam alta capacidade de disseminação e transmissão horizontal entre insetos pragas (CONCESCHI et al., 2016) e também do desenvolvimento de epizootias naturais em agroecossistemas. Nos Estados Unidos alguns casos de infecção natural e epizootia de fungos entomopatogênicos sobre *D. citri* foram relatados por pesquisadores como MEYER et al. (2007; 2008) e HALL et al. (2012). A partir disso, vários outros estudos vêm mostrados a importância da utilização desses entomopatógenos para desenvolver novos bioprodutos para o controle de *D. citri* (PADULLA e ALVES, 2009; GANDARILLA-PACHECO et al., 2013).

1.3.1 Os fungos entomopatogênicos e sua importância no controle de *Diaphorina citri*

Dentre os inimigos naturais, os fungos entomopatogênicos apresentam um papel de destaque, pois possuem a capacidade de infectar um número grande de espécies pragas em todas as fases da vida, exceto os ovos, e se manter no ambiente pelo desenvolvimento de epizootias naturais (ALVES, 1998). Os fungos entomopatogênicos são facilmente produzidos

em massa *in vitro* e podem ser utilizados no desenvolvimento de bioprodutos (ALVES, LOPES, 2008).

Segundo BLACKWEEL (2010) eram conhecidas mais de 700 espécies de fungos entomopatogênicos. Grande parte delas encontram-se nos filos Ascomycota (ordem Hypocreales) e Entomophthoromycota (BLACKWEEL, 2010; ALVES, 1998). Os fungos do filo Ascomycota ordem Hypocreales anamórficos são considerados patógenos generalistas, pois tem a capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros, às vezes podem apresentar seu ciclo de vida patogênico ou saprofítico, enquanto os fungos Entomophthorales são específicos (BLACKWEEL, 2010; ALVES, 1998).

Os fungos do filo Ascomycota têm como característica marcante a presença de hifas septadas que se diferenciam em células conidiogênicas, conidióforos ou fiálides e os conídios, que são as estruturas de reprodução assexuada desses fungos. A dispersão dos conídios dessas espécies é de forma passiva pelo vento, chuva ou hospedeiros alternativos. Dentro do Filo Ascomycota, a ordem Hypocreales é dividida em três famílias de fungos entomopatogênicos: Na família Cordycipitaceae estão os gêneros de maior importância agrícola, tais como *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Simplicillium* (HUMBER, 2012); a segunda família é a Clavicipitaceae onde se encontram os gêneros *Metarhizium*, *Aschersonia* e *Pochonia* e a terceira família é a Ophicordycipitaceae com os gêneros mais importantes *Hirsutella* e *Syngliocladium* (HUMBER, 2012).

Quando os fungos entomopatogênicos são pulverizados sobre insetos e/ou ácaros, os conídios entram em contato com a cutícula da praga e germinam formando um tubo germinativo, que por pressão e produção de compostos químicos (enzimas) degradam a cutícula do hospedeiro e penetram no seu interior. Durante a colonização interna, o fungo cresce pelos órgãos e produz toxinas que causam a morte da praga. Após a morte, o micélio emerge do corpo do hospedeiro produzindo conídios que poderão servir para um novo ciclo infectivo (ALVES, 1998).

Os seguintes fungos associados têm sido relatados como potenciais reguladores de *D. citri*: *Isaria fumosorosea* (Wize), *Hirsutella citriformis* Speare, *Lecanicillium lecanii* Zimm, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.), *Metarhizium anisopliae*, *Cladosporium* sp.. Nr. *oxysporum*, e *Capnodium citri* (SUBANDIYAH et al., 2000; YANG et al., 2006; MEYER et al., 2007; AVERY et al., 2009; HOY et al., 2010; HUNTER et al., 2010; LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2012; GANDARILHA-PACHECO et al., 2013; STAUDEMAN et al., 2012; ORDUÑO-CRUZ et al., 2015). Estes microrganismos podem ser utilizados como micopesticidas os quais representam uma opção de controle eficaz para a mitigação da resistência aos inseticidas em

populações de *D. citri*, e por serem seletivos a algumas espécies de inimigos naturais (CARDOSO et al., 2007).

1.3.2 Potencial do fungo *Isaria fumosorosea* para o controle de *Diaphorina citri*

Dentre os fungos entomopatogênicos da família Cordycipitaceae se destaca o gênero *Isaria* (anteriormente denominado *Paecilomyces*) que tem sido considerado um dos mais promissores, pois causam epizootias naturais em lepidópteros, coleópteros, hemípteros e ortópteros (ALVES, 1998). O fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* tem sido relatado como um dos entomopatógenos com maior potencial para o controle de *D. citri* no mundo (AVERY et al., 2009; HOY et al., 2010; HUNTER et al., 2011; LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2012; GANDARILHA-PACHECO et al., 2013; CONCESCHI, 2013, AUSIQUE, 2014; ORDUÑO-CRUZ et al., 2015). Esse fungo entomopatogênico apresenta elevada virulência sobre ninfas e adultos de *D. citri* após a pulverização direta de conídios ou blastósporos. Também tem mostrado alto poder de disseminação de seus conídios no ambiente, o que aumenta a possibilidade de transmissão horizontal entre insetos infectados e sadios da mesma espécie ou diferentes espécies (PATT et al., 2015; CONCESCHI et al., 2016).

O potencial de *I. fumosorosea* para o controle de *D. citri* tem sido demonstrado por vários pesquisadores. No México, Orduño-Cruz et al. (2015) observaram que o isolado II de *I. fumosorosea* foi capaz de provocar mortalidade de 100% em adultos de *D. citri* após a pulverização de uma suspensão com 1×10^8 conídios/mL. Da mesma forma, nos Estados Unidos, Avery et al. (2009) e Hunter et al. (2011) também observaram valores de mortalidade de 100% para adultos de *D. citri*. Estudo desenvolvido por Stauderman et al. (2012) mostrou que a ação do micoinseticida de *I. fumosorosea* (isolados de PFR-97) reduziu em 50% a população de *D. citri* após 3 semanas da pulverização. Já, Hoy et al. (2010) determinaram que o isolado (*IfrAsCP*) de *I. fumosorosea* na concentração de $6,8 \times 10^5$ conídios/ mL foi capaz de causar 50% de mortalidade para adultos de *D. citri*. No Brasil, o fungo *I. fumosorosea* também tem sido considerado altamente virulento para *D. citri*. Os primeiros estudos que comprovaram isso, iniciaram em 2011 com a seleção do isolado ESALQ-1296 de *I. fumosorosea* em um *screening* contendo 17 isolados de fungos entomopatogênicos do banco de entomopatógenos da ESALQ-USP. Com a seleção do isolado ESALQ-1296 estudos seguintes comprovaram que o mesmo apresenta potencial para controle de outras espécies-pragas de citros (CONCESCHI, 2013), além de que, esse fungo entomopatogênico foi capaz

de resistir a maior período sob a radiação ultravioleta UV-B quando comparados com outros isolados de *I. fumosorosea* (ROJAS, 2015). Em semi-campo e campo esse isolado foi altamente virulento para adultos de *D. citri* (AUSIQUE, 2014), o que despertou o interesse da Koppert Brasil em registrar uma formulação de *I. fumosorosea* para o controle de *D. citri* no Brasil (com o nome comercial de PUMA[®]).

1.3.3 Importância da umidade relativa (UR) e radiação ultravioleta UV-B para os fungos entomopatogênicos

A elaboração de uma formulação a base de fungos entomopatogênicos é o maior desafio no desenvolvimento de um bioproduto, isso porque os propágulos infectivos (conídios ou blastósporos) devem permanecer viáveis por tempos prolongados, mesmo após serem aplicados no campo. Assim, os conídios tendem a serem mais tolerantes à dessecação e mais estáveis quando provenientes de fermentação sólida (preparação seca), em comparação com conídios submersos obtidos por fermentação líquida (JACKSON, 1997).

Em condições de campo, a eficácia de inseticidas biológicos a base de fungos entomopatogênicos depende de diversos fatores ambientais como temperatura, umidade relativa, exposição à radiação solar direta, saturação de água, fatores fungistáticos dentre outros (SHAAT, 1990).

A radiação ultravioleta (UV) pode provocar aquecimento e dessecação dos conídios além de danos letais ao DNA e mutações (FARGUES et al., 1996; BRAGA et al., 2001a). A radiação UV pode atuar sobre a germinação dos conídios e sobre os estágios iniciais do tubo germinativo, afetando diretamente a sua capacidade de infectar insetos (BRAGA et al., 2001a, b). A radiação solar é provavelmente o fator ambiental que mais influencia na viabilidade do fungo entomopatogênico aplicado em campo. Dentre as condições que podem interferir na suscetibilidade ou na tolerância às radiações ultravioletas destacam-se; os nutrientes do meio de cultivo, a exposição ou restrição do fungo entomopatogênico a luz visível durante o cultivo, a idade do fungo cultivado (FERNANDES et al., 2015).

Sabe-se que devido à variabilidade inter e intraespecífica dos fungos entomopatogênicos alguns isolados são capazes de adaptar-se a diferentes condições ambientais. Na seleção de isolados potenciais para o controle de pragas é muito importante selecionar os isolados que são capazes de tolerar naturalmente maior período em exposição à radiação ultravioleta (FERNANDES et al., 2015). Essas características já vêm sendo

avaliadas para identificação de fungos entomopatogênicos promissores. Rojas (2015) observou que os isolados de *I. fumosorosea* apresentam diferenças na tolerância quanto a UV-B, sendo o isolado ESALQ-1296 o mais tolerante. Além da radiação ultravioleta, outros fatores também podem interferir na infecção e esporulação dos fungos entomopatogênicos, com destaque a umidade relativa (ALVES, 1998; INGLIS et al., 2001).

A umidade no ambiente natural pode se manifestar através da chuva, umidade do solo e umidade do ar. As fases de germinação, penetração, esporulação e disseminação dos patógenos são todas influenciadas pela umidade (ALVES, 1998). Assim, realizar pulverizações desses entomopatógenos em condições adequadas de umidade relativa é de fundamental importância para o sucesso desses agentes de controle microbiano. Isso já foi observado para várias espécies de fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* (FERRON, 1977; RAMOSKA, 1984; JAMES et al., 1998; SHIPP et al., 2003; JAMES et al., 1998), *Metarhizium anisopliae* (ARTHURS e THOMAS, 2001). Em casa de vegetação é possível controlar a umidade relativa do ar e assim maximizar o controle da espécie praga (SHIPP et al., 2003). Em condições de campo, o controle da umidade não é possível, portanto, a pulverização do fungo entomopatogênico teria que ser realizada nas épocas ou horários que mais favoreça o agente de controle microbiano. Além do horário e da época de aplicação, outras tecnologias podem ser empregadas para minimizar o efeito do ambiente, como fazer formulações de propágulos do microrganismo em óleo, adjuvantes e fotoprotetores, os quais reduzem tais efeitos deletérios (FERNANDES et al., 2015).

Os componentes utilizados na formulação do entomopatógeno podem determinar o comportamento dos propágulos do agente de controle, de tal forma a mantê-los infectivos durante maior período de tempo. A formulação adequada pode reduzir a dessecação, melhorar a dispersão dos conídios em caldas de pulverização e aumentar a tolerância à radiação solar e a dessecação (ALVES et al., 1998). Essas características foram observadas para alguns isolados de fungos entomopatogênicos por Loong et al. (2013). Segundo estes autores o tipo de formulação e a espécie do entomopatógeno influenciam diretamente na tolerância à radiação solar e umidade relativa. Com isso, os fatores abióticos devem ser levados sempre em consideração na seleção e no desenvolvimento de bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos, a fim de maximizar sua eficiência de controle de *D. citri* no campo.

1.3.4 Compatibilidade de adjuvantes e fungicidas aos fungos entomopatogênicos

O manejo de pragas e doenças nas culturas de citros é realizado basicamente pela aplicação de produtos fitossanitários como os inseticidas, fungicidas químicos e os adjuvantes. A associação do controle químico e biológico tem sido utilizada no programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (SILVA e NEVES, 2005). O principal problema da utilização desses produtos fitossanitários é a falta de seletividade ou compatibilidade como os inimigos naturais, dentre eles os fungos entomopatogênicos. Assim, estudos de compatibilidade entre os produtos fitossanitários e os fungos entomopatogênicos são ferramentas indispensáveis no MIP, o que contribui para a preservação destes patógenos e consequentemente na manutenção do equilíbrio dentro do sistema agrícola (NORRIS et al., 2003).

A compatibilidade de fungos entomopatogênicos aos produtos fitossanitários em laboratório vem sendo muito estudado. Ausique (2014) avaliou a compatibilidade de 27 produtos fitossanitários utilizados na cultura dos citros em relação aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* ESALQ-PL63 e *I. fumosorosea* ESALQ-1296. Dentre os produtos fitossanitários testados, os fungicidas foram os produtos fitossanitários que mais afetaram esses fungos entomopatogênicos. Da mesma forma Avery et al. (2013) observou que para o isolado Apopka 97 de *I. fumosorosea*, os fungicidas cúpricos foram os menos compatíveis. As pulverizações de fungicidas são necessárias para controlar os diferentes fitopatógenos que afetam a cultura dos citros. Os principais ingredientes ativos de fungicidas permitidos pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para essa cultura são: azoxistrobina, composto de cobre, difenoconazol, enxofre, fenpropatrina, fosetil, piraclostrobina, pirimetanil, tebuconazol, tiabendazol, trifloxistrobinas (FUNDECITRUS, 2015). Segundo Ausique (2014) quando esses fungicidas são misturados com o fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em calda, a viabilidade dos conídios desse fungo entomopatogênico é drasticamente reduzida. Assim, não podemos associar a pulverização do fungicida com o fungo entomopatogênico no tanque de pulverização. Uma alternativa seria realizar aplicações desses produtos em momentos distintos, porém, não existem estudos realizados para o isolado *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em citros.

Em outras culturas, estudos realizados por Kouassi et al. (2003) observaram que o tempo entre a aplicação do fungicida e a aplicação de *B. bassiana* isolado MK2001 pode afetar diretamente na eficácia de controle de *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois, 1818 (Hemiptera: Miridae). Quando os fungicidas mancozeb, metalaxyl e oxido de cobre foram

aplicados 2 a 4 dias após a pulverização do fungo entomopatogênico, a eficácia do bioproduto foi potencializada (efeito sinérgico). No entanto, quando esses fungicidas foram aplicados 2 a 4 dias antes ou no mesmo momento da pulverização do fungo entomopatogênico a eficácia do controle da praga *L. lineolaris* foi reduzida (efeito antagônico). O tempo da aplicação do fungicida e da aplicação do fungo *B. bassiana* também foi avaliado por outros autores como Jaros-Su et al. (1999). Esses autores constataram que alguns fungicidas além de afetar a eficácia do entomopatógeno sobre a praga, eles também interferem na esporulação de *B. bassiana* sobre cadáver do inseto. Portanto, os estudos do período entre a aplicação de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e as pulverizações dos fungicidas são necessários para que se possa integrar esse agente de controle no manejo integrado de pragas em citros.

1.3.5. Seletividade de fungos entomopatogênicos a parasitoides e predadores

Os inimigos naturais como os parasitoides e predadores são de grande importância para o equilíbrio da população de espécies pragas em pomares de citros (GRAVENA, 2005). Sabe-se que os produtos fitossanitários podem influenciar na população de inimigos naturais, com maior destaque aos produtos químicos. Os fungos entomopatógenos principalmente os da ordem Hypocreales são considerados inespecíficos e podem causar morte de algumas espécies de inimigos naturais (ALVES, 1998). Assim, o aumento da utilização desses bioprodutos nas culturas têm aumentado também a preocupação sobre os seus efeitos sobre a população de espécies não-alvo, com maior destaque aos inimigos naturais.

Estudos de seletividade de fungos entomopatogênicos sobre inimigos naturais têm sido realizado principalmente para hortaliças e culturas anuais (FARAG, 2008; RENE et al., 2010; EMAMI e MINAEI, 2013; MATTER e SABBOUR, 2013; RÄNNBÄCK et al., 2015). Entretanto, poucos trabalhos têm avaliado os efeitos desses microrganismos sobre os outros inimigos naturais em culturas perenes, como a cultura dos citros. Dentre os inimigos naturais encontrados em citros, os crisopídeos apresentam uma grande importância, sendo a espécie *Ceraeochrysa cincta* a mais encontrada em pomares de citros no estado de São Paulo (RUGNO, 2013). Portanto, o elevado número de pulverizações de bioprodutos a base de fungo entomopatogênico poderia vir a causar alterações nas populações naturais de *C. cincta* e outras espécies de predadores e parasitoides. Cardoso et al. (2007) verificaram que a pulverização do isolado ARSEF 6430 de *Lecanicillium lecanii* e o isolado E9 de *Metarhizium*

anisopliae não provocam a mortalidade de ovos e larvas de *C. cincta*, sendo assim seletivos a esse inimigo natural.

O fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* tem apresentado seletividade a diversos predadores, dentre eles *Axinoscymnus cardilobus* Ren e Fang 1991, (Coleoptera: Coccinellidae) (ZHOU et al., 2010), *Coccinella undecimpunctata* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Coccinellidae) (MATTER e SABBOUR, 2013), e também aos parasitoides *Aphelinus asychis* Walker, 1839, (Hymenoptera: Aphelinidae) (MESQUITA e LACEY, 2001), *Eretmocerus furuhashii* Rose e Zolenerowich, 1994 (Hymenoptera: Aphelinidae) (HUANG et al., 2010). Segundo esses autores, *I. fumosorosea* apresenta um bom potencial de ser combinado com os outros inimigos naturais como predadores e parasitoides. Embora a espécie de *I. fumosorosea* apresente seletividade a muitos predadores e parasitoides, essa seletividade na maioria das vezes depende muito do tipo de formulação do entomopatógeno (ALVES, 1998). Assim, as diferenças na mortalidade dos inimigos naturais podem estar diretamente relacionadas aos adjuvantes (emulsificante, espalhantes, óleos) e inertes que são utilizados na formulação do fungo entomopatogênico. Portanto, a seletividade desses adjuvantes aos inimigos naturais é um dos parâmetros que devem ser considerados na seleção e no desenvolvimento de uma formulação de bioproduto.

1.4 Objetivos

Determinar os parâmetros que resultem em maior eficiência das pulverizações do fungo *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 para o manejo de *Diaphorina citri*. Assim os principais objetivos específicos foram:

1. Caracterizar a importância de adjuvantes na adesão e germinação de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em ninfas e adultos de *D. citri*;
2. Determinar a relação entre a viabilidade dos conídios e a mortalidade de *D. citri*;
3. Avaliar o efeito da umidade relativa e da radiação ultravioleta UV-B na eficácia do fungo *I. fumosorosea* em condições de laboratório para auxiliar na recomendação do horário e época de aplicação em campo;
4. Definir o período entre a aplicação dos fungicidas químicos e do fungo *I. fumosorosea* em campo;

5. Determinar a seletividade do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 aos inimigos naturais *Tamaraxia radiata* e *Ceraeochrysa cincta* em condições de laboratório;
6. Definir o volume de calda adequado do fungo *I. fumosorosea* no controle de *D. citri* em pomares comerciais;
7. Avaliar a eficiência do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 no manejo de *D. citri* e efeito em outras espécies de artrópodes em dois sistemas de produção de citros.

Referências

- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.
- ALVES, S.B.; LOPES, R.B. Controle microbiano de pragas na América latina: Avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414 p.
- ARTHURS, S.; THOMAS, M.B. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.78, p. 59-65, 2001.
- 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.
- AVERY, P.B.; PICK, D.A.; ARISTIZÁBAL, L.F.; KERRIGAN, J.; POWELL, C.A.; ROGERS, M.E.; ARTHURS, S.P. Compatibility of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) blastospores with agricultural chemicals used for management of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Insects**, Basel, v. 4, p.694-711, 2013.
- AUSIQUE, J.J.S. **Desenvolvimento de estratégias para incorporação de fungos entomopatogênicos no manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) na cultura dos citros**. 2014. 78p. Tese de (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- BLACKWHEEL, M. Fungal evolution and taxonomy. **BioControl**, Dordrecht, v. 55, p. 7-16, 2010.

- BRAGA G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS; D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from m 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 78, p. 98-108, 2001a.
- BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D. W. Both solar UV-A and UV-B radiation impair conidial culture ability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 74, p. 734-739, 2001b.
- CARDOSO, E.R.; FREITAS, S.; NUNES, H.T.; PESSOA, L.G.A. Seletividade de *Lecanicillium lecanii* e *Metarhizium anisopliae* para larvas de primeiro instar de *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) em laboratório. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 4, p. 563-568, 2007.
- 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.
- CONCESCHI, M.R.; D'ALESSANDRO, C.P.; MORAL, R.; DEMETRIO, C.G.B.; DELALIBERA JR, I. Transmission potential of the entomopathogenic fungi *Isaria fumosorosea* and *Beauveria bassiana* from sporulated cadavers of *Diaphorina citri* and *Toxoptera citricida* to uninfected *D. citri* adults. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 61, p. 567-577, 2016.
- CONCESCHI, M.R. **Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* para o controle de pragas dos citros**. 2013. 104 p. Dissertação de (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- COSTA LIMA, A.M. **Insetos do Brasil**. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1942. 327 p. (Homopteros, v. 3).
- DINIZ, A.J.F. **Otimização da criação de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) e de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), visando à produção em larga escala do parasitoide e avaliação do seu estabelecimento em campo**. 2013. 129 p. Tese de (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

- EMAMI, F.; ALICHI, M.; MINAEI, K. Interaction between the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the parasitoid wasp, *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Entomological and Acarological Research**, Milan, v. 47, n. 4, p. 14-17, 2013.
- FARAG, N.A. Impact of entomopathogenic fungi on the aphid, *Brevicoryne brassicae* L. and its associated predator, *Coccinella undecimpunctata* L. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, Giza, v. 18, n. 2, p. 297-301, 2008.
- FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. **Mycopathologia**, Dean Haag, v. 135, p. 171-181, 1996.
- FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.I.; ROBERTS, D.W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, New York, v. 61, p. 427-440, 2015.
- FERRON, P. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi: Imperfecti, Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides obtectus* (Col: Bruchidae). **Entomophaga**, Paris, v. 22, n. 4, p. 393-396, 1977.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Tomada de decisão em laranjais pede cautela. In: _____. **AGRIANUAL 2013: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2013. p. 249-250.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Preço da Laranja deve melhorar em 2015. In: _____. **AGRIANUAL 2015: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2015. p. 241-242.
- FUNDECITRUS. Greening chega às regiões Norte e Sul do estado. **Revista Fundecitrus**, Araraquara, v. 20, n. 124, p. 8-11, 2004.
- FUNDECITRUS. O balanço do greening: 2 anos. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, n. 134, p. 1-16, 2006.
- FUNDECITRUS. **Levantamento de Greening ano de 2011**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 18 jan. 2016.
- FUNDECITRUS. **Levantamento de HLB ano de 2015**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 18 jan. 2016.
- FUNDECITRUS. **Levantamento de HLB ano de 2016**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

- 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.
- GANDARILLA-PACHECO, F.L.; GÁLAN-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 citrus growing areas of México on adults of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 96, n. 1, p. 187-195, 2013.
- GARCIA-PEREZ, F.; ORTEGA-ARENAS, L.D.; LÓPEZ-ARROYO, I.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A.; LOMELI-FLORES, J.R.; ROMERO-NÁPOLES, J. Morphometry of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on six rutaceae from Veracruz, Mexico. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 96, n. 2, p. 529-537, 2013.
- 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 práctico de manejo ecológico de plagas dos citros**. Jaboticabal: Gravena, 2005. 372 p.
- HALL, D.G.; HENTZ, M.G.; MEYER, J.M.; KRISS, A.B.; GOTTWALD, T.R.; BOUCIAS, D.G. Observations on the entomopathogenic fungus *Hirsutella citriformis* attacking adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in a managed citrus grove. **BioControl**, Dordrecht, v. 57, p. 663-675, 2012.
- 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.
- HUANG, Z.; SAHAR, F.; REN, S.; ALI, S. Effect of *Isaria fumosoroseus* on *Eretmocerus* sp. nr. *furuhaskii* (Hymenoptera: Aphelinidae), a parasitoid of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Pakistan Journal of Zoology**, Lahore, v. 42, n. 2, p. 121-127, 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.
- INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N (eds) **Fungi as biological control agents**. CAB International, Wallingford, 2001, p. 24-69.
- JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agent. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 19, p. 180-187, 1997.
- JAMES, R.R.; CROFT, B.A.; SHAFFER, B.T.; LIGHTHART, B. Impact of temperature and humidity on host-pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a Coccinellid. **Biological Control**, Orlando, v. 27, p. 1506-1513, 1998.
- JAROS-SU, J.; GRODEN, E.; ZHANG, J. Effects of selected fungicides and the timing of fungicide application on *Beauveria bassiana* induced mortality of the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Biological Control**, Orlando, v. 15, p.259-269, 1999.
- 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.
- KONDO, T.; GONZÁLEZ, G.F; TAUBER, C.; SARMIENTO, Y.C.G.; MONDRAGON, A.F.V. A checklist of natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in the department of Valle del Cauca, Colombia and the world. **Insecta Mundi**, Gainesville, v. 0457, p.1-14, 2015.
- KOUASSI, M.; CODERRE, D.; TODOROVA, S.I. Effects of the timing of applications on the incompatibility of the three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beuaveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 127, p. 421-426, 2003.
- KUCHMENT, A. The end of orange juice. **Scientific American**, New York, v. 308, p. 52-59, 2013.

- 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.
- LOONG, C.Y.; SAJAP, A.S.; NOOR, H.M.; OMAR, D.; ABOOD, F. Effects of UV-B and solar radiation on the efficacy of *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) for controlling bagworm, *Pteroma pendula* (Lepidoptera: Psychidae). **Journal of Entomology**, London, v. 10, n. 2, p.53-65, 2013.
- MATTER, M.M.; SABBOUR, M.M. Differential efficacies of *Nomuraea rileyi* and *Isaria fumosorosea* on some serious pests and the pests efficient predator prevailing in tomato fields in Egypt. **Journal of plant protection research**, Poznan, v. 53, n. 2, p. 103-109, 2013.
- MEAD, F.W.; FASULO, T.R. **Asiatic citrus psyllid – *Diaphorina citri* Kuwayama 2002**. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/in160>>, Acesso em: 20 jan. 2016.
- MESQUITA, A.L.M.; LACEY, L.A. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), the parasitoid, *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae), and their aphid host. **Biological Control**, Orlando, v. 22, p. 51-59, 2001.
- 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.
- 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.
- 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.

- MICHAUD, J.P. Biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), in Florida: a preliminary report. **Entomological News**, Philadelphia, v. 113, p. 216–222, 2002.
- MICHAUD, J.P. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. **Biological Control**, Orlando, v.29, p. 260-269, 2004.
- NEVES, M.F.; KALAK, R.B.; TROMBIN, V.B. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: Citrus, 2010. 137 p.
- NORRIS, R.F.; CASWELL-CHEN, E.P.; KOGAN, M. **Concepts in integrated pest management**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall., 2003, 586 p.
- ORDUÑO-CRUZ, N.; GUZMÁN-FRANCO, A.W.; RODRÍGUEZ-LEYVA, E.; ALATORRE-ROSAS, R.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H.; MORA-AGUILERA, G. In vivo selection of entomopathogenic fungal isolates for control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Biological Control**, Orlando, v. 90, p. 1-5, 2015.
- 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 de 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 parasitism 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.
- PATT, J.M.; CHOW, A.; MEIKLE, W.G; GARCIA, C.; JACKSON, M.A.; FLORES, D.; SÉTAMOU, M.; DUNLAP, C.A.; AVERY, P.B.; HUNTER, W.B.; ADAMCZYK, J.J. Efficacy of an autodisseminator of an entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea*, to suppress asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, under greenhouse conditions. **Biological Control**, Orlando, v.88, p. 37-45, 2015.

- PLUKE, R.W.H.; QURESHI, J.A.; STANSLY, 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.
- RAMOSKA, W.A. The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the chinch bug, *Blissus leucopterus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.43, p. 389-394, 1984.
- RÄNNBÄCK, L.M.; COTES, B.; ANDERSON, P.; RÄMERT, B.; MEYLING, N.V. Mortality risk from entomopathogenic fungi affects oviposition behavior in the parasitoid wasp *Trybliographa rapae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 124, p. 78-86, 2015.
- REN, S.X.; ALI, S.; HUANG, Z.; WU, J.H. *Lecanicillium muscarium* as microbial insecticide against whitefly and its interaction with other natural enemies. In: **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Badajoz, 2º Edição, 2010, 1620 p.
- ROJAS, V.M.A. **Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa**. 2015. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- RUGNO, G.R. **Seletividade de inseticidas utilizados na cultura dos citros ao predador *Ceraeochrysa cubana* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), desenvolvimento em diferentes temperaturas e diversidade de crisopídeos em propriedades com manejo intensivo e convencional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae)**. 2013. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- SHAAT, N.A. The chemistry of sunscreens. In: Lowe N.J., Shaath N.A. (Eds.) **The sunscreens, development, evaluation, and regulatory aspects**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1990, p. 211 – 233.
- 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.

- SHIPP, J.I.; ZHANG, Y.; HUNT, D.W.A; FERGUSON, G. Influence of humidity and greenhouse microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for control of greenhouse arthropod pests. **Environment Entomology**, Lanham, v. 32, n. 5, p. 1154-1163 2003.
- SILVA, R.Z.; NEVES, P.M.O.J. Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beuaveria bassiana* (Bals.)Vuill. and in vitro phytosanitary products. **Pest Managment Science**, Sussex, v. 61, n. 7, p. 667-674, 2005.
- STAUDERMAN, K.; AVERY, P.; ARISTIZÁBAL, L.; ARTHUR, S. Evaluation of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 22, p.747–761, 2012.
- 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.
- 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.
- 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.
- WENNINGER, E.J; STELINSKI, L.L.; HALL. Roles of olfactory cues, visual cues, and mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) to four diferent host plants. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, n.12, p. 225-234, 2009.
- 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.
- 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.

ZHOU, F.; ALI, S.; HUANG, Z. Influence of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* on *Axinoscymnus cardilobus* (Coleoptera: Coccinellidae) under laboratory conditions. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, p. 709-722, 2010.

2 AÇÃO DE ADJUVANTES NA ADESÃO E GERMINAÇÃO DE *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 EM NINFAS E ADULTOS DE *Diaphorina citri*

Resumo

Estudos prévios demonstraram que a utilização dos adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 melhoram a eficiência de controle do fungo *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 sobre ninfas e adultos de *Diaphorina citri*. No entanto, não se conhece a ação destes adjuvantes no desenvolvimento de *I. fumosorosea* no tegumento do inseto. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar comparativamente a adesão e germinação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na cutícula de ninfas e adultos de *D. citri*, quando esse entomopatógeno foi misturado com os adjuvantes Tween 80; KBRAdj e Silwet L-77. Os tratamentos testados foram: 1- Tween 80 0,01% (controle), 2- KBRAdj 0,075%, 3- Silwet L-77 0,025%, 4- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 + Tween 80 0,01%, 5- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj 0,075%, 6- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 + Silwet L-77 0,025%. O fungo foi aplicado na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹. As imagens obtidas no microscópio eletrônico de varredura permitiram determinar que o corpo dos adultos de *D. citri* apresenta um tegumento mais complexo que as ninfas, observando elevada quantidade de acantos, sensilas e ceras. A aplicação isolada dos adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 provocaram alterações na cutícula de adultos, porém não alteram visivelmente a cutícula de ninfas de 1° e 3° instares. A adição dos adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 nas suspensões de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 favoreceram o desenvolvimento do entomopatógeno em todos os estágios do inseto em comparação com o Tween 80. Germinação dos conídios foi observada após 24h em ninfas de 3° instar e 48h em ninfas de 1° instar e adultos de *D. citri*, exceto com Tween 80 onde nos adultos não foi observada germinação. Maior proporção de conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 aderidos e germinados foi observada na região ventral posterior (abdomen) em adultos, entretanto, para ninfas de 1° e 3° instares a germinação ocorreu tanto na região dorsal como ventral. Os testes de deposição de conídios demonstraram que o número de conídios de *I. fumosorosea* aderidos foi similar em todos os tratamentos em ninfas de 1° e 3° instares. Os conídios aderidos aos insetos foram retirados por lavagem em água e quantificados e constatou-se menor adesão de conídios em adultos nas pulverizações do fungo com Silwet L-77 em comparação com os demais adjuvantes. Os resultados obtidos sugerem que os adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 interagem na adesão e germinação dos conídios de *I. fumosorosea* em ninfas e adultos de *D. citri*.

Palavras-chave: Formulações, Psilídeo asiático do citros, Ultramorfometria da cutícula, Biopesticida

Abstract

Previous studies have demonstrated that the use of the adjuvants KBRAdj and Silwet L-77 improved the efficiency of *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 to control nymphs and adults of *Diaphorina citri*. However, the action of these adjuvants in the development of *I. fumosorosea* on insect integument is not known. In this context, the aim of this study was to evaluate the adhesion and germination of conidia *I. fumosorosea* ESALQ-1296 on the cuticle of nymphs and adults of *D. citri* when this entomopathogen was formulated with the adjuvants Tween 80; KBRAdj and Silwet L-77. The treatments were: 1- 0.01% Tween 80 (control), 2- 0.075% KBRAdj, 3- 0.025% Silwet L-77, 4- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 + 0.01% Tween 80, 5- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 + 0.075% KBRAdj, 6- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 + 0.025% Silwet L-77. The fungus was applied at the concentration of 5×10^6

conidia.mL⁻¹. The images obtained in a scanning electron microscope revealed that the body of adult *D. citri* presents a more complex integument than the nymphs, showing high amount of acanthus, sensilla and waxes. The application of KBRAdj and Silwet L-77 adjuvants alone caused changes in the adult cuticle, but this was not noticeably on the cuticle of 1st and 3rd nymphal instars. Addition of the adjuvants KBRAdj and Silwet L-77 in the suspension of *I. fumosorosea* favored the development of the entomopathogen in all insect stages in comparison with the Tween 80. Germination of the conidia was observed after 24hs in 3rd instar nymphs and 48hs in 1st instar and adults of *D. citri*, except with Tween 80 where no germination was observed in adults. A higher proportion of conidia of *I. fumosorosea* adhered and germinated was observed in the posterior ventral region (abdomen) in adults, however, for 1st and 3rd instar nymphs the germination occurred in dorsal and ventral regions. Counting of conidia washed from the insects showed that the number of conidia of *I. fumosorosea* adhered was similar in all treatments for 1st and 3rd instars nymphs. Lower adhesion of conidia in adults was observed in fungus sprays with Silwet L-77 compared to the other adjuvants. The results suggest that the adjuvants KBRAdj and Silwet L-77 interact in the adhesion and germination of conidia *I. fumosorosea* ESALQ-1296 in nymphs and adults of *D. citri*.

Keywords: Formulations, Asian citrus psyllid, Cuticle ultramorphometry, Biopesticide.

2.1 Introdução

O sucesso do controle de pragas por fungos entomopatogênicos está diretamente relacionado com as primeiras etapas do ciclo de infecção do patógeno sobre o tegumento do inseto hospedeiro. A adesão dos conídios sobre a cutícula dos insetos é um evento complexo que ocorre por mecanismos físicos e químicos entre o patógeno e o hospedeiro (ALVES, 1998). Neste sentido, uma das alternativas que se tem empregado para melhorar a adesão dos conídios é a utilização de adjuvantes na preparação das formulações fúngicas. Os adjuvantes são substâncias incorporadas nas preparações de defensivos agrícolas para facilitar o manuseio e aplicação, aumentar a eficiência e a segurança do produto ao usuário (KISSMANN, 1998).

Conceschi (2013) observou que quando o fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foi pulverizado sobre ninfas e adultos de *D. citri* utilizando a água e o espalhante adesivo Tween 80, as mortalidades foram inferiores a 20%. No entanto, quando os adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 foram adicionados às suspensões fúngicas, a mortalidade de ninfas e adultos foi superior a 60%. Segundo Alves (1998) esse aumento na mortalidade pode ser devido ao melhor espalhamento e dispersão dos conídios na pulverização e também na adesão dos conídios sobre o tegumento do inseto. Além disso, alguns adjuvantes podem reduzir os efeitos da radiação ultravioleta sobre os conídios, aumentando assim a chance de germinação e penetração do fungo entomopatogênico no corpo do inseto (D'ALESSANDRO, comunicação pessoal).

Por outro lado, existem relatos que alguns adjuvantes podem ser tóxicos aos artrópodes, pois promovem a asfixia dos insetos pela formação de uma película sobre os indivíduos, que impede com que estes respirem (PURCELL e SCHROEDER, 1996; STARK e WALTHALL, 2003). Os adjuvantes como KBRAAdj e Silwet L-77 resultaram em mortalidades elevadas em laboratório, principalmente para *D. citri*, *T. citricida* e as espécies de ácaros *B. phoenicis* e *P. citri* (COCCO e HOY, 2008; CONCESCHI, 2013). Imai et al. (1995) avaliaram a ação Silwet L-77 na mortalidade de adultos de *Myzus persicae* em diferentes condições de umidade e constataram que o composto químico de Silwet L-77 inibe a evaporação da água do corpo do inseto, e quando esses insetos são mantidos em alta umidade, morrem por sufocamento.

Embora autores tenham referido que os adjuvantes melhoram a eficiência no controle de *D. citri*, não é sabido se esses produtos provocam modificações na estrutura cuticular do inseto, de tal forma que facilite a adesão e germinação dos conídios de *I. fumosorosea* sobre o corpo de *D. citri*. Portanto, nesse capítulo buscou-se estudar a ultramorfologia da cutícula de ninfas e adultos de *D. citri* e avaliar o grau de adesão e germinação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 pulverizado em misturas com os adjuvantes: Tween 80, KBRAAdj e Silwet L-77.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Criação de *Diaphorina citri*

A criação foi iniciada utilizando adultos de *D. citri* fornecidos pelo Laboratório de Biologia de Insetos situado no campus da ESALQ-USP em Piracicaba-SP. A criação foi mantida em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C; 65-80% de UR e 12 h de fotofase e também em estufas em condições climáticas não controladas, de forma semelhante à descrita por Conceschi (2013). A técnica de criação de *D. citri* utilizada foi semelhante à metodologia descrita por Gómez-Torres (2009).

2.2.2 Produção do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* ESALQ 1296 e preparo das suspensões fúngicas

O isolado *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 foi obtido de *Bemisia tabaci* na região de Jaboticabal-SP e esta disponível no banco de entomopatógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, ESALQ-USP, Piracicaba-SP, armazenados em criotubos dentro de freezer (-80 °C). O fungo foi cultivado 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, 15 g.L⁻¹ de ágar) 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.

A produção de conídios aéreos foi feita em sacos de polipropileno contendo 300 g de arroz parboilizado tipo 1, previamente cozido e esterilizado por autoclavagem a 120 °C por 20 minutos. Os sacos foram inoculados com 10 mL de uma suspensão de 1 x 10⁷ conídios.mL⁻¹ de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 produzidos em placas e agitados vigorosamente para obter uma distribuição uniforme dos propágulos no substrato. As sacolas contendo o arroz inoculado foram armazenadas em uma B.O.D. a 26 ± 1°C e 12 horas de fotofase e, após quatro dias, o arroz foi transferido para bandejas plásticas (30 × 45 × 12,5 cm) a fim de permitir a esporulação fúngica. Posteriormente, os conídios aéreos foram extraídos dos grãos de arroz por meio de um sistema vibratório contendo três peneiras de 20 cm de diâmetro com o tamanho da abertura de 32 mesh (500 µm) (BERTEL Indústria Metalúrgica Ltda., São Paulo, Brasil). Os conídios puros em forma de pó foram armazenados em freezer -20 °C até o preparo das suspensões para os experimentos.

Para o preparo das suspensões foram misturados em água destilada estéril os conídios aéreos produzidos em arroz (lote com viabilidade superior a 95%). 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 viáveis.mL⁻¹. Posteriormente, foram adicionados os adjuvantes Tween 80 na concentração de 0,01% (v/v) (Monooleato de Sorbitan 80, Oxiteno®, Brasil), KBRAdj na concentração de 0,075% (v/v) (em pedido de registro pela Koppert Sistemas Biológicos LTDA, Piracicaba, SP, Brasil) e Silwet L-77 na concentração de 0,025% (v/v) (Copolímero de poliéter e silicone 1000 g.L⁻¹, Momenive

Performance Materials Industria de Silicones LTDA[®], Brasil), concentrações estas utilizadas por Conceschi, 2013.

2.2.3 Pulverizações e preparação de *Diaphorina citri* para a observação no microscópio eletrônico de varredura

Os estudos tiveram a colaboração da pesquisadora Dra. Maria Izabel Camargo Mathias, docente e responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da UNESP – Rio Claro e do Pós-doutorando Dr. André Arnosti. Os tratamentos foram preparados no laboratório de Patologia e Controle microbiano da ESALQ-USP através da mistura do fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (*If*) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ com o adjuvante Tween 80, KBRAdj e Silwet L-77, sendo: 1- Tween 80 0,01%, 2- KBRAdj 0,075%, 3- Silwet L-77 0,025%, 4- *If* + Tween 80 0,01%, 5- *If* + KBRAdj 0,075%, 6- *If* + Silwet L-77 0,025%. O tratamento com o Tween 80 foi utilizado como controle porque é um espalhante adesivo amplamente utilizado na preparação de suspensões fúngicas.

A pulverização dos tratamentos foi realizada sobre ninfas e adultos de *D. citri*. Antes da pulverização, folhas jovens de limão cravo (*Citrus limonia*) foram infestadas com ninfas de 1º e 3º instares e acondicionadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Para os ensaios com adultos, foi necessário anestesiá-los com CO₂ por período de 30 segundos, a fim de evitar a fuga durante a pulverização. Os insetos anestesiados foram colocados em placas de Petri de vidro de 9 cm de diâmetro contendo papel filtro no fundo. A pulverização foi realizada em uma Torre de Potter (Burkard Manufacturing Company Limited), sob pressão de 15 PSI e um volume de 2 mL por repetição. O número total de ninfas de cada estágio e adultos pulverizados foi de 80 indivíduos dispostos em quatro repetições (20 insetos/cada). Posteriormente, as ninfas tratadas foram mantidas nas folhas de limão cravo e os adultos foram confinados em uma planta de limão cravo de aproximadamente 20 cm de altura colocada dentro de um copo plástico (dimensões de 13,5 cm x 8,5 cm x 5,5 cm e o volume de 500 mL) contendo tecido *voile* com velcro (CONCESCHI, 2013). Todos os insetos tratados foram mantidos em sala climatizada 25 ± 2 °C, 70 ± 20 % de UR e 12 h de fotofase, por 24, 48, 72 horas. Em cada tempo, foram retirados 15 insetos e transferidos para tubos de Eppendorf contendo uma solução fixadora de Paraformaldeído a 4% e mantidos por 24 horas em geladeira. Após a fixação dos insetos, foi realizada a desidratação dos mesmos pela

passagem sucessiva de soluções de acetona (70%, 80%, 90%, 95% e duas vezes em 100%, com duração de 10 minutos cada banho). Os insetos foram colocados para secagem em ponto crítico, e posteriormente, foram colados em *stubs* de alumínio com fitas dupla-face, a fim de serem metalizados com banho de ouro em *sputtering*. Os insetos foram examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura Hitachi TM3000, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da UNESP – Rio Claro.

2.2.4 Avaliação da deposição de conídios de *Isaria fumosorosea* sobre *Diaphorina citri*

Com o objetivo de avaliar a deposição de conídios de *Isaria fumosorosea* sobre as ninfas e adultos de *Diaphorina citri*, foram realizadas as pulverizações dos tratamentos descritos previamente no item 2.2.3. Dez indivíduos foram pulverizados por repetição (n=3 repetições) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹, totalizando 30 insetos por tratamento. Os experimentos foram repetidos duas vezes no tempo e os dados foram analisados conjuntamente por não apresentar diferenças entre os experimentos. Após a pulverização e secagem dos tratamentos no corpo dos insetos, cada repetição de 10 indivíduos foi transferida para tubos de Eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de água destilada estéril. Os tubos foram agitados em Vortex[®] por 2 minutos para facilitar a remoção dos conídios aderidos ao corpo dos insetos. De cada tubo foram retirados 100 µL e inoculados em placas de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA seletivo descrito por Behie, Jones e Bidochka (2015). Todas as placas foram mantidas em B.O.D. a 26 ± 1 °C e 14 horas de fotofase por quatro dias para quantificar o número de unidade formadora de colônia (UFC) e assim determinar o número de conídios depositado nos insetos. Os dados de UFC foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância com auxílio do pacote *laercio* (SILVA, 2010) do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

2.3 Resultados E Discussão

2.3.1 Caracterização cuticular de ninfas de 1° e 3° instares e adultos de *Diaphorina citri*

Importantes diferenças na morfologia da cutícula de ninfas de 1° e 3° instares e adultos de *D. citri* foram observadas, e que podem explicar a adesão e germinação diferencial de conídios nas fases do inseto (Figura 1). As ninfas de 1° e 3° instares não apresentam

estruturas esculturais na região dorsal e ventral, apresentando apenas uma pequena camada de cera que sobrepõem à cutícula dos estádios (Figura 1 B; D). Já a cutícula dos adultos apresenta uma morfologia mais complexa que as ninfas, contendo estruturas especializadas como, os acantos e sensilas (Figura 1 E; F). As sensilas são predominantemente do tipo tricóide, com aproximadamente 15 μm de comprimento (Figura 1 F). Uma maior quantidade de setas e ceras foi encontrada na região dorsal dos adultos de *D. citri*, fator que pode dificultar o molhamento do corpo do inseto quando uma suspensão aquosa é aplicada. Segundo Arnosti et al., (2016) essa região dos adultos de *D. citri* é mais esclerotizada que a região ventral o que se torna mais resistente a penetração de microrganismos.

Figura 1. Morfologia da cutícula da região dorsal de ninfas de 1º (A, B) e 3º instares (C, D) e adultos (E, F) de *Diaphorina citri* sob microscopia eletrônica de varredura

Segundo Bush et al. (2008), os insetos que apresentam grande quantidade de setas e ceras no corpo são considerados hidrofóbicos, como por exemplo, os insetos aquáticos que são capazes de deslocar sobre a superfície da água sem submergirem. Assim, as micro-nanoestruturas encontradas no corpo dos insetos podem afetar a tensão superficial da água. Watson et al. (2010) demonstraram que a disposição das estruturas cuticulares no corpo dos insetos podem aumentar a hidrofobicidade do tegumento em uma suspensão aquosa. Estes mesmos autores verificam que quando óxido de silicone é adicionado na água, a adesão e o contato da gota d'água no corpo do inseto aumenta cerca de 10 vezes. Portanto, para que

ocorra uma melhoria no molhamento do corpo de ninfas e adultos de *D. citri* seria necessária a utilização de adjuvantes que quebrem a tensão superficial entre a gota d'água e a superfície do corpo do inseto.

2.3.2 Efeito dos adjuvantes sobre a cutícula de adultos e de ninfas de 1° e 3° instares de *Diaphorina citri*

Após aplicação dos adjuvantes Tween 80 (0,01%), KBRAdj (0,075%) e Silwet L-77 (0,025%) em ninfas de 1° e 3° instares de *D. citri* não foi observada nenhuma alteração visível na cutícula. No entanto, a aplicação de KBRAdj e Silwet L-77 em adultos de *D. citri* ocasionou alterações na cutícula na região ventral e dorsal do corpo, caracterizadas por manchas escuras (Figura 2). Essas alterações podem ter acontecido pela remoção dos hidrocarbonetos ou lipídeos depositados no corpo do inseto, os quais foram descritos por Buteler e Stadler (2009) como as moléculas que conferem maior resistência à perda de água e à penetração de patógenos no inseto.

Figura 2. Morfologia das regiões ventral (A-C, E-G e L-K) e dorsal (D, D1, H, H1 e L1) de adultos de *Diaphorina citri* após pulverização de diferentes adjuvantes (Tween 80 0,01%, KBRAdj 0,075% e Silwet-L77 0,025%) sob microscopia eletrônica de varredura. As áreas com alteração na cutícula são indicadas por setas brancas. Escalas: A, D, E, H, I e L: 500 μ m; B, C, F, J e K: 300 μ m; G: 400 μ m; D1, H1 e L1: 250 μ m

2.3.3 Adesão e germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na mistura com diferentes adjuvantes sobre ninfas de 1º instar de *Diaphorina citri*

As ninfas de 1º instar de *D. citri* são achatadas e alongadas, e apresentam uma cutícula sem estruturas complexas, o que poderia favorecer o contato e adesão dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296. As imagens obtidas no microscópio eletrônico de varredura permitiram observar a adesão dos conídios na região dorsal e ventral das ninfas em todos os tratamentos (Figuras 3 e 4). Os adjuvantes Tween 80, Silwet L-77 e KBRAdj, não provocaram alterações no tegumento na região dorsal e ventral das ninfas. Na região dorsal verificou-se que os conídios encontravam-se em maior quantidade próximos a sulcos intersegmentares (Figura 3). A germinação dos conídios ocorreu predominantemente na região dorsal 48 horas após no tratamento *If* + Silwet L-77 (Figura 3 E, e), e após 72 horas foi observado em todos os tratamentos (Figuras 3 C, F, I). Porém foi no tratamento *If* + KBRAdj que se encontrou a presença do fungo *I. fumosorosea* em processo mais avançado de desenvolvimento e possível penetração sobre o corpo das ninfas (Figura 3 I). Situação semelhante foi encontrada na região ventral (Figura 4). O processo de germinação na região ventral foi observado apenas após 72 horas no tratamento *If* + Silwet L-77 (Figura 4 F).

Nossos resultados obtidos em ninfas de 1º instar de *D. citri* coincidem com os trabalhos conduzidos por Malsam et al. (2002), onde foi demonstrado que a adição de adjuvantes nas suspensões fúngicas aumentou a adesão e distribuição dos conídios de *M. anisopliae* em ninfas de 1º instar das espécies de moscas-brancas, *Trialeurodes vaporariorum* e *Bemisia tabaci*.

A utilização dos adjuvantes na mistura com os fungos entomopatogênicos pode melhorar a adesão dos conídios sobre o corpo do inseto, e consequentemente aprimorar a eficácia de controle de *D. citri*. Conceschi (2013) verificou que a mortalidade de *D. citri* provocada pelos fungos entomopatogênicos *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *B. bassiana* ESALQ-PL63 foi incrementada quando os adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 foram adicionadas nas suspensões fúngicas. D'Alessandro (comunicação pessoal) verificou que a adição de KBRAdj na concentração de 0,075% e Silwet L-77 na concentração de 0,025% aumentou o espalhamento da gota d'água sobre as folhas de citros. Assim, essa atividade sinérgica dos adjuvantes em conjunto com os fungos entomopatogênicos provalvemente pode ter acontecido pelo aumento no molhamento do inseto, o que favoreceu a maior adesão e espalhamento dos conídios na cutícula. Portanto, a adição de adjuvantes na formulação de

bioprodutos a base de fungos entomopatogênicos faz-se necessária para melhorar o desempenho desses entomopatógenos nas pulverizações para o controle de *D. citri*.

Figura 3. Efeitos de adjuvantes (Tween 80 0,01%, KBRAAdj 0,075% e Silwet-L77 0,025%) na adesão e germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na região dorsal de ninfas de 1º instar de *Diaphorina citri* por microscopia eletrônica de varredura. Seta: conídios. Barra: A-I: 100 µm; a-i: 15 µm

Figura 4. Efeitos de adjuvantes (Tween 80 0,01%, KBRAAdj 0,075% e Silwet-L77 0,025%) na adesão e germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na região ventral de ninfas de 1º instar de *Diaphorina citri* por microscopia eletrônica de varredura. Seta: conídios. Barra: A-I: 100 µm; a-i: 15 µm

2.3.4 Adesão e germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na mistura com diferentes adjuvantes sobre ninfas de 3º instar de *Diaphorina citri*

As ninfas de 3º instar de *Diaphorina citri* são achatadas e alongadas, assemelhando-se muito às ninfas de 1º instar, porém com tamanho e área corporal superior. As imagens obtidas no microscópio eletrônico de varredura permitiram observar que as suspensões fúngicas contendo os adjuvantes Tween 80, Silwet L-77 e KBRAdj, não provocaram alterações no tegumento na região dorsal e ventral das ninfas (Figuras 5 e 6). Também, não foram encontradas alterações na deposição de conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na região dorsal e ventral após a aplicação de todos os tratamentos. Na região dorsal foi observado que após 24 horas da aplicação das suspensões fúngicas, os conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 estavam aderidos na cutícula predominantemente nas áreas próximas aos intersegmentos do corpo do inseto (Figura 5). No mesmo período, foi observado o processo de germinação dos conídios em todos os tratamentos (Figura 5 A; D; G). Entretanto, o desenvolvimento do fungo nos tratamentos *If* + KBRAdj e *If* + Silwet L-77 foi mais rápido que no tratamento *If* + Tween 80, sendo observado após 72 horas a extrusão de hifas do fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na parte dorsal das ninfas (Figuras 5 C; F; I). Na região ventral das ninfas de 3º instar de *D. citri* foi observado que os conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 da aplicação do tratamento dos tratamentos *If* + Tween, *If* + Silwet L-77 e *If* + KBRAdj apresentaram conídios germinados (Figuras 6 A; D; G).. Assim, após 72 horas nos tratamentos contendo os adjuvantes Silwet L-77 e KBRAdj foi possível observar a extrusão das hifas fúngicas e a presença de micélios externamente nas ninfas de 3º instar de *D. citri*.

De forma geral, a adesão e germinação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ 1296 em ninfas de terceiro instar de *D. citri* foi observada principalmente próximo aos intersegmentos ou cavidades do exoesqueleto das ninfas. Estudo de microscopia eletrônica realizado por Padulla (2007) verificou que conídios de *B. bassiana* ESALQ-PL63 também ficam aderidos nesses locais em *D. citri*. Para outras espécies de insetos, a região membranosa intersegmentar tem sido o local de maior fixação dos conídios (McCAULEY, ZACHARUK e TINLINE, 1968). Portanto, a topografia da epicutícula do corpo inseto pode aumentar a adesão dos conídios (BOUCIAIS e PENDLAND, 1991), favorecendo assim a infecção pelo entomopatógeno.

Figura 5. Efeitos de adjuvantes (Tween 80 0,01%, KBRAj 0,075% e Silwet-L77 0,025%) na adesão e germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na região dorsal de ninfas de 3º instar de *Diaphorina citri* por microscopia eletrônica de varredura. g: germinação; sp: sítio de penetração; ex: extrusão; seta preta: conídios. Barra: A-I: 250 µm; a-i: 15 µm

Figura 6. Efeitos de adjuvantes (Tween 80 0,01%, KBRAdj 0,075% e Silwet-L77 0,025%) na adesão e germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na região ventral de ninfas de 3º instar de *Diaphorina citri* por microscopia eletrônica de varredura. g: germinação; sp: sítio de penetração; ex: extrusão; seta preta: conídios. Barra: A-I: 250 µm; a-i: 15 µm

A maioria dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 aderidos no tegumento das ninfas de terceiro instar de *D. citri* encontravam-se germinados após 24 horas da pulverização, o qual também foi encontrado por Padulla (2007) para *B. bassiana* ESALQ-PL63 para o mesmo instar. Segundo Moino Jr et al. (2002) o tempo de germinação dos conídios dos fungos entomopatogênicos pode ser variável dentro da mesma espécie de entomopatógeno. Esses autores verificaram que o intervalo de germinação dos conídios de *B. bassiana* (isolados ESALQ-447 e ESALQ-634) foi entre 12 a 48 horas quando aplicados sobre o tegumento de *Heterotermes tenuis*.

Ao comparar os resultados encontrados nos experimentos com ninfas de 1º e 3º instares de *D. citri* verificamos diferenças entre o tempo de germinação dos conídios para cada um dos estádios do inseto. Conforme descrito acima, conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em germinação foram encontrados após 24 horas da pulverização em ninfas de 3º instar de *D. citri* e a partir de 48 horas para as ninfas de 1º instar de *D. citri*. Essa diferença no tempo de germinação pode ter sido determinada pela diferença na quantidade de inibidores cuticulares das ninfas de primeiro instar em comparação ao estágio de terceiro instar de *D. citri*. Segundo James et al. (2003) os lipídios cuticulares de *Bemisia argentifolii* apresentam efeito inibitório sobre conídios de *I. fumosorosea* e *B. bassiana*, podendo ter variação de quantidade e concentração de acordo com o estágio ou estágio de desenvolvimento do inseto. Vários outros autores também tem observado esses efeitos, e descrevem que os lipídeos cuticulares de espécies de lepidópteros (SAITO; AOKI, 1983) e mosca branca (JAMES et al., 2003) podem apresentar efeito fungistático ou fungicida sobre a germinação de conídios de fungos entomopatogênicos. Portanto, a camada cerosa do corpo das ninfas de 1º instar de *D. citri* pode apresentar compostos químicos que poderiam reduzir ou retardar o tempo de germinação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296. Para confirmar essas hipóteses seria necessário conduzir estudos sobre a composição cuticular das ninfas de *D. citri*.

2.3.5 Adesão e germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na mistura com diferentes adjuvantes sobre adultos de *Diaphorina citri*

As observações conduzidas no microscópio eletrônico de varredura permitiram determinar que o corpo dos adultos de *D. citri* apresenta um tegumento mais complexo que as ninfas, observando elevada quantidade de acantos, sensilas e ceras. A aplicação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 misturados com os adjuvantes resultaram em adesão dos conídios na região dorsal e ventral dos adultos. Na região dorsal anterior (cabeça e tórax) do

adulto de *D. citri* foi observada maior quantidade de acantos, sensilas e ceras em relação à região ventral posterior (abdômen). A aplicação das misturas de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e os adjuvantes não interferiram na quantidade de conídios depositados (Figura 7), mas influenciou na germinação dos conídios. Somente no tratamento *If* + KBRAdj após 72 horas foi observada a germinação dos conídios (Figura 7 J). Na região ventral posterior dos adultos de *D. citri* foi observada maior adesão dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 próxima às regiões intersegmentares e sensilas (Figura 8), aparentando ser maior do que na região dorsal anterior. Também foram observadas pequenas lesões (manchas escuras) na superfície do tegumento dos adultos, as quais podem ter sido causadas pela ação do adjuvante Silwet L-77 e KBRAdj (Figura 8). O processo de germinação dos conídios foi constatado apenas nos tratamentos de *If* + Silwet L-77 e *If* + KBRAdj após o período de 48 horas da aplicação (Figura 8 E, H). Assim, o tratamento *If* + Tween 80 não apresentou conídios germinados em nenhum dos tempos avaliados (Figura 8 A; B; C).

O grau de esclerotização da cutícula e a topografia da região dorsal anterior (cabeça e tórax) de *D. citri* é muito diferente da região ventral posterior (abdômen). A região dorsal anterior apresenta uma cutícula mais espessa e esclerotizada em relação à região ventral posterior (ARNOSTI et al., 2016). Além disso, a região dorsal anterior também é composta por uma grande quantidade de estruturas cerosas, acantos e cerdas, diferentemente do que ocorre na região ventral posterior que se caracteriza por ser mais lisa e com sulcos intersegmentares (ARNOSTI et al., 2016). Segundo Sosa-Gomez, Boucias e Nation (1997) a topografia e a composição química da cutícula dos insetos são fatores que comprometem a adesão e germinação de conídios de *M. anisopliae* em ninfas de *Nezara viridula*. Portanto, esses fatores podem ter interferido na adesão e germinação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na região dorsal dos adultos de *D. citri*.

A aplicação de Tween 80 na concentração de 0,01% não afetou a cutícula dos adultos de *D. citri* nas duas regiões estudadas (dorsal anterior, ventral posterior). Os conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 pulverizados junto com esse adjuvante não apresentaram germinação durante todo o período de avaliação, o que pode ter sido causada pela ação dos lipídeos e hidrocarbonetos cuticular do inseto. Assim, alguns desses compostos cuticulares podem ter efeito fungistático ou fungicida, retardando ou impedindo a germinação dos conídios *I. fumosorosea* ESALQ-1296 no corpo do adulto de *D. citri*.

Figura 7. Efeitos de adjuvantes (Tween 80 0,01%, KBRAdj 0,075% e Silwet-L77 0,025%) na adesão e germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na região dorsal de adultos de *Diaphorina citri* por microscopia eletrônica de varredura. ac: acantos; c: cera; s: sensilas; seta preta: conídios. Barra: A-J: 250 µm; j1: 15 µm

Figura 8. Efeitos de adjuvantes (Tween 80 0,01%, KBRAdj 0,075% e Silwet-L77 0,025%) na adesão e germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na região ventral de adultos de *Diaphorina citri* por microscopia eletrônica de varredura. ac: acantos; c: cera; s: sensilas; le: Lesões causadas pelo adjuvante; seta preta: conídios. Barra: A-I: 250 µm; c1, f1 e i1: 15 µm

Tais efeitos já foram descritos por Hajek e Eastburn (2003) para outras espécies de fungos entomopatogênicos, como em *Entomophaga maimaiga* em pulverizações sobre algumas espécies de lepidópteros, e por Yaginuma, Hiromori e Hatsukade (2004) para *Beauveria amorphae* (isolado HPBa-1) em larvas de *Heptophylla picea* (Coleoptera: Scarabaeidae). Entretanto, a aplicação de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 nas misturas com KBRAdj e Silwet L-77 apresentaram conídios germinados após as 72 horas, podendo indicar que a aplicação destes adjuvantes pode ter removido ou diluído os compostos cuticulares que

afetam a germinação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296. Da mesma forma, foi observado que o tempo de germinação dos conídios no tratamento *If* + KBRAdj foi superior na região dorsal (72h) em comparação com a região ventral (48h). Esses resultados sugerem que os compostos cuticulares se encontram em maior quantidade na região dorsal em comparação com a região ventral.

Em geral a aplicação dos adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 mostraram ser capazes de potencializar a germinação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre adultos de *D. citri*, favorecendo assim o desenvolvimento da infecção fúngica.

2.3.6 Deposição de conídios em ninfas e adultos de *Diaphorina citri*

O número de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 depositados nas ninfas e adultos de *D. citri* variou proporcionalmente ao tamanho dos insetos, que pode ser observado pela variação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para cada estágio e estágio do inseto (Tabela 1).

As ninfas de 1º e 3º instares de *D. citri* apresentaram semelhança estatística no número de UFC/inseto em todas as misturas de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 com os adjuvantes para cada estágio ($F_{2, 16} = 2,48$; $P=0,135$ e $F_{2, 16} = 0,37$; $P=0,542$, respectivamente). Em adultos de *D. citri* foi observado que os tratamentos *If* + KBRAdj e *If* + Tween 80 foram os que apresentaram maior número de UFC, sendo estatisticamente diferente do tratamento *If* + Silwet L-77 ($F_{2, 16} = 31,02$; $P<0,0001$). Esses resultados demonstraram que a adição do Silwet L-77 resultou em menor deposição de conídios na cutícula dos adultos. O adjuvante Silwet L-77 é classificado como um surfactante e tem a propriedade de aumentar o espalhamento e molhamento das pulverizações, portanto, a adição deste adjuvante na mistura com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 pode ter aumentado o escorrimento dos conídios do corpo do adulto de *D. citri*.

A maior eficiência de controle de adultos de *D. citri* pelos tratamentos *If* + KBRAdj e *If* + Silwet L-77 estudos de Conceschi (2013) provamente não está relacionada à maior deposição de conídios, mas sim a interação destes com cutícula e taxa de germinação no corpo do inseto.

Tabela 1. Deposição de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 sobre ninfas e adultos de *Diaphorina citri* aplicados com os adjuvantes Tween 80, KBRAdj e Silwet L-77

Tratamentos	Média de UFC/inseto $\pm$ EP*		
	Ninfas de 1° instar	Ninfas de 3° instar	Adultos
<i>I. fumosorosea</i> + Tween 80	4,7 $\pm$ 2,6a	53,3 $\pm$ 8,0a	609,0 $\pm$ 39,0a
<i>I. fumosorosea</i> + KBRAdj	7,3 $\pm$ 2,6a	49,3 $\pm$ 3,8a	648,0 $\pm$ 30,9a
<i>I. fumosorosea</i> + Silwet L-77	8,0 $\pm$ 2,0a	49,7 $\pm$ 7,9a	166,7 $\pm$ 13,9b
CV(%)	58,7%	21,7%	30,9%

* UFC= Unidade Formadora de Colônia; Médias seguidas por letras diferentes na coluna apresentam diferenças estatísticas pelo teste de múltipla comparação ($P < 0,05$), CV (%) = Coeficiente de variação

2.4 Conclusões

Esse estudo conduzido para avaliar adesão e germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 sobre ninfas e adultos de *Diaphorina citri* foi o primeiro a relatar a influência dos adjuvantes Tween 80, Silwet L-77 e KBRAdj no processo de infecção e consequentemente, no controle de *D. citri*. Assim, podem-se indicar as principais conclusões:

- Os adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77 geram lesões na estrutura cuticular de adultos de *D. citri*;
- A adesão dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na região dorsal das ninfas de 1° e 3° instares ocorre predominantemente nos sulcos intersegmentares, observando o processo de germinação após 48h e 24h, respectivamente;
- O desenvolvimento do fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 nos tratamentos *If* + KBRAdj e *If* + Silwet L-77 foi mais rápido que no tratamento *If* + Tween 80 em ninfas de 3° instar de *D. citri*;
- A adesão dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em adultos de *D. citri* ocorre predominantemente próxima aos sulcos intersegmentares da região ventral posterior (abdômen), sendo a germinação observada após 48 h nos tratamentos com os adjuvantes KBRAdj e Silwet L-77;
- A deposição de conídios foi similar em ninfas de 1° e 3° instares de *D. citri*, entretanto a mistura de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 com o adjuvante Silwet L-77 resultou em menor quantidade de conídios aderidos no corpo dos adultos de *D. citri* em comparação com os demais tratamentos.

Referências

- ALVES, S.B.; TAMAI, M.A.; ROSSI, L.S.; CASTIGLIONI, E. *Beauveria bassiana* pathogenicity to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 37, p. 117-122, 2005.
- ARNOSTI, A.; DELALIBERA JR., I.; CONCESCHI, M.R.; TRAVAGLINI, R.V.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological mapping of the integument of adults females of *Diaphorina citri* Kuwayama, targeting the development of control strategies. **International Journal of Advance Agricultural Research**, Southport, v. 4, p. 57-64, 2016
- BEHIE, S.W.; JONES, S.J.; BIDOCHKA, M.J. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. **Fungal Ecology**, Oxford, v. 13, p-112-119, 2015.
- BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. Attachment of mycopathogens to cuticle. In **The fungal spore and disease initiation in plants and animals** Cole and Hoch Ed. Plenum, New York, 1991, pp.101-127.
- BUSH, J.W.N.; HU, D.L.; PRAKASH, M. The integument of water-walking arthropods: Form and function. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 34, p.117-192, 2008.
- BUTLER, M.; STALLER, T. A Review on the mode of action and current use of petroleum distilled spray oils. **Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management**, Margarita Stoytcheva (Ed.), 2009. Disponível em: <www.intechopen.com>. Acesso: 16 fevereiro 2016.
- 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.
- CONCESCHI, M.R. **Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* para o controle de pragas dos citros**. 2013. 104p. Dissertação de (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- 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.

- HAJEK, A.E.; EASTBURN, C.C. Attachment and germination of *Entomophaga maimaiga* conidia on host and non-host larval cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 82, p. 12-22, 2003.
- IMAI, T.; TSUCHIYA, S.; FUJIMORI, T. Aphicidal effects of Silwet L-77, organosilicone nonionic surfactant. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 30, n. 2, p. 380-382, 1995.
- 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.
- KISSMANN, K.G Adjuvantes para caldas de produtos fitossanitários. In: GUEDES, J.V.V & DORNELLES, B. (Org.). Tecnologia e segurança na aplicação de agrotóxicos: novas tecnologias. Santa Maria, 1998, p. 39-51.
- 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.
- McCAULEY, V.J.E.; ZACHARUK, R.Y.; TINLINE, R.D. Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 12, p. 444-459, 1968.
- MOINO JR., A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; NEVES, P.M.O.J.; PEREIRA, R.M.; VIEIRA, S.A. Esternal development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 2, p. 267-273, 2002.
- 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 de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- PURCELL, M.F. e 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 3.0.1 2013. Disponível em: <<http://r-development-core-team.software.informer.com>>. Acesso: 13 mar. 2015.
- 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.
- SILVA, L.J. Laercio: Duncan test, Tukey test and Scott-Knott test. R package version 1.0-1. 2010. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=laercio>>. Acesso em 03 nov. 2015.
- SOSA-GOMEZ, D.R.; BOUCIAS, D.G.; NATION, J.L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 69, p. 31-39, 1997.
- 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.
- YAGINUMA, D.; HIROMORI, H.; HATSUKADE, M. Relationship between virulence and adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria amorpha* (Strain: HpBa-1) to the yellowish elongate chafer, *Heptophylla picea* (Motschulsky) (Coleoptera: Scarabaeidae). **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 48, p. 101-108, 2004
- WATSON, G.; WATSON, J.A.; HU, S.; BROWN, C.L.; CRIBB, B.; MYHRA, S. Micro and nanostructures found on insect wings-designs for minimizing adhesion and friction. **International Journal of Nanomanufacturing**, Australia v. 5, n.1/2, p.112-128, 2010.

3 IMPORTÂNCIA DA CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE DE CONÍDIOS, RADIAÇÃO UV-B, UMIDADE RELATIVA DO AR E FUNGICIDAS NA EFICÁCIA DE *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 SOBRE *Diaphorina citri*

Resumo

O desempenho das aplicações de fungos entomopatogênicos no manejo integrado de pragas pode ser influenciado por diversos fatores, tais como a concentração e viabilidade dos propágulos infectivos do patógeno, umidade relativa do ar, radiação ultravioleta e os fungicidas químicos. Assim, conhecer esses fatores nos permite maximizar a eficiência do entomopatogêno sobre a praga, através de indicações do melhor horário de aplicação, da época do ano mais favorável, do intervalo entre pulverização de fungicidas e a pulverização do fungo entomopatogênico. Portanto, estudos foram conduzidos para determinar o efeito destes fatores sobre a eficiência do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 no controle de *Diaphorina citri*. A maior eficiência de controle de *D. citri* pelo fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foi obtida com lotes de conídios com alto vigor, entretanto é possível ajustar a concentração em função da viabilidade do entomopatógeno sem grandes perdas na mortalidade da praga. As formulações de *I. fumosorosea* com KBRAdj 0,075% apresentaram melhor desempenho no controle de *D. citri* em todos os níveis de umidade, mas especialmente em períodos de baixa umidade relativas ($\leq 50\%$) e sob exposição à radiação UV-B (> 2 horas) em relação a aplicação com Tween. Entretanto, é recomendável que as pulverizações sejam realizadas em períodos com menor incidência de radiação UV-B e maior umidade relativa do ar. As pulverizações dos fungicidas Kumus[®] DF, Kocide[®] WDG, Nativo[®], Flint 500[®] WG não influenciaram no desempenho do entomopatógeno quando os fungicidas foram pulverizados antes ou após a aplicação de *I. fumosorosea* sobre os adultos de *D. citri*. Portanto, a eficiência do fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 no controle de *D. citri* depende da formulação utilizada e das condições ambientais.

Palavras-chave: Controle microbiano; Fungo entomopatogênico; Condições climáticas; Psíldio dos citros

Abstract

The performance of entomopathogenic fungi applications in integrated pest management can be influenced by several factors, such as the concentration and viability of conidia, relative humidity, ultraviolet radiation and chemical fungicides. Thus, understanding these factors allows us to maximize the efficiency of the entomopathogen over the pest, through recommendations of the best time of application, the most favorable season, the interval between spraying of fungicides and spraying of the entomopathogenic fungus. Therefore, studies were conducted to determine the effect of these factors on the efficiency of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 in the control of *Diaphorina citri*. The highest control efficiency of *D. citri* by the fungus *I. fumosorosea* was obtained with batches of conidia with high vigor; however it is possible to adjust the concentration as a function of the viability of the entomopathogen without great losses in the mortality of the pest. The formulations of *I. fumosorosea* with 0.075% KBRAdj showed better performance in the control of *D. citri* at all moisture levels, but especially in periods of low relative humidity

($\leq 50\%$) and exposure to UV-B (> 2 Hours) in comparison to Tween application. However, it is recommended that spraying must be carried out in periods with lower incidence of UV-B radiation and higher relative humidity. Applications of the fungicides Kumus[®] DF, Kocide[®] WDG, Nativo[®], Flint 500[®] WG did not influence the performance of entomopathogen when the fungicides were sprayed before or after the application of *I. fumosorosea* on adults of *D. citri*. Therefore, the efficiency of the fungus *I. fumosorosea* ESALQ-1296 in controlling of *D. citri* depends on the formulation used and the environmental conditions.

Keywords: Microbial control; Entomopathogenic fungus; Climatic conditions; Asian Citrus Psyllid

3.1 Introdução

Diaphorina citri é controlada principalmente pela aplicação intensiva de inseticidas químicos em áreas comerciais, e mais recentemente tem sido implantado em algumas áreas a liberação inoculativa do parasitoide *Tamarixia radiata*, especialmente em áreas abandonadas, fundo de quintal e áreas urbanas. Segundo a Fundecitrus (2015) o controle do inseto transmissor do HLB (Huanglongbing) é dificultado em áreas abandonadas, fundo de quintal e áreas urbanas, que acabam servindo de reservatório do inseto e patógeno que dispersão para áreas de produção.

O fungo *Isaria fumosorosea* poderá ser uma ferramenta importante para o manejo de *D. citri* e outras importantes pragas dos citros (CONCESCHI, 2013) a fim de reduzir a aplicação excessiva de inseticidas químicos e contribuir para o manejo mais sustentável da praga. O bioproduto PUMA a base do isolado ESALQ-1296 de *I. fumosorosea* encontra-se em fase de registro. Por ser *D. citri* um vetor do fitopatógeno ‘*Candidatus Liberibacter*’, a aplicação do bioproduto a base de *I. fumosorosea* deve ser feita de forma inundativa e atingir elevados níveis de controle para promover uma rápida supressão da população dessa praga e evitar a transmissão do fitopatógeno para as plantas sadias. Então, as aplicações do bioproduto devem ser realizadas quando as condições ambientais sejam favoráveis para o fungo, além da integração com os defensivos utilizados na cultura (por exemplo, fungicidas). Portanto, novos estudos devem ser desenvolvidos para elucidar alguns parâmetros essenciais para o sucesso do bioproduto a base de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 no campo, tais como: a concentração e viabilidade do bioproduto, influência das condições climáticas (radiação UV-B e umidade), o tempo necessário entre a aplicação de fungicidas e o bioproduto.

A concentração e viabilidade dos conídios de fungos entomopatogênicos são os parâmetros mais importantes a serem avaliados quando se pretende aplicar o entomopatógeno para o controle de pragas. A viabilidade e vigor dos conídios podem ser variáveis de acordo

com o método de produção de conídios, o lote de produção e o tempo de armazenamento. Comumente, antes da aplicação de um bioproduto a base de fungos entomopatogênicos é recomendável realizar a correção da concentração de conídios de acordo com a porcentagem de viabilidade do fungo. No entanto, não se conhece se a correção da concentração de conídios para lotes com baixa viabilidade (<60%) pode ter a mesma eficiência de controle da correção de lotes com alta viabilidade (>95%).

Outro fator de grande importância para os fungos entomopatogênicos é radiação ultravioleta UV-B que atua nos processos vitais do entomopatógeno (FERNANDES et al., 2015). Assim, determinar seus efeitos sobre as formulações de *I. fumosorosea* ESALQ-1269 possibilita aumentar sua eficiência de controle no campo através de pulverizações em horário com menor incidência de radiação.

A umidade relativa do ar e a pulverização de fungicidas também pode influenciar no desempenho dos fungos entomopatogênicos (ALVES, 1998). Assim sendo, estudos sobre esses parâmetros se fazem necessário para determinar a melhor época de pulverização de *I. fumosorosea* ESALQ-1269 em campo. Além do mais, sabe-se que os fungicidas químicos utilizados na citricultura interferem na eficiência de controle do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre adultos de *D. citri* (AUSIQUE, 2014). Portanto, uma alternativa para o uso de ambos os produtos seria realizar estudos sobre o intervalo das pulverizações de fungicidas e a do bioproduto, isso poderia reduzir os efeitos dos fungicidas. Nesse sentido, foram realizados experimentos para elucidar a influência desses parâmetros na eficiência do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre *D. citri*.

3.2. Material E Métodos

Para os experimentos realizados nesse capítulo foram utilizados os insetos de *Diaphorina citri* e conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 de acordo com as metodologias já descritas no item 2.2.1 e 2.2.2.

3.2.1 Relação entre a viabilidade dos conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 e a mortalidade de *Diaphorina citri*

Os experimentos foram montados utilizando quatro lotes de conídios aéreos de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 produzido em grão de arroz conforme descrito no item 2.2.2. A

concentração de conídios de cada lote foi determinada usando uma câmara de Neubauer. A viabilidade foi avaliada segundo a metodologia de Oliveira et al. (2015) utilizando placas Rodac®, sendo realizada a inoculação de 150 µL de uma suspensão de 1×10^6 conídios.mL⁻¹ em placas de Petri contendo meio de cultura BDA mais o fungicida Derosal (10 µL.L⁻¹) (princípio ativo Carbendazim). Os lotes de conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foram incubados por 12h, 14h, 18h, 20h, 22h, 24h a 26° C e 14h de fotofase para determinar o vigor de cada lote. A porcentagem de germinação foi quantificada contando-se no mínimo 200 conídios germinados e/ou não germinados por placa mediante a utilização de um microscópio ótico em aumento de 400X, sendo quatro repetições/lote. Foram considerados conídios germinados aqueles que apresentaram o tubo germinativo com tamanho igual ou superior a duas vezes o diâmetro dos mesmos (OLIVEIRA et al., 2015).

Os lotes usados nas análises acima foram então utilizados nos bioensaios com *D. citri* através da pulverização dos insetos nas plantas de citros, *Citrus limonia*, de 20 cm de altura mantidas dentro de um copo plástico (dimensões de 13,5 cm x 8,5 cm x 5,5 cm e o volume de 500 mL) contendo tecido *voile* com velcro. Em cada copo foram confinados 20 adultos de *D. citri* provenientes da criação (CONCESCHI, 2013).

A viabilidade dos lotes de conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foram de 96,3% (lote 1), 90,2% (lote 2), 63,8% (lote 3) e 58,7% (lote 4).

Os experimentos foram conduzidos com 10 tratamentos. Dois controles foram utilizados: aplicação somente de água destilada estéril e aplicação de 0,075% do adjuvante KBRAdj (Tratamentos 1 e 2). Os tratamentos 3 a 6 consistiram na pulverização do fungo na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ (viáveis e não viáveis). Nos tratamentos 7 a 10 foi feito um ajuste da concentração em função da viabilidade corrigindo para atingir 5×10^6 conídios viáveis.mL⁻¹. As viabilidades dos conídios nos lotes determinadas no estudo anterior foram de 58,7%, 63,8%, 90,2% e 96,3% após 24 horas de incubação. Portanto, os tratamentos foram:

- 1- Água destilada estéril (controle);
- 2- KBRAdj 0,075%;
- 3- Lote com viabilidade de 58,7% (concentração de $2,93 \times 10^6$ conídios viáveis.mL⁻¹) + KBRAdj;
- 4- Lote com viabilidade de 63,8% (concentração de $3,19 \times 10^6$ conídios viáveis.mL⁻¹) + KBRAdj;
- 5- Lote com viabilidade de 90,2% (concentração de $4,5 \times 10^6$ conídios viáveis.mL⁻¹) + KBRAdj;

- 6- Lote com viabilidade de 96,3% (concentração de $4,81 \times 10^6$ conídios viáveis.mL⁻¹) + KBRAdj;
- 7- Lote com viabilidade de 58,7% (concentração de 5×10^6 conídios viáveis.mL⁻¹) + KBRAdj;
- 8- Lote com viabilidade de 63,8% (concentração de 5×10^6 conídios viáveis.mL⁻¹) + KBRAdj;
- 9- Lote com viabilidade de 90,2% (concentração de 5×10^6 conídios viáveis.mL⁻¹) + KBRAdj;
- 10- Lote com viabilidade de 96,3% (concentração de 5×10^6 conídios viáveis.mL⁻¹) + KBRAdj.

O ajuste da concentração foi realizado da seguinte a formula: $CV=C'V'$, sendo no lote com 58,7% de viabilidade adicionado 70,3% a mais de conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 para atingir concentração de 5×10^6 conídios viáveis.mL⁻¹. O mesmo foi feito para os demais lotes, sendo 56,7% a mais de conídios no lote com 63,8% de viabilidade; 10,9% a mais de conídios no lote com 90,2% de viabilidade e 3,8% a mais de conídios no lote com 96,3% de viabilidade. Todos os tratamentos foram aplicados sobre os adultos de *D. citri* utilizando um pulverizador tipo *airbrush*[®] (Sagayma[®], modelo SW-168). Em cada copo contendo 20 adultos foram aplicados 1 mL de cada tratamento, e todos os tratamentos foram montados com quatro repetições totalizando 80 insetos/tratamento. As plantas contendo os adultos pulverizados foram acondicionadas em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ de UR e 12 horas de fotoperíodo. A quantificação da mortalidade dos adultos de *D. citri* foi avaliada diariamente até o décimo dia após a aplicação, sendo todos os insetos mortos colocados em câmara úmida para a confirmação da infecção pelo fungo entomopatogênico (esporulação). O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente aleatorizado e repetido duas vezes no tempo.

3.2.2 Efeito da umidade relativa do ar na eficácia de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296, adjuvante KBRAdj e óleo no controle de *Diaphorina citri*

Os experimentos foram realizados com o objetivo de verificar se a formulação do fungo *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 pode influenciar na exigência de umidade relativa do ar para infecção de adultos de *Diaphorina citri*. Para isso, os insetos foram confinados em

copos plásticos contendo planta de limão cravo *Citrus limonia* e as suspensões fúngicas preparadas de acordo com o item 2.2.2. Os tratamentos foram:

- 1- Água destilada estéril (controle);
- 2- Tween 0,01%;
- 3- KBRAdj 0,075%;
- 4- Óleo de girassol (95% de óleo de girassol e 5% de KBRAdj sendo a emulsão em água, utilizada em 0,2% do volume de calda);
- 5- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹) misturado com Tween 0,01%;
- 6- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹) misturado KBRAdj 0,075%;
- 7- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹) misturado com óleo de girassol (95% de óleo de girassol e 5% de KBRAdj sendo a emulsão em água, utilizada em 0,2% do volume de calda).

Os tratamentos foram aplicados sobre os insetos com um pulverizador tipo *airbrush*® de forma semelhante à descrição do item anterior. Após a pulverização, os insetos foram mantidos em uma câmara climatizada tipo Fitotron marca Eletrolab® do Laboratório de Ecologia de Insetos da ESALQ-USP ajustadas nas umidades relativas do ar de $30 \pm 5\%$, $50 \pm 5\%$, $70 \pm 5\%$, $80 \pm 5\%$. Os experimentos com $45 \pm 10\%$ durante o dia e $> 95\%$ durante a noite foi realizado no laboratório de Patologia e Controle Microbiano da ESALQ-USP em sala climatizada, sendo essas umidades monitoradas com auxílio de um datalogger Maxitrak 2c/temp RH. A temperatura e o fotoperíodo foram padronizados para 25 ± 2 °C, e fotoperíodo 12:12 horas. Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente aleatorizado, com oito repetições de 20 insetos/tratamento, totalizando 160 insetos. A quantificação da mortalidade foi avaliada diariamente até o décimo dia após a aplicação, sendo todos os insetos mortos colocados em câmara úmida para a confirmação da infecção pelo fungo entomopatogênico (esporulação).

3.2.3 Influência da radiação ultravioleta UV-B na eficiência de controle de *Diaphorina citri* pelo fungo *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296

Os experimentos foram realizados numa caixa de madeira contendo quatro lâmpadas fluorescentes UV-B-313EL da Q-Lab. Corporation (EUA), as quais apresentam o máximo de

irradiação no comprimento de onda de 313 nm (correspondente à luz UV-B) com um valor médio de irradiação de 2186,6 mW/m² ou 7,91 KJ/h. As amostras foram acondicionadas a uma distância de 48 cm das lâmpadas e cobertas com filtro de diacetato para unificar a radiação e reduzir o espectro de longitude de onda para 290 nm.

O efeito da radiação UV-B foi avaliado sobre o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e seu controle em ninfas de 3º ínstar de *D. citri*. Brotações jovens de murta *M. paniculata* (L.) JACK (Rutaceae) contendo de ninfas de 3º ínstar provenientes da criação de *D. citri* foram transferidas para plantas de limão cravo *C. limonia*. As mudas apresentavam 20 cm de altura e foram plantadas em tubetes pretos de plástico. As brotações de murta foram deixadas por 24 horas até a completa transferência das ninfas, para obter um número mínimo de 30 ninfas/planta. Posteriormente, foram preparadas dois tipos de suspensão fúngica de *I. fumosorosea* ESALQ-1296, a primeira na concentração de 5×10^6 conídios viáveis.mL⁻¹ com o adjuvante Tween 80 0,01% e a segunda na concentração de 5×10^6 conídios viáveis.mL⁻¹ com o adjuvante KBRAdj 0,075%.

Foram montados dois experimentos em tempos diferentes com cada tipo de suspensão. Os tratamentos controle foram conduzidos com Tween 80 (0,01%) e o KBRAdj (0,075%) em cada experimento, sendo todos tratamentos expostos a radiação UV-B por até 6 horas ou sem exposição a radiação. As ninfas foram pulverizadas com as suspensões fúngicas ou controle utilizando um pulverizador tipo *airbrush*® seguindo a metodologia já descrita anteriormente. Posteriormente, as plantas com ninfas pulverizadas foram colocadas dentro da caixa de madeira para exposição à radiação UV-B nos intervalos de 2 horas, 4 horas e 6 horas. No tempo zero foram preparadas plantas de citros contendo ninfas de 3º ínstar de *D. citri* sem serem expostas à radiação UV-B. Todas as plantas (irradiadas e sem irradiar) foram acondicionadas em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 20\%$ de UR e 12:12 horas de fotoperíodo.

Os ensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente aleatorizado, com quatro repetições de 30 insetos/tratamento (total 120 insetos) para avaliação da mortalidade de ninfas de *D. citri*, sendo que estes testes foram repetidos em duas ocasiões distintas para a suspensão com Tween 80 0,01% e uma vez para KBRAdj 0,075%. A quantificação da mortalidade foi avaliada diariamente até o sétimo dia após a exposição, sendo os insetos mortos colocados em câmara úmida para a confirmação da infecção pelo fungo entomopatogênico (esporulação).

Além disso, foi avaliado o efeito da radiação UV-B sobre a viabilidade dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296. Para isso, as suspensões fúngicas contendo 1×10^6 conídios.mL⁻¹ e os adjuvantes Tween 80 (0,01%) e o KBRAdj (0,075%) foram inoculadas

no centro das placas Rodac[®] seguindo a metodologia de Oliveira et al. (2015). Posteriormente, as placas foram colocadas dentro da caixa de madeira para exposição à radiação UV-B nos intervalos de 2 horas, 4 horas e 6 horas. No tempo zero dos experimentos foram preparadas placas de viabilidade contendo conídios do fungo sem serem expostas a radiação UV-B. Todas as placas inoculadas foram acondicionadas em B.O.D. a 26°C, 14 horas de fotofase por um período de 24 horas (para as placas sem irradiar) e 48 horas (para as placas irradiadas). O tempo de incubação foi maior nas placas irradiadas porque o fungo entomopatogênico precisa se recuperar do estresse e, conseqüentemente, germinar. Cada tratamento apresentou três repetições (placas Rodac[®]) para avaliação da germinação dos conídios, sendo que estes testes foram repetidos em duas ocasiões distintas para a suspensão com Tween 80 0,01% e uma vez para KBRAdj 0,075%. A contagem direta do número de conídios germinados e não germinados foi realizada no microscópio de luz (400x).

Em todos os experimentos, as plantas contendo ninfas de 3º ínstar de *D. citri* e as placas inoculadas com as suspensões fúngicas foram expostas simultaneamente a radiação UV-B.

3.2.4 Determinação do período entre as aplicações de fungicidas químicos e o fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* em campo

Com objetivo de avaliar o efeito das aplicações dos fungicidas sobre a eficiência de controle de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 em adultos de *Diaphorina citri*, foram montados experimentos em campo com duas metodologias distintas. A primeira metodologia foi conduzida para avaliar o efeito residual dos fungicidas, que consistiu na aplicação dos fungicidas sobre a planta, seguido do confinamento dos adultos de *D. citri* e, posteriormente, a aplicação de *I. fumosorosea* + KBRAdj 0,075%. A segunda metodologia foi realizada para avaliar o efeito de contato dos fungicidas e o experimento consistiu no confinamento dos insetos, seguido da aplicação de *I. fumosorosea* + KBRAdj 0,075% e, posteriormente, a aplicação dos fungicidas.

Em todos os experimentos foi avaliado o efeito de quatro fungicidas comerciais utilizados para o controle de fitopatógenos de citros nas concentrações recomendadas (Tabela 2). Portanto, os tratamentos foram:

- 1- Controle (Sem aplicação);

- 2- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹) com KBRAdj 0,075%;
- 3- Kocide® WDG e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹) com KBRAdj 0,075%;
- 4- Kumulus® DF e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹) com KBRAdj 0,075%;
- 5- Nativo® e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹) com KBRAdj 0,075%;
- 6- Flint® 500 WG e *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹) com KBRAdj 0,075%;
- 7- Kocide® WDG;
- 8- Kumulus® DF;
- 9- Nativo®;
- 10- Flint® 500 WG.

Tabela 2. Nomes técnicos, comerciais, doses e grupos químicos dos fungicidas avaliados

Nome		Doses g i.a./L água	Grupo químico
Técnico	Comercial		
Enxofre	Kumus® DF	4	Inorgânico
Hidróxido de cobre	Kocide® WDG	0,67	Inorgânico
Trifloxistrobina + Tebuconazol	Nativo®	0,12	Estrobilurina + Triazol
Trifloxistrobina	Flint® 500 WG	0,05	Estrobilurina

Foram utilizadas plantas de citros (*Citrus sinensis*) da variedade Valência de 1 metro de altura, onde foram confinados 20 adultos de *D. citri* por planta em um saco de tecido tipo *voile* (20 cm x 15 cm). Todos os tratamentos apresentaram oito repetições, totalizando 160 insetos/tratamento. As pulverizações de fungicidas foram efetuadas usando um aplicador manual de plástico de 500 mL e as plantas foram molhadas antes de atingir o ponto de escoamento. As pulverizações da mistura de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 com o adjuvante KBRAdj 0,075% foram realizadas na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ no volume de 4 mL/planta até molhar a brotação, onde se localizavam os insetos.

No experimento para avaliar o efeito residual dos fungicidas, as plantas foram pulverizadas com os fungicidas e mantidas em campo por 12 horas até o confinamento dos adultos de *D. citri*. Passadas 12 horas do confinamento dos insetos foi realizada a aplicação de

I. fumosorosea ESALQ-1296 com o adjuvante KBRAdj 0,075% nas plantas. Por outro lado, nos experimentos de contato foi realizado primeiramente o confinamento dos adultos de *D. citri* nas plantas e após 12 horas foi pulverizado *I. fumosorosea* ESALQ-1296 com o adjuvante KBRAdj 0,075%. Passadas 24 horas da pulverização do fungo entomopatogênico, foram realizadas as aplicações dos fungicidas.

As avaliações da mortalidade dos adultos de *D. citri* foram realizadas no décimo dia após a pulverização dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e os insetos mortos foram colocados em câmara úmida para confirmação da infecção fúngica e observação da esporulação.

3.2.6 Análises estatísticas

Os dados de germinação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296, esporulação dos cadáveres de *D. citri* e de mortalidade de *D. citri* nos ensaios de período entre a aplicação de fungicidas químicos e o fungo entomopatogênico foram submetidos a análises estatísticas utilizando modelos lineares generalizados (NELDER; WEDDERBURN, 1972; DEMÉTRIO et al., 2014) do tipo binomial ou quasibinomial. 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*”. Todas essas análises foram realizadas no software estatístico “R”, versão 3.0.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

Os dados de mortalidade diária de adultos de *D. citri* dos experimentos do efeito da viabilidade, umidade relativa do ar e radiação UV-B foram utilizados para análise de sobrevivência com o estimador Kaplan-Meier não paramétrico, ao nível de 5%. A comparação entre as curvas de sobrevivência foi feita pelo teste de Log-Rank, considerando-se o nível de 5% de probabilidade. Essas análises foram realizadas utilizando o software estatístico IBM SPSS Statistics 22 (2013).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Relação entre a viabilidade dos conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 e a mortalidade de *Diaphorina citri*

Inicialmente foi avaliado o período de incubação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 para a quantificação da germinação e vigor dos lotes de produção. A germinação dos conídios entre os lotes foi diferente em cada período de incubação: 12 horas ($F_{3,15}=52,00$; $P<0,001$), 14 horas ($F_{3,15}=145,01$; $P<0,001$), 18 horas ($F_{3,15}=348,41$; $P<0,001$), 20 horas ($F_{3,15}=82,47$; $P<0,001$), 22 horas ($F_{3,15}=245,06$; $P<0,001$), 24 horas ($F_{3,15}=116,83$; $P<0,001$) (Figura 9). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas na germinação de *I. fumosorosea* ao longo dos períodos de incubação nos lotes 1 ($F_{5,23}=0,96$; $P=0,462$), lote 2 ($F_{5,23}=0,57$; $P=0,775$) e lote 3 ($F_{5,23}=2,39$; $P=0,078$). As médias de germinação após 24 horas de incubação foram de: lote 1= 96,3% lote 2= 90,2%, lote 3= 63,8% e lote 4= 58,7%, sendo o lote 4 o único que apresentou diferença estatística na germinação, aumentando ao longo dos períodos de incubação ($F_{5,23}=3,81$; $P=0,015$). Os lotes com viabilidade superior a 63% (lotes 1, 2 e 3) apresentaram valores de germinação similares após 14 horas de incubação, entretanto, o lote 4 com 58,7% teve um ligeiro aumento na germinação dos conídios a longo do tempo de incubação (Figura 9).

Segundo Farias et al. (2015), os conídios de *B. bassiana* capazes de germinar em um período de incubação inferior a 16 horas a 25°C são considerados vigorosos. Assim, foi demonstrado pelos autores que os lotes de conídios com baixo vigor demoraram mais tempo para provocar a morte de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em comparação com os lotes de alto vigor. Os resultados obtidos para *I. fumosorosea* ESALQ-1296 demonstraram que os lotes 1, 2 e 3 apresentaram conídios de alto vigor. Por outro lado, os conídios do lote 4 apresentaram um aumento na germinação (7,3%) quando as placas foram incubadas por um período de 24 horas, sugerindo que os conídios apresentavam baixo vigor. Portanto, a quantificação da viabilidade dos lotes de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 deveria ser realizada num período de 14 horas de incubação, o que ajudaria a separar os lotes de maior vigor e possivelmente os mais virulentos.

Posteriormente, foi avaliado o efeito da correção da concentração com base na germinação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na eficiência de controle de adultos de *D. citri*. A sobrevivência dos adultos variou entre os tratamentos ($\chi^2=99,76$; $df=9$; $P<0,001$) mas poucas diferenças foram observadas (Figura 10). Os valores de sobrevivência

foram nos tratamentos com a concentração corrigida dos lotes 1, 2 e 3, foram de $54,4 \pm 7,9\%$, $47,3 \pm 7,7\%$, e $53,7 \pm 9,0\%$, respectivamente. Os tratamentos com a concentração sem corrigir atingiram valores médios de sobrevivência de $61,2 \pm 5,6\%$, $60,2 \pm 2,6\%$, $62,4 \pm 6,9\%$ e $66,4 \pm 6,0\%$ nos lotes 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os valores máximos de sobrevivência foram obtidos com a aplicação de KBRAdj ($83,8\% \pm 5,7\%$) e água destilada estéril ($88,6 \pm 7,5\%$) (Figura 10).

Embora tenham sido observados valores numericamente superiores dos lotes com a concentração corrigida em relação a não corrigida e dos lotes com maiores viabilidades em relação aos lotes de menores viabilidades, devido a grande variabilidade nos dados não se observou diferenças significativas estatisticamente. Ou seja, mesmo diferenças superiores a 20% na viabilidade não resultaram em diferenças significativas na mortalidade.

A esporulação *I. fumosorosea* nos cadáveres de *D. citri* colocados em câmara úmida nos diferentes tratamentos foi estatisticamente semelhante ($F_{7,63} = 1,69$; $P=0,129$) (Tabela 3). Os valores de esporulação variaram de $23,4 \pm 5,3\%$ (Lote 4 com concentração corrigida) a $52,5 \pm 7,7$ (Lote 2 com concentração corrigida) (Tabela 3).

De uma forma geral, os resultados sugerem que para obter uma boa eficiência de controle de *D. citri* pelo fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 é preferível o uso de lotes com conídios de alto vigor do que ajustar a concentração em função da viabilidade de lotes com menor viabilidade do entomopatógeno.

Figura 9. Germinação de conídios de diferentes lotes de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 submetidos aos períodos de incubação de 12h, 14h, 18h, 20h, 22h, 24h a 26° C e 14h de fotofase. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre os lotes de *I. fumosorosea* em cada tempo de incubação e letras maiúsculas representam diferenças estatísticas dos lotes ao longo do tempo de incubação pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 10. Sobrevivência de adultos de *Diaphorina citri* após aplicação de suspensões de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 provenientes de lotes de produção com diferentes níveis de viabilidade. Os lotes foram aplicados na concentração de 5×10^6 conídios totais.mL⁻¹ (sem corrigir) e 5×10^6 conídios viáveis.mL⁻¹ (corrigida) após correção pela porcentagem de germinação. Lote 1 com 96,3 % de viabilidade (sem corrigir= $4,81 \times 10^6$ conídios viáveis.mL⁻¹); lote 2 com 90,2 % de viabilidade ($4,5 \times 10^6$ conídios viáveis.mL⁻¹); lote 3 com 63,78% de viabilidade ($3,19 \times 10^6$ conídios viáveis.mL⁻¹), lote 4 com 58,72% de viabilidade ($2,93 \times 10^6$ conídios viáveis.mL⁻¹). Os tratamentos sem a aplicação do fungo foram; controle (água destilada estéril) e o adjuvante KBRAAdj 0,075%. Tratamentos com letras vermelhas diferentes à frente apresentam diferenças significativas pelo teste de Log-Rank ($P < 0,05$)

Tabela 3. Porcentagem de adultos de *Diaphorina citri* esporulados pelo fungo *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 proveniente de lotes de produção com diferentes níveis de viabilidade 10 dias após a aplicação com a concentração de conídios corrigida em função da germinação e sem correção

Lote de produção	Concentração de conídios ¹	Esporulação $\pm$ EP (%) ²
Lote 1 (96,3 %)	Corrigida	$43,1 \pm 7,3$ a
	Sem corrigir	$35,9 \pm 6,0$ a
Lote 2 (90,2%)	Corrigida	$52,5 \pm 7,7$ a
	Sem corrigir	$37,9 \pm 2,9$ a
Lote 3 (63,8 %)	Corrigida	$42,0 \pm 9,6$ a
	Sem corrigir	$37,4 \pm 6,4$ a
Lote 4 (58,7%)	Corrigida	$23,4 \pm 5,3$ a
	Sem corrigir	$28,4 \pm 5,2$ a

¹.Corrigida= 5×10^6 conídios viáveis.mL⁻¹. ²Porcentagem média de cadáveres esporulados pelo fungo $\pm$ Erro padrão; letras minúsculas representam diferenças significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

3.3.2 Efeito da umidade relativa do ar na eficácia de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296, adjuvante KBRAdj e óleo no controle de *Diaphorina citri*

A mortalidade de adultos de *Diaphorina citri* tratados com diferentes misturas de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 com os adjuvantes Tween 80 0,01%, KBRAdj 0,075% e óleo de girassol 0,2% foi influenciada pelas diferentes umidades relativa do ar (Figura 11 e 12).

A $30 \pm 5\%$ UR foram observadas diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevivência dos adultos de *D. citri* ($\chi^2=338,37$; $df=6$; $P<0,001$) (Figura 11). O tratamento que resultou em maior mortalidade de *D. citri* nesta umidade foi *If* + KBRAdj ($54,5 \pm 6,6\%$) e o segundo tratamento mais eficiente foi *If* + óleo de girassol ($34,3 \pm 6,3\%$). Os demais tratamentos reduziram pouco a mortalidade dos adultos de *D. citri*, obtendo valores de $9,0 \pm 5,2\%$ para o óleo de girassol, $6,5 \pm 2,0\%$ para KBRAdj, $6,5 \pm 2,2\%$ para a mistura de *If* + Tween 80, $1,8 \pm 0,9\%$ para o controle e $0,7 \pm 0,7\%$ para o Tween 80. O tempo letal para matar cinquenta por cento da população de adultos de *D. citri* (TL_{50}) foi calculado só no tratamento *If* + KBRAdj, sendo o TL_{50} de 9 dias, pois os demais tratamentos não resultaram em 50% de mortalidade. Nas misturas contendo o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foi observado que os cadáveres de *D. citri* apresentaram maior esporulação nos tratamentos com *If* + KBRAdj ($49,6 \pm 7,2\%$) e *If* + óleo de girassol ($32,9 \pm 6,4\%$) em comparação com *If* + Tween 80 ($0,6 \pm 0,6\%$) (Tabela 4).

Na umidade relativa do ar de $50 \pm 5\%$ foram observadas que as curvas de sobrevivência de adultos de *D. citri* apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($\chi^2=498,72$; $df=6$; $P<0,001$) (Figura 11). Maiores mortalidades dos adultos de *D. citri* foi obtida nas pulverizações dos tratamentos *If* + óleo de girassol ($58,5 \pm 4,3\%$) e *If* + KBRAdj ($55,7 \pm 4,0\%$), sendo que os outros tratamentos resultaram em mortalidades muito baixas, óleo de girassol ($11,5 \pm 4,8\%$), KBRAdj ($7,2 \pm 1,4\%$), controle ($6,9 \pm 6,2\%$), *If* + Tween ($4,2 \pm 1,9\%$), Tween ($4,2 \pm 2,4\%$). O TL_{50} foi semelhante nas misturas de *If* + KBRAdj e *If* + óleo de girassol, obtendo valores de $6,0 \pm 1,0$ dias e $7,0 \pm 0,68$ dias, respectivamente. A esporulação dos cadáveres de *D. citri* foi superior nos tratamentos *If* + óleo de girassol ($56,8 \pm 4,9\%$) e *If* + KBRAdj ($55,2 \pm 3,87\%$) em comparação com *If* + Tween 80 ($1,2 \pm 0,8\%$) (Tabela 4).

Na umidade relativa do ar de $70 \pm 5\%$ foram encontradas diferenças estatísticas entre as curvas de sobrevivência dos insetos ($\chi^2=444,57$; $df=6$; $P<0,001$) (Figura 11). O fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na mistura com óleo de girassol apresentou maiores mortalidades

dos adultos de *D. citri* ($72,1 \pm 6,3\%$), seguido pelo tratamentos *If* + KBRAdj, alcançando valores de $64,8 \pm 6,0\%$ após 10 dias da pulverização. Os tratamentos contendo óleo de girassol 0,2%, KBRAdj 0,075%, *If* + Tween 80, controle e Tween 80 provocaram mortalidade de *D. citri* de $44,1 \pm 11,0\%$, $20,0 \pm 6,5\%$, $13,8 \pm 4,9\%$, $3,0 \pm 1,7\%$ e $2,6 \pm 1,0\%$, respectivamente. O TL_{50} do tratamento *If* + óleo de girassol foi de $4,0 \pm 0,1$ dias, sendo diferente do tratamento *If* + KBRAdj que foi de $TL_{50} = 7,0 \pm 0,8$ dias. Os valores de esporulação foram de $71,0 \pm 6,0\%$ para o tratamento *If* + óleo de girassol, $63,7 \pm 6,2\%$ para o tratamento *If* + KBRAdj e $13,2 \pm 5,1\%$ para o tratamento *If* + Tween, os quais apresentam diferenças estatísticas entre si ($F_{2,23}=23,50$; $P<0,001$) (Tabela 4).

No experimento com umidade relativa do ar de $80 \pm 5\%$ também foi observado diferenças estatísticas na sobrevivência de adultos de *D. citri* ($\chi^2=381,74$; $df=6$; $P<0,001$)(Figura 11). Os tratamentos que se destacaram na redução da sobrevivência de *D. citri* foram; *If* + óleo de girassol com valores de $79,4 \pm 4,4\%$ de mortalidade, *If* + KBRAdj ($77,1 \pm 4,0\%$) e óleo de girassol 0,2% ($64,7 \pm 13,3\%$). Seguidos dos tratamentos KBRAdj 0,075% ($50,8 \pm 6,1\%$), controle ($22,9 \pm 6,1\%$), *If* + Tween 80 ($20,8 \pm 9,4\%$) e Tween 80 ($20,4 \pm 7,7\%$). Os TL_{50} dos tratamentos *If* + KBRAdj, *If* + óleo de girassol e dos adjuvantes sozinhos (óleo de girassol 0,2% e KBRAdj 0,075%) foram de $4,0 \pm 0,2$ dias, $5,0 \pm 0,1$ dias e 10 dias, respectivamente. Todos os cadáveres de *D. citri* apresentaram esporulação do fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 obtendo valores de $79,4 \pm 4,4\%$, $77,1 \pm 4,0\%$ e $20,8 \pm 9,4\%$ para as misturas com *If* + óleo de girassol, *If* + KBRAdj e *If* + Tween, respectivamente. O tratamento *If* + Tween foi estatisticamente diferente dos demais tratamentos ($F_{2,23}=19,86$; $P<0,001$) (Tabela 4).

Figura 11. Sobrevivência de adultos de *Diaphorina citri* à aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 (*If*) a 5×10^6 conídios.mL⁻¹ com os adjuvantes Tween 80 0,01%, KBRAdj 0,075% e óleo de girassol 0,2% e mantidos em Fitotron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h de fotofase e diferentes níveis de umidade relativa do ar (UR) por 10 dias. Tratamentos com letras vermelhas diferentes à frente apresentam diferenças significativas pelo teste de Log-Rank ($P < 0,05$)

Tabela 4. Porcentagem de adultos de *Diaphorina citri* esporulados pelo fungo *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 (*If*) (5×10^6 conídios.mL⁻¹) aplicado com os adjuvantes Tween 80 0,01%, KBRAdj 0,075% e Óleo de girassol 0,2% e mantidos em diferentes umidade relativa do ar a 25 ± 2 °C e 12 h de fotofase

Tratamentos	Umidade relativa do ar			
	30 ± 5%	50 ± 5%	70 ± 5%	80 ± 5%
<i>If</i> + Tween 80 0,01%	0,6 ± 0,6 -	1,2 ± 0,8-	13,2 ± 5,1b	20,8 ± 9,4b
<i>If</i> + KBRAdj 0,075%	49,4 ± 7,2a	55,2 ± 3,9a	63,7 ± 6,2a	77,1 ± 4,0a
<i>If</i> + Óleo de Girassol 0,2%	32,9 ± 6,4a	56,8 ± 4,9a	71,0 ± 6,3a	79,4 ± 4,4a

“-“ dados inflados de zero não foram submetidos às análises estatísticas. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados interessantes e reveladores do estudo da eficiência de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em umidades constantes nos levou a realizar um experimento com variações da umidade do ar para tentar simular as condições de umidade elevada durante a noite e menor durante o dia, semelhante ao que é encontrado em campo, especialmente no verão. Para isso, foi conduzido um experimento onde os insetos de *D. citri* pulverizados foram acondicionados em sala climatizada com umidade relativa do ar de $45 \pm 10\%$ durante o dia e $> 95\%$ durante a noite. Os resultados demonstraram que a sobrevivência dos insetos foi drasticamente reduzida nos tratamentos *If* + KBRAdj ($98,8 \pm 1,2\%$ de mortalidade) e *If* + óleo de girassol ($96,7 \pm 2,2\%$), sendo as curvas de sobrevivência estatisticamente diferentes dos demais tratamentos ($\chi^2=246,61$; $df=6$; $P < 0,001$) (Figura 12). O TL₅₀ dos tratamentos *If* + KBRAdj e *If* + óleo de girassol foi de 4,0 dias. A partir do quinto dia da pulverização foi observado que a umidade relativa elevada durante a noite afetou negativamente a sobrevivência dos adultos de *D. citri* em todos os tratamentos (Figura 12). A esporulação nos cadáveres de *D. citri* dos tratamentos contendo o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foram elevadas com valores de $98,8 \pm 1,2\%$, $96,7 \pm 2,2\%$ e $92 \pm 3,5\%$ para os tratamentos com *If* + KBRAdj, *If* + óleo de girassol e *If* + Tween 80, respectivamente.

Os resultados obtidos indicaram que o aumento da umidade relativa do ar provocou uma melhoria na eficiência de controle de adultos de *D. citri* em todos os tratamentos com o fungo e que apenas os tratamentos *If* + KBRAdj e *If* + óleo de girassol tiveram melhor desempenho em baixas umidades.

Além da redução na sobrevivência dos adultos de *D. citri*, o incremento da umidade relativa do ar também reduziu o TL₅₀ no tratamento *If* + KBRAdj, sendo o TL₅₀ de 9 dias quando os insetos pulverizados foram acondicionados com $30 \pm 5\%$ de umidade e o TL₅₀ de 4 dias na condição de $80 \pm 5\%$ de umidade. Ferron (1977) verificou que a umidade relativa do

ar reduz a TL_{50} de *B. bassiana* em pulverizações sobre *Acanthoscelides obtectus*. De acordo com ele, umidades de 100% reduz em 2 dias a TL_{50} , quando essa é comparada a umidades relativas inferiores de 35%, 50% e 76% de UR. Resultados semelhantes foram obtidos por Ramoska (1984) na aplicação de *B. bassiana* sobre *Blissus leucopterus*. Portanto, essa redução na TL_{50} de *I. fumosorosea* sobre *D. citri* dada pelo aumento da umidade relativa do ar é muito importante para aumentar a eficiência de controle de *D. citri* e assim, reduzir a transmissão de bactérias fitopatogênicas pelo inseto vetor.

Figura 12. Sobrevivência de adultos de *Diaphorina citri* à aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 (*If*) a 5×10^6 conídios.mL⁻¹ com os adjuvantes Tween 80 0,01%, KBRAdj 0,075% e óleo de girassol 0,2% e mantidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h de fotofase e $45 \pm 10\%$ UR durante o dia e $> 95\%$ UR a noite em sala climatizada. Tratamentos com letras vermelhas diferentes à frente apresentam diferenças significativas pelo teste de Log-Rank ($P < 0,05$)

No experimento com variações na umidade do ar durante o dia e a noite verificou-se uma redução drástica na TL_{50} dos tratamentos *If* + KBRAdj e *If* + óleo de girassol, apresentando mortalidade superior a 80% no tratamento *If* + KBRAdj após cinco dias da pulverização. A elevada umidade relativa do ar durante a noite ($> 95\%$) provavelmente compensou a baixa umidade relativa do ar durante o dia ($45 \pm 10\%$), indicando que as altas

umidades noturnas em campo podem favorecer ainda mais o controle de *D. citri* por *I. fumosorosea* ESALQ-1296.

Por outro lado, foi verificado que a aplicação de óleo de girassol e o adjuvante KBRAAdj isoladamente causaram um aumento na mortalidade dos adultos de *D. citri* quando esses foram expostos a maiores umidades relativas do ar. A mortalidade dos adultos no tratamento com óleo de girassol aumentou de $9,0 \pm 5,2\%$ a $30 \pm 5\%$ UR para $64,7 \pm 13,3\%$ a $80 \pm 5\%$ UR. Já a mortalidade dos adultos tratados com o adjuvante KBRAAdj variou de $6,5 \pm 2,0\%$ na umidade de $30 \pm 5\%$ para $50,6 \pm 6,1\%$ na umidade de $80 \pm 5\%$. Estudos realizados por Imai et al. (1995) encontraram resultados parecidos para o adjuvante Silwet L-77, onde foi demonstrado que a aplicação deste adjuvante sobre pulgões produziu uma película sobre o corpo do inseto que impediu a respiração, e como consequência, os insetos morreram por sufocamento. Assim, se a umidade relativa do ar é baixa ($30 \pm 5\%$), após a aplicação sobre os adultos de *D. citri*, o adjuvante KBRAAdj evapora-se rapidamente e não afeta os insetos. No entanto, se a umidade relativa do ar é alta ($80 \pm 5\%$), o adjuvante pode ficar mais tempo sobre o corpo dos adultos de *D. citri*, aumentando a chance de sufocamento e por consequência aumentando a mortalidade dos mesmos.

A utilização de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em campo é favorecida pela época chuvosa, quando níveis de umidade mais elevados são observados. No entanto, isso dependeria muito do tipo de formulação do entomopatógeno e as características dos adjuvantes. Assim, as formulações que são mais estáveis durante a mudanças da umidade relativa do ar seriam as melhores a serem utilizadas para o controle de *D. citri*. Nos experimentos aqui apresentados, é possível observar que as misturas de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 com KBRAAdj e o óleo de girassol influenciaram na sobrevivência de *D. citri*. O tratamento de *If* + KBRAAdj foi o que apresentou menor variação na sobrevivência de *D. citri* quando esse foi comparado nas diferentes umidades relativa do ar. Diferentemente do que aconteceu com *If* + óleo de girassol que teve uma variação de 45,1% na sobrevivência de *D. citri* entre a menor ($30 \pm 5\%$) e a maior umidade relativa do ar ($80 \pm 5\%$). Portanto, utilizar o adjuvante KBRAAdj em formulações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 pode reduzir a influência da umidade relativa do ar sobre a eficácia de controle de *D. citri* no campo.

3.3.3 Influência da radiação ultravioleta UV-B na eficiência de controle de *Diaphorina citri* pelo fungo *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296

Inicialmente, foi verificado o efeito da luz UV-B sobre os conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296. A exposição aos diferentes períodos de radiação UV-B afetou significativamente a germinação dos conídios tanto nas misturas contendo os adjuvantes Tween 80 0,01% ($F_{3,23}=52,10$; $P<0,001$) quanto nas misturas com KBRAdj 0,075% ($F_{3,11}=113,51$; $P<0,001$), sendo drasticamente reduzida a partir de 4 horas de exposição em ambos os adjuvantes (Figura 13).

A eficiência de controle de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 para o controle de ninfas de 3º ínstar de *D. citri* foi avaliada durante diferentes tempos de exposição a radiação UV-B. Nos experimentos conduzidos com a mistura de *If* + Tween 80 0,01%, foi observado que a sobrevivência das ninfas de 3º ínstar de *D. citri* foi afetada pela radiação UV-B ($\chi^2=215,23$; $df=5$; $P<0,001$) (Figura 14). O tratamento de *If* + Tween 80 sem exposição a radiação UV-B foi o que mais reduziu a sobrevivência de *D. citri* ($49,5 \pm 8,6\%$). O aumento no período de exposição dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 a radiação UV-B afetou negativamente a eficiência de controle pelo entomopatógeno, observando que a sobrevivência das ninfas foi de $68,9 \pm 7,6\%$, $61,9 \pm 9,1\%$ e $80,3 \pm 8,1\%$ para 2, 4 e 6 horas de exposição. As ninfas de 3º ínstar de *D. citri* pulverizadas apenas com Tween 0,01% e sem exposição à radiação UV-B apresentou sobrevivência de $88,0 \pm 5,6\%$, e no mesmo tratamento com exposição de 6 horas apresentaram sobrevivência de $86,3 \pm 6,0\%$. Os cadáveres de ninfas de *D. citri* apresentaram esporulação nos tratamentos com o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296, sendo afetadas pela exposição a radiação UV-B ($F_{3,15}=19,84$; $P<0,0001$). Assim, os maiores valores de esporulação foram encontrados nos tratamentos sem exposição à radiação ($42,5 \pm 9,9\%$) que diferiu de 2 horas ($28,1 \pm 7,4\%$), 4 horas ($27,4 \pm 6,3\%$) e 6 horas ($13,4 \pm 9,0\%$).

A sobrevivência das ninfas de 3º ínstar de *D. citri* pulverizadas com a mistura de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 com KBRAdj 0,075%, também foi afetada pelos tempos de exposição a UV-B ($\chi^2=267,25$; $df=7$; $P<0,001$) (Figura 14). O tratamento *If* + KBRAdj sem ser exposto a radiação UV-B foi o que mais afetou a sobrevivência de ninfas de 3º ínstar de *D. citri* ($41,5 \pm 10,2\%$). No tempo de exposição de 2 horas, apresentaram sobrevivência de $43,8 \pm 14,6\%$, 4 horas de $45,9 \pm 10,9\%$ e 6 horas de $53,1 \pm 8,6\%$. A aplicação de apenas o adjuvante KBRAdj 0,075% sem a exposição a radiação também afetou a sobrevivência das ninfas ($57,0 \pm 7,6\%$), sendo significativamente diferente da aplicação da mesma mistura com 6 horas de exposição ($69,0 \pm 6,4\%$). É possível que o efeito tóxico do KBRAdj para ninfas

seja neutralizado pela ação da radiação UV-B. Considerando que todos os tratamentos com o fungo em mistura com KBRAdj tiveram a ação da radiação UV-B, as altas mortalidades observadas foram predominantemente pelo fungo e não pelo KBRAdj. As ninfas de *D. citri* que não foram pulverizadas (controle) apresentaram sobrevivência de $98,3 \pm 1,0\%$ e de $98,1 \pm 1,9\%$ para as ninfas sem exposição e com 6 horas de exposição à radiação UV-B, indicando que a radiação não afeta a sobrevivência das ninfas. As porcentagens de ninfas esporuladas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foram estatisticamente semelhantes para os diferentes tempos de exposição ($F_{2,11}=0,32$; $P=0,807$), observando que o tempo 0 horas (sem exposição), 2 horas e 4 horas de exposição à radiação UV-B foram os únicos tratamentos que apresentaram esporulação com valores de $52,4 \pm 7,3\%$, $49,1 \pm 11,7\%$ e $41,4 \pm 7,1\%$, respectivamente. A exposição por 6 horas resultou em inibição total da esporulação do fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296.

Figura 13. Efeito da radiação ultravioleta UV-B sobre conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 com Tween 80 0,01% e KBRAdj 0,075% expostos em placas Rodac® a diferentes períodos de radiação UV-B (2, 4 e 6 horas) ou sem exposição (tempo 0 h) e acondicionados em B.O.D a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $80 \pm 10\%$ de UR e 12h de fotofase. Tratamentos com letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P<0,05$)

Figura 14. Sobrevivência de ninfas de 3º ínstar de *Diaphorina citri* após aplicação de conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 com Tween 80 0,01% ou KBRAdj 0,075% e expostas à radiação ultravioleta UV-B por 0, 2, 4 e 6 horas e acondicionadas em sala climatizadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $50 \pm 20\%$ de UR e 12h de fotofase. Tratamentos com letras vermelhas diferentes à frente apresentam diferenças significativas pelo teste de Log-Rank ($P < 0,05$)

A radiação solar UV-B reduziu a germinação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 após 2 horas de exposição. Rojas (2015) demonstrou que o isolado ESALQ-1296 foi o mais resistente à luz UV-B em comparação com outros isolados de *I. fumosorosea*. Após o período de 6 horas de exposição foi demonstrado que a germinação de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foi reduzida a 20%. Segundo Loong et al. (2013) o fungo *I. fumosorosea* apresentou uma redução mais drástica na germinação, caindo mais de 50% após 1 hora de exposição à radiação UV-B na mesma irradiância de nossos experimentos.

Para contornar os efeitos deletérios da radiação solar UV-B sobre o conídio de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 podem ser utilizadas duas estratégias. A primeira empregada através do uso de fotoprotetores, inertes e adjuvantes nas formulações do fungo entomopatogênico e assim prolongar a sobrevivência dos conídios no ambiente (FERNANDES et al., 2015). Como foi demonstrado por Loong et al. (2013) onde a introdução de caulim e goma chantana na formulação de *I. fumosorosea* foi capaz de prolongar a sobrevivência dos conídios quando foram expostos a diferentes períodos de radiação UV-B. A segunda estratégia seria evitar os períodos com maior radiação UV-B no campo, podendo ser realizadas as pulverizações em horários de menor incidência da radiação UV-B como por exemplo, durante a tarde ou à noite. Assim, os conídios permaneceriam viáveis por maior período de tempo, de tal forma, a favorecer a germinação e penetração do fungo sobre o tegumento do inseto.

3.3.4 Período entre as aplicações de fungicidas químicos e o fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 em campo

Os experimentos foram realizados para determinar o período necessário entre as pulverizações de fungicidas e do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296. No experimento de contato foram realizadas pulverizações dos insetos com uma suspensão de conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e após 24 horas foram aplicados os diferentes fungicidas químicos nas mesmas plantas contendo os insetos tratados. Os tratamentos contendo o fungo entomopatogênico diferiram do controle e dos fungicidas aplicados isoladamente ($F_{9,79}=29,92$; $P<0,001$) (Figura 15). Os maiores valores de mortalidade foram encontrados nos tratamentos com a aplicação de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 mais os fungicidas Kumulus® DF ($81,8 \pm 4,21\%$), Kocide® WDG ($73,3 \pm 6,9\%$), Flint 500® WG ($69,9 \pm 8,2\%$) e Nativo® ($67,0 \pm 8,0\%$), os quais não diferiram do tratamento com a aplicação de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sem fungicidas ($69,9 \pm 5,7\%$). Os tratamentos contendo

unicamente os fungicidas apresentaram os valores de mortalidade, $11,4 \pm 3,0\%$; $10,2 \pm 1,9\%$; $8,0 \pm 3,8\%$; $8,0 \pm 3,5\%$ para Flint 500[®] WG, Nativo[®], Kocide[®] WDG e Kumulus[®] DF, respectivamente. Esses valores foram estatisticamente similares ao do tratamento controle, que apresentou $10,5 \pm 2,8\%$ de mortalidade.

No experimento do efeito residual dos fungicidas, foram realizadas as pulverizações dos fungicidas sobre as plantas e após 24 horas foi aplicado o fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre os insetos confinados nas plantas tratadas. Os tratamentos contendo o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 se diferenciaram estatisticamente dos demais tratamentos ($F_{9,79}=68,917$; $P<0,0001$) (Figura 16), sendo que a aplicação do fungo sozinho resultou em $89,9 \pm 2,7\%$ de mortalidade, seguido dos tratamentos com o *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e os fungicidas Flint 500[®] WG ($86,1 \pm 3,9\%$), Nativo[®] ($83,9 \pm 4,0\%$), Kocide[®] WDG ($80,5 \pm 3,5\%$) e Kumulus[®] DF ($73,2 \pm 4,9\%$). O residual dos fungicidas pulverizados sobre as plantas não resultou em mortalidade dos adultos de *D. citri*, apresentando os valores de mortalidade de $11,8 \pm 5,85\%$ para Flint 500[®] WG, $4,3 \pm 2,1\%$ para Nativo[®], $3,5 \pm 1,1\%$ Kumulus[®] DF e $2,3 \pm 0,9\%$ para Kocide[®] WDG.

Na cultura dos citros, os fungicidas à base de cobre são os produtos mais usados para controle dos fitopatógenos (ROGERS et al., 2012). AVERY et al. (2013) descreveram que a utilização desses produtos na cultura dos citros reduz a eficiência dos blastosporos de *I. fumosorosea* PFR-97 para o controle de *D. citri*. No entanto, os estudos aqui realizados comprovam que a eficiência dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 não foi afetada quando os propágulos foram pulverizados antes ou depois da aplicação dos fungicidas Kumus[®] DF, Kocide[®] WDG, Nativo[®], Flint[®] 500 WG. Resultados semelhantes foram encontrados para *B. bassiana* isolado MK 2001 por KOUASSI, CODERRE e TODOROVA (2003) na espécie-praga *Lygus lieolaris*. Segundo eles, a pulverização dos fungicidas Metalayl, Mancozeb ou óxido de cobre no período de 48-96 horas após a pulverização do entomopatógeno não interferiu na eficiência de *B. bassiana* sobre o controle de *L. lieolaris*. Portanto, na cultura dos citros é possível compatibilizar a utilização dos fungicidas Kumus[®] DF, Kocide[®] WDG, Nativo[®], Flint[®] 500 WG com o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em pulverizações separadas.

Figura 15. Porcentagem de mortalidade ($\pm$ EP) de adultos de *Diaphorina citri* que receberam aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 (5×10^6 conídios.mL⁻¹) e após 24 horas foram pulverizados com os fungicidas Kocide® WDG, Kumus® DF, Flint® 500 WG, Nativo® em plantas de citros em condição de campo. Os tratamentos controle receberam aplicação somente do fungo, somente dos fungicidas ou água (controle negativo). Tratamentos com letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 16. Porcentagem de mortalidade ($\pm$ EP) de adultos de *Diaphorina citri* que receberam aplicação dos fungicidas Kocide® WDG, Kumus® DF, Flint® 500 WG, Nativo® e após 24 horas foram pulverizados com *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 (5×10^6 conídios.mL⁻¹) em plantas de citros em condição de campo. Os tratamentos controle receberam aplicação somente do fungo, somente dos fungicidas ou água (controle negativo). Tratamentos com letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

3.4 Conclusões

- A determinação da viabilidade dos conídios de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 deve ser realizada num período de 14 horas de incubação a 26° C e 14h de fotofase para separar os lotes de conídios que germinam mais rapidamente, ou seja, os mais vigorosos;
- Para obter uma boa eficiência de controle de *D. citri* pelo fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 é recomendado o uso de lotes de conídios com alto vigor, entretanto é possível ajustar a concentração em função da viabilidade do entomopatógeno sem grandes perdas na mortalidade da praga;
- Baixa umidade relativa do ar (<50%), longo período de exposição à radiação UV-B (> 2 horas) afetam a eficiência do controle de *D. citri* por *I. fumosorosea*;
- A pulverização dos fungicidas Kumus® DF, Kocide® WDG, Nativo®, Flint® 500 WG no período de 24 horas antes ou após a pulverização de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 não influenciou no desempenho do entomopatógeno.

Referências

- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.
- AUSIQUE, J.J.S. **Desenvolvimento de estratégias para incorporação de fungos entomopatogênicos no manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) na cultura dos citros**. 2014. 78 p. Tese de (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- AVERY, P.B.; PICK, D.A.; ARISTIZÁBAL, L.F.; KERRIGAN, J.; POWELL, C.A.; ROGERS, M.E.; ARTHUS, S.P. Compatibility of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) blastospores with agricultural chemicals used for management of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **Insects**, Basel, v. 4, p.694-711, 2013.
- CONCESCHI, M.R. **Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* para o controle de pragas dos citros**. 2013. 104.p. Dissertação de (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

- DEMÉTRIO, C.G.B.; HINDE, J.; MORAL, R.A. Models for Overdispersed data in entomology. In: Ecological Modelling Applied to Entomology, capítulo 9, v. 1, p. 219-259, 2014.
- FARIA, M.; LOPES, R.B; SOUZA, D.A.; WRIGHT, S.P. Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 125, p. 68-72, 2015.
- FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.I.; ROBERTS, D.W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, New York, v. 61, p.427-440, 2015.
- FUNDECITRUS. **Levantamento de HLB ano de 2015**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 18 jan. 2016.
- KOUASSI, M.; CODERRE, D.; TODOROVA, S.I. Effects of the timing of applications on the incompatibility of the three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beuaveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 127, p. 421-426, 2003.
- IBM CORP. **IBM SPSS statistics for windows**: version 22.0. Armonk, 2013.
- IMAI, T.; TSUCHIYA, S.; FUJIMORI, T. Aphicidal effects of Silwet L-77, organosilicone nonionic surfactant. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 30, n. 2, p. 380-382, 1995.
- LOONG, C.Y.; SAJAP, A.S.; NOOR, H.M.; OMAR, D.;ABOOD, F. Effects of UV-B and solar radiation on the efficacy of *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) for controlling bagworm, *Pteroma pendula* (Lepidoptera: Psychidae). **Journal of Entomology**, London, v. 10, n.2, p.53-65, 2013.
- MASCARIN, G.M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: Madelaine Venzon, Trazibo José de Paula Júnior, Angelo Pallini (Org.). Controle alternativos de pragas e doenças na agricultura orgânica. 1 ed. Viçosa:UR EPAMIG, 2010, v.4, p.169-195.
- 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.
- PARRA, J.R.P; LOPES, J.R.S; GÓMEZ TORRES, M.L; NAVA, D.E; PAIVA, P.E.B. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Corderopolis, v. 31, n. 1, p. 37-51, 2010.

- R DEVELOPMENT CORE TEAM: versão 3.0.1 2013. Disponível em: <<http://r-development-core-team.software.informer.com>>. Acesso: 13 mar. 2015.
- RAMOSKA, W.A. The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the chinch bug, *Blissus leucopterus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.43, p. 389-394, 1984.
- RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 87, p. 77-83, 2004.
- RANGEL, D.E.N.; ALSTON, D.G, A.J.; ROBERTS. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research**, Cambdrige, v. 112, p. 1355-1361, 2008.
- ROGERS, M.E.; STANSLY, P.A.; STELINSKI, L.L. Florida citrus pest management guide: Asian citrus psyllid and citrus leafminer. IFAS Extension Publication ENY-734; University of Florida: Gainesville, FL, USA, 2012.
- ROJAS, V.M.A. **Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa**. 2015. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

4 SELETIVIDADE DE *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 SOBRE *Tamarixia radiata* E *Ceraeochrysa cincta* EM LABORATÓRIO

Resumo

A pulverização de formulações de *Isaria fumosorosea* com adjuvantes pode reduzir o controle de *Diaphorina citri* pelo parasitóide *Tamarixia radiata* e o predador *Ceraeochrysa cincta*. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a seletividade de formulações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre adultos de *T. radiata* e larvas neonatas de *C. cincta*. O efeito residual foi avaliado em discos de folhas de citros em placas de 3 cm de diâmetro. Os discos foram pulverizados com as misturas de adjuvantes + *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e, em seguida, os adultos de *T. radiata* foram confinados sobre os discos e alimentados com gotas de mel. Aplicações tópicas foram realizadas sobre larvas neonatas de *C. cincta* com torre de Potter e transferidas para tubos de vidro de 8,5 cm de comprimento e 2,5 cm diâmetro, sendo alimentadas com ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). Os insetos foram avaliados após um e três dias para *T. radiata* e diariamente até vigésimo dia para *C. cincta*. As misturas foram classificadas de acordo com as classes de toxicidade propostas pela IOBC/WPRS. Nos experimentos com adultos de *T. radiata* todos os tratamentos foram considerados como Classe 1, com exceção do tratamento *I. fumosorosea* + óleo de girassol + KBRAdj que foi classificado levemente nocivo (Classe 2) (mortalidade de $50,0 \pm 15,8\%$). Nos experimentos com larvas neonatas de *C. cincta* todos os tratamentos apresentaram uma mortalidade inferior a 17,5% sendo classificados como Classe 1. É possível compatibilizar o uso de formulações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 com a liberação dos inimigos naturais *T. radiata* e *C. cincta* no MIP de *D. citri*.

Palavras-chave: Fungo entomopatogênico; Compatibilidade; Parasitóide; Crisopídeo

Abstract

Spraying mixtures of non-selective adjuvants together with *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 may reduce the control of *Diaphorina citri* by *Tamarixia radiata* and *Ceraeochrysa cincta*. Therefore, this work aimed to evaluate the selectivity of mixtures of *I. fumosorosea* ESALQ-1296 on adults of *T. radiata* and neonates of *C. cincta*. The residual effect was evaluated on citrus leaf discs (3 cm diameter) sprayed with the adjuvant mixtures + *I. fumosorosea* ESALQ-1296. The adults of *T. radiata* were confined on the discs and fed with honey drops. Topical contact application was measure on neonate larvae of *C. cincta* sprayed in Potter's tower and transferred to glass tubes 8.5 cm in length and 2.5 cm in diameter, fed with eggs of *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). The insects were evaluated after one and three days for *T. radiata* and daily until the 20th day for *C. cincta*. The mixtures were classified according to the classes proposed by IOBC / WPRS. In the experiments with adults of *T. radiata* all treatments were considered as Class 1 (innocuous), except for the treatment *I. fumosorosea* + sunflower oil + KBRAdj which was classified as slightly harmful (Class 2) (mortality of $50.0 \pm 15.8\%$). In the experiments with neonates larvae of *C. cincta* all treatments had mortality lower than 17.5% being classified as Class 1. The natural enemies *I. fumosorosea* with adjuvants and *T. radiata* and *C. cincta* are compatible and can be implemented in the IPM of *D. citri*.

Keywords: Entomopathogenic fungus; Compatibility; Parasitoid; Lacewing

4.1 Introdução

Os inimigos naturais *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae) e *Ceraeochrysa cincta* (Schneider, 1851) (Neuroptera: Chrysopidae) são encontrados com grande frequência nos pomares paulistas (DINIZ, 2013; RUGNO, 2013). Essas espécies apresentam grande importância para o controle de *Diaphorina citri* (GRAVENA, 2005). O ectoparasitoide *T. radiata* é uma espécie nativa da Índia e é específico para o controle de *D. citri* (CHIEN, 1995). Os adultos desse parasitoide apresentam coloração escura e medem de 0,92 a 1,04 mm (ONAGBOLA et al., 2009) e podem apresentar parasitismo de até 88,75% (GOMEZ-TORREZ, 2009). O predador *C. cincta* é a espécie mais encontrada nos pomares citrícolas paulistas, suas larvas são campodeiformes, corpo fusiforme e pernas ambulatórias, podendo sua população permanecer na cultura dos citros o ano inteiro (RUGNO, 2013). Segundo PAIVA (2009) ninfas e adultos de *D. citri* foram encontrados sendo predadas por larvas de crisopídeos, o que indica que este inimigo natural também podem regular a população de *D. citri*. Assim, os estudos de seletividade de produtos fitossanitários sobre estes inimigos naturais são importantes para selecionar inseticidas com menor impacto.

Nos últimos anos, o número de bioprodutos a base de fungos entomopatogênicos tem aumentado consideravelmente, com isso as preocupações com seus efeitos sobre a população de espécies não-alvo também tem sido crescente. Segundo Alves (1998), algumas espécies de fungos entomopatogênicos podem ter efeito negativo sobre a população de inimigos naturais, sendo muitas vezes o tipo de formulação o principal fator de mortalidade. Isso pode ocorrer quando alguns adjuvantes (emulsificante, espalhantes, óleos) e inertes não seletivos são utilizados na formulação, os quais compromete populações de espécies não-alvo.

O isolado ESALQ-1296 de *I. fumosorosea* apresentou alto desempenho sobre espécies pragas, como; *D. citri*, *Toxoptera citricida*, *Aleurocanthus woglumi*, *Brevipalpus phoenicis*, *Panonychus citri* (CONCESCHI, 2013). No entanto, até o momento nenhum estudo foi conduzido para demonstrar os seus efeitos sobre as espécies de inimigos naturais encontradas na cultura dos citros. Nesse sentido, foi avaliando nesse capítulo a seletividade de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre os inimigos naturais *T. radiata* e *C. cincta* para compatibilizar ao uso do bioproduto.

4.2. Material e Métodos

Com o objetivo de verificar a seletividade do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 sobre os inimigos naturais *Tamarixia radiata* e *Ceraeochrysa cincta*, foram realizados experimentos adaptando a metodologia descrita para inseticidas por Beloti (2013) para *T. radiata* e por Rugno (2013) para *Ceraeochrysa cubana*.

Os tratamentos utilizados nos experimentos foram:

- 1- Água destilada estéril (controle);
- 2- Tween 0,01%;
- 3- KBRAdj 0,075%;
- 4- Óleo de girassol (95% de óleo de girassol e 5% de KBRAdj para emulsão em água, sendo utilizada no volume de calda de 0,2%);
- 5- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹) com Tween 0,01%;
- 6- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹) com KBRAdj 0,075%;
- 7- *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (concentração de 5×10^6 conídios. mL⁻¹) com óleo de girassol (95% de óleo de girassol e 5% de KBRAdj, sendo utilizada no volume de calda de 0,2%).

O experimento com *T. radiata* foi realizado com base no efeito residual de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre adultos, pelo fato desses insetos serem sensíveis à pulverização tópica. Assim, seguindo a metodologia de Beloti (2013), as pulverizações foram realizadas primeiramente sobre discos de folha de citros seguido da transferência dos adultos de *T. radiata*. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente aleatorizado, com cinco repetições por tratamento (total de 50 insetos). A mortalidade de *T. radiata* foi avaliada após 24 h e 72 h da aplicação dos tratamentos e a partir dos resultados os tratamentos foram classificados segundo os índices propostos pela IOBC/WPRS: Classe 1= Mc <25% (inócuo); Classe 2 = $25 \leq Mc \leq 50$ % (levemente nocivo); Classe 3= $51 \leq Mc \leq 75$ % (moderadamente nocivo); Classe 4 = > 75% (nocivo) (VAN DE VEIRE et al., 2002).

O experimento com *C. cincta* foi realizado pela aplicação tópica dos tratamentos sobre larvas de 24 horas de idade conforme Rugno (2013) no delineamento inteiramente aleatorizado com 40 repetições (insetos)/tratamento. A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente até vigésimo dia e os resultados obtidos permitiram classificar os tratamentos de acordo com os índices propostos pela IOBC/WPRS: Classe 1= Mc <30% (inócuo); Classe 2 =

30 < Mc < 79 % (levemente nocivo); Classe 3= 79 < Mc < 99% (moderadamente nocivo); Classe 4 = > 99% (nocivo) (VAN DE VEIRE et al., 2002).

Os dados de seletividade de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 aos inimigos naturais, foram analisados estatisticamente utilizando modelos lineares generalizados (NELDER; WEDDERBURN, 1972; DEMÉTRIO et al., 2014) do tipo binomial ou quasibinomial. 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 *multicomp* com ajuste em função dos valores de “P”. Todas essas análises foram realizadas no software estatístico “R”, versão 3.0.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013). Nesses experimentos os valores de esporulação foram inferiores a 5%, portanto, não foram analisados estatisticamente.

4.3 Resultados e Discussão

Nos experimentos com adultos de *T. radiata* não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos no período de 24 horas de exposição ($F_{6,34}=2,96$; $P=0,068$), sendo considerados todos os tratamentos como inócuos (Classe 1). Porém no período de 72 horas de exposição foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($F_{6,34}=3,23$; $P=0,015$), sendo o tratamento *If* + óleo de girassol + KBRAdj levemente nocivo (Classe 2) para os adultos de *T. radiata* obtendo valores de mortalidade de $50,0 \pm 15,8\%$ (Tabela 5). Todos os insetos mortos não apresentaram micoses e esporulação do fungo entomopatogênico, indicando que o óleo poderia ter causado a mortalidade dos adultos.

Nos experimentos com larvas de 1º ínstar de *C. cincta* não foram observadas diferenças estatísticas na mortalidade após 20 dias da aplicação direta dos tratamentos ($F_{6,27}=0,34$; $P=0,904$) (Tabela 6). Todos os tratamentos apresentaram uma mortalidade inferior a 17,5% sendo classificados como inócuos (Classe 1). Nenhuma das larvas mortas de *C. cincta* apresentaram micoses e esporulação de *I. fumosorosea*.

Os testes de seletividade conduzidos neste estudo foram os primeiros que avaliaram o efeito de formulações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre os inimigos naturais *T. radiata* e *C. cincta* no Brasil. Os resultados demonstraram que este entomopatógeno causou uma baixa toxicidade em ambos os inimigos naturais, sendo considerado na maioria dos tratamentos como inócuo (Classe 1). Entretanto, Chow et al. (2016) conduziram um experimento com ninfas de *D. citri* após de 3, 6 e 9 dias de parasitadas por *T. radiata* e imersas em uma suspensão de blastósporos de *I. fumosorosea* ARSEF 3581. Seus resultados indicaram que o

entomopatígeno afetou a mumificação, emergência e razão sexual de machos: fêmeas de *T. radiata* apenas para ninfas com três dias do parasitismo. No entanto, nenhum efeito ocasionado pelo fungo entomopatogênico foi observado em ninfas de *D. citri* com 6 e 9 dias do parasitismo por *T. radiata*. Isso sugere que ainda é possível compatibilizar o uso de *I. fumosorosea* e *T. radiata* no controle de *D. citri* na mesma área, onde podem ser feitas pulverizações do fungo entomopatogênico antes ou após seis dias do parasitismo por *T. radiata*.

Os resultados com *T. radiata* mostraram que o fungo de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 associados ao KBRAAdj não provocou mortalidade significativa dos adultos do parasitóide. Entretanto, quando foi introduzido o óleo de girassol foi observado um aumento na mortalidade dos adultos, indicando um efeito sinérgico do óleo + fungo entomopatogênio *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre *T. radiata*. Portanto, o uso de *If* + KBRAAdj seria a mais indicada para evitar os efeitos sobre o inimigo natural.

Atualmente, existem programas de liberação de *T. radiata* em áreas abandonadas e fundo de quintal no estado de São Paulo para controlar as populações de *D. citri* que migram para as áreas com pomares comerciais (PARRA et al., 2010). De acordo com nossos resultados, o fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 poderia ser utilizado de forma integrada com as liberações de *T. radiata*. Alguns trabalhos têm mostrado que existe um sinergismo na integração de parasitoides e fungos entomopatogênicos no controle de espécies pragas (EMAMI, ALICHI e MINAEI, 2013; MESQUITA e LACEY, 2001), portanto, a integração de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e *T. radiata* poderia ser uma alternativa ao controle de *D. citri* em pomares de citros.

Outros estudos também demonstraram que o fungo *I. fumosorosea* foi seletivo para espécies de inimigos naturais encontradas em citros tais como *Coccinella undecimpunctata* (MATTER e SABBOUR, 2013) e *Aphelinus asychis* (MESQUITA e LACEY, 2001). Assim, *I. fumosorosea* ESALQ-1296 poderia ser utilizado, tanto em pomares comerciais quanto em áreas abandonadas ou fundo de quintal de forma conjunta com a liberação de parasitóides e predadores com objetivo de melhorar o manejo integrado de *D. citri*. No entanto, novos estudos ainda devem ser realizados para comprovar esse potencial de controle em áreas comerciais de citros.

Tabela 5. Efeito residual de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 com os adjuvantes Tween 80, KBRAdj e óleo de girassol para adultos de *Tamaraxia radiata* após 24h e 72h e classe de toxicidade segundo a IOBC/WPRS

Tratamentos	24 horas			72 horas		
	Mortalidade ± EP ¹	MC (%) ²	IOBC/ WPRS ³	Mortalidade ± EP ¹	MC (%) ²	IOBC/ WPRS ³
Controle	8,0 ± 4,9 a	-	-	10,0 ± 5,5a	-	-
Tween 80 0,01%	2,0 ± 2,0 a	0,0	1	12,0 ± 3,7a	2,0	1
KBRAdj 0,075%	0,0 ± 0,0 a	0,0	1	14,0 ± 5,1a	4,0	1
Óleo de girassol 0,2%	0,0 ± 0,0 a	0,0	1	28,0 ± 8,6a	18,0	1
If + Tween 80 0,01%	2,0 ± 2,0 a	0,0	1	30,0 ± 11,0a	20,0	1
If + KBRAdj 0,075%	0,0 ± 0,0 a	0,0	1	8,0 ± 3,7 a	0,0	1
If + óleo de girassol 0,2%	10,0 ± 4,5a	2,17	1	50,0 ± 15,8b	40,0	2

¹ Mortalidade média ± Erro padrão (EP). ² Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925). ³ Classificação da toxicidade de acordo com IOBC/WPRS em função da mortalidade do parasitoide: Classe 1= MC < 25% (inócuo); Classe 2= 25 ≤ MC ≤ 50% (levemente nocivo); Classe 3= 51 ≤ MC ≤ 75% (moderadamente nocivo); Classe 4= MC>75% (nocivo) (Van de Veire et al., 2002)

Tabela 6. Efeito de contato de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 com os adjuvantes Tween 80, KBRAdj e óleo de girassol para as larvas de 1º ínstar de *Ceraeochrysa cincta* após 20 dias e classe de toxicidade segundo a IOBC/WPRS

Tratamentos	Mortalidade ± EP ¹	MC (%) ²	IOBC/WPRS ³
Controle	17,5 ± 4,8a	-	-
Tween 0,01%	15,0 ± 6,5a	0,0	1
KBRAdj 0,075%	12,5 ± 4,8a	0,0	1
Óleo de girassol 0,2%	10,0 ± 0,0a	0,0	1
If + Tween 0,01%	10,0 ± 4,1a	0,0	1
If + KBRAdj 0,075%	12,5 ± 2,5a	0,0	1
If + óleo de girassol 0,2%	10,0 ± 7,1a	0,0	1

¹ Mortalidade média ± Erro padrão (EP). ² Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925). ³ Classes da IOBC/WPRS em função da mortalidade do predador, sendo: Classe 1= Mc <30% (inócuo); Classe 2 = 30 < Mc < 79 % (levemente nocivo); Classe 3= 79 < Mc < 99% (moderadamente nocivo); Classe 4 = > 99% (nocivo) (Van de Veire et al., 2002)

4.4 Conclusão

- As misturas do fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 com Tween 80 e KBRAdj foram classificadas como inócuas para os adultos de *T. radiata* e as larvas neonatas de *C. cincta*. Entretanto, a mistura do fungo com o óleo de girassol + KBRAdj foi levemente nocivo para *T. radiata*.

Referências

- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.
- BELOTI, V.H. **Seletividade de inseticidas recomendados para a produção integrada de citros sobre o parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae)**. 2013. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- CARDOSO, E.R.; FREITAS, S.; NUNES, H.T.; PESSOA, L.G.A. Seletividade de *Lecanicillium lecanii* e *Metarhizium anisopliae* para larvas de primeiro instar de *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) em laboratório. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 4, p. 563-568, 2007.
- CHIEN, C.C. The role of parasitoids in the pest management of citrus psyllid. In: SYMPOSIUM RESEARCH AND DEVELOPMENT OF CITRUS IN TAIWAN, 1995, Taichung, Proceedings...Taichung, 1995. P. 241-261.
- CHOW, A.; DUNLAP, C.A.; JACKSON, M.A.; FLORES, D.; PATT, J.M.; SETAMOU, M. Oviposition behavior and survival of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae), an ectoparasitoid of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), on hosts exposed to an entomopathogenic fungus, *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae), under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 119, n.5, p. 1995-2005, 2016.
- DEMÉTRIO, C.G.B.; HINDE, J.; MORAL, R.A. Models for Overdispersed data in entomology. In: Ecological Modelling Applied to Entomology, capítulo 9, v. 1, p. 219-259, 2014.
- DINIZ, A.J.F. **Otimização da criação de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) e de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), visando à produção em larga escala do parasitoide e avaliação do seu estabelecimento em campo**. 2013. 129 p. Tese de (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- EMAMI, F.; ALICHI, M.; MINAEI, K. Interaction between the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) and the parasitoid wasp, *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Entomological and Acarological Research**, Milan, v. 47, n. 4, p. 14-17, 2013.

- GOMEZ-TORREZ, M.L. **Estudos bioecológicos de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922)(Hymenoptera: Eulophidae) para o controle de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1907(Hemiptera: Psyllidae).** 2009. 138p. Tese de (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- LOONG, C.Y.; SAJAP, A.S.; NOOR, H.M.; OMAR, D.;ABOOD, F. Effects of UV-B and solar radiation on the efficacy of *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) for controlling bagworm, *Pteroma pendula* (Lepidoptera: Psychidae). **Journal of Entomology**, London, v. 10, n.2, p.53-65, 2013.
- MATTER, M.M.; SABBOUR, M.M. Differential efficacies of *Nomuraea rileyi* and *Isaria fumosorosea* on some serious pests and the pests efficient predator prevailing in tomato fields in Egypt. **Journal of plant protection research**, Poznan, v. 53, n. 2, p.103-109, 2013.
- MESQUITA, A.L.M.; LACEY, L.A. Interactions among the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), the parasitoid, *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae), and their aphid host. **Biological Control**, Orlando, v. 22, p. 51-59, 2001.
- 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.
- ONAGOLA, E.O.; BOINA, D.R.; HERMANN, S.L.; STELINSKI, L.L. Antennal sensila of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllid). **Annals of Entomological Society of America**, Lanham, v. 102, p. 523-531, 2009.
- PAIVA, E.B.P. **Distribuição especial e temporal, inimigos naturais e tabela de vida ecológica de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em citros em São Paulo.** 2009.64 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM: versão 3.0.1 2013. Disponível em: <<http://r-development-core-team.software.informer.com>>. Acesso: 13 mar. 2015.

- RUGNO, G.R. Seletividade de inseticidas utilizados na cultura dos citros ao predador *Ceraeochrysa cubana* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), desenvolvimento em diferentes temperaturas e diversidade de crisopídeos em propriedades com manejo intensivo e convencional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). 2013. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- VAN DE VEIRE M.; STERK, G.; VANDER STAAL, M.; RAMAKERS, P.M.J.; TIRRY, L. Sequential testing scheme for the assessment of the side-effects of plant protection products on the predatory bug *Orius laevigatus*. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 47, p. 1001-113, 2002.

5 ADEQUAÇÃO DO VOLUME DE CALDA E MONITORAMENTO DA EFICIÊNCIA DE APLICAÇÕES DE *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 NO CONTROLE DE *Diaphorina citri* E OUTRAS PRAGAS EM PRODUÇÃO ORGÂNICA E CONVENCIONAL DE CITROS

Resumo

Os objetivos deste estudo foram ajustar o volume de calda para a pulverização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 no controle de *Diaphorina citri* e avaliar seu efeito no manejo desta praga e sobre populações não-alvo nos sistemas de produção orgânica e convencional de citros. Os experimentos de adequação do volume de calda foram realizados em duas fazendas com produção convencional, sendo avaliados os volumes de 20, 40 e 60 mL por m³ de copa das árvores. Os resultados mostraram que o volume de 60 mL.m⁻³ de área de copa apresentou maiores mortalidades de *D. citri* (62 a 90%). A eficiência das aplicações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foi avaliada sobre adultos de *D. citri* confinados nas árvores de citros e, também, sobre as populações naturais de *D. citri* e artrópodes não-alvo. Os experimentos foram conduzidos em duas áreas comerciais, uma delas com sistema de produção orgânica e outra com sistema de produção convencional. As pulverizações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 causaram uma mortalidade de adultos de *D. citri* confinados que variou de 28,9% a 90,8% na área orgânica e de 74,5% a 86,8% na área convencional. O monitoramento populacional na propriedade orgânica mostrou que as aplicações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 reduziram significativamente a população natural das espécies-pragas *D. citri* e o ácaro da leprose (*Brevipalpus* spp.), porém, não reduziram a população de cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* e moscas das frutas. O monitoramento das pragas na propriedade com sistema de produção convencional revelou que as populações naturais de *D. citri*, *Brevipalpus* spp., ácaros tetraniquídeos, moscas das frutas e cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* foram muito baixas. Entretanto, as pulverizações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 reduziu significativamente a população do ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*) nos pomares convencionais. Além disso, foi verificado que as aplicações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 não apresentaram efeitos negativos nas populações dos predadores joaninhas, crisopídeos e hemeróbídeos. Portanto, este estudo comprovou a eficiência do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 para o controle de populações de *D. citri* podendo também ter efeito na redução de *Brevipalpus* spp. e *P. oleivora*, que também são de grande importância para a citricultura brasileira.

Palavras-chave: Tecnologia de aplicação; Pragas de citros; Inimigos naturais; Flutuação populacional

Abstract

The objectives of this study were to adjust the spraying volume of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 for the control of *Diaphorina citri* and to evaluate its effect on the management of the pest and on the impact on non-target populations in organic and conventional citrus production systems. The experiments were carried out in two farms with conventional production and the volumes of 20, 40 and 60 mL per m³ of tree were evaluated. The volume of 60 mL.m⁻³ of tree area resulted in higher mortalities of *D. citri* (62 and 90%). The efficiency of the *I. fumosorosea* ESALQ-1296 applications was evaluated on adults of *D. citri* confined in citrus trees and, also, on the natural populations of *D. citri* and non-target arthropods. The experiments were conducted in

two commercial areas, one with an organic production system and the other with a conventional production system. Sprays of *I. fumosorosea* ESALQ-1296 caused mortality of confined *D. citri* adults ranging from 28.9% to 90.8% in the organic area and from 74.5% to 86.8% in the conventional area. Population monitoring on organic farm showed that *I. fumosorosea* ESALQ-1296 applications significantly reduced the natural population of *D. citri* and the false spider mite (*Brevipalpus* spp.), but did not reduce the spittlebugs vector of *Xylella fastidiosa* and fruit flies. Monitoring of pests on the farm with a conventional production system showed that the natural population of *D. citri*, *Brevipalpus* spp., tetranychid mites, fruit flies and the spittlebugs were very low. However, the spraying of *I. fumosorosea* ESALQ-1296 significantly reduced the population of the citrus rust mite (*Phyllocoptruta oleivora*) in conventional orchards. In addition, it was demonstrated that the applications of *I. fumosorosea* ESALQ-1296 did not present negative effects on the natural populations of ladybird, chrysopid and hemerobiide predators. Therefore, this study proved the efficiency of the entomopathogenic fungus *I. fumosorosea* ESALQ-1296 for the control of natural populations of *D. citri* and the potential for reducing populations of *Brevipalpus* spp. and *P. oleivora*, which are also of great importance for Brazilian citriculture.

Keywords: Application technology, Citrus pests, Natural enemies, Population fluctuation

5.1 Introdução

Diaphorina citri vem causando sérias preocupações para os citricultores paulistas, os quais por falta de alternativas mais sustentáveis de controle têm utilizado basicamente inseticidas químicos. O aumento no número de pulverizações de inseticidas tem causado vários problemas, como o aumento nos custos de produção (FNP, 2013), e desequilíbrios nas populações de pragas e inimigos naturais. A integração do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 no manejo de *D. citri* pode ser uma boa alternativa, uma vez que, seu uso pode diminuir o número de aplicações desses inseticidas químicos, consequentemente, reduzir os seus efeitos sobre o agroecossistema.

Em áreas orgânicas, o controle de *D. citri* é menos intensivo e poucas alternativas existem. Decorrente disso, a população de *D. citri* nessas áreas tem sido bem elevada, o que tem comprometido ou mesmo inviabilizado esse sistema de produção. Estudo realizado por Ausique (2014) com insetos confinados em *voile* indicou que o isolado ESALQ-1296 de *I. fumosorosea* tem grande potencial no controle de adultos de *D. citri*. Embora existam resultados promissores, ainda não se conhece a eficiência desse isolado no manejo de populações naturais de *D. citri*, e quais são os seus efeitos sobre outras espécies pragas e inimigos naturais na cultura.

Os estudos de flutuação populacional de pragas são fundamentais para o planejamento e escolha das medidas de controle. Na citricultura, apesar da busca pelo manejo integrado de pragas, ainda são poucos os trabalhos que avaliam o uso intensivo de aplicações de fungos

entomopatogênicos sobre as populações de artrópodes. O trabalho conduzido por Molina (2007) demonstra a alta eficiência dos fungos *Syngliocladium* sp. e *Lecanicillium longisporum* para o controle de *Orthezia praelonga* (atualmente *Praelongorthezia praelonga*) em citros. Além disso, as aplicações desses entomopatógenos não interferem nas populações e diversidade dos inimigos naturais nos pomares.

Estudos conduzidos em laboratório demonstraram que o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 é patogênico para outras espécies de pragas de citros, tais como: os ácaros da leprose (*Brevipalpus phoenicis*), ácaros tetraniquídeos (*Panonychus citri*), pulgão-preto (*Toxoptera citricida*) e mosca-negra (*Aleurocanthus woglumi*) (CONCESCHI, 2013). Portanto, os objetivos desses estudos foram: 1- determinar o volume de calda de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 adequado para o controle de *D. citri*; 2- monitorar a eficiência das aplicações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na população de *D. citri* e outras espécies de pragas em dois sistemas de produção citrícola (convencional e orgânico); 3- avaliar o efeito das pulverizações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre as populações de inimigos naturais.

5.2 Material E Métodos

Em todos os experimentos foram utilizados adultos de *D. citri* com 7 a 10 dias após a emergência, provenientes da criação no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano ESALQ-USP, seguindo a metodologia descrita no item 2.2.1. Os conídios do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 foram produzidos e fornecidos pela Koppert® Brasil e a concentração ajustada em 5×10^6 condios.mL⁻¹ em calda contendo 0,075% do adjuvante KBRAdj.

5.2.1 Testes de adequação do volume de calda para *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 no controle de *Diaphorina citri* em campo

Com o objetivo de determinar o volume de calda de *Isaria fumosorosea* ESALQ 1296 adequado para o controle de *D. citri*, foram realizados experimentos em pomares comerciais em duas fazendas (Fazenda São Carlos no município de Nova Europa-SP e Fazenda Maringá, no município Gavião Peixoto- SP). Antes da aplicação foi determinado o volume da copa de 15 árvores de citros (cubicagem) em ambas as fazendas, escolhidas aleatoriamente na área.

Na fazenda São Carlos, utilizou-se área com a variedade Valência, com $75,5 \pm 1,0 \text{ m}^3$ de área de copa em espaçamento entre linhas de 7 metros e entre plantas de 4 metros ($357 \text{ plantas.ha}^{-1}$). Na fazenda Maringá a variedade das plantas de citros foi “Pera”, sendo o volume da copa das árvores de $39,5 \pm 1,2 \text{ m}^3$ em espaçamento de 7 m x 2,8 m ($510 \text{ plantas.ha}^{-1}$).

Os tratamentos foram conduzidos com os volumes de calda de 20, 40 e 60 mL por m^3 de área de copa das árvores e o dimensionamento do volume foi ajustado utilizando bicos de pulverização da marca Jacto[®]. O tratamento controle foi realizado sem aplicação de água ou fungo. No tratamento de 20 mL.m^{-3} foi utilizado o bico AD2 com difusor AC 23 em pressão de 100 lbf.pol². No tratamento 40 mL.m^{-3} foi o bico AD3 contendo um difusor AC 25 em pressão de 125 lbf.pol². No tratamento com 60 mL.m^{-3} foi utilizado o bico AD4 com difusor AC 25 em pressão de 117 lbf.pol² (Tabela 7).

O desenho experimental foi em blocos casualizados, contendo três blocos e quatro tratamentos. Cada bloco conteve quatro parcelas correspondendo cada um dos tratamentos. A parcela era composta de três linhas contínuas de plantas, onde na linha central foram colocados três sacos de tecido tipo *voile* (contendo 20 adultos de *D. citri* por saco), totalizando 180 adultos por tratamento. As pulverizações foram feitas com turbo pulverizador bilateral Jacto[®] Valencia 4000, com capacidade de 4000 litros, ramal especial de bicos, acoplado a um trator New Holland, modelo TL75 ou Massey Ferguson, modelo 275, que trabalhou a 1800 rpm, proporcionando 540 rpm na tomada de potência (TDP), a uma velocidade de aplicação de $6,4 \text{ km.h}^{-1}$.

Tabela 7. Tratamentos com os diferentes volumes de suspensão do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 utilizados no teste de volume de calda realizado na fazenda São Carlos em Nova Europa-SP e Fazenda Maringá em Gavião Peixoto-SP

Tratamentos mL.m^{-3}	Fazenda São Carlos		Fazenda Maringá	
	Volume (L.ha^{-1})	Concentração de fungo ($10^{12} \text{ conídios.ha}^{-1}$)	Volume (L.ha^{-1})	Concentração de fungo ($10^{12} \text{ conídios.ha}^{-1}$)
60	1618	8,1	1224	6,1
40	1079	5,4	816	4,0
20	539	2,7	408	2,0
Controle	0	0	0	0

Após 10 dias da aplicação, os ramos contendo os adultos de *D. citri* foram cortados com auxílio de uma tesoura de poda e trazidos ao laboratório. Posteriormente, foi realizada a contagem dos adultos mortos e vivos para a determinação da mortalidade, e os adultos mortos

foram transferidos para uma câmara úmida e mantidos durante três dias em B.O.D a 26°C para a confirmação da esporulação do fungo.

5.2.2 Monitoramento das populações de *Diaphorina citri*, outras pragas de citros e inimigos naturais em áreas pulverizadas com *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296

5.2.2.1 Áreas experimentais

Os experimentos foram realizados em duas áreas comerciais de citros. A primeira área situada em Itirapina-SP (Fazenda da Toca) adota o sistema orgânico de produção e a segunda (Fazenda São Carlos) localizada em Nova Europa-SP, adota o sistema convencional de produção.

Ambas as áreas consistem de plantas de citros da variedade Valência, plantadas no espaçamento de 7 metros entre linhas e de 4 metros entre plantas (357 plantas. ha⁻¹). A área de copa das plantas de citros foi de 63,2 ± 0,3 m³ na fazenda da Toca e de 75,5 ± 1,0 m³ na fazenda São Carlos.

5.2.2.2 Tratamentos e pulverizações

Na fazenda da Toca (área orgânica), os experimentos foram conduzidos no delineamento em blocos casualizados, sendo três blocos com dois tratamentos (*Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 e controle). Dentro de cada bloco, o tratamento consistiu de uma parcela de três hectares contendo nove linhas de plantas com largura de 56 metros e comprimento de 500 metros (Figura 17). No período do experimento, os responsáveis pelo manejo agrícola da fazenda mantiveram as aplicações de enxofre e soluções nutritivas em toda a área experimental de acordo com o cronograma da fazenda.

Na fazenda São Carlos (área convencional), os ensaios foram conduzidos no delineamento em blocos casualizados, sendo três blocos com três tratamentos (Figura 18). Os tratamentos dos experimentos foram:

- 1- Controle (sem aplicação);
- 2- *I. fumosorosea* na concentração de 5 x 10⁶ conídios.mL⁻¹ + KBRAdj (0,075%) em volume de 60 mL.m⁻³;

3- Inseticida químico (apenas na fazenda convencional).

As parcelas eram compostas de dois hectares contendo nove linhas de plantas com 56 metros de largura e 350 metros de comprimento. Os inseticidas aplicados na área convencional foram cedidos pelo proprietário da fazenda e as pulverizações com fungicidas, acaricidas, bactericidas e adubos foliares foram mantidos normalmente seguindo a necessidade de cada propriedade.

As aplicações foram feitas com turbo pulverizador bilateral Jacto[®] Valência 4000, com capacidade de 4000 litros (Fazenda São Carlos) e Jacto[®] Arbus 2000, com capacidade para 2000 litros (Fazenda da Toca), ambos contendo ramal especial de bicos, acoplado a um trator New Holland, modelo TL75 e Massey Ferguson, modelo 275, respectivamente, que trabalhou a 1800 rpm, proporcionando 540 rpm na tomada de potência (TDP), a uma velocidade de aplicação de 6,4 km.h⁻¹. O bico de pulverização utilizado foi da marca Jacto[®], bico AD4 com difusor AC 25 em pressão de 117 lbf.pol².

Na área orgânica (Fazenda da Toca), a frequência das aplicações de fungo foi mensal no intervalo de 02/05/2014 a 09/01/2015 e 08/04/2015 a 16/07/2015, e quinzenal no intervalo de 09/01/2015 á 08/04/2015, sendo essa frequência determinada pelo monitoramento da população de *D. citri*. As pulverizações da área orgânica foram realizadas nas seguintes datas; 02/05/2014, 30/05/2014, 26/06/2014, 06/08/2014, 02/09/2014, 07/10/2014, 01/11/2014, 02/12/2014, 09/01/2015, 26/01/2015, 09/02/2015, 24/02/2015, 11/03/2015, 25/03/2015, 08/04/2015, 07/05/2015, 03/06/2015, 06/07/2015.

Na área com produção convencional (Fazenda São Carlos), as aplicações de fungo e inseticida foram realizadas mensalmente nos intervalos de 04/03/2014 a 07/07/2015, seguindo as programações da fazenda. As pulverizações foram realizadas nas seguintes datas; 04/03/2014, 03/04/2014, 02/05/2014, 05/06/2014, 04/07/2014, 07/08/2014, 05/09/2014, 06/10/2014, 07/11/2014, 01/12/2014, 16/01/2015, 13/02/2015, 12/03/2015, 16/04/2015, 15/05/2015, 15/06/2015.

Os inseticidas utilizados na Fazenda São Carlos para o controle de *D. citri* foram Turbo[®] ou Dimetoato[®] 500 EC Nortox, na dose de 400 mL/1000 litros de água em volume de 20 mL.m⁻³ de copa de árvore. No intervalo de 04/03/2014 a 07/08/2014 foram pulverizados o inseticida Turbo[®] e as demais datas foram pulverizadas o inseticida Dimetoato 500 EC Nortox[®]. Durante o período das chuvas, período de maior incidência de *D. citri*, foram realizadas cinco pulverizações aéreas em área total da fazenda. As pulverizações de acaricidas, fungicidas e adubação foliar foram também realizadas em área integral.

Figura 17. Disposição do experimento na Fazenda da Toca, Itirapina-SP contendo três blocos (B1, B2, e B3) constituídos pelos tratamentos Controle (C) e *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 (F) e suas repetições (R1, R2, R3). No centro de cada tratamento (5° linha) foram fixados seis armadilhas amarelas e três sacos de voile contendo adultos de *Diaphorina citri*

Figura 18. Disposição do experimento na Fazenda da São Carlos, Nova Europa-SP contendo três blocos (B1, B2, e B3) constituídos pelos tratamentos Controle (C), *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 (F) e inseticida químico (Q) e suas repetições (R1, R2, R3). No centro de cada tratamento (5° linha) foram fixados seis armadilhas amarelas e três sacos de *voile* contendo adultos de *Diaphorina citri*. As áreas no entorno do experimento apresentavam plantas de citros

5.2.2.3 Amostragens para avaliação da eficiência das aplicações de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 sobre adultos de *Diaphorina citri* confinados em *voile*

Em algumas das datas de aplicação do fungo *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na Fazenda da Toca e Fazenda São Carlos, foram confinados adultos de *Diaphorina citri* para avaliar a eficiência das aplicações para o controle de *D. citri*. Em cada parcela foram fixados três sacos de *voile* (contendo 20 adultos de *D. citri* por saco) localizados na linha central (5° linha), totalizando 180 insetos por tratamento (Figura 17 e 18).

Na área orgânica (Fazenda da Toca) foram confinados os adultos de *D. citri* em 11 pulverizações, sendo elas nas datas: 02/05/2014, 30/05/2014, 26/06/2014, 06/08/2014, 02/09/2014, 07/10/2014, 01/11/2014, 02/12/2014, 09/01/2015, 26/01/2015, 09/02/2015. Já

para a área convencional (Fazendo São Carlos) foram confinados os insetos em três pulverizações, nas datas: 05/09/2014, 07/11/2014, 01/12/2014.

Após 10 dias de cada aplicação, os ramos contendo os adultos de *D. citri* foram cortados com auxílio de uma tesoura de poda e trazidos ao laboratório. Posteriormente, foi realizada a contagem dos adultos mortos e vivos para a determinação da mortalidade total, e os adultos mortos foram transferidos para uma câmara úmida e mantidos durante três dias em B.O.D a 26°C para a confirmação da esporulação do fungo.

5.2.2.4 Amostragens e monitoramento das populações de pragas e inimigos naturais

Nos experimentos conduzidos na área com produção convencional e na área orgânica, as pulverizações de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 foram realizadas com o objetivo de avaliar a eficiência do fungo sobre a população natural de *Diaphorina citri*. No entanto, as pulverizações poderiam ter efeito sobre outras espécies de pragas e inimigos naturais. Assim, foi realizado o monitoramento das populações de pragas: *D. citri*, ácaros da leprose (*Brevipalpus* spp.), ácaros da falsa ferrugem (*P. oleivora*), ácaros tetraniquídeos (*P. citri*, *Tetranychus mexicanus*, etc), cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* (agente causal da Clorose Variegada dos Citros-CVC) e moscas das frutas, e também, dos inimigos naturais: joaninhas, crisopídeos, hemerobiídeos.

A amostragem das espécies-praga foi realizada de duas formas: a amostragem direta e a amostragem por armadilhas adesivas amarelas. As amostragens diretas foram realizadas através da contagem direta em 10 plantas nas três linhas centrais de cada parcela, totalizando 30 plantas por tratamento. Essas plantas foram escolhidas aleatoriamente sendo observadas cinco brotações para a avaliação de ninfas e adultos de *D. citri* e cigarrinhas, cinco frutos para avaliação dos ácaros *Brevipalpus* spp. e *P. oleivora* e cinco folhas totalmente expandidas para avaliação de ácaros tetraniquídeos. As avaliações foram efetuadas a cada 15 dias na área orgânica e em períodos de 30 dias na área convencional. As amostragens com armadilhas adesivas amarelas foram realizadas para o monitoramento dos adultos de *D. citri*, cigarrinhas e moscas das frutas. As armadilhas foram fixadas na linha central de cada parcela (quinta linha), no terço médio superior das plantas de forma que elas ficassem distanciadas 24 metros umas das outras (Figura 17). Cada parcela conteve seis armadilhas adesivas amarelas de 30 cm x 10 cm (marca ISCA), num total de 18 armadilhas/tratamento. As armadilhas foram

trocadas a cada 15 dias na área orgânica (Fazenda da Toca) e 30 dias na área convencional (Fazenda São Carlos).

As amostragens dos inimigos naturais foram realizadas utilizando a mesma metodologia descrita para as espécies pragas. As amostragens diretas dos predadores foram realizadas através da observação dos inimigos naturais presentes a uma altura pré-estabelecida de 1,5 a 2 metros nas plantas de citros. A padronização dessas amostragens foi realizada com base no tempo, sendo estabelecidos 2 minutos por planta. As plantas amostradas foram escolhidas ao acaso nas três linhas centrais, seguindo a mesma disposição das plantas escolhidas para as amostragens das pragas. As amostragens dos adultos dos inimigos naturais por armadilhas foram realizadas nas mesmas armadilhas adesivas amarelas que foram avaliadas as espécies-praga. O número e a frequência de troca das armadilhas foram as mesmas citadas anteriormente.

Na área orgânica e convencional foram coletados os dados climáticos através do uso de um datalogger Maxitrak 2c/temp RH, a fim de determinar a temperatura e umidade durante todo período do experimento. O datalogger foi programado para coletar os dados a cada 1 hora. O período total do experimento foi de 16 meses na área orgânica (Fazenda da Toca) e 14 meses na área convencional (Fazenda São Carlos).

5.2.3 Análises estatísticas

Os dados de mortalidade de *Diaphorina citri* nos testes de adequação de volume de calda, e nos experimentos de confinamento dos insetos em sacos de *voile* foram submetidos a análises estatísticas utilizando modelos lineares generalizados (NELDER; WEDDERBURN, 1972; DEMÉTRIO et al., 2014) do tipo binomial ou quasibinomial. 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”. Os valores de esporulação foram inferiores a 5%, portanto, não foram considerados para as análises estatísticas. Todas as análises foram realizadas no software estatístico “R”, versão 3.0.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

As contagens dos insetos e ácaros obtidos pelos diferentes métodos de amostragem nas duas áreas de produção (orgânico e convencional) foram analisadas utilizando modelos lineares generalizados mistos com *splines* penalizados (RUPPERT et al., 2003; VERBYLA et al., 1999; MULLAH et al., 2015). No modelo, é pressuposto que a variável resposta dada pela

soma das contagens por armadilhas ou por amostragens dentro da i -ésima parcela no j -ésimo período de avaliação segue uma distribuição Binomial Negativa, com função de ligação logarítmica dada por:

$$\log[E(Y_{ij} | B_i, T_i, t_{ij})] = \beta_0 + \beta_1 B_i + \beta_2 T_i + \beta_3 t_{ij} + \text{spli}_i(t_{ij}), \quad (1)$$

em que B_i e T_i correspondem a variáveis indicadoras de bloco e tratamento, t_{ij} é o dia de coleta da armadilha ou amostra e $\text{spli}_i(\cdot)$ é a função suavizadora com *splines* penalizados de efeito aleatório aplicado ao dia de coleta. O número de pontos, da função *spline*, utilizados para suavizar o modelo (“nós”) variou de 10 a 20 dependendo da complexidade da variável resposta e de dificuldades de convergência. A estimação dos parâmetros foi realizada pelo método da máxima verossimilhança, sendo a comparação entre tratamentos realizada pelo teste Wald-F. Todas as análises foram geradas pelo procedimento GLIMMIX do *software* SAS 9.4 (SAS, 2016).

Os dados obtidos no monitoramento das pragas e inimigos naturais foram analisados em parceria com a Dra. Clarice Garcia Borges Demétrio e seu aluno de doutorado Ms. Ricardo Klein do Departamento de Estatística da ESALQ-USP.

5.3. Resultados E Discussão

5.3.1 Testes de adequação do volume de calda para *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 no controle de *Diaphorina citri* em campo

Até o momento, as aplicações dos bioprodutos a base de fungos entomopatogênicos são realizadas adotando os mesmos procedimentos recomendados para os inseticidas químicos. Contudo, nem sempre as recomendações a serem empregadas para os inseticidas químicos também são adequadas para os fungos entomopatogênicos, o que pode levar ao insucesso no controle da praga. Portanto, a eficiência de controle de um entomopatógeno na maioria das vezes depende do volume de calda e a concentração de conídios aplicados por hectare.

Os resultados obtidos nos experimentos de adequação do volume de calda de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em pomares comerciais demonstraram que a mortalidade dos adultos de *D. citri* incrementou em função do aumento do volume pulverizado por m^3 de copa de árvore. No experimento realizado na Fazenda São Carlos foi encontrada diferença

estatística entre os tratamentos ($\chi^2=223,28$, $df=3$, $P<0,001$), sendo obtido no controle uma mortalidade média de *D. citri* de $2,7 \pm 1,2\%$ e nos tratamentos com os diferentes volumes de calda de $60,2 \pm 6,0\%$, $69,0 \pm 7,2\%$ e $90,9 \pm 2,4\%$ para 20, 40 e 60 mL.m⁻³, respectivamente (Figura 19 A). No experimento realizado na Fazenda Maringá, os tratamentos apresentaram diferença estatística ($\chi^2=283,328$, $df=3$, $P<0,001$), obtendo valores de mortalidade média de *D. citri* de $12,6 \pm 4,2\%$ para o tratamento controle, $23,2 \pm 7,8\%$ para o volume de 20 mL.m⁻³, de $58,1 \pm 8,7\%$ para o volume de 40 mL.m⁻³ e $62,1 \pm 14,1\%$ para volume de 60 mL.m⁻³ (Figura 19 B).

Segundo Antuniassi (2006) a eficiência de controle de pragas por defensivos agrícolas estão relacionadas à correta aplicação do produto, sendo o volume de calda um dos parâmetros mais importantes para que se tenha um sucesso no controle. Bonadiman (2008) observou que o volume de calda influencia diretamente no controle químico de *Anticarsia gemmatalis* e *Piezodorus guildinii* em soja. Além disso, Costa et al. (2005) descrevem que a eficácia do controle de *Spodoptera frugiperda* em milho e sorgo foi influenciada diretamente pelo tamanho ou estágio fenológico da planta. Os estudos aqui realizados mostraram a importância de aperfeiçoar a tecnologia de aplicação do fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em plantas de citros, principalmente no ajuste do volume de calda pela área de copa de árvore. Com base nos resultados foi possível verificar que o volume de calda de 60 mL.m⁻³ de copa foi o tratamento que provocou maior mortalidade sobre os adultos de *D. citri*, o qual provavelmente foi causado pelo maior molhamento atingindo um maior número de insetos. O uso deste volume é aplicável a áreas com plantas de pequeno porte. A recomendação da utilização de 60 mL.m⁻³ para pode ser economicamente inviável para pomares adultos com plantas com grande área de copa devido ao custo da quantidade de fungo a ser utilizado. Outra opção em plantios adultos seria a utilização de menores volumes de calda associado a subdosagens de inseticidas de baixo custo.

Figura 19. Porcentagem de mortalidade ($\pm$ EP) de adultos de *Diaphorina citri* que receberam a aplicação de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ nos volumes de 20 mL.m⁻³, 40 mL.m⁻³ e 60 mL.m⁻³ de copa da árvore na Fazenda São Carlos- Nova Europa- SP (A) e na Fazenda Maringá- Gavião Peixoto- SP (B). Tratamentos com letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

5.3.2 Eficiência das aplicações de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 sobre adultos de *Diaphorina citri* confinados em sacos de tecido tipo voile

Em todas as 11 aplicações de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 na Fazenda da Toca foi observada diferença estatística entre o controle e o tratamento com o fungo. A mortalidade média dos adultos de *D. citri* causada pelo fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 variou de $28,9 \pm 5,4\%$ na data de 07/10/2014 a $90,8 \pm 5,8\%$ na data de 09/02/2015, observado os valores máximos de mortalidade nos meses de novembro/2014 a fevereiro/2015. No tratamento controle foi observada uma mortalidade média que variou de $3,4 \pm 1,8\%$ (06/08/2014) a $20,3 \pm 7,5\%$ (09/02/2015) (Figura 20 A). Observou-se entre 30/05 a 07/10 uma redução da

umidade relativa, aumento da temperatura e redução da eficiência de controle, exceto em 02/09. A menor mortalidade de *D. citri* foi observada em 07/10/2014 quando também se constatou os menores valores de umidade relativa do ar (<45% de UR) e elevadas temperaturas (>28°C) durante os 10 dias que sucederam a aplicação de *I. fumosorosea* ESALQ-1296. Da mesma forma, os maiores valores de mortalidade foram obtidos em 09/02/2015 e 26/01/2015 quando a umidade relativa do ar foi superior a 82% e a temperatura média foi próxima aos 25°C (Figuras 20 B e C). Esses resultados coincidem com os obtidos nos experimentos em laboratório no item 3.2.2, onde foi demonstrado que a umidade relativa do ar pode influenciar diretamente na eficiência de controle de *D. citri*. Além disso, Ausique (2014) demonstrou que a mortalidade dos adultos de *D. citri* e a esporulação do fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foram correlacionadas com o aumento na umidade relativa do ar e precipitações.

No pomar com produção convencional localizado na Fazenda São Carlos a mortalidade média dos adultos de *D. citri* no tratamento controle variou de $4,8 \pm 2,7\%$ (07/11/2014) a $30,5 \pm 6,9\%$ (05/09/2014), no tratamento com *I. fumosorosea* foi de $74,5 \pm 13,3\%$ (05/09/2014) a $86,8 \pm 4,6\%$ (01/12/2014) e no tratamento com o inseticida químico de $47,8 \pm 13,4\%$ (05/09/2014) a $94,2 \pm 1,9\%$ (07/11/2014) (Figura 21). A única pulverização que não resultou em diferenças estatísticas entre os tratamentos foi realizada em 05/09/2014 ($F_{1,6}=30,8421$ $P=0,1542$), com valores de mortalidade de $30,5 \pm 6,9\%$ no tratamento controle, de $74,5 \pm 13,3\%$ no tratamento fungo *I. fumosorosea* e de $47,8 \pm 13,4\%$ no tratamento com inseticida químico. Em 07/11/2014 foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($F_{1,6}=40,40$, $P<0,001$) sendo as mortalidades do controle químico superior as do fungo. Em 01/12/2014, estes dois tratamentos não diferiram significativamente, mas foram superiores ao controle ($F_{1,6}=40,40$, $P<0,001$ e $F_{1,6}=50,64$, $P<0,001$).

Nas três aplicações, o controle pelo fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 diferiu do químico em apenas uma ocasião. Da mesma forma, Ausique (2014) relatou que as aplicações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ foram capazes de causar mortalidades de adultos de *D. citri* semelhantes às aplicações de inseticidas químicos em plantas de citros no sistema de produção convencional.

Figura 20. Aplicações de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ no pomar comercial com produção orgânica localizado na Fazenda da Toca - Itirapina-SP. A- Porcentagem de mortalidade ($\pm$ EP) de adultos de *Diaphorina citri* que receberam a aplicação do fungo *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 ou sem aplicação (controle). B- Média de umidade relativa do ar $\pm$ desvio padrão. C- Média da temperatura $\pm$ desvio padrão. Tratamentos com letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Figura 21. Aplicações de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ e de inseticidas químicos no pomar comercial com produção convencional localizado na Fazenda São Carlos- Nova Europa-SP. A- Porcentagem de mortalidade ($\pm$ EP) de adultos de *Diaphorina citri* que receberam a aplicação do fungo *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296, inseticida químico ou sem aplicação (controle). B- Média de umidade relativa do ar $\pm$ desvio padrão. C- Média da temperatura $\pm$ desvio padrão. Tratamentos com letras diferentes apresentam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

5.3.3 Monitoramento das populações de espécies pragas e inimigos naturais na área orgânica (Fazenda da Toca)

5.3.3.1 Monitoramento da população de pragas

As aplicações de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 reduziram a população de *Diaphorina citri* e *Brevipalpus* spp. no período de 02/05/2014 a 16/07/2015 (Figura 22 e 24). No entanto, não reduziu a população de cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa*, moscas das frutas (Figuras 26 e 27, respectivamente). As populações de *Phyllocoptruta oleivora* e dos ácaros tetraniquídeos foram baixas nas parcelas avaliadas, portanto, não puderam ser analisados estatisticamente.

O aumento na população de adultos de *D. citri* na área experimental iniciou na primeira quinzena de outubro de 2014, sendo identificadas através de armadilhas adesivas amarelas. Na segunda quinzena de outubro de 2014 foram observadas as primeiras chuvas na área experimental, o que favoreceu o crescimento das brotações de citros, e o aumento da oviposição dos adultos de *D. citri*. A partir disso, no fim de novembro, foi observado o primeiro pico populacional de ninfas + adultos de *D. citri* nas amostragens diretas em brotações. Após esse período, um número maior de brotações foi surgindo, que favoreceu o aumento da população de *D. citri* na área. Os picos populacionais de *D. citri* ocorreram entre novembro de 2014 e abril de 2015, período de maior fluxo vegetativo das plantas (Figura 22). Resultados semelhantes foram obtidos por Yamamoto, Paiva e Gravena (2001) para região norte de São Paulo, Beloti et al. (2013) para Taquaritinga-SP e por Santos (2013) para Boa Esperança do Sul-SP e Iaras-SP para populações de *D. citri* em fazenda com sistema convencional.

As populações de ninfas + adultos de *D. citri* nas amostragens direta em brotações ($F_{1;2} = 40,35$, $P < 0,001$) e de adultos de *D. citri* nas armadilhas adesivas amarelas ($F_{1;2} = 42,86$, $P < 0,001$) no tratamento controle foram superiores à do tratamento *I. fumosorosea* ESALQ-1296, indicando que o entomopatógeno foi capaz de reduzir a população de *D. citri* (Figura 22 A e B). O tratamento controle apresentou uma população 10 vezes maior em relação à área tratada com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em amostragem direta (Figura 22 B).

A diferença na flutuação populacional de *D. citri* entre os tratamentos foi maior na amostragem direta das brotações (Figura 22 B) do que nas amostragens por armadilhas adesivas (Figura 22 A). O valor médio de ninfas + adultos de *D. citri* quantificados em

amostragens diretas nas parcelas controle foi de $1007,0 \pm 15,1$ indivíduos/parcela ou $3,9 \pm 0,5$ indivíduos/brotação (total de 3.021 insetos quantificados). Entretanto, nas parcelas tratadas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296, o valor médio de ninfas + adultos de *D. citri* foi de $164,0 \pm 38,6$ indivíduos/parcela ou $0,6 \pm 0,1$ indivíduos/brotação (total de 492 insetos quantificados). Portanto, a população de *D. citri* amostrada nas parcelas controle foi 514,0% superior às populações nas parcelas tratadas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296. Já o número médio de adultos de *D. citri* capturados por armadilhas adesivas amarelas nas parcelas controle foi de $269,3 \pm 37,2$ adultos/parcela ou $44,9 \pm 6,2$ adultos/armadilha (total de 808 adultos capturados), uma população 49,7% superior à encontrada nas parcelas tratadas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296, que foi de $135,3 \pm 17,5$ adultos/parcela ou $22,5 \pm 2,9$ adultos/armadilha (total de 406 adultos capturados). Estes resultados sugerem que embora o controle com o fungo tenha sido eficiente a constante migração de insetos adultos para as áreas tratadas resultaram em menores diferenças entre os tratamentos. Já nas amostragens direta nas brotações onde a maioria dos insetos estavam na fase de ninfa as diferenças foram expressivas.

A diferença na captura de adultos de *D. citri* por armadilhas adesivas amarelas pode ter sido influenciada pela migração dos adultos provenientes das áreas vizinhas. Segundo Boina et al. (2009) os adultos de *D. citri* são capazes de dispersarem 100 metros em 3 dias, fator que pode ter interferido nas amostragens por armadilhas adesivas amarelas. A disposição das armadilhas adesivas nas parcelas foi a uma distância de aproximadamente 100 metros da área vizinha. Na área vizinha do talhão do experimento foram fixadas seis armadilhas na bordadura do talhão com o objetivo de observar a população dos adultos de *D. citri* no entorno da área experimental. Verificou-se que a média da população de adultos nessa área foi oito vezes maior à encontrada na área do tratamento com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 e quatro vezes maior a área controle. Portanto, a migração da população de *D. citri* das áreas vizinhas provavelmente influenciou na população de adultos de *D. citri* das parcelas experimentais.

As repetições 1 e 3 do controle (CR1 e CR3) apresentaram maiores médias acumuladas de adultos de *D. citri* em relação a CR2. Estas duas parcelas estavam localizadas mais próximas a áreas vizinhas de citros não pulverizadas, sendo que CR2 estava localizada dentro da área experimental (Figura 23 A). Além disso, observa-se que CR2 estava localizada entre duas parcelas tratadas com *I. fumosorosea* (FR1 e FR2) (Figura 17), o que sugere que as parcelas tratadas com fungo possam ter servido de barreira para a dispersão dos adultos de *D. citri* dentro da área. A parcela 1 tratada com *I. fumosorosea* (FR1) também apresentou uma

maior média acumulada de insetos capturados nas armadilhas adesivas em comparação a parcela 2 do fungo (FR2). Isso indica que o entomopatógeno foi suficiente para baixar a população da praga nas parcelas tratadas, porém, os insetos de *D. citri* das parcelas controle podem ter dispersado para as parcelas tratadas, o que pode ter aumentado a captura de adultos nessas parcelas.

Figura 22. Flutuação populacional média por parcela de adultos de *Diaphorina citri* coletados em seis armadilhas adesivas amarelas (A) e ninfas e adultos de *Diaphorina citri* em amostragem direta de 10 plantas (B) que receberam a aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) (x) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ e controle (●) no período de 02/05/2014 à 16/07/2015

Comparando as populações obtidas nas amostragens por armadilhas, apenas adultos (Figura 23 A) e amostragem direta, maioria de ninfas de *D. citri* (Figura 23 B) verificou-se uma menor variação nas amostragens diretas em comparação as amostragens por armadilhas. O que sugerem que a migração de adultos de *D. citri* das áreas vizinhas e a dispersão dos adultos das parcelas controle influenciaram nos resultados obtidos pelo fungo entomopatogênico. Na figura 23 B observa-se que o fungo foi eficiente em suprimir as populações de ninfas (contagens diretas) apresentando apenas incremento em duas ocasiões.

Figura 23. Média acumulada de adultos de *Diaphorina citri* por armadilha coletados em armadilhas adesivas amarelas (A) e média de ninfas e adultos de *Diaphorina citri* por planta em amostragem direta (B) que receberam a aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ (F) e controle (C) e suas repetições (R1, R2, R3) no período de 02/05/2014 à 16/07/2015

Para *Brevipalpus* spp. o pico populacional foi observado entre julho e novembro de 2014 com pico em outubro, assemelhando aos resultados do monitoramento realizado por Czermainski et al. (2007), onde a densidade populacional de ácaros da leprose em citros foi maior entre outubro e dezembro. A população do ácaro-praga *Brevipalpus* spp. foi significativamente diferente nas parcelas com aplicação de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em relação às parcelas controle ($F_{1;2}=29,01$, $P<0,001$) (Figura 24). Essa diferença foi bem nítida, observando um pico populacional dos ácaros da leprose nas parcelas controle e praticamente ausente nas parcelas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296. Tais resultados refletiram diretamente na sintomatologia do vírus da leprose nas árvores de citros, observando na área controle um maior número de plantas doentes em comparação com a área tratada com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 (Figura 25).

Além do efeito do entomopatógeno, outro fator que pode ter influenciado a densidade populacional de *Brevipalpus* spp. na área foi a ocorrência de chuvas. Segundo as observações realizadas por Pedro Neto et al. (2009), as chuvas ou precipitação pluviométrica afetam diretamente a população de *Brevipalpus phoenicis* em café. Nossos resultados demonstraram uma redução na população de *Brevipalpus* spp. a partir da segunda quinzena de dezembro de 2014, que coincidiu com a época chuvosa (Figura 24).

No tratamento controle, o número médio de ácaros da leprose foi de $233,0 \pm 47,6$ ácaros/parcela ou $0,9 \pm 0,2$ ácaros/cm²/planta (total de 699 ácaros), entretanto, no tratamento com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foi de $73,7 \pm 8,9$ ácaros da leprose/parcela ou $0,3 \pm 0,03$ ácaros/cm²/planta (total de 221 ácaros), assim a população de *Brevipalpus* spp. foi 216,3% superior à encontrada nas parcelas tratadas com o fungo.

Figura 24. Flutuação populacional média de *Brevipalpus* spp. por parcela em amostragem direta de 10 plantas que receberam a aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) (x) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ e controle(●) no período de 02/05/2014 a 16/07/2015

Figura 25. Sintomas de leprose na área tratada com *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 (A) e na área controle (B e C)

Ao contrário do que aconteceu com a população de *D. citri* e *Brevipalpus* spp., as aplicações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 não foram eficazes na redução da população de cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* e moscas das frutas (Figuras 26 e 27).

Os picos populacionais de cigarrinhas ocorreram entre os meses de setembro de 2014 e fevereiro de 2015, período com maior número de brotações (fluxo vegetativo) (Figura 26). Consoni (2011) também observou maiores populações de cigarrinhas nos períodos com maior fluxo vegetativo.

Nas amostragens por armadilhas, os valores médios de adultos de cigarrinhas coletados nas parcelas controle foram de $329,3 \pm 68,3$ adultos/parcela ou $54,9 \pm 11,4$ adultos/armadilha (total de 988 adultos capturados), sendo semelhante aos obtidos nas parcelas tratadas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296, que foram de $359,3 \pm 22,9$ adultos/parcela ou $59,9 \pm 3,8$ adultos/armadilha (total de 1.078 adultos capturados) ($F_{1;2}=0,07$, $P=0,794$).

Há de se considerar que cigarrinhas apresentam uma grande capacidade de dispersão em campo, e o que pode ter acontecido é que a mortalidade nas parcelas com aplicação do fungo tenha sido superada pela dispersão e migração das parcelas controle e das áreas vizinhas (matas). Segundo Milanez et al. (2002), as cigarrinhas vetoras de *X. fastidiosa* desenvolvem-se em plantas alternativas ao redor da área de citros e na fase adulta vão para as plantas cítricas só para se alimentar. Essa característica também foi observada por Consoni (2011) quando as aplicações de inseticidas químicos foram realizadas para o controle de cigarrinhas no município de Motuca-SP entre o período de 2006 a 2011.

Para as moscas das frutas, o aumento populacional ocorreu no período entre julho e outubro de 2014, que coincide com o período de frutos maduros nas plantas de citros (Figura 27). O número médio de moscas das frutas encontradas nas parcelas controle foi de $209,7 \pm 37,6$ adultos/parcela ou $34,8 \pm 6,3$ adultos/armadilha (total de 629 capturadas), sendo semelhante à população encontrada nas parcelas com *I. fumosorosea*, as quais apresentaram médias de $195,3 \pm 18,3$ adultos/parcela ou $32,5 \pm 3,0$ adultos/armadilha (total de 586 adultos capturados) ($F_{1;2}=0,10$, $P=0,753$).

O estudo realizado nesta tese corresponde ao primeiro relato da eficiência do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre as populações naturais de *D. citri* e outras pragas em citros, apresentando elevado potencial no controle de *D. citri* e o ácaro *Brevipalpus* spp.

Figura 26. Flutuação populacional média de cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* coletadas por parcela em amostragem de seis armadilhas adesivas amarelas que receberam a aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) (x) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ e controle (●) no período de 02/05/2014 a 16/07/2015

Figura 27. Flutuação populacional média de moscas das frutas coletadas por parcela em amostragem de seis armadilhas adesivas amarelas que receberam a aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) (x) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ e controle (●) no período de 02/05/2014 a 16/07/2015

5.3.3.2 Monitoramento da população de inimigos naturais

As aplicações de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 não afetaram a população natural de crisopídeos, hemerobiídeos e joaninhas (Figura 28, 29 e 30), sugerindo que o entomopatógeno pode ser seletivo para esses grupos de inimigos naturais.

A flutuação populacional de crisopídeos não apresentou diferença estatística entre os tratamentos ($F_{1;2}=3,74$, $P=0,055$). Observou-se nas primeiras datas de amostragens, entre o período de maio a agosto de 2014 (Figura 28) populações maiores no controle do que no tratamento *I. fumosorosea*. Essa diferença já foi observada na primeira avaliação ainda antes das pulverizações o que indica que já haviam diferenças entre as populações já no início do experimento. Nas amostragens diretas, foi monitorado a presença de ovos, larvas, pupas e adultos de crisopídeos obtendo valores médios de $595,7 \pm 31,9$ indivíduos/parcela ou $2,3 \pm 0,1$ indivíduos/planta (total de 1.787 indivíduos) nas parcelas controle, sendo semelhante aos valores obtidos nas parcelas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 que foram de $436,7 \pm 16,3$ indivíduos/parcela ou $1,7 \pm 0,1$ indivíduos/planta (total de 1.310 indivíduos). Nas amostragens por armadilhas adesivas amarelas foi observada uma população baixa de adultos de crisopídeos, portanto, esses dados não foram utilizados para as análises estatísticas.

De acordo com KONDO et al. (2015) existem 13 espécies de crisopídeos que foram encontradas se alimentando de *D. citri*, dentre elas: *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911), *Ceraeochrysa cubana* (Hagen, 1861), *Ceraeochrysa cincta* (Schneider, 1851), *Ceraeochrysa everes* Banks, 1920, *Ceraeochrysa valida* (Banks, 1895), *Chrysoperlla rufilabris* (Bumeister, 1839), *Chrysoperlla externa* (Hagen, 1861). No estado de São Paulo, a espécie mais abundante é *C. cincta*, que ocorre o ano todo. Essa espécie pode ser encontrada tanto em áreas com intensivo uso de produtos químicos quanto em áreas com manejo menos intensivo de defensivos (RUGNO, 2013). A área estudada apresenta um sistema de produção orgânica e, portanto, não são realizadas pulverizações de inseticidas químicos, o que pode ter favorecido ainda mais a população desse grupo de predadores. Resultados semelhantes foram observados para *C. externa* (Hagen, 1861) em áreas orgânicas de café (SILVA et al., 2006).

Nossos resultados demonstram que as aplicações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 não afetam as populações de crisopídeos, o que já foi demonstrado nos testes de seletividade de laboratório para a espécie *C. cincta* (capítulo 4).

A população de adultos de hemerobiídeo aumentou no período de maio a agosto de 2014 em ambos os tratamentos (Figura 29) e não foram observadas diferenças estatísticas no número de adultos capturados por armadilhas adesivas amarelas ($F_{1;2}=0,15$, $P=0,695$). Nas parcelas controle foi coletado um número médio de $26,0 \pm 2,1$ adultos/parcela ou $0,1 \pm 0,01$ adultos/planta (total de 78 adultos) e nas parcelas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 um número médio de $29,7 \pm 7,9$ adultos/parcela ou $0,1 \pm 0,03$ adultos/planta (total de 89 adultos).

A população de joaninhas nas amostragens diretas foi baixa e, portanto, não foi possível realizar a análise estatística. A população de adultos de joaninhas coletados em armadilhas adesivas amarelas apresentou um pico populacional entre janeiro e março de 2015 (Figura 30). Nas parcelas controle foi coletado um número médio de $187,7 \pm 38,9$ adultos/parcela ou $0,7 \pm 0,1$ adultos/planta (total de 563 adultos) e nas parcelas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 um valor médio de $155,0 \pm 8,9$ adultos/parcela (total de 465 adultos), não sendo observadas diferenças entre os tratamentos ($F_{1;2}=1,03$, $P=0,312$). O aumento populacional de joaninhas nas parcelas do controle e *I. fumosorosea* foi posterior ao surgimento das populações de pulgões. Esses pulgões provavelmente serviram de alimento para as joaninhas o que favoreceu o aumento populacional. Algumas espécies de joaninhas além de consumir pulgões apresentam também grande potencial no consumo de ninfas de *D. citri*, dentre elas *Curinus coeruleus* (Mulsant, 1850), *Cycloneda sanguinea* (L. 1763), *Chilocorus stigma* (Say, 1835) e *Hippodamia convergens* (Guérin-Ménéville, 1842) (GONZÁLEZ-CÁRDENAS et al., 2012) o que pode ter contribuído para o controle de campo.

A seletividade do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 sobre os grupos de predadores pode potencializar o controle de *D. citri* no campo, pois os inimigos naturais podem agir de forma conjunta como o entomopatógeno na redução populacional de *D. citri*. Portanto, as pulverizações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 podem ser integradas no manejo de pragas na cultura dos citros, sem causar impacto sobre a população de crisopídeos, hemerobiídeos e joaninhas.

Figura 28. Flutuação populacional média de ovos, larvas, pupas e adultos de crisopídeos por parcela em amostragem direta de 10 plantas que receberam a aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) (x) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ e controle (●) no período de 02/05/2014 a 16/07/2015

Figura 29. Flutuação populacional média de adultos de hemerobiídeos coletados por parcela em seis armadilhas adesivas amarelas que receberam a aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) (x) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ e controle (●) no período de 02/05/2014 a 16/07/2015

Figura 30. Flutuação populacional média de adultos de joaninhas coletados por parcela em seis armadilhas adesivas amarelas que receberam a aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) (x) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ e controle (●) no período de 02/05/2014 a 16/07/2015

5.3.4 Monitoramento das populações de espécies pragas e inimigos naturais na área convencional (Fazenda São Carlos)

5.3.4.1 Monitoramento da população de pragas

Durante todo o período do experimento não foi observada nenhuma ninfa ou adulto de *Diaphorina citri* nas amostragens diretas sobre brotações de citros, e foram coletados apenas dois adultos de *D. citri* nas armadilhas adesivas amarelas localizadas nas parcelas controle. Da mesma forma, as populações das espécies de moscas das frutas, cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa*, o ácaro da leprose (*Brevipapus* spp.) e os ácaros tetraniquídeos também foram muito baixas, portanto, não foi possível ajustar um modelo para análise dos dados.

A baixa população de pragas na área experimental deve-se à realização sistemática de pulverizações de inseticidas e acaricidas químicos em todos os pomares no entorno da área experimental, o que dificulta a entrada dos insetos e ácaros nas parcelas do experimento.

Por outro lado, o ácaro da falsa ferrugem *Phyllocoptruta oleivora* foi a única espécie que foi possível realizar as análises estatísticas dos dados ($F_{2,96} = 4,98$ $P=0,008$). As populações de *P. oleivora* nas parcelas controle e nas parcelas tratadas com inseticidas químicos foram semelhantes entre si ($SE=0,26$, $df=96$, $P=0,768$) e superiores as parcelas pulverizadas com o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 ($SE=0,27$, $df=96$, $P=0,011$) ($SE=0,26$, $df=96$, $P=0,0005$). A população de *P. oleivora* apresentou dois picos populacionais, sendo o primeiro no período de maio a julho de 2014 e o segundo de março a julho de 2015 (Figura 31). No período de agosto de 2014 a março de 2015 o número de ácaros de *P. oleivora* nas parcelas experimentais foi baixo.

Figura 31. Flutuação populacional de ácaros da falsa ferrugem *Phyllocoptruta oleivora* por parcela em amostragem direta de 10 plantas que receberam a aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%) (x) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹, inseticida químico (Químico) (□) e controle (●) no período de 04/03/2014 a 07/07/2015

Segundo Chiaradia (2001) os picos populacionais de ácaro da falsa ferrugem *P. oleivora* se concentram no período de fevereiro a maio, o que pode ser atribuído às condições climáticas e à variedade de citros. Os resultados aqui obtidos mostraram que a população de *P. oleivora* na Fazenda São Carlos se concentrou no período de março a julho, o que pode estar relacionado com a temperatura mensal e o crescimento vegetativo das plantas.

As populações médias de *P. oleivora* encontradas nas parcelas controle e nas parcelas com inseticida químico foram de $794,3 \pm 101,5$ ácaros/parcela ou $6,1 \pm 0,8$ ácaro/cm²/planta

(total de 2383 ácaros observados) e $1053,0 \pm 92,7$ ácaros/parcela ou $8,1 \pm 0,7$ ácaro/cm²/planta (total de 3160 ácaros observados), respectivamente. Nas parcelas com pulverização de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 foi observado um número médio de $896,0 \pm 78,6$ ácaros/parcela ou $6,9 \pm 0,6$ ácaro/cm²/planta (total de 2688 ácaros observados). (Figura 29). Portanto, as aplicações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 apresentaram um efeito negativo sobre a população de ácaro da falsa ferrugem *P. oleivora*.

5.3.4.2 Monitoramento da população de inimigos naturais

As populações de joaninhas e hemerobiídeos foram baixas nas áreas experimentais, não sendo possível a realização das análises estatísticas dos dados inflados de zeros. As baixas populações de joaninhas e hemerobiídeos podem ter sido provocadas pela baixa disponibilidade de alimento para os predadores, principalmente pela baixa presença de presas, tais como, pulgões e cochonilha.

O único grupo de predadores que apresentou uma população suficiente para as análises estatísticas foram os crisopídeos. Nas amostragens diretas foi observada a presença de ovos, larvas, pupas e adultos de crisopídeos nas plantas de citros, obtendo valores médios nas parcelas controle de $134,3 \pm 28,9$ indivíduos/parcela ou $1,0 \pm 0,2$ indivíduos/planta (total de 403 indivíduos). Nas parcelas pulverizadas com os inseticidas químicos apresentaram valores médios de $96,7 \pm 35,2$ indivíduos/parcela $0,7 \pm 0,3$ indivíduos/planta (total de 290 indivíduos) e nas parcelas pulverizadas com *I. fumosorosea* ESALQ-1296 os valores médios foram de $68,3 \pm 3,8$ indivíduos/parcela ou $0,5 \pm 0,02$ indivíduo/planta (total de 205 indivíduos). Assim, na modelagem da flutuação populacional dos crisopídeos não foi encontrada diferença entre os tratamentos ($F_{1:2}=1,87$, $P=0,160$), sendo a comparação do controle vs o fungo ($SE=0,24$, $df=84$, $P=0,060$), controle vs inseticida químico ($SE=0,23$, $df=84$, $P=0,226$) e fungo vs inseticida químico ($SE=0,24$, $df=84$, $P=0,484$). Portanto, a pulverização de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 para o controle de *D. citri* não afetaram a população natural de crisopídeos (Figura 32).

Figura 32. Flutuação populacional média de ovos, larvas, pupas e adultos de crisopídeos por parcela em amostragem direta de 10 plantas que receberam a aplicação de *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 + KBRAdj (0,075%)(x) na concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹, inseticida químico (Químico) (□) e controle (●) no período de 04/03/2014 a 07/07/2015

5.4 Conclusões

- O volume que resultou em maiores mortalidades de *Diaphorina citri* em pomares de citros foi de 60 mL.m⁻³ de área de copa;
- Na Fazenda da Toca com sistema de produção orgânica, foi observado que as aplicações do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 reduzam as populações de *Diaphorina citri* e *Brevipalpus* spp.;
- Na Fazenda São Carlos com sistema de produção convencional, foi observado que as aplicações do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 reduziram as populações de ácaro da falsa ferrugem *P. oleivora*;
- As aplicações do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 realizadas para o controle de *D. citri* não apresentaram efeitos negativos nas populações naturais dos predadores crisopídeos, joaninhas e hemerobiídeos.

Referências

ANTUNIASSI, U.R. Tecnologia de aplicação de defensivos. **Revista Platio Direto**, Pelotas, v. 15, p. 17-22, 2006.

- AUSIQUE, J.J.S. **Desenvolvimento de estratégias para incorporação de fungos entomopatogênicos no manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) na cultura dos citros**. 2014. 78p. Tese de (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- BELOTI, V.H.; RUGNO, G.R.; FELIPPE, M.R.; CARMO-UEHARA, A.D.; GARBIM, L.F.; GODOY, W.A.C.; YAMAMOTO, P.T. Population dynamics of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in orchards of ‘Valencia’ Orange, ‘Pokan’ mandarin and ‘murcott’ tangor trees. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 96, n. 1, p. 173-176, 2013.
- BOINA, D.R.; MEYER, W.L.; ONAGBOLA, E.O.; STELINSKI, L.L. Quantifying dispersion of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, n. 4, p. 1250-1258, 2009.
- BONADIMAN, R. **Pontas de pulverização e volumes de calda no controle de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 e *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) na cultura da soja *Glycine max***. 2008. Dissertação de (Mestrado em Engenharia Agrícola)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- CHIARADIA, L.A. Flutuação populacional do ácaro da falsa-ferrugem *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead, 1879) (Acari, Eriophyidae) em pomares de citros da região oeste catarinense. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 111-120, 2001.
- CONCESCHI, M.R. **Potencialidade dos fungos entomopatogênicos *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana* para o controle de pragas dos citros**. 2013. 104.p. Dissertação de (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- CONSONI, R. **Efeito da aplicação de inseticidas em plantas cítricas na população das cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada dos Citros, e do psíldeo vetor de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, agente causal do Huanglongbing, em pomares novos**. 2011. 58 p. Dissertação de (Mestrado em Fitossanidade) – Fundo de Defesa da Citricultura “Fundecitrus”, Araraquara, 2011.
- COSTA, M.A.G.; GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F.S; COSTA, E.C.; STORCH, G.; STEFANELLO JUNIOR, G.J. Eficácia de diferentes inseticidas e de volumes de calda no controle de *Spodoptera frugiperda* nas culturas do milho e sorgo cultivados em várzea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1234-1242, 2005.

- 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, p. 295-303, 2007.
- DEMÉTRIO, C.G.B.; HINDE, J.; MORAL, R.A. **Models for Overdispersed Data in Entomology**. In: Ecological Modelling Applied to Entomology, capítulo 9, v. 1, p. 219-259, 2014.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Tomada de decisão em laranjais pede cautela. In: _____. **AGRIANUAL 2013**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2013. p. 249-250.
- GONZÁLEZ-CÁRDENAS, J.C.; CASTELLANOS-STUREMARK, I.E.; FUCIKOVSKY-ZAC, L.J.; LÓPEZ-HERRERA, M.; SÁNCHEZ-ROJAS, G. Coccinélidos como potenciais enemigos naturales de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en un huerto de cítricos en Tuxpan, Veracruz. **Revista Científica UDO Agrícola**, Monagas, v. 12, n. 4, p. 855-860, 2012.
- KONDO, T.; GONZÁLEZ, G.F.; TAUBER, C.; SARMIENTO, Y.C.G.; MONDRAGON, A.F.V. A checklist of natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in the department of Valle del Cauca, Colombia and the world. **Insecta Mundi**, Gainesville, v. 0457, p.1-14, 2015.
- MILANEZ, J.M.; PARRA, J.R.P.; CUSTÓDIO, I.A.; MAGRI, D.C.; CERA, C. Biologia e exigências térmicas de três espécies de cigarrinhas vetoras da bactéria *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeiropolis, v. 23, p. 127-140, 2002.
- MOLINA, J.H.G. **Efeito do controle microbiano em insetos sugadores em três sistemas de manejo de pragas de citros**. 2007. 107 p. Tese de (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- MULLAH, M. A.S.; BENEDETTI, A. Effect of smoothing in generalized linear mixed models on the estimation of covariance parameters for longitudinal data. **The International Journal of Biostatistics**, p. 1-19, 2015.
- 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.
- PEDRO NETO, M.; REIS, P.R.; ZACARIAS, M.S. Influence of rainfall on mite distribution in organic and conventional coffee systems. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2009.

- R Development Core Team: versão 3.0.1 2013. Disponível em: <<http://r-development-core-team.software.informer.com>>. Acesso: 13 mar. 2015.
- RUGNO, G.R. **Seletividade de inseticidas utilizados na cultura dos citros ao predador *Ceraeochrysa cubana* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), desenvolvimento em diferentes temperaturas e diversidade de crisopídeos em propriedades com manejo intensivo e convencional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae).** 2013. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- RUGNO, G.R.; ZANARDI, O.Z.; YAMAMOTO, P.T. Are the pupae and eggs of the lacewing *Ceraeochrysa cubana* (Neuroptera: Chrysopidae) tolerant to insecticides?. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 108, p. 263-2639, 2015.
- RUPPERT, D.; WAND, M.P.; CARROL, R.J. Semiparametric regression (New York: Cambridge University Press), 2003, 382p.
- SANTOS, T.R. **Flutuação populacional e distribuição espacial de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) em propriedade citrícolas com manejo intensivo do huanglongbing.** 2013. 54 p. Dissertação de (Mestre em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista- UNESP, Jaboticabal, 2013.
- SAS Institute Inc. **The GLIMMIX Procedure (Experimental)** (Cary, NC: SAS Institute), 2016.
- SILVA, R.A.; REIS, P.A.; SOUZA, B.; CARVALHO, C.F.; CARVALHO, G.A. Flutuação populacional de adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) em cafeeiros conduzidos em sistemas orgânicos e converncional. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, Turrialba, n. 77, p. 44-49, 2006.
- VERBYLA, A.P.; CULLIS, B.R.; KENWARD, M.G.; WELHAM, S.J. The analysis of designed experiments and longitudinal data by using smoothing splines. **Applied Statistics**, Abingdon, v. 48, p. 269–311, 1999
- YAMAMOTO, P.T.; PAIVA, P.E.B.; GRAVENA, S. Flutuação populacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) em pomares de citros na região norte do estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 30, n. 1, p. 165-170, 2001.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta tese de doutorado contribuirão para o aperfeiçoamento do uso do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* ESALQ-1296 no manejo integrado de *Diaphorina citri* em pomares de citros. De acordo com os resultados é possível indicar que:

- Para melhorar a adesão e germinação dos conídios de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 no corpo de ninfas e adultos de *D. citri* é recomendado o uso do adjuvante KBRAdj 0,075% nas misturas fúngicas;
- Para aumentar a eficiência de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 no controle de *D. citri* é necessário usar lotes de conídios com alto vigor;
- Baixas umidades relativas do ar (<50%) e a exposição à radiação UV-B (> 2 horas) reduzem a eficiência de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 no controle de *D. citri*, mas as formulações com óleo de Girassol e KBRAdj 0,075% apresentaram melhor desempenho em períodos de baixa umidade em relação a aplicação com Tween. Mesmo assim, recomenda-se concentrar as pulverizações do fungo nos pomares de citros durante o final da tarde (após 16 horas) ou a noite em períodos de alta umidade;
- A pulverização dos fungicidas Kumus[®] DF, Kocide[®] WDG, Nativo[®], Flint[®] 500 WG no período de 24 horas antes ou após a pulverização de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 não influencia no desempenho do fungo no controle de *D. citri*;
- O fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* ESALQ-1296 nos adultos de *T. radiata* e nas larvas neonatas de *C. cincta* não apresentou efeitos negativos nestes inimigos naturais em condições de laboratório;
- As pulverizações do fungo *I. fumosorosea* ESALQ-1296 em pomares de citros reduzem a população natural de *D. citri* e, também, as populações do ácaro da leprose, *Brevipalpus* spp., e do ácaro da falsa ferrugem, *P. oleivora*, indicando que o fungo é eficiente para o controle das principais pragas da citricultura brasileira;
- As pulverizações de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 não afetam a população natural dos predadores crisopídeos, joaninhas e hemerobiídeos, presentes nos pomares de citros.

Dessa forma, concluiu-se que *I. fumosorosea* ESALQ-1296 é uma ótima alternativa para o controle de *D. citri*, e pode auxiliar no controle dos ácaros *Brevipalpus* spp. e *P. oleivora*, sem apresentar efeitos negativos nos inimigos naturais. Portanto, a integração deste entomopatógeno no manejo integrado de pragas em pomares comerciais de citros representa uma estratégia sustentável para minimizar as aplicações de inseticidas e acaricidas químicos,

reduzir o desenvolvimento de resistência a inseticidas e, conseqüentemente, diminuir os impactos no agroecossistema.

O potencial de *I. fumosorosea* ESALQ-1296 revelado nestes estudos foi a base para o desenvolvimento de um novo biopesticida com o nome comercial PUMA atualmente em fase de registro pela empresa Koppert Sistemas Biológicos LTDA no Brasil.