



**Bioecologia de pragas carpófagas da castanha e controlo
microbiológico de *Cydia splendana* (Lepidoptera, Tortricidae) e
Curculio elephas (Coleoptera, Curculionidae)**

Maria Eliza Cota e Souza

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária
de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em
Agroecologia*

Orientada por

Prof. Dr. Albino António Bento

Bragança, 2022

O trabalho que se apresenta teve o apoio financeiro do Projeto:

BioPest: Estratégias Integradas de Luta Contra Pragmas-chave em Espécies de Frutos Secos PDR2020-101-030960.

À minha família
Aos amigos e companheiros da Agroecologia

Agradecimentos

Deixo aqui minha sincera gratidão por todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Agradeço ao meu orientador, Professor Albino Bento, por me acolher como bolsista e por toda paciência, confiança e conhecimento compartilhado. Pelos ensinamentos diversos em agricultura, culinária, vinhos e política portuguesa. Em especial pela dedicação a este trabalho em todas as fases do processo, sou muito grata pela oportunidade.

Um sincero agradecimento a Isabel Rodrigues pela amizade, disponibilidade e pelo companheirismo em tempos de pandemia juntamente com Diogo e Luísa.

Aos colegas de Laboratório, Isabel, Diogo, Luísa, Ketrin, Laís, Marta, Marco, Susana, Maria Villa, Jacinto e todos que passaram, obrigada por me receber e compartilhar trabalho, conhecimento, cafés, jantares, risadas e lágrimas.

A Rosalina Marrão, que auxiliou no trabalho, dividiu saberes e me apresentou os sotos da região de Trás-os-Montes.

À Professora Eugênia Gouveia e Valentim Coelho pelos ensinamentos e pelo suporte.

À minha família pelo apoio durante todo o processo, em especial a meu pai Estevão, minha mãe Valdete e meus irmãos (Cassi, Jozi e Cléber), as sobrinhas (Vitória e Vívian) e ao primo Luiz.

À Sara Figueiredo pela amizade, dias e noites de estudo, e pelo apoio e incentivo sempre, principalmente durante o isolamento.

Gratidão, Melina, Rosamaria, Are, Luíza, Maria Gabriela, Beatriz, Tatiane, Alanna, Juliana, Danniele, Simony e tantas outras. Muito obrigada pelo incentivo nesta jornada.

Índice

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica	13
1.1. Introdução geral.....	13
1.2. Castanheiro (<i>Castanea sativa</i> (Mill.) e sua importância económica	14
1.2.1. Bichado-da-castanha, <i>Cydia splendana</i> (Hübner, 1799).....	17
1.2.2. <i>Cydia fagiglandana</i> (Zeller, 1841).....	21
1.2.3. Gorgulho, <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal, 1836).....	23
1.3. Índices de diversidade e diversidade funcional.....	25
1.4. Proteção integrada em castanheiro	27
1.5. Fungos entomopatogénicos	28
1.5.1. <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	30
1.6. Bibliografia	31
Capítulo 2 - Caracterização dos locais de estudo	39
2.1. Localização	39
2.2. Breve caracterização dos locais	39
Capítulo 3 - Monitorização das populações de <i>Cydia splendana</i> Hübner e <i>Cydia fagiglandana</i> Zeller (Lepidoptera, Tortricidae)	44
3.1. Introdução.....	46
3.2. Material e métodos	47
3.3. Resultados e discussão	48
3.3.1. Curva de voo de <i>Cydia splendana</i> (Hübner, 1799).....	48
3.3.2. Monitorização de ovos de <i>Cydia splendana</i> em folhas de <i>Castanea sativa</i> .	50
3.3.3. Curva de voo de <i>Cydia fagiglandana</i> (Zeller 1841).....	51
3.4. Conclusões	53
3.5. Bibliografia	53
Capítulo 4 - Efeito da manutenção do solo na diversidade funcional de artrópodes em castanheiros	57
4.1. Introdução.....	59
4.2. Material e métodos	60
4.2.1. Método de amostragem	60
4.2.2. Análise dos dados.....	61

4.3. Resultados e discussão	61
4.3.1. Riqueza, dominância e diversidade de artrópodes em castanheiros	62
4.3.2. Diversidade funcional.....	64
4.4. Conclusões	66
4.5. Bibliografia	66
Capítulo 5 – Eficiência de <i>Beauveria bassiana</i> (Deuteromycotina: Hypomycetes) no controlo microbiológico das pragas carpófagas <i>Cydia splendana</i> (Lepidoptera, Tortricidae) e <i>Curculio elephas</i> (Coleoptera, Curculionidae).....	69
5.1. Introdução.....	71
5.2. Materiais e métodos.....	72
5.2.1. Tratamentos	72
5.2.2. Preparação dos vasos.....	73
5.2.3. Instalação	73
5.2.4. Avaliação da mortalidade e contaminação das larvas.....	74
5.2.5. Análise molecular	75
5.2.6. Dados do clima	76
5.2.7. Análise dos dados.....	76
5.1. Resultados.....	77
5.1.1. Dados do clima	77
5.3.2. Mortalidade das larvas.....	78
5.3.3. Infeção das larvas com <i>Beauveria Bassiana</i>	79
5.3.4. Tempo letal médio LT50.....	80
5.3.5. Interação Inseto por tratamento em D100 e D220	82
5.3.5.1. Mortalidade das larvas.....	82
5.3.5.2. Larvas contaminadas.....	83
5.4. Discussão.....	84
5.4.1. Temperatura do solo durante o ensaio e biologia dos insetos.....	84
5.5. Conclusões	86
5.6. Bibliografia	87

Índice de figuras

Figura 1. Castanheiro, <i>Castanea sativa</i> (Mill.).	14
Figura 2. Mapa de distribuição do castanheiro europeu (<i>Castanea sativa</i>). Fonte: EUFORGEN, 2009.....	15
Figura 3. Evolução da área cultivada de castanheiro para fruto em diferentes países da Europa de 1999 a 2020. Fonte: FAOSTAT (2021).....	16
Figura 4. Área e a produção de castanha em Portugal Continental em 2020. Fonte: INE (2021).	16
Figura 5. Ovo de <i>Cydia splendana</i> (Hübner).	18
Figura 6. Larva de <i>Cydia splendana</i> (Hübner).	19
Figura 7. Adulto de <i>Cydia splendana</i> (Hübner).	19
Figura 8. Morfologia da <i>Cydia fagiglandana</i> (Zeller) – (A) adulto (B) larva.	22
Figura 9. Adulto de <i>Cydia fagiglandana</i> (Zeller). Fonte: GBIF (2022).	22
Figura 10. Adulto de <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal).	23
Figura 11. Larva de <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal) e o hibernáculo de terra onde hibernam.	24
Figura 12. Larva de <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal) na castanha.....	24
Figura 13. Mapa dos locais onde desenvolveu-se o estudo.	39
Figura 14. Souto de Espinhosela.	40
Figura 15. Souto de Fontes.....	40
Figura 16. Souto de Espinhoso.	41
Figura 17. Souto de Amendoeira.....	42
Figura 18. Souto de Samil.....	42
Figura 19. Armadilha do tipo delta com feromona sexual instalada em castanheiro...	47
Figura 20. Postura de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em folha de castanheiro (A); Folhas de castanheiros analisadas em lupa binocular (B); ovo viável de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) (C1); ovo eclodido de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) (C2); ovo predado de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) (C3).	48
Figura 21. Média e respetivo erro padrão de adultos de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) capturados em armadilha delta com feromona sexual, na região de Trás-os-Montes, em cinco pomares experimentais em 2020.	49

Figura 22. Número total de ovos de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) (viáveis, eclodidos e predados) observados em cinco soutos da Região de Trás-os-Montes em 2020. .	50
Figura 23. Média e respetivo erro padrão de adultos de <i>Cydia fagiglandana</i> (Zeller) capturados em armadilha delta com feromona sexual, na região de Trás-os-Montes, em cinco pomares experimentais em 2020.	52
Figura 24. Recolha de artrópodes por meio da técnica das pancadas (A); Identificação dos artrópodes amostrados em lupa binocular (B)	61
Figura 25. Distribuição de abundância de artrópodes no souto com coberto vegetal (CCV).....	62
Figura 26. Distribuição de abundância de artrópodes no souto sem coberto vegetal (SCV)	63
Figura 27. Curvas de rarefação da comunidade de artrópodes coletadas em dois soutos em Trás-Os-Montes, Portugal. CCV - com coberto vegetal; SCV - sem coberto vegetal.....	63
Figura 28. Série de Hill mostrando as ordens 'q' de diversidade da comunidade de artrópodes capturados pela técnica das pancadas em dois soutos na região de Trás-Os-Montes, Portugal.	64
Figura 29. Esquema de montagem dos vasos utilizados no ensaio.....	73
Figura 30. Local onde foram enterrados os vasos do tratamento.....	74
Figura 31. Dados da temperatura do solo a superfície (TmnG1) e a 15 cm de profundidade (Tmn15) registados pela estação meteorológica da Escola Superior Agrária de Bragança.	77
Figura 32. Dados da humidade relativa do ar durante a condução do ensaio registados pela estação meteorológica da Escola Superior Agrária de Bragança.....	78
Figura 33. Regressão Probit do tempo letal médio (LT50) de lavas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) nos tratamentos T2 e T3.....	81
Figura 34. Regressão Probit do tempo letal médio (LT50) de lavas de <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal) nos tratamentos T2 e T3.....	81

Índice de Quadros

Quadro 1. Classificação taxonómica do castanheiro europeu.....	14
Quadro 2. Classificação taxonómica do bichado-da-castanha, <i>Cydia splendana</i> (Hübner).	17
Quadro 3. Classificação taxonómica da <i>Cydia fagiglandana</i> (Zeller).....	21
Quadro 4. Classificação taxonómica do <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal).	23
Quadro 5. Géneros de fungos entomopatogénicos e exemplos de insetos hospedeiros. Adaptado de Shah & Pell, 2003.....	28
Quadro 6. Abundância total (N) e média (\pm desvio padrão) dos diferentes grupos recolhidos ao longo do período de amostragem em soutos com e sem coberto vegetal. Trás-os-Montes, 2020.....	65
Quadro 7. Data de retirada dos vasos do solo e dias após o tratamento com <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	74
Quadro 8. Taxa de mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) e <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal) nos diferentes tratamentos.	79
Quadro 9. Taxa de contaminação de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) e <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal) nos diferentes tratamentos.....	80
Quadro 10. Taxa de mortalidade e interação inseto por tratamento em larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) e <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal) nos diferentes tratamentos.	83
Quadro 11. Taxa de contaminação e interação inseto por tratamento em larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) e <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal) nos diferentes tratamentos.	83



Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

1.1. Introdução geral

O presente trabalho teve por objetivo estudar os insetos carpófagos da castanha, *Cydia splendana* (Hübner), *Cydia fagiglandana* (Zeller) e *Curculio elephas* (Gyllenhal), considerados praga-chave da cultura em Portugal, bem como avaliar possíveis formas de controlo microbiológico destes insetos.

No capítulo 1 realizou-se uma revisão bibliográfica sobre os principais insetos carpófagos que atacam a castanha na região de Trás-os-Montes e são considerados praga-chave da cultura, nomeadamente, *C. splendana*, *C. fagiglandana* e *C. elephas*. Descreveu-se a sua biologia e ciclo de vida, bem como o conceito de índice de diversidade e como alguns grupos funcionais de artrópodes auxiliares promovem a limitação natural de pragas. Por fim, abordaram-se aspetos da proteção integrada em castanheiros com destaque para o controlo microbiológico realizado por fungos entomopatogénicos, entre eles *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.

No capítulo 2 conta a descrição os locais onde se realizou o estudo, com a localização e a caracterização dos cinco soutos onde se realizou a monitorização e a colheita das amostras.

A monitorização dos adultos de *C. splendana* e *C. fagiglandana* foi estudada no capítulo 3, para o qual foram utilizadas armadilhas tipo delta com feromonas sexuais específicas de cada espécie nos cinco soutos. Neste capítulo, estudou-se também o período de postura de *C. splendana* nas folhas dos castanheiros nesses sítios.

No capítulo 4 estudou-se a influência da manutenção do solo na riqueza, diversidade e abundância dos artrópodes recolhidos, assim como, nos grupos funcionais (predadores, parasitoides, fitófagos e indiferentes) através da técnica das pancadas em dois soutos, um com presença de coberto vegetal e outro mobilizado.

Por fim, o capítulo 5 traz o estudo conduzido em condições de campo para avaliar a eficiência de duas concentrações de conídios do fungo entomopatogénico *B. bassiana* sobre as taxas de mortalidade e contaminação de larvas de *C. splendana* e *C. elephas*.

1.2. Castanheiro, *Castanea sativa* (Mill.) e sua importância económica

A família Fagaceae apresenta-se na Europa e na Península Ibérica em três géneros: *Castanea* (castanheiros), *Quercus* (carvalhos) e *Fagus* (faias) (Aguiar, 2020). Das nove espécies do género *Castanea* apenas uma é autóctone da Europa, a *Castanea sativa* (Mill.) (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação taxonómica do castanheiro europeu.

Taxonomia do Castanheiro europeu	
Reino	Plantae
Divisão	Spermatophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Fagales
Família	Fagaceae
Gênero	<i>Castanea</i>
Espécie	<i>Castanea sativa</i>

O castanheiro (Figura 1) é uma árvore de grande porte (pode atingir os 30-35 m), caducifólia, com preferência por zonas montanhosas com solos frescos e bem drenados, temperatura média anual variando entre 8 e 15 °C, temperaturas médias mensais acima de 10 °C durante 6 meses e precipitação mínima entre 600 e 800 mm (Conedera *et al.* 2016). Pode ser cultivado com a finalidade de produção de madeira e/ou fruto.



Figura 1. Castanheiro, *Castanea sativa* (Mill.).

Em vários períodos o castanheiro assumiu papel relevante na sobrevivência das populações das regiões de montanha, sobretudo antes da chegada da batata-comum (*Solanum tuberosum* L.) (Abreu, 2007). Segundo Costa (2020), o interesse na castanha alargou a área de distribuição do castanheiro muito para além da área de distribuição primitiva. A distribuição atual abrange desde o sul da Europa, Inglaterra, Bélgica até a Ásia (Figura 2).

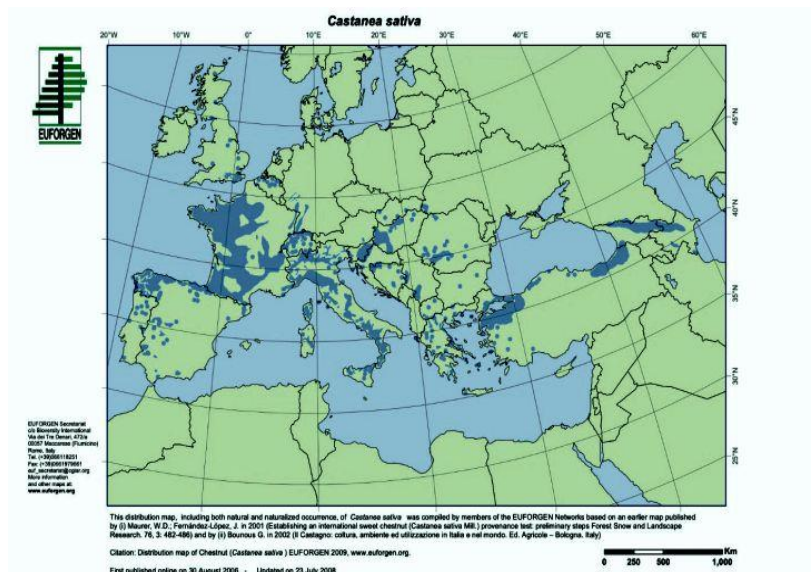


Figura 2. Mapa de distribuição do castanheiro europeu (*Castanea sativa*). Fonte: EUFORGEN, 2009.

Na Europa a maior parte da área de ocupação (90%) está concentrada, por ordem crescente, em França, Grécia, Itália, Espanha e Portugal (FAOSTAT, 2021). Em Portugal, a área de cultivo de castanheiro para fruto vem aumentando nas últimas décadas, passando de 29,011 ha em 1999 para 51,700 ha em 2020 (Figura 3). É hoje, a Europa, o país com a maior área de produção para essa finalidade (FAOSTAT, 2021).

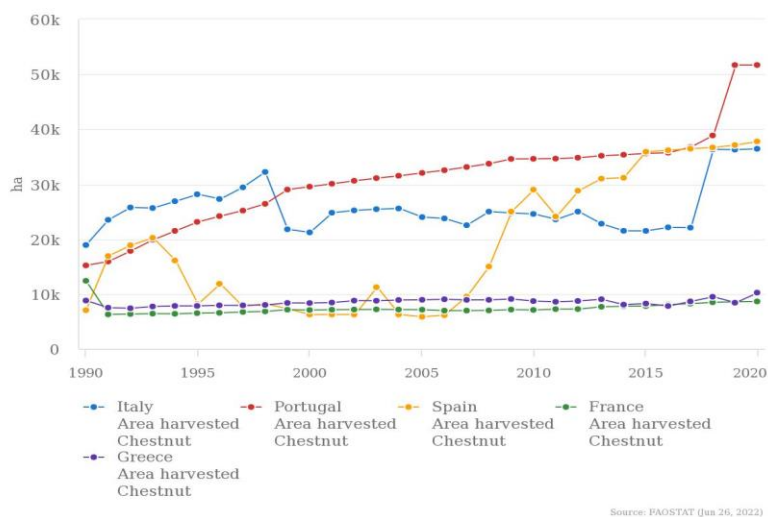


Figura 3. Evolução da área cultivada de castanheiro para fruto em diferentes países da Europa de 1999 a 2020. Fonte: FAOSTAT (2021).

Segundo Arrobas & Rodrigues (2020) o preço elevado a que a castanha tem vindo a ser vendida e a falta de alternativas de ocupação nos territórios originam uma paisagem salpicada com plantações jovens de castanheiro. As zonas montanhosas do norte concentram cerca de 88% da área em produção de castanha no país (Figura 4).

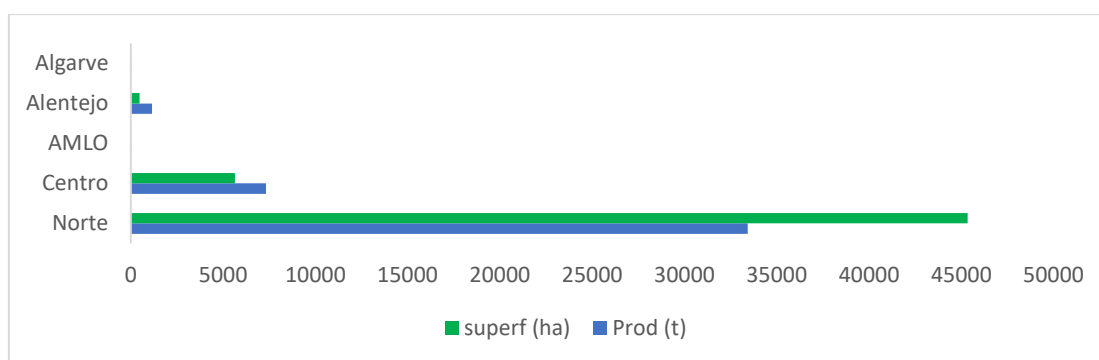


Figura 4. Área e a produção de castanha em Portugal Continental em 2020. Fonte: INE (2021).

Além do valor económico, o castanheiro destaca-se também pelo efeito multiplicador na ocupação do espaço rural e proteção da paisagem, na promoção da identidade dos territórios, da gastronomia, e fomento do turismo e indústria (Aguiar, 2020).

1.3. Principais inimigos que atacam o castanheiro

Introduzidas através do comércio global de produtos madeireiros e não-madeireiros, ou por dispersão natural, uma série de pragas e doenças invasivas desafiaram a *C. sativa* nos dois últimos séculos, incluindo a doença-da-tinta (*Phytophthora* spp.), o cancro-do-castanheiro (*Cryphonectria parasitica* (Murr. Barr.)) e, mais recentemente, a vespa-das-galhas-do-castanheiro (*Dryocosmus kuryphilus* (Yasumatsu)) (Conedera *et al.* 2016).

Na região transmontana, o bichado-da-castanha, provocado pelo complexo de pragas *Laspeyresia* (= *Cydia*) *splendana* (Hübner), *Cydia fagiglandana* (Zeller), *Pammene fasciana* L., e o gorgulho, *Curculio* (= *Balaninus*) *elephas* (Gyllenhal) são apontadas como as principais pragas dos soutos e que maiores estragos podem provocar no fruto, depreciando o seu valor comercial e causando perdas no rendimento aos agricultores e empresas de comercialização e transformação (Bento *et al.* 2007; Ruocco *et al.* 2016).

1.2.1. Bichado-da-castanha, *Cydia splendana* (Hübner, 1799)

Cydia splendana é uma Lepidoptera da família Tortricidae (Quadro 2), distribui-se por toda Europa e na região de Trás-os-Montes é a principal responsável pelos prejuízos nos frutos (Bento *et al.* 2007). São insetos carpófagos que possuem uma geração anual e atacam plantas do género *Castanea*, *Quercus*, *Fagus* e *Juglans* (Navarro, 2019).

Quadro 2. Classificação taxonómica do bichado-da-castanha, *Cydia splendana* (Hübner).

Taxonomia <i>C. splendana</i>	
Ordem	Lepidoptera
Subordem	Heteroneura
Divisão	Dytrisia
Superfamília	Tortricoidea
Família	Tortricidae
Tribo	Grapholitini
Género	<i>Cydia</i> Hübner, 1825
Espécie	<i>Cydia splendana</i> (Hübner, 1799)

Fonte: Bogenschütz (1991).

São holometábolos e durante seu ciclo de vida passam por quatro fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. *C. splendana* é uma espécie com uma geração por ano com período de voo dos adultos durante junho a julho na Europa Central ou julho a setembro no sul da Europa e Hungria (Conedera *et al.* 2016). Em trabalhos realizados por Bento *et al.* (2007) na região de Trás-os-Montes detetaram a presença de adultos entre início de julho e outubro, com os valores mais elevados em fins de agosto/início de setembro.

No estado larvar alimenta-se do fruto (castanha ou bolotas) provocando galerias no seu interior que causam a perda total de seu valor comercial e causam enormes prejuízos ao nível da produção e da qualidade, no caso da castanha.

Os ovos têm cerca de $0,7 \times 0,6$ mm e são esbranquiçados quando postos. Mais tarde, o embrião em desenvolvimento é visível como um anel vermelho-púrpura (Figura 5. Ovo de *Cydia splendana* (Hübner).Figura 5). São depositados principalmente junto às nervuras de folhas próximas aos ouriços jovens, não havendo lado preferencial da folha para postura (Bogenschütz, 1991). O período de incubação é de 10 a 15 dias, após a eclosão as larvas dirigem-se para os frutos, penetram nos ouriços e depois na castanha para se alimentar, permanecem no fruto até que estejam completamente desenvolvidas. Geralmente, desenvolvem os cinco estágios larvares dentro da mesma castanha, o que leva cerca de dois meses. No final do quinto estado larvar, o fruto tende a cair no chão prematuramente.

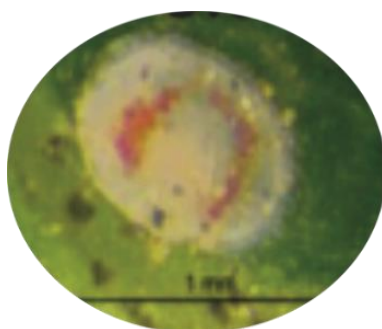


Figura 5. Ovo de *Cydia splendana* (Hübner).

As larvas têm até 15 mm de comprimento, de cor verde acinzentada a amarelada, translúcidas e com cabeça marrom-amarelada (Figura 6). A lagarta faz um buraco na

castanha, abandona o fruto e uma vez no solo enterra-se superficialmente formando um casulo (Mansilla *et al.* 2000; Navarro, 2019), no qual permanecem no inverno e primavera na fase de larva hibernante e mais tarde de pupa. O período de pupação demora cerca de oito a dezasseis dias, depois emerge como adulto já no verão seguinte (Bogenschütz, 1991).



Figura 6. Larva de *Cydia splendana* (Hübner).

Os adultos (Figura 7) têm hábitos noturnos. Os machos vivem de 10 a 12 dias, máximo 21 dias, as fêmeas um pouco menos (Romero, 2013) e depositam os ovos durante 4 a 5 dias, podendo ovipositar até 300 ovos (Pombo *et al.* 2018).



Figura 7. Adulto de *Cydia splendana* (Hübner).

Os prejuízos nas castanhas são causados pela alimentação das larvas, ficando perfuradas e perdendo valor comercial. Somado a isso, o interior destruído e cheio de excrementos, com frequência apresentam fungos (Pereira *et al.* 2018).

O bichado-da-castanha apresenta níveis populacionais variáveis de ano para ano e dentro do mesmo ano entre diferentes locais (p.e. Bento *et al.* 2007; González *et al.* 2007; Marrão *et al.* 2021). Os níveis populacionais do bichado-da-castanha são

influenciados pela variedade da castanha, as condições climáticas e as práticas culturais como a gestão do solo. A presença de hospedeiros alternativos para o bichado como seja a existência de outras espécies do género *Quercus*, presença de castanheiro para madeira ou castanheiro em que não se faz a apanha da castanha, bem como a presença de parasitoides e predadores também exercem influência nos níveis populacionais (Bento *et al.* 2007; Pombo *et al.* 2018).

A probabilidade de ataque de inimigos naturais varia conforme a fase de desenvolvimento da praga. Os ovos são muito sensíveis a predação e parasitismo, já que ficam expostos por um período de 10 a 15 dias na superfície das folhas. As larvas encontram-se no interior das castanhas ou no solo durante a maior parte do tempo e as pupas enterradas no solo, portanto, menos expostas à ação de predadores e parasitoides. A fase adulta é a mais exposta e tem uma longa duração, porém, apresentam elevada mobilidade (Pombo *et al.* 2018).

Existem alguns inimigos naturais de *C. splendana*, referidos na Europa, como os parasitoides: *Ascogaster* sp, *Itopectis maculator* (Fabrucius), *Bassus tumidulus* (Nees), *Bracon caudiger* (Nees), *Endromopoda detrita* (Holmgreen), *Glypta parvicaudata* (Bridgmanos), *Phanerotoma dentata* (Panzer) e *Microdus tumidulus* (Nees), *Trichogramma* sp., *Elachertus* sp. e os dípteros *Bessa selecta* (Meigen) e *Pseudoperichaeta nigrolineata* (Walker) (Meijerman & Ulemberg, 2000; Yu *et al.* 2004; Romero, 2013; Pombo *et al.* 2018).

Algumas medidas preventivas recomendadas passam pela mobilização superficial do solo durante a primavera com intuito de expor as pupas ao ataque de predadores; a recolha periódica de frutos atacados e sua destruição; e o armazenamento das castanhas em lugares cimentados, para evitar que as lagartas se enterrem no solo (Santos *et al.* 2019). Outra medida para impedir que as larvas se enterrem no solo é a colocação de rede de polietileno no solo (Mansilla *et al.* 2000).

A monitorização dos adultos faz-se com recurso a armadilhas delta com feromona sexual, no entanto, alguns autores como Aguin-Pombo *et al.* (2008) e Rotundo *et al.* (2010) relatam a baixa seletividade das feromonas sintéticas no mercado entre as diferentes espécies de *Cydia*.

O controlo químico é considerado difícil devido ao porte do castanheiro, à geografia dos soutos, geralmente em áreas montanhosas, ou áreas de proteção ambiental e à dificuldade de escolher o momento adequado à aplicação, que devem ser realizadas apenas no momento do nível mais alto da população e máxima incubação de ovos, mas antes que as larvas penetrem nos ouriços (Navarro, 2019). Além disso, o uso de produtos fitofármacos pode desenvolver resistência no inseto e contaminação dos cogumelos silvestres que apresentam grande importância associada à atividade. Atualmente, em Portugal, não existe nenhum produto químico homologado ou autorizado para combate ao bichado-da-castanha.

1.2.2. *Cydia fagiglandana* (Zeller, 1841)

Cydia fagiglandana é um lepidóptero da família Tortricidae do mesmo género da *C. splendana*, portanto, apresenta características muito similares. O

Quadro 3 descreve a sua taxonomia.

Quadro 3. Classificação taxonómica da *Cydia fagiglandana* (Zeller).

Taxonomia <i>Cydia fagiglandana</i> Zeller	
Ordem	Lepidoptera
Subordem	Heteroneura
Divisão	Dytrisia
Superfamília	Tortricoidea
Família	Tortricidae
Tribo	Grapholitini
Género	<i>Cydia</i> Hübner, 1825
Espécie	<i>Cydia fagiglandana</i> (Zeller)

Fonte: Bogenschütz (1991).

A área de distribuição compreende a toda a Europa até ao norte do Irão e Ásia central onde ataca frutos dos géneros *Castanea*, *Quercus*, *Fagus* e *Juglans* (Romero, 2013).

Os adultos têm um comprimento de 13 a 19 mm e as asas anteriores apresentam estrias em forma de “espinha de peixe”. As larvas, de cor rosada, passam por cinco estados de desenvolvimento (Figura 8).



Figura 8. Morfologia da *Cydia fagiglandana* (Zeller) - (A) adulto (B) larva.
Fonte: <http://lepidoptera.online/corsavy/en/cydia-fagiglandana-01.html>

Emergem em meados de julho, voam até finais de setembro, início de outubro (Figura 9). A postura decorre entre finais de julho e setembro nas folhas do castanheiro. As larvas desenvolvem-se dentro do fruto por cerca de 30 - 40 dias, no final do quinto estado de desenvolvimento abandonam as castanhas para hibernar no solo ou em fendas da casca do castanheiro, protegidas por um casulo. Entre finais de maio e finais de julho, dá-se a pupação (Serrano *et al.* 2001; Jimenez-Pino *et al.* 2011).



Figura 9. Adulto de *Cydia fagiglandana* (Zeller). Fonte: GBIF (2022).

A monitorização do adulto faz-se com uso de armadilhas delta com feromona sexual, distanciadas em 50 metros entre si. Os adultos são contados semanalmente e a feromona substituída mensalmente. Essa técnica permite conhecer a curva de voo do inseto e quando atingem o pico de capturas (Santos *et al.* 2019).

As medidas preventivas adotadas são as mesmas referidas para a *C. splendana*. Não existem meios de luta química homologados para essa espécie em Portugal.

1.2.3. Gorgulho, *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836)

O gorgulho-da-castanha é um besouro (Coleóptera) pertencente à família Curculionidae (Quadro 4) que ataca diversas folhosas, em particular o castanheiro e plantas do género *Quercus* como o carvalho e o sobreiro.

Quadro 4. Classificação taxonómica do *Curculio elephas* (Gyllenhal).

Taxonomia <i>Curculio elephas</i>	
Ordem	Coleoptera
Superfamília	Curculionoidea
Família	Curculionidae
Família	Curculionidae
Gênero	<i>Curculio</i> Linnaeus, 1758
Espécie	<i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal, 1836)

Fonte: GBIF (2022).

Distribui-se no sul da Europa, norte de África, centro e sul da França, Balcãs, Suíça e oeste da Alemanha (Romero, 2013). Possui uma geração por ano, todavia, parte das larvas pode apresentar uma diapausa prolongada que pode estender-se a dois, três ou quatro anos (Mansilla *et al.* 2000; Menu & Debouzie, 1993; Romero, 2013) dependendo das condições ambientais (Menu, 1993).

Os adultos medem entre 6 e 10 mm de longitude, têm forma oval, de cor amarelada e rostro comprido (Figura 10. Adulto de *Curculio elephas* (Gyllenhal).Figura 10). Aparecem entre os meses de agosto e setembro, alimentam-se por uma semana e realizam a postura de 2 ou 3 ovos dentro dos frutos. A fertilidade média é de 40 ovos/fêmea e o período de postura de cerca de 25 dias, iniciando-se 8 a 10 dias após o acasalamento (Mansilla *et al.* 2000; Romero, 2013; Soria *et al.* 1995).



Figura 10. Adulto de *Curculio elephas* (Gyllenhal).

Os ovos são de cor branca e medem entre 0,4 e 0,5 mm de longitude. As larvas são ápodas de cor branca e com forma arqueada (Figura 11). Apresenta 4 estados larvares e no final mede entre 7 e 12 mm de comprimento. As larvas de último instar constroem um habitáculo de terra comprimida onde hibernam.



Figura 11. Larva de *Curculio elephas* (Gyllenhal) e o hibernáculo de terra onde hibernam.

Os prejuízos causados por *C. elephas* decorrem da atividade da larva, que se alimenta da castanha durante o seu desenvolvimento (Soria *et al.* 1995) provocando a queda prematura e a perda de tamanho e peso dos frutos (Figura 12). Em 2018, na região de Trás-os-Montes, os estragos provocados por *C. elephas* foram variáveis, tendo-se registado valores entre 1% e 7% de castanhas atacadas (Santos *et al.* 2019).



Figura 12. Larva de *Curculio elephas* (Gyllenhal) na castanha.

A monitorização dessa espécie é complexa, assim como o seu controlo por inimigos naturais, uma vez, que grande parte de seu desenvolvimento é realizado no interior do fruto ou enterrados a bastante profundidade no solo e não existem feromonas para acompanhamento dos adultos. Romero (2013) faz referência a ocorrência do

parasitoide *Schizoprymnus longiseta* (Herrich-Schäffer) e à presença do fungo entomopatogénico *Beauveria bassiana*, infetando as larvas em Espanha.

As medidas preventivas e os meios de luta adotados são os mesmos referidos para a *C. splendana*.

1.3. Índices de diversidade e diversidade funcional

Os artrópodes benéficos fornecem uma ampla variedade de serviços ecossistémicos essenciais à vida humana (Schowalter *et al.* 2018). O controlo biológico de pragas, realizado por esses organismos é um importante serviço ecossistémico para as culturas (Tscharrntke *et al.* 2005) incluindo decomposição, polinização e controlo biológico que influenciam a sustentabilidade da produção agrícola (Isaacs *et al.* 2009), avaliado em mais de US\$ 400 bilhões por ano (Costanza *et al.* 1997), serviços essenciais para muitas culturas (Classen *et al.* 2014).

No entanto, o crescimento populacional e o crescente aumento da produção de alimentos vêm provocando a intensificação da exploração dos recursos naturais e causando cada vez mais modificações no ecossistema. O uso agrícola cobre cerca de 40% da superfície terrestre europeia, com valores até 70% em algumas áreas (Robinson *et al.* 2014). Essa expansão e mudança da produção agrícola com a prevalência de uso de agroquímicos e simplificação de paisagens resultam na diminuição da artropodofauna e à medida que os artrópodes diminuem, o mesmo acontece com os serviços que eles fornecem (Oliver *et al.* 2015; Tilman, 1999).

Para atender à crescente procura de produtos alimentares e as políticas nacionais e internacionais implementadas é necessário integrar um melhor uso de todos os recursos naturais com práticas agrícolas novas e sustentáveis (Barberi *et al.* 2010). Para isso, tem de se compreender como as mudanças agrícolas podem afetar a capacidade dos artrópodes benéficos fornecerem serviços ecossistémicos (Woodcock *et al.* 2019).

Uma das formas de compreender a organização e a estruturação das comunidades é o uso de índices de diversidade. Normalmente esses índices combinam dois atributos de uma comunidade: riqueza de espécies e equabilidade (também denominada

equitabilidade) (Hurlbert, 1971; Peet, 1974). Os padrões de distribuição de espécies em comunidades locais e o grau de equitabilidade ou dominância das espécies nessas comunidades podem ser descritos por modelos clássicos de distribuição da abundância de espécies (Melo, 2008). Em ambientes de agricultura, onde há bastante intervenção antrópica, o ajuste ao modelo do tipo Série Logarítmica é mais comum (Hill *et al.* 1995).

Embora a riqueza e diversidade de espécies sejam as medidas mais usadas em estudos de diversidade, esses índices falham em ligar atributos funcionais das espécies com alterações no ambiente (Eros *et al.* 2009). As características das espécies podem ser diferentes entre ambientes sob distintas condições de impacto, contudo, o número de espécies pode ser semelhante. Além disso, a diversidade funcional é mais sensível para detectar respostas das comunidades às alterações ambientais do que as tradicionais medidas de diversidade (Cianciaruso *et al.* 2009).

A diversidade funcional é cada vez mais utilizada como uma métrica para avaliar o impacto das estratégias de gestão e a influência da biodiversidade no funcionamento do ecossistema (Balvanera *et al.* 2006; Díaz *et al.* 2006; Laureto *et al.* 2015). Esta unidade de medida considera os organismos como “entidades dinâmicas que interagem com seu ambiente” (Calow, 1987).

As características funcionais podem ser definidas como características do organismo que influenciam a aptidão e o funcionamento dos ecossistemas (Cianciaruso *et al.* 2009; Petchey & Gaston, 2006; Swenson, 2014). Os chamados “grupos funcionais” são utilizados para designar grupos de animais explorando recursos semelhantes e visam classificar as espécies com respeito aos seus papéis nos processos ecossistêmicos e sua interação com outras espécies (Cummins, 1974). Focar em grupos funcionais permite comparações de áreas biogeográficas distintas mesmo que as comunidades de espécies sejam diferentes (Moretti *et al.* 2006).

Em castanheiros González *et al.* (2007), identificou que 70% das espécies encontradas da região de Zamora, Espanha, são besouros, himenópteros e lepidópteros. Em relação aos predadores, Lopes *et al.* (2018) ao investigar a fauna auxiliar associada ao castanheiro na ilha dos Açores identificou que são constituídos, essencialmente, por aranhas. Outras ordens importantes foram os Neurópteros e os Coleópteros. Ao todo,

23 espécies fitófagas foram consideradas como fazendo parte da entomofauna do castanheiro, com destaque para os tripses da família Thripidae e afídeos da família Aphididae que podem causar alguns estragos ao castanheiro. Outros sem interesse, mas representativos, como o grupo dos psocópteros também são citados.

1.4. Proteção integrada em castanheiro

O conceito de inseto-praga segundo Berti Filho & Macedo (2011), pode ser compreendido como aquele que causa prejuízo económico às áreas agrícolas, florestais, agropecuárias e urbanas, podendo ser vetor de doenças de plantas e animais.

A utilização da proteção integrada surgiu diante a carência de apropriada solução para os problemas de combate a essas pragas utilizando, exclusivamente, a luta química ou a luta biológica. Recomendou-se, então, a integração destes dois meios de luta e o uso da luta química somente quando inevitável e através do recurso a inseticidas com menor impacto ao ambiente e a valorização, o mais possível, ao tratamento biológico, nomeadamente, através do fomento da limitação natural (Stern *et al.* 1959).

Em terminologia portuguesa em Luta Biológica são designadas três modalidades: limitação natural; luta biológica clássica; e tratamento biológico. Na literatura americana é muito frequente designar estas três modalidades por *Conservation, Introduction e Augmentation* (Amaro, 2003).

Segundo Amaro (2002), a regulação das populações num ecossistema é um processo biológico que envolve inimigos naturais, os auxiliares, que reduzem a densidade das populações das presas ou dos hospedeiros abaixo de níveis que se manteriam na sua ausência. Num contexto económico, esta regulação deve ocorrer a valores de densidade populacional inferiores ao nível económico de ataque. Inimigos naturais como predadores, vespas e moscas parasitas, bem como, os patógenos têm sido estudados há muito tempo para exploração no controlo biológico (Shah & Pell, 2003).

Diversos métodos de controlo biológico fundamentados em organismos supressores naturais de pragas são tidos como alternativas, devido, principalmente, a preocupações com a saúde e o meio ambiente. Diversas abordagens e conceitos também foram

testados e as preparações comerciais baseadas em organismos estão aumentando constantemente, sobretudo com base em moléculas biocidas (DGAV, 2014).

Os bioinsecticidas são microrganismos patogénicos para insetos e abrangem: bactérias, vírus, fungos e nematodes (Amaro, 2003).

1.5. Fungos entomopatogénicos

Segundo Samson *et al.* (1988) os fungos entomopatogénicos encontram-se nas divisões Zygomycota, Ascomycota e Deuteromycota, Chytridiomycota e Oomycota, que agora são classificados dentro do reino de Straminipila (Quadro 5).

Quadro 5. Géneros de fungos entomopatogénicos e exemplos de insetos hospedeiros. Adaptado de: Shah & Pell, 2003.

Filo / Classe / Ordem	Género	Exemplo de insetos hospedeiros	Produtos comerciais
Oomycota	<i>Lagenidium</i>	Mosquitos	L. giganteum registado nos Estados Unidos da América.
Chytridiomycota	<i>Coelomomyces</i>	Mosquitos	
Zygomycota	<i>Conidiobolus, Entomophaga</i>	Pulgões, Moscas, Larvas	
Zygomycetes	<i>Entomophthora, Erynia, Neozygites, Pandora</i>		
Entomophthorales	<i>Zoophthora</i>		
Ascomycota	<i>Cordyceps, Hypocrella, Torribiella</i>	Cochonilhas, Borboletas e Mariposas, Besouros	
Deuteromycota	<i>Aschersonia, Beauveria</i>	Cochonilhas, Moscas Brancas, Pulgões	Diversos produtos à base de <i>B. bassiana</i> , <i>B. brongniartii</i> , <i>M. anisopliae</i> , <i>P. fumosoroseus</i> ou <i>V. lecanii</i>
Hyphomycetes	<i>Hirsutella, Metarhizium</i>	Gafanhotos, Borboletas e Mariposas, Besouros	
Moniliales	<i>Nomuraea, Paecilomyces, Tolypocladium, Verticillium</i>	Nomuraea, Paecilomyces, Tolypocladium, Verticillium	

São organismos capazes de regular a população natural de pragas, como insetos, carrapatos e ácaros (Butt *et al.* 2001) atuando normalmente, por contato. O esporo ou o conídio em contato com a cutícula do inseto, em condições favoráveis de temperatura e humidade, penetra através da cutícula, atingida a hemolinfa desenvolvem-se as hifas que colonizam todo o corpo do inseto, causando a sua morte (Amaro, 2003; Federici, 1999).

O uso de fungos entomopatogénicos para controlo biológico de insetos pode ser empregado nas três amplas estratégias de controlo biológico. A maioria das pesquisas tem como objetivo desenvolvê-los como agentes de controlo biológico inundativo, apesar do grande potencial para uso em estratégias clássicas de biocontrolo e conservação (Butt *et al.* 2001; Goettel *et al.* 2005; Vincent *et al.* 2007).

Segundo Gelernter & Lomer (2000), para qualquer agente de controlo microbiano ter sucesso, a eficácia técnica é essencial, mas é necessário ser combinada com pelo menos dois outros critérios entre os seguintes: eficácia prática (absorção fácil e barata), viabilidade comercial (lucratividade), sustentabilidade (controlo de longo prazo) e/ou benefício público (segurança). É essencial considerar cada caso individualmente, e comparações diretas com inseticidas químicos, geralmente, são inadequadas. Deve-se ter em conta, também, que é difícil utilizar as mesmas diretrizes que foram formuladas e empregues no uso de predadores e parasitoides no controlo biológico utilizando fungos entomopatogénicos (Shah & Pell, 2003), e que muitas estratégias de controlo biológico são utilizadas em conjunto com outros métodos convencionais e culturais em proteção integrada (Pell *et al.* 2001).

Os entomopatógenos fúngicos são particularmente afetados por fatores abióticos, como temperatura, humidade relativa e radiação solar (Inglis *et al.* 2001; Vidal *et al.* 2003). Por isso, apesar de haver mais de 100 anos de pesquisa na área da sua eficácia, a adoção comercial ainda é limitada, em parte, devido à suscetibilidade à luz ultravioleta (UV), baixa humidade e à ausência de análises de custo/benefício (Vega, 2018).

Dois espécies de fungos entomopatogénicos representaram a maior parte dos micoinseticidas disponíveis, *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, são utilizados para controlo de uma grande variedade de espécies de várias ordens e famílias de insetos (Faria & Wright, 2007) como as moscas-brancas, baratas, brocas do milho e do café, e gafanhotos, entre outros (Butt *et al.* 2001).

Ainda que algumas desvantagens possam ser indicadas para os inseticidas à base de fungos (velocidade de morte e custo), em comparação com os inseticidas convencionais (Lacey, 2017), eles também apresentam vantagens consideráveis. Não há relatos de aquisição de resistência por pragas de insetos à infecção por fungos entomopatogênicos (Shelton *et al.* 2014). Os isolados de fungos de uma determinada espécie de inseto tendem a ser mais virulento a essa espécie e pode apresentar uma gama de hospedeiros mais estreita (Goettel *et al.* 1995).

Outros benefícios incluem a segurança para mamíferos, alta persistência no ambiente, bem como a possibilidade de modificar, por meio de pesquisas biotecnológicas, a produção de enzimas e toxinas responsáveis pela infecção e mortalidade (Wan *et al.* 2003).

1.5.1. *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.

Beauveria bassiana ocorre naturalmente em mais de 700 espécies de hospedeiros (Inglis *et al.* 2001). Segundo Meyling & Eilenberg (2007), é provável que quase todos os principais táxons de insetos colhidos intensivamente sejam considerados hospedeiros naturais para *B. bassiana* em regiões temperadas.

Beauveria bassiana também possui potencial para se envolver em interações planta-fungo apresentando atividade endofítica. Além da ocorrência natural no tecido foliar do milho (*Zea mays* L.), *B. bassiana* exibiu atividade endofítica em cacau (*Theobroma cacao* L.), papoila (*Papaver somniferum* L.), café (*Coffea spp.*) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Bing & Lewis, 1993; Meyling & Eilenberg, 2007; Posada & Vega, 2005). Os fungos endofíticos são frequentemente considerados mutualistas defensores das plantas (Saikkonen *et al.* 2013) e a presença de *B. bassiana* no tecido interno da planta foi debatida como uma proteção adaptativa contra insetos herbívoros (Elliot *et al.* 2000; White *et al.* 2002).

Assim como outros fungos entomopatogênicos, a ação da *B. bassiana* é altamente influenciada por fatores ambientais: temperatura, humidade e radiação. Além disso, a disponibilidade de hospedeiros e o manejo cultural também afetam o seu crescimento e a sua capacidade de infecção. Por conseguinte, o solo é usualmente o local de

isolamento convencional para fungos entomopatogénicos hipocreados e várias espécies podem ser encontrados em habitats cultivados e/ou naturais (Hajek, 1997).

Beauveria bassiana apresenta uma temperatura ótima de crescimento de cerca de 23 - 28 °C, e um mínimo de 5 - 10 °C e máximo de 30 - 38 °C (Zimmermann, 2007). Além disso, o tempo letal médio (LT50) também depende da temperatura (Vestergaard *et al.* 1995). Quanto a humidade relativa, um mínimo de 95,5% é necessário para a germinação de esporos, a 25 °C, abaixo disso nenhuma germinação foi detetada por Fargues (1996). Quanto a radiação, Yao *et al.* (2010) observou que quando exposto a doses crescentes da radiação UV-B houve um decréscimo acentuado nas taxas de mortalidade para pulgão, *Myzus persicae* (Macchiati) infetados com *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Os fungos necessitam dos artrópodes para construir níveis populacionais de estágios infeciosos e esses hospedeiros são considerados como a principal fonte de matéria orgânica para o aumento da população de fungos.

Outros fatores como manejo do solo, densidade de infestantes, resíduos de cultura e abundância também podem influenciar os níveis de fungos entomopatogénicos (Jabbour & Barbercheck, 2009). Bing & Lewis (1993) analisaram unidades formadoras de colónias de *B. bassiana* em solos de cultivo de milho nos EUA e sob diferentes regimes de manejo. Os resultados foram muito variáveis entre os anos, mas foram aparentemente maiores em sistemas de plantação direta em comparação com sistemas sujeitos a mobilização do solo.

1.6. Bibliografia

Abreu, C. G. (2007). A origem e dispersão do castanheiro pelo mundo. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 15-21.

Aguiar, C. (2020). Sistemática, morfologia, fenologia e biologia da reprodução. *In* Manual boas práticas do castanheiro. Ed. Bento e Ribeiro, 2020.

Aguin-Pombo, D., Arraiol, A., Aguiar, A. F., Freitas, E., & Angeli, G. (2008). Large infestation of chestnut by *Cydia* moths in Madeira Island: monitorization of *Cydia splendana* populations with pheromone lures. *Acta Horticulturae*, 784, 175.

Amaro, P. (2002). Há quase 40 anos que se aguarda pela legislação da aplicação dos pesticidas. Até quando. *Vida Rural*, 1686, 24-26.

- Amaro, P. (2003). A proteção integrada (pp. 1-458). ISAPress.
- Arrobas, M., & Rodrigues, M. A. (2020). Agroecologia do castanheiro. *In* Manual boas práticas do castanheiro. Ed. Bento e Ribeiro, 2020.
- Balvanera, P., Pfisterer, A. B., Buchmann, N., He, J. S., Nakashizuka, T., Raffaelli, D., & Schmid, B. (2006). Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecology letters*, 9(10), 1146-1156.
- Barberi, P., Burgio, G., Dinelli, G., Moonen, A. C., Otto, S., Vazzana, C., & Zanin, G. (2010). Functional biodiversity in the agricultural landscape: relationships between weeds and arthropod fauna. *Weed Research*, 50(5), 388-401.
- Bento, A., Pereira, J. A., & Pereira, S. (2007). Pragas associadas à castanha em Trás-os-Montes: biologia e estragos. *In* II Congresso Ibérico do Castanheiro (pp. 254-258).
- Berti Filho, E., & Macedo, L. P. M. (2011). Fundamentos de controle biológico de insetos-praga. STERN, V. M., SMITH, R. F., BOSCH, R. e HAGEN, K. S. (1959). The integrated control concept. *Hilgardia*.
- Bing, L. A., & Lewis, L. C. (1993). Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 45(1-2), 147-156.
- Bogenschütz, H. (1991). Eurasian species in forestry. *In* Tortricid Pest (L.P.S. van der Geest y Evenhuis, H. H.; Eds.). Elsevier. Amsterdam. Cap. 7, 673-709.
- Butt, T. M., Jackson, C., & Magan, N. (2001). Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential. CABI.
- Calow, P. (1987). Towards a definition of functional ecology. *Functional Ecology*, 1(1), 57-61.
- Cianciaruso, M. V., Silva, I. A., & Batalha, M. A. (2009). Diversidades filogenética e funcional: novas abordagens para a Ecologia de comunidades. *Biota Neotropica*, 9, 93-103.
- Classen, A., Peters, M. K., Ferger, S. W., Helbig-Bonitz, M., Schmack, J. M., Maassen, G., ... & Steffan-Dewenter, I. (2014). Complementary ecosystem services provided by pest predators and pollinators increase quantity and quality of coffee yields. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1779), 20133148.
- Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., de Rigo, D., & Caudullo, G. (2016). *Castanea sativa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats.
- Costa, R. L. (2020). Castanheiro: uma cultura milenar e marcante nas regiões de montanha. Disponível em: <https://florestas.pt/conhecer/castanheiro-uma-cultura-milenar-e-marcante-nas-regioes-de-montanha>. Acedido em março de 2021.

Costanza, R., d'Arge, R., De Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., ... & Van Den Belt, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387(6630), 253-260.

Cummins, K. W. (1974). Structure and function of stream ecosystems. *BioScience*, 24(11), 631-641.

DGAV. (2014). Proteção Integrada das Culturas, conceitos e princípios. Direção Geral de Agricultura e Veterinária. Disponível em: http://geo.drapn.min-agricultura.pt/agri/archivos/publicaciones/1392826878_Prote%C3%A7%C3%A3o%20integrada%20das%20culturas_Volume%20I.pdf. Acedido em maio de 2021.

Díaz, S., Fargione, J., Chapin III, F. S., & Tilman, D. (2006). Biodiversity loss threatens human well-being. *PLoS biology*, 4(8), e277.

Elliot, S., Sabelis, M., Janssen, A., Van der Geest, L., Beerling, E., & Fransen, J. (2000). Can plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecology Letters*, 3, 228-235.

Eros, T., Heino, J., Schmera, D., & Rask, M. (2009). Characterising functional trait diversity and trait–environment relationships in fish assemblages of boreal lakes. *Freshwater Biology*, 54(8), 1788-1803.

EUFORGEN, European Forest Genetic Programme. Distribution map of chestnut (*Castanea sativa*) (2009). Disponível em: www.euforgen.org. Acedido em maio de 2021.

FAOSTAT. (2021). Crops. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acedido em abril de 2021.

Fargues, J., Goettel, M. S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L. A., ... & Rougier, M. (1996). Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia*, 135(3), 171-181.

Faria, M. R., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237-256.

Federici, B. A. (1999). A perspective on pathogens as biological control agents for insects pests. *In* Bellows, T. S. e Fisher, T. W. (Ed.) – *Handbook of biological control*: 517-548.

GBIF, Global Biodiversity Information Facility. Taxonomia do *Curculio elephas*. (2022). Disponível em: <https://www.gbif.org/species/123418846/verbatim>. Acedido em junho de 2022.

Gelernter, W. D., & Lomer, C. J. (2000). Success in biological control of above-ground insects by pathogens. *In* *Biological control: measures of success*, 297-322. Springer, Dordrecht.

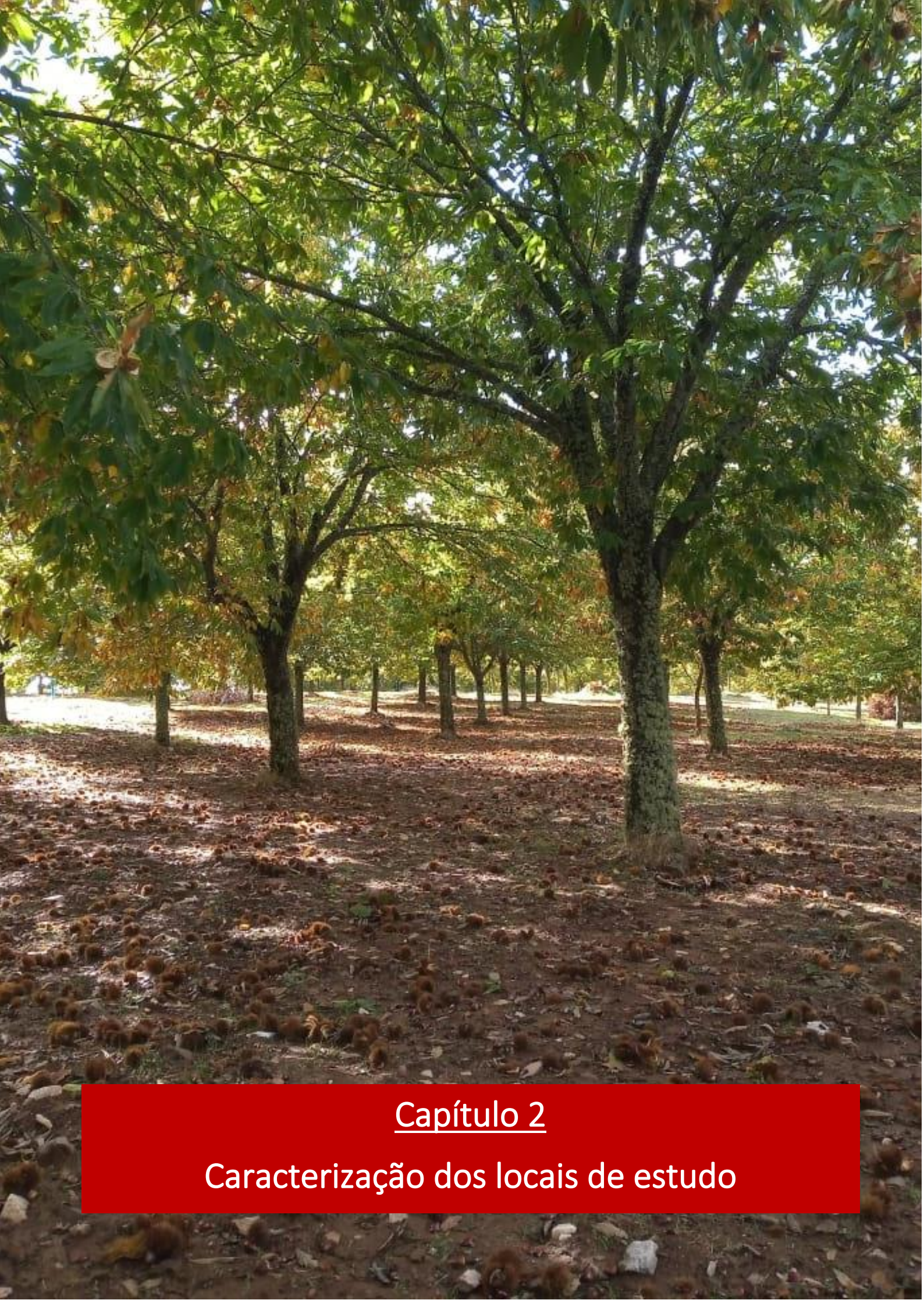
Goettel, M. S., Johnson, D. L., & Inglis, G. D. (1995). The role of fungi in the control of grasshoppers. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 71-75.

- Goettel, M. S., Eilenberg, J., & Glare, T. (2005). Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. *In* Gilbert, L., Iatrou, K., Gill, S. *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 6. Elsevier, Boston, 361-406.
- González, I. A., Sanz, A. P., Santiago, Y., & de la Iglesia, L. (2007). Seguimiento de un castañar en Trabazos (Zamora). *Tierras de Castilla y León: Agricultura*, (139), 94-98.
- Hajek, A. E. (1997). Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *In* *Advances in microbial ecology* (pp. 193-249). Springer, Boston, MA.
- Hill, J. K., Hamer, K. C., Lacey, L. A., & Banham, W. M. T. (1995). Effects of selective logging on tropical forest butterflies on Buru, Indonesia. *Journal of Applied Ecology*, 754-760.
- Hurlbert, S. H. (1971). The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, 52(4), 577-586.
- Instituto Nacional de Estatística, I.P (INE) (2021). *Estatísticas Agrícolas 2020*. Edição de 2021.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., & Butt, T. M. (2001). For Managing Insect Pests. Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential, 23.
- Isaacs, R., Tuell, J., Fiedler, A., Gardiner, M., & Landis, D. (2009). Maximizing arthropod-mediated ecosystem services in agricultural landscapes: the role of native plants. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(4), 196-203.
- Jabbour, R., & Barbercheck, M. E. (2009). Soil management effects on entomopathogenic fungi during the transition to organic agriculture in a feed grain rotation. *Biological Control*, 51(3), 435-443.
- Jimenez-Pino, A., Maistrello, L., Lopez-Martinez, M. A., Ocete-Rubio, M. E., & Soria-Iglesias, F. J. (2011). Spatial distribution of *Cydia fagiglandana* (Zeller) in an exploited holm oak (*Quercus ilex* L.) forest. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(2), 570-579.
- Lacey, L. A. (2017). Entomopathogens used as microbial control agents. *In* *Microbial control of insect and mite pests* (pp. 3-12). Academic Press.
- Laureto, L. M. O., Cianciaruso, M. V., & Samia, D. S. M. (2015). Functional diversity: an overview of its history and applicability. *Natureza & Conservação*, 13(2), 112-116.
- Lopes, D. H., Macedo, N., Figueiredo, A., Pimentel, R., Martins, J. T., Ventura, L. B., ... & Mexi, A. M. M. (2018). O castanheiro nos Açores. A cultura do castanheiro na Madeira: manual prático, 179-193.
- Mansilla, P., Pérez, R., Pintos, C., Salinero, C., & Iglesias, C. (2000). Plagas y enfermedades del castaño en Galicia. Xunta de Galicia. Consellería de Agricultura, Ganadería e Política Agroalimentaria. Pontevedra.
- Marrão, R., Lopes, E., & Bento, A. (2021). O bichado-da-castanha, *Cydia splendana* (Hübner) (Lepidoptera: Tortricidae) em Portugal. *Millenium*, 2(15), 97-107.

- Meijerman, L., & Ulenberg, S.A. (2000). Arthropods of economic importance. Eurasian Tortricidae, Version 1.0, CD-ROM. ETI, University of Amsterdam.
- Melo, A. S. (2008). What do we winn'confounding' species richness and evenness in a diversity index?. *Biota Neotropica*
- Menu, F. (1993). Strategies of emergence in the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia*, 96(3), 383-390.
- Menu, F., & Debouzie, D. (1993). Coin-flipping plasticity and prolonged diapause in insects: example of the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Oecologia*, 93(3), 367–373.
- Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological control*, 43(2), 145-155.
- Moretti, M., Duelli, P., & Obrist, M. K. (2006). Biodiversity and resilience of arthropod communities after fire disturbance in temperate forests. *Oecologia*, 149(2), 312-327.
- Navarro, C. M. I. (2019). Diversidad genética y resistencia del castaño a factores bióticos y abióticos.
- Oliver, T. H., Isaac, N. J., August, T. A., Woodcock, B. A., Roy, D. B., & Bullock, J. M. (2015). Declining resilience of ecosystem functions under biodiversity loss. *Nature communications*, 6(1), 1-8
- Peet, R.K. (1974). The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5, 285-307.
- Pell, J. K., Eilenberg, J., Hajek, A. E., & Steinkraus, D. C. (2001). Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, 390, 71-154.
- Pereira, J.A., Rodrigues, I., Lobo Santos, A., & Bento, A. (2018). Pragas-chave associadas ao castanheiro e amendoeira. Disponível em: <http://www.agrotec.pt/noticias/pragas-chave-associadas-ao-castanheiro-e-amendoeira/>. Acedido em maio de 2021.
- Petchey, O. L., & Gaston, K. J. (2006). Functional diversity: back to basics and looking forward. *Ecology letters*, 9(6), 741-758.
- Pombo, D. A., Angeli, G., Franquinho Aguiar, A. M., & Horta Lopes, D. (2018). Critérios para a gestão sustentada do bichado-da-castanha. Universidade da Madeira.
- Posada, F., & Vega, F. E. (2005). Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in Cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia*, 97(6), 1195-1200.

- Robinson, D. A., Fraser, I., Dominati, E. J., Davíðsdóttir, B., Jónsson, J. O. G., Jones, L., ... & Clothier, B. E. (2014). On the value of soil resources in the context of natural capital and ecosystem service delivery. *Soil Science Society of America Journal*, 78(3), 685-700.
- Romero, P. (2013). El control de los insectos carpófagos del castaño (*Castanea sativa*) en Andalucía mediante captura masiva con feromona sexual y evaluación de la actividad insecticida de hongos entomopatógenos.
- Rotundo, G., Cristofaro, A., Parillo, R., & Germinara, G. S. (2010). Monitoring of chestnut moths by intra-and interspecific semiochemicals. *In I European Congress on Chestnut-Castanea 2009*, 866 (pp. 435-441).
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Varlese, R., Aliberti, A., Carpenito, S., Woo, S.L., Scala, F., & Lorito, M., (2016). New tools to improve the shelf life of chestnut fruit during storage. *Acta Horticulturae*, 1144, 309-315 p.
- Saikkonen, K., Gundel, P. E., & Helander, M. (2013). Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 962-968.
- Samson, R. A., Evans, H. C., & Latge, J. P. (1988). *Atlas of entomopathogenic fungi* Springer. Verlag., Berlin, Heidelberg, New York, 1-187.
- Santos, A., Marrão, R., & Bento, A. (2019). Pragas. *In Manual boas práticas do castanheiro*. Ed. Bento e Ribeiro, 2020
- Schowalter, T. D., Noriega, J. A., & Tschardt, T. (2018). Insect effects on ecosystem services—Introduction. *Basic and Applied Ecology*, 26, 1-7.
- Serrano, J. F., Fernández P. J. S., Rodríguez, J. A. S., Gutiérrez, F. J. D. P., & Martínez, P. M. (2001). *El castaño. Manual y Guía Didáctica*. Autor-Editor.
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5), 413-423.
- Shelton, A. L., Henning, J. A., Schultz, P., & Clay, K. (2014). Effects of abundant white-tailed deer on vegetation, animals, mycorrhizal fungi, and soils. *Forest Ecology and Management*, 320, 39-49.
- Soria, J., Villagrán M., Del Tió R., & Ocete, E. (1995). Incidencia de *Curculio elephas* (Gyllenhal) (Col.: Curculionidae) en alcornoques y encinares del parque natural Sierra Norte de Sevilla. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 21, 195-201.
- Stern, V. M. R. F., Smith, R., van den Bosch, R., & Hagen, K. (1959). The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid: the integrated control concept. *Hilgardia*, 29(2), 81-101.
- Swenson, N. G. (2014). *Functional and phylogenetic ecology in R* (p. 212). New York: Springer.

- Tilman, D. (1999). Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 5995-6000.
- Tscharntke, T., Klein, A. M., Kruess, A., Steffan-Dewenter, I., & Thies, C. (2005). Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity–ecosystem service management. *Ecology Letters*, 8(8), 857-874.
- Vega, F. E. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*, 110(1), 4-30.
- Vestergaard, S., Gillespie, A. T., Butt, T. M., Schreiter, G., & Eilenberg, J. (1995). Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science and Technology*, 5(2), 185-192.
- Vidal, C., Fargues, J., Rougier, M., & Smits, N. (2003). Effect of air humidity on the infection potential of hyphomycetous fungi as mycoinsecticides for *Trialeurodes vaporariorum*. *Biocontrol Science and Technology*, 13(2), 183-198.
- Vincent, C., Andermatt, M., & Valéro, J. (2007). Madex® and VirosoftCP4®, viral biopesticides for codling moth control. *Biological Control: A Global Perspective*, eds. C. Vincent, M. S. Goethel, and G. Lazarovits, 336-343.
- Wan, J., Dai, W., Ren, Z., Chen, R., & Shi, Y. (2003). Study on isolation of pathogenic dematiaceous fungi from wild toads. *Chinese Journal of Dermatology*.
- White, J., Belanger, F., Meyer, W., Sullivan, R., Bischoff, J., & Lewis, E. (2002). Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes - development of symbiotic interactions with plants. *Symbiosis*, 33, 201-213.
- Woodcock, B. A., Garratt, M. P. D., Powney, G. D., Shaw, R. F., Osborne, J. L., Soroka, J., ... & Pywell, R. F. (2019). Meta-analysis reveals that pollinator functional diversity and abundance enhance crop pollination and yield. *Nature Communications*, 10(1), 1-10.
- Yao, S. L., Ying, S. H., Feng, M. G., & Hatting, J. L. (2010). In vitro and in vivo responses of fungal biocontrol agents to gradient doses of UV-B and UV-A irradiation. *BioControl*, 55(3), 413-422.
- Yu, D. S., Achterberg, K. van, & Horstman, K. (2004). *World Ichneumonidea. Taxonomy, biology, morphology and distribution*. Taxapad 2005, CD-ROM, Lexington, Kentucky.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553-596.



Capítulo 2

Caracterização dos locais de estudo



Figura 14. Souto de Espinhosela.

Este souto possui 0,5 hectares, inserido numa mancha contínua de castanheiro próximo ao Parque Natural do Montesinho em uma cota de 923 m de altitude (41°52'16.05"N, 6°49'19.12"W). Os castanheiros têm uma distribuição regular, com um compasso de 9 × 9 m, predominando a variedade longal.

Fontes

Situado no concelho de Bragança (41°53'58.70"N, 6°52'56.85"W) na cota de 905 m altitude, é um souto centenário, predominando a variedade judia, onde a manutenção do solo é feita recorrendo à mobilização do solo, uma a duas vezes no ano (primavera), com o objetivo de controlar a vegetação espontânea (Figura 15).



Figura 15. Souto de Fontes.

Este souto possui 1 hectare, os castanheiros apresentam uma distribuição irregular no terreno, isto é, não tem um compasso definido e encontra-se em volta a outros soutos e outras plantações agrícolas e árvores para madeira.

Espinhoso

Localiza-se no concelho de Vinhais (41°49'42.86"N, 7°05'7.54"W) a 839 m de altitude, é um souto jovem, com aproximadamente 12 anos. A manutenção do solo é feita recorrendo à mobilização do solo, uma a duas vezes no ano (primavera), com o objetivo de controlar a vegetação espontânea (Figura 16).



Figura 16. Souto de Espinhoso.

Este souto possui 2,70 hectares, os castanheiros têm uma distribuição regular, com um compasso de 9 × 9 m. Na área envolvente há castanheiros 'bravos' numa extremidade da parcela e encontra-se envolto em outros soutos e vegetação natural. Predomina a variedade judia.

Amendoeira

Souto localizado no concelho de Macedo de Cavaleiros (41°34'08.2"W, 6°58'45.8"N) numa cota de 722 m. Plantação com mais de 50 anos que possui coberto vegetal durante todo o ano e a manutenção do solo faz-se recorrendo ao corte da vegetação espontânea com recurso a um destroçador uma vez por ano, antes da colheita. Os castanheiros têm

uma distribuição regular, com um compasso de 9 × 9 m. Este souto possui 0,85 hectares, predominando a variedade longal e na área envolvente encontram-se outros soutos, outras culturas agrícolas, área urbana e área industrial (Figura 17).



Figura 17. Souto de Amendoeira.

Samil

Situado no concelho de Bragança (41°46'50.14"W, 6°45'52.97) em uma cota de 797 m de altitude, é um souto centenário, predominando a variedade longal, onde a manutenção do solo é feita recorrendo à mobilização do solo, uma a duas vezes no ano (primavera), com o objetivo de controlar a vegetação espontânea (Figura 18). Os castanheiros apresentam uma distribuição irregular no terreno, isto é, não tem um compasso definido e encontram-se em volta a outros soutos, áreas de castanheiro para madeira e da área urbana da cidade de Bragança.



Figura 18. Souto de Samil.

Capítulo 3

Monitorização das populações de *Cydia splendana* Hübner e *Cydia fagiglandana* Zeller



Capítulo 3 - Monitorização das populações de *Cydia splendana* Hübner e *Cydia fagiglandana* Zeller (Lepidoptera, Tortricidae)

Resumo

O castanheiro europeu (*Castanea sativa* Miller) é uma cultura que apresenta grande importância económica e social, sendo em algumas regiões de montanha a principal fonte de rendimento das populações rurais. A região de Trás-os-Montes concentra grande parte da área plantada com essa espécie em Portugal. A cultura é atacada por vários insetos que causam prejuízos tanto a produtores como a comerciantes de castanha. Os Lepidópteros da família Tortricidae *Cydia splendana* (Hübner) e *Cydia fagiglandana* (Zeller) são considerados praga-chave da cultura na região. Os insetos na fase de larva alimentam-se do fruto causando perda do valor comercial da castanha. O objetivo do estudo foi monitorar a população adulta de *C. splendana* e *C. fagiglandana* e os níveis de ataque da espécie *C. splendana* na região de Trás-os-Montes. O trabalho decorreu entre os meses de julho e outubro de 2020, em cinco soutos dos concelhos de Bragança, Vinhais e Macedo de Cavaleiros, atrás caracterizados. Para acompanhar o voo dos adultos, em cada um dos soutos, foram instaladas três armadilhas tipo delta com feromona sexual, para cada uma das espécies de insetos. Para avaliar os níveis de ataque de *C. splendana* recolheram-se semanalmente folhas dos castanheiros, nos cinco soutos (20 folhas em 20 árvores diferentes), totalizando 400 folhas por souto. A primeira captura de *C. splendana* foi observada em 29/07, observando-se o pico de capturas entre 20/08 e 02/09. O período de postura foi relativamente curto, com ovos viáveis entre final de agosto e meados de setembro. Os ovos predados aumentaram ao longo do tempo e foram observados em todas as datas de amostragem. A primeira captura de *C. fagiglandana* foi observada em 22/07, observaram-se dois picos de capturas, o primeiro entre 08/08 e 13/08 e o segundo entre 26/08 e 02/09. As capturas foram maiores nos pomares com presença de hospedeiro alternativo (castanheiros para madeira e outras espécies de *Quercus*).

Palavras-chave: Castanheiro, bichado da castanha, pragas, curva de voo.

Abstract

The European chestnut (*Castanea sativa* Miller) is a crop of great economic and social importance, being in some mountain regions the main source of income for rural populations. The “Trás-os-Montes” region concentrates a large part of the area planted with this species in Portugal. The crop is attacked by various insects that cause damage to both nut producers and traders. Lepidoptera of the Tortricidae family *Cydia splendana* (Hübner) and *Cydia fagiglandana* (Zeller) are considered key crop pests in the region. Insects in the larval stage feed on the fruit causing the nut to lose its commercial value. The aim of the study was to monitor the adult population of *C. splendana* and *C. fagiglandana* and the levels of attack by the species *C. splendana* in the region of “Trás-os-Montes”. The work took place between the months of July and October 2020, in five chestnut groves in the municipalities of Bragança, Vinhais and Macedo de Cavaleiros, described above. To monitor the flight of adults, in each of the chestnut groves, three delta-type traps with sex pheromone were installed for each of the insect species. To assess the attack levels of *C. splendana*, leaves were collected from chestnut trees weekly in the five chestnut groves (20 leaves in 20 different trees), totaling 400 leaves per grove. The first capture of *C. splendana* was observed on 07/29, with a peak of captures between 08/20 and 09/02. The laying period was relatively short, with viable eggs between late August and mid-September. Predated eggs increased over time and were observed at all sampling dates. The first capture of *C. fagiglandana* was observed on 07/22, there were two peaks of captures, the first between 08/08 and 08/13 and the second between 08/26 and 09/02. Catches were higher in orchards with the presence of an alternative host (wood chestnut and other *Quercus* species).

Keywords: Chestnut tree, chestnut bug, pests, flight curve.

3.1. Introdução

Castanea sativa Miller (Fagaceae), é uma espécie nativa do sul da Europa e cultivada principalmente para a obtenção de fruto e madeira (Aguiar, 2020). A região de Trás-os-Montes concentra cerca de 88% da área de produção de castanha em Portugal (INE, 2021), onde é uma das culturas mais antigas e representativas, agregando benefícios económicos, sociais, culturais, ambientais e paisagísticos.

O valor comercial da castanha é significativamente prejudicado por pragas ou doenças, levando a perdas económicas para os agricultores e para as empresas de comercialização e processamento de castanha (Bento *et al.* 2007). As pragas associadas ao castanheiro assumem com alguma regularidade importância elevada. O bichado-da-castanha, provocado pelo complexo de pragas *Laspeyresia* (= *Cydia*) *splendana* (Hübner), *Cydia fagiglandana* (Zeller), *Pammene fasciana* (L.) e o gorgulho, *Curculio* (= *Balaninus*) *elephas* (Gyllenhal), são apontadas como as espécies que maiores estragos podem provocar na região de Trás-os-Montes, Portugal (Bento *et al.* 2005).

Cydia splendana e *C. fagiglandana* são lepidópteros da família Tortricidae e possuem biologia e ciclo de vida bem próximos (descritos no capítulo 1) apresentando ciclo univoltino com cinco fases larvares. Os adultos emergem no final da primavera até ao início do outono, a postura de ovos ocorre entre julho e setembro, a fase larvar ocorre dentro da castanha até que esta caia no solo e a larva se enterra passando o outono/inverno na forma de pupa no solo até emergir como adulto na primavera seguinte (Jimenez-Pino *et al.* 2011). Os estragos causados pelas larvas resultam do processo de alimentação causando perda total do valor comercial do fruto.

A monitorização de *C. splendana* e *C. fagiglandana* no nordeste transmontano contribuiu para desenhar programas de controlo integrado em função das características biológicas dessas duas pragas carpófagas na zona. Este estudo teve por objetivo monitorizar a biologia do bichado-da-castanha, *C. splendana* através da observação da ovipostura nas folhas de castanheiro bem como a monitorização da população adulta de *C. splendana* e *C. fagiglandana* em armadilha delta com feromona sexual, em cinco sotos na região de Trás-os-Montes, Portugal.

3.2. Material e métodos

O trabalho decorreu entre os meses de julho e outubro de 2020 em cinco soutos dos concelhos de Bragança, Vinhais e Macedo de Cavaleiros, conforme descrito no capítulo 2.

Para acompanhar o voo dos adultos de *C. splendana* e *C. fagiglandana*, em cada um dos soutos, foram instaladas três armadilhas tipo delta com feromona sexual de *C. splendana* (Econex® 2 mg) e três armadilhas tipo delta com feromona sexual de *C. fagiglandana* (Econex® 2 mg). Todas as armadilhas foram instaladas a meio da copa das árvores, de forma aleatória na área, de modo que as armadilhas da mesma espécie se encontrem separadas em pelo menos 50 metros entre si (Figura 19). A feromona foi substituída mensalmente com auxílio de pinça entomológica, seguindo as recomendações do fabricante e a contagem dos adultos foi realizada semanalmente entre os dias 22 de julho e 26 de outubro de 2020. Para produzir a curva de voo de cada espécie utilizou-se a média das três armadilhas e o erro padrão.



Figura 19. Armadilha do tipo delta com feromona sexual instalada em castanheiro.

Para análise de postura de *C. splendana* nas folhas recolheram-se semanalmente nos cinco soutos, 20 folhas situadas próximas do ouriço em 20 árvores diferentes, de forma totalmente aleatória. O material foi transportado numa geleira e no laboratório

procedeu-se a observação e contagem dos ovos viáveis, eclodidos e predados com auxílio de lupa binocular (Figura 20).

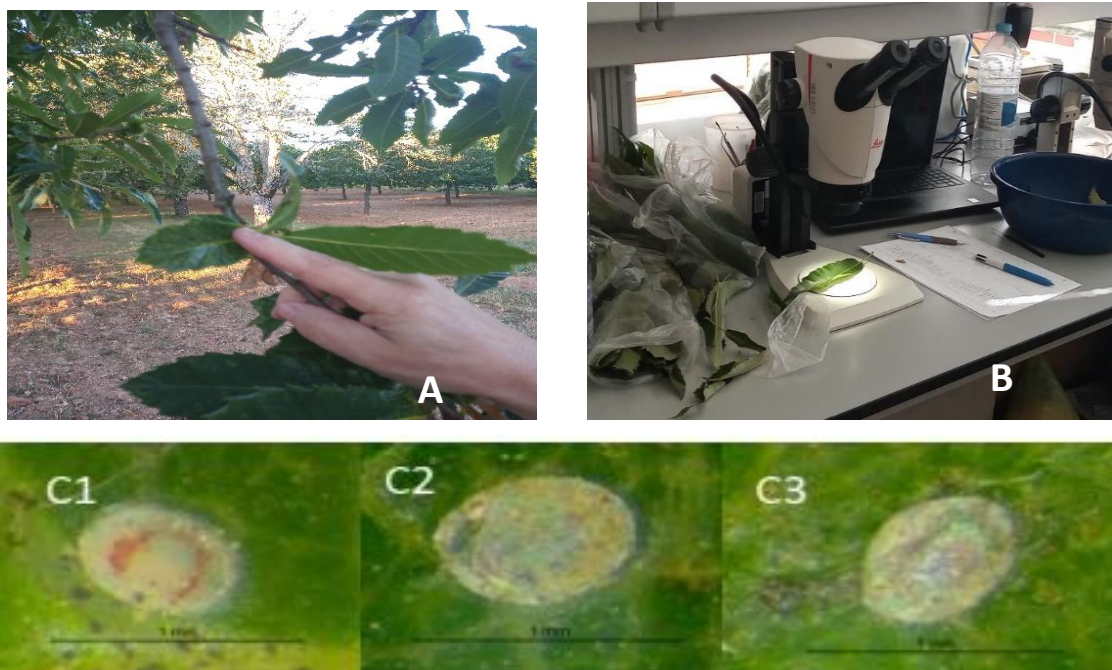


Figura 20. Postura de *Cydia splendana* (Hübner) em folha de castanheiro (A); Folhas de castanheiros analisadas em lupa binocular (B); ovo viável de *Cydia splendana* (Hübner) (C1); ovo eclodido de *Cydia splendana* (Hübner) (C2); ovo predado de *Cydia splendana* (Hübner) (C3).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Curva de voo de *Cydia splendana* (Hübner, 1799)

O número total de indivíduos de *C. splendana* capturados nas cinco localidades monitorizadas variou consideravelmente de acordo com as datas. As primeiras contagens foram obtidas entre final de julho e final de agosto (Espinhoso 29/07, Espinhosela 08/08, Amendoeira 13/08 e Fontes 26/08). Entre 20/08 e 09/09 observaram-se capturas em todas as localidades (Figura 21).

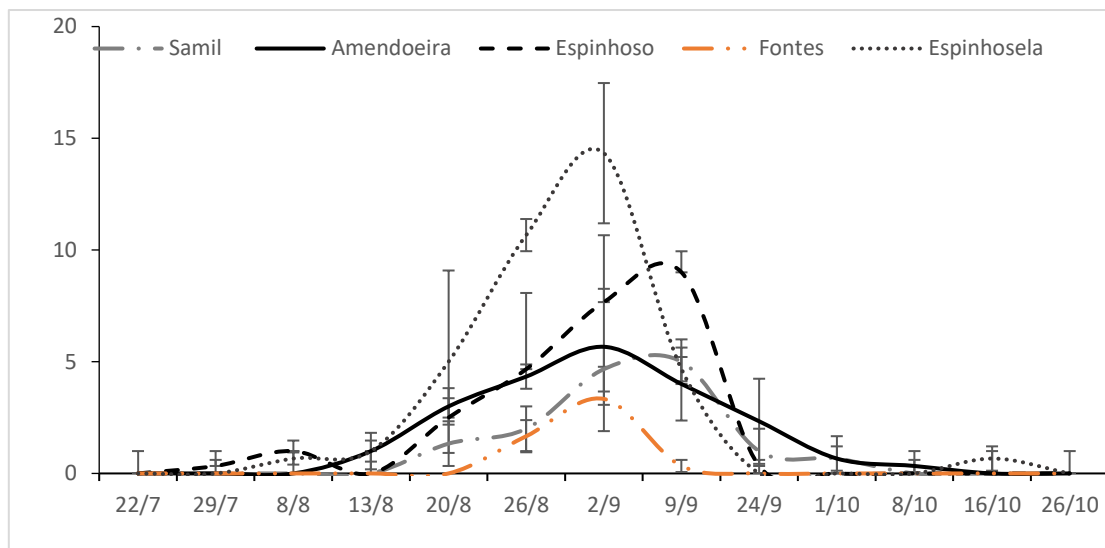


Figura 21. Média e respetivo erro padrão de adultos de *Cydia splendana* (Hübner) capturados em armadilha delta com feromona sexual, na região de Trás-os-Montes, em cinco pomares experimentais em 2020.

A média de indivíduos de *C. splendana* capturados nas cinco localidades monitorizadas variou consideravelmente de acordo com o local e as datas. O primeiro registo de adultos foi obtido em 29/07 no Souto de Espinhoso ($0,33 \pm 0,27$), na semana seguinte Espinhosela também registou a primeira contagem ($0,67 \pm 0,47$). Observou-se um máximo de capturas de *C. splendana*, entre 20/08 e 02/09 com o maior número de capturas a ocorrer na primeira semana de setembro na maioria dos sotos. O maior número médio de adultos de *C. splendana* foi registado no soto de Espinhosela ($14,33 \pm 3,14$) e o menor em Fontes ($1,67 \pm 0,72$).

Aguin-Pombo *et al.* (2008) relata maior número de indivíduos de *C. splendana* no mês de setembro. Bento *et al.* (2009) observou que capturas de *C. splendana* mais elevadas em meados de agosto, Santos *et al.* (2012) em julho e em setembro. Marrão *et al.* (2021) voou observou o máximo de capturas em finais de agosto em 2018 e na segunda semana de setembro em 2019.

A variação no número de capturas entre os sotos eventualmente deve-se a abundância de hospedeiros na área circundante. Espinhosela encontra-se inserida em uma região onde a cultura predominante é de castanheiro, tanto para frutos como madeira, e o soto de Espinhoso encontra-se próximo a castanheiros 'bravos'. A presença de espécies de *Quercus*, que são plantas hospedeiras deste inseto carpófago fornece árvores

adicionais para infestação e aumento populacional (Bonal *et al.* 2007; Cuestas *et al.* 2020; Delisle *et al.* 2004).

Observamos o número médio de capturas mais elevado nos soutos localizados em cotas mais altas, o que coincide com Marrão *et al.* (2021). Porém, autores como Pombo *et al.* (2018), Henriques (2015) e Lopes *et al.* (2009), referem que os maiores níveis populacionais são observados em soutos localizados em altitudes mais baixas.

3.3.2. Monitorização de ovos de *Cydia splendana* em folhas de *Castanea sativa*

Os primeiros ovos viáveis foram observados na primeira data de amostragem em 26/08, exceto em Samil, onde foi registado um ovo predado nesta data. O início das posturas coincidiu com o máximo de capturas de adultos (entre 20/08 e 02/09). O período de postura foi relativamente curto, com ovos viáveis observados entre final de agosto e meados de setembro. No início de setembro, o número de ovos viáveis, eclodidos e predados apresentaram valores equilibrados, mas na segunda semana de setembro, os ovos eclodidos e predados predominaram (Figura 22). Todos os soutos amostrados apresentaram maior número de ovos predados em relação a ovos viáveis e eclodidos, o que revela a importância da fauna auxiliar.

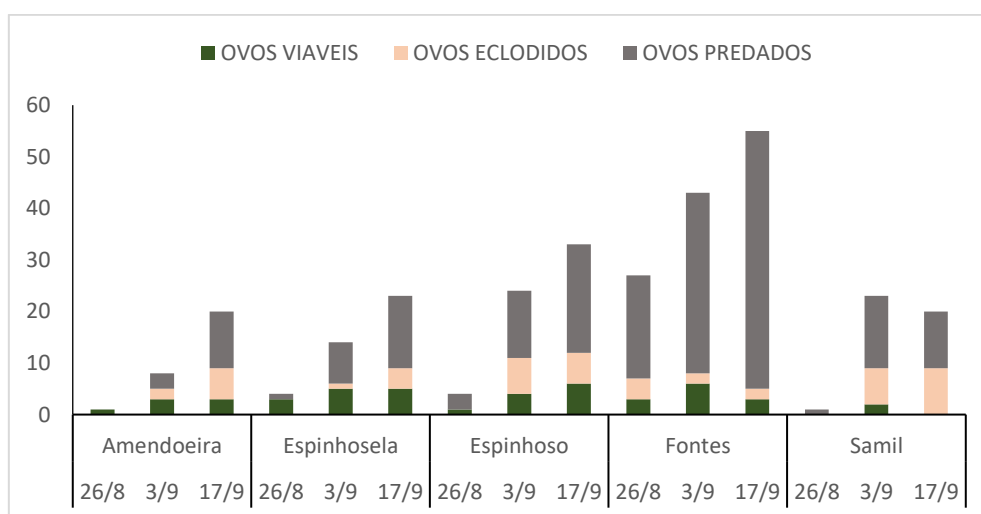


Figura 22. Número total de ovos de *Cydia splendana* (Hübner) (viáveis, eclodidos e predados) observados em cinco soutos da região de Trás-os-Montes em 2020.

Estudos de monitorização de *C. Splendana* em fase de ovo são mais escassos que os realizados na fase adulta do inseto. Na mesma região onde foi realizado o presente estudo, entre 2005 e 2008, as primeiras eclosões de ovos de *C. splendana* foram registadas no final de julho e o pico no final de setembro (Bento *et al.* 2009). Em 2018 o período de eclosão coincide com o aqui apresentado. Em 2019 só foi possível registar ovos viáveis na primeira semana de setembro, continuando a postura até ao final de setembro (Marrão *et al.* 2021).

Outra diferença em relação ao trabalho realizado em 2018 e 2019 por Marrão *et al.* (2021) foi o número total de ovos observados nas folhas, que em 2020 foi bem superior. Segundo Cuestas *et al.* (2020), condições secas e quentes, como as observadas em 2020, podem afetar a emergência de adultos, oviposição, ou viabilidade do ovo de *C. splendana*.

3.3.3. Curva de voo de *Cydia fagiglandana* (Zeller 1841)

O número total de indivíduos de *C. fagiglandana* capturados nas cinco localidades monitorizadas também variou consideravelmente de acordo com as datas. Amendoeira ($5,33 \pm 0,98$) e Espinhosela ($2,67 \pm 1,19$) apresentaram o maior número de adultos capturados. Os primeiros adultos foram observados em 22/07. No início de agosto todas as localidades já apresentavam capturas, exceto Espinhosela. Entre 08/08 e 02/09 registamos capturas em pelo menos 4 localidades (Figura 23).

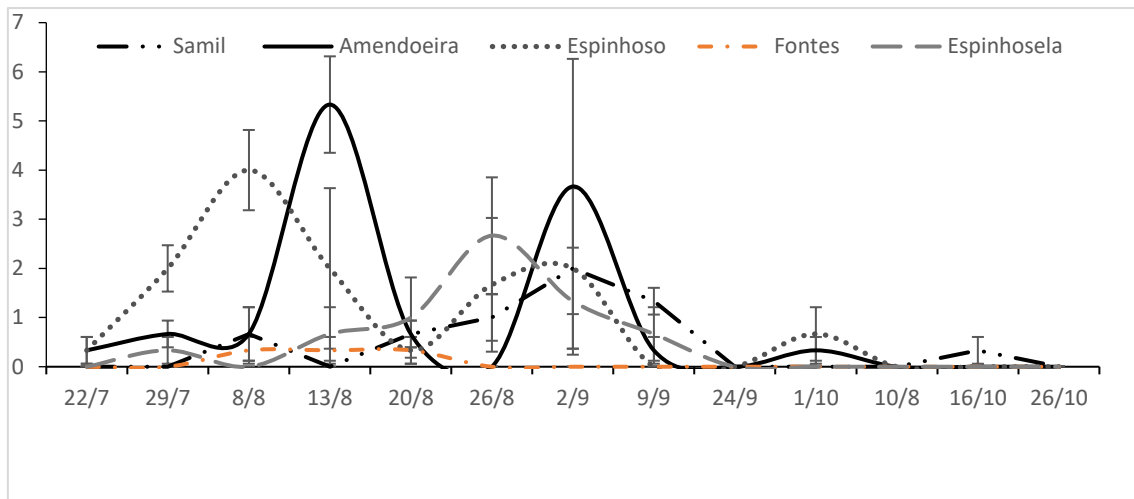


Figura 23. Média e respetivo erro padrão de adultos de *Cydia fagiglandana* (Zeller) capturados em armadilha delta com feromona sexual, na região de Trás-os-Montes, em cinco pomares experimentais em 2020.

Foram registados dois máximos de capturas de adultos, o primeiro entre 08/08 e 13/08 e o segundo entre 26/08 e 02/09. A partir de 24/09 observa-se forte redução no número de adultos capturados nas armadilhas e em 26/10 já não se registavam capturas em nenhuma das localidades.

Utilizando a mesma técnica de monitorização Angeli *et al.* (1997) observou somente um máximo de capturas, em finais de agosto e Rotundo *et al.* (2009) na terceira semana de agosto. Para Jimenez-Pino *et al.* (2011) um dos fatores que pode afetar a distribuição espacial de *C. fagiglandana* é a competição interespecífica com o gorgulho, *C. elephas*. As condições climáticas também podem afetar o ciclo de vida de *C. fagiglandana*. Segundo o Instituto Português do Mar e Atmosfera (IPMA, 2020) o mês de agosto de 2020 em Portugal Continental classificou-se como quente em relação à temperatura do ar e normal em relação à precipitação. O valor médio da temperatura média do ar, 22,76 °C, foi superior ao normal 1971-2000 com uma anomalia de +0,62 °C. Já o valor médio da temperatura máxima do ar, 30 °C, foi 1,2 °C superior ao normal.

3.4. Conclusões

Durante o período de monitorização de *C. splendana* a ocorrência de adultos iniciou-se em 29/07 estendendo o período de voo até meados de outubro apresentando o máximo de capturas no início de setembro. Os ovos viáveis foram observados entre 26/08 e 17/09. Os ovos predados aumentaram ao longo do tempo e foram observados em todas as datas de amostragem.

A curva de voo da *C. fagiglandana* iniciou-se mais cedo em 22/07, e estendeu-se até meados de outubro como a *C. splendana*, mas apresentou dois picos com maiores números de capturas em agosto e setembro.

O souto de Espinhosela apresentou as maiores capturas de *C. splendana* e em Amendoeira de *C. fagiglandana*.

As capturas foram maiores nos pomares com longas extensões de plantações de castanheiros consecutivas e também em soutos com presença de hospedeiro alternativo (madeira de castanheiro e outras espécies de *Quercus*).

3.5. Bibliografia

Aguiar, C. (2020). Sistemática, morfologia, fenologia e biologia da reprodução. In Manual boas práticas do castanheiro. Ed. Bento e Ribeiro, 2020.

Aguin-Pombo, D., Arraiol, A., Aguiar, A. M., Freitas, E., & Angeli, G. (2008). Large infestation of chestnuts by *Cydia* moths in Madeira Island: monitorization of *Cydia splendana* populations with pheromone lures. *Acta Horticulturae*, 784, 175– 180.

Angeli, G., Antonaroli, R., & Nanni, C. (1997). Prime esperienze di contenimento delle due tortrici del castagno *Cydia fagiglandana* e *C. splendana* con la tecnica della. *Informatore fitopatologico*, 65.

Bento, A., Pereira, S., & Pereira, J. A., (2007). Pragas associadas à castanha em Trás-os-Montes: biologia e estragos. In II Congresso Ibérico do Castanheiro. Vila Real. 254-258 p.4.

Bento, A., Pereira, S. & Pereira, J. A. (2009). Biology and losses of the chestnut moth, *Laspeyresia* (= *Cydia*) *splendana* (Hübner), in northeast of Portugal. In *Castanea* 2009. 1st

European Congress on Chestnut. Cuneo. p. 207. Disponível em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/4855>.

Bonal, R., Munoz, A., & Díaz, M. (2007). Satiation of predispersal seed predators: the importance of considering both plant and seed levels. *Evolutionary Ecology*, 21(3), 367-380.

Cuestas, M. I., Martin, M. A., Aldebis, H. K., Mena, J. D., Martin, L. M., & Vargas-Osuna, E. (2020). Differential response among chestnut traditional varieties to the attack of *Cydia splendana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 168(3), 259-265.

Delisle, J., Marcotte, M., Boutitie, A., Chapoux, M., Bengtsson, M., & Witzgall, P. (2004). Pheromone Trials for the Monitoring of *Cydia splendana* in Chestnut Plantations of France. *In III International Chestnut Congress 693* (pp. 605-610).

Henriques, C. A. S. (2015). Contributo para o estudo da produtividade do castanheiro "Martainha" em Penela da Beira (DOP "Soutos da Lapa"). Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrónómica. Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária. Disponível em: <https://repositorio.ipcb.pt/handle/10400.11/2906>.

Instituto Nacional de Estatística, I.P (INE) (2021). Estatísticas Agrícolas 2020. Edição de 2021.

IPMA. (2020). Instituto Português do Mar e Atmosfera, I.P. Resumo Climatológico agosto e Verão de 2020. Disponível em: https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20200903/aLIMdENsRORERlkagmmX/cli_20200801_20200831_pcl_mm_co_pt.pdf. Acedido em fevereiro de 2022.

Jimenez-Pino, A., Maistrello, L., Lopez-Martinez, M. A., Ocete-Rubio, M. E., & Soria-Iglesias, F. J. (2011). Spatial distribution of *Cydia fagiglandana* (Zeller) in an exploited holm oak (*Quercus ilex* L.) forest. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(2), 570-579.

Lopes, D., Macedo, N., Figueiredo, A., Zorman, M., Pimentel, R., Ventura, L., & Pombo, D. (2009). Evolução populacional dos adultos do bichado-da-castanha, *Cydia splendana* Hubner (Lepidoptera, Tortricidae) e prejuízos observados na ilha terceira. *Actas Do I Congresso De Fruticultura e Viticultura*.

Marrão, R., Lopes, E., & Bento, A. (2021). O bichado-da-castanha, *Cydia splendana* (Hübner) (Lepidoptera: Tortricidae) em Portugal. *Millenium*, 2(15), 97-107.

Pombo, D. A., Angeli, G., Franquinho Aguiar, A. M., & Horta Lopes, D. (2018). Critérios para a gestão sustentada do bichado-da-castanha. Universidade da Madeira.

Rotundo, G., De Cristofaro, A., Parillo, R., & Germinara, G. S. (2009). Monitoring of chestnut moths by intra-and interspecific semiochemicals. *In I European Congress on Chestnut-Castanea 2009 866* (pp. 435-441).

Santos, A., Azevedo, J., Pimentel, R., Ventura, L., Mexia, A., & Lopes, D. H. (2012). Avaliação de feromonas na monitorização de bichado-da-castanha *Cydia splendana* (Hubner)(Lepidoptera: Tortricidae) na Ilha Terceira, Açores. Revista de Ciências Agrárias.



Capítulo 4

Efeito da manutenção do solo na diversidade funcional de artrópodes em Castanheiros

Capítulo 4 - Efeito da manutenção do solo na diversidade funcional de artrópodes em castanheiros

Resumo

A vespa-das-galhas-do-castanheiro, *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu), o bichado-da-castanha, *Cydia splendana* (Hübener) e o gorgulho, *Curculio elephas* (Gyllenhal) são considerados praga-chave da cultura do castanheiro em Portugal. Os meios de luta contra esses insetos são complexos uma vez que passam a maior parte de sua vida protegidos e apresentam grande mobilidade na fase adulta. A eficácia do controlo biológico pode ser potencializado com a diversificação de espécies vegetais no meio ou em volta das culturas. A vegetação espontânea pode fornecer alimento, hospedeiros alternativos e abrigo para os inimigos naturais e incrementar a limitação natural destas pragas. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do coberto vegetal nos índices de biodiversidade, bem como na riqueza e abundância da fauna auxiliar associada à cultura do castanheiro na região de Trás-os-Montes. O trabalho foi desenvolvido em dois soutos no distrito de Bragança, um com coberto vegetal e outro mobilizado, onde se procedeu à recolha quinzenal de artrópodes entre agosto e outubro de 2020, por meio da técnica das pancadas. Os indivíduos foram triados em laboratório e separados por ordens e grupos funcionais (predadores, parasitoides, fitófagos e indiferentes), os dados analisados no programa Rstudio e Past 4.3. No total, capturaram-se 5.020 artrópodes pertencentes à classe Insecta (nove ordens) e à classe Arachnida (uma ordem). Em termos de biodiversidade, o souto com coberto vegetal apresentou maior abundância ($p < 0,01$) e menor dominância ($p < 0,001$) que o souto mobilizado. Analisando os grupos tróficos observou-se que o souto com coberto vegetal apresentou maior número de parasitoides ($p < 0,05$) e menor número de fitófagos ($p < 0,01$), com destaque para a família Cicadellidae. Não houve diferença significativa no número de predadores.

Palavras-chave: Fauna auxiliar, limitação natural, diversidade, cobertura vegetal.

Abstract

The chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu), the chestnut worm, *Cydia splendana* (Hübener) and the weevil, *Curculio elephas* (Gyllenhal) are considered key pests of chestnut cultivation in Portugal. The means of fighting these insects are complex since they spend most of their life protected and are highly mobile in the adult stage. The effectiveness of biological control can be enhanced with the diversification of plant species in the middle or around the crops. Spontaneous vegetation can provide food, alternative hosts and shelter for natural enemies and increase the natural limitation of these pests. In this context, this study aimed to evaluate the effect of vegetation cover on biodiversity index, as well as on the richness and abundance of auxiliary fauna associated with chestnut cultivation in the region of “Trás-os-Montes”. The work was carried out in two chestnut groves in the district of Bragança, one with vegetation cover and the other mobilized, where the biweekly collection of arthropods was carried out between August and October 2020, using the shake technique. The individuals were screened in the laboratory and separated by orders and functional groups (predators, parasitoids, phytophagous and indifferent), the data analyzed in the software Rstudio and Past 4.3. In total, 5.020 arthropods belonging to the Insecta class (nine orders) and the Arachnida class (one order) were captured. In terms of biodiversity, the grove with vegetation cover showed greater abundance ($p < 0.01$) and lower dominance ($p < 0.001$) than the mobilized grove. Analyzing the trophic groups, it was observed that the grove with vegetation cover had the highest number of parasitoids ($p < 0.05$) and the lowest number of phytophagous ($p < 0.01$), with emphasis on the Cicadellidae family. There was no significant difference in the number of predators.

Keywords: Auxiliary fauna, natural limitation, diversity, vegetal cover.

4.1. Introdução

O castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.) apresenta grande importância económica e social, sendo em algumas regiões a principal fonte de rendimento das populações rurais, constituindo-se ainda como elemento caracterizador da paisagem. A região montanhosa do norte e centro do país concentra 94% da produção de castanhas em Portugal (INE, 2019).

Segundo Bento *et al.* (2007), pragas ou doenças de podridão podem levar a perda do valor comercial da castanha acarretando perda de valor económico para agricultores e empresas. De entre as pragas-chave da cultura destacam-se a vespa-das-galhas-do-castanheiro, *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu), o bichado-da-castanha, *Cydia splendana* (Hübner) e o gorgulho, *Curculio elephas* (Gyllenhal).

O controlo biológico é definido como a ação de parasitoides, predadores e patógenos na manutenção da densidade de outro organismo a um nível mais baixo do que aquele que normalmente ocorreria nas suas ausências (Debach, 1968). A eficácia do controlo biológico pode ser potencializado com a diversificação de espécies vegetais no meio ou em volta das culturas (Begon *et al.* 2007) fornecendo alimento, hospedeiros alternativos e abrigo para os inimigos naturais e incrementar a limitação natural das pragas, funcionando também como corredores ecológicos permitindo a passagem de um habitat a outro. A prática do uso de coberto vegetal também auxilia nos teores de matéria orgânica do solo e mitiga o efeito da erosão.

Algumas comunidades de insetos reagem rapidamente e podem ser favorecidas enquanto outras podem extinguir-se localmente a depender das práticas agrícolas utilizadas (Basset *et al.* 1998; Kremen, 1992). Entretanto, outras espécies são mais resilientes e são capazes de recuperar-se rapidamente após passar por repetidas perturbações ambientais (Begon *et al.* 2007).

Fatores como práticas de manutenção do solo e uso de pesticidas, dentre outros, podem afetar a riqueza e a diversidade de insetos. No entanto, os processos como os organismos se organizam são complexos e inúmeras variáveis coexistem simultaneamente (Souza, 2012). Compreender como as comunidades de artrópodes se

estruturam em ambientes de cultivo de castanheiros pode ser útil nas escolhas de práticas para o controlo biológico natural. Assim, o estudo dos impactos antrópicos sobre a estrutura funcional das comunidades é essencial, pois pode prever não apenas os padrões da comunidade, mas também os processos que operam nesses ecossistemas (Mayfield & Levine, 2010).

Preservar e aumentar a abundância e biodiversidade é de interesse crítico para o desenvolvimento de estratégias que promovam a agricultura sustentável (Jacobson *et al.* 2019). Habitats com vegetação permanente e sem mobilizações constituem importantes locais de hibernação para artrópodes, uma vez que fornecem recursos e local de hibernação (Hanson *et al.* 2017).

O objetivo do trabalho foi comparar a diversidade funcional das comunidades de artrópodes em áreas de souto com o solo mobilizado e com presença de coberto vegetal, na região de Trás-os-Montes.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Método de amostragem

O trabalho foi realizado em dois soutos da região de Trás-os-Montes, Portugal. Em Amendoeira (CCV), localizada no concelho de Macedo de Cavaleiros, que possui coberto vegetal e o destroçamento da vegetação nativa foi realizado apenas antes da colheita das castanhas. E em Espinhosela (SCV), localizada no concelho de Bragança, onde fez-se uso de mobilização do solo duas vezes ao ano. A descrição completa dos soutos encontra-se no capítulo 2.

Para captura dos artrópodes utilizou-se a técnica das pancadas adaptada (Figura 24A). Amostram-se 13 árvores, quatro ramos por árvore, duas abanadelas por ramo a cada 15 dias entre os meses de agosto e outubro. As árvores foram selecionadas de forma totalmente aleatória dentro de cada um dos soutos com o objetivo de obter 13 amostras representativas de cada uma das parcelas.

Após a recolha, o material foi transportado numa geleira e no laboratório foi logo colocado numa arca congeladora. Posteriormente, as amostras foram colocadas em tabuleiros com os sacos abertos para facilitar a secagem da amostra. Depois do material seco, os artrópodes foram identificados com auxílio da lupa binocular (Figura 24B).

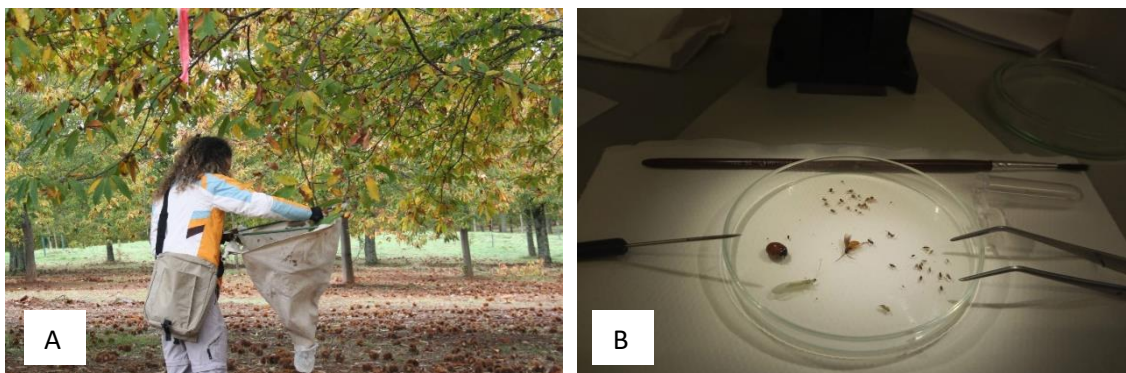


Figura 24. Recolha de artrópodes por meio da técnica das pancadas (A); Identificação dos artrópodes amostrados em lupa binocular (B).

4.2.2. Análise dos dados

A estrutura da comunidade de artrópodes nos dois soutos foi avaliada em termos de abundância, riqueza e diversidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas no ambiente R (R studio 4.3). Optou-se pela série de Hill (Hill, 1973) uma vez que essa série substitui a utilização de vários índices em separado e relativiza o peso da equabilidade em relação à riqueza à medida que varia o valor de q (parâmetro de ordem de diversidade). Para a comparação de médias entre grupos recorreu-se ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis, usando também o programa estatístico R (R studio 4.3).

4.3. Resultados e discussão

Foram capturados 5,020 artrópodes, separados em 36 morfotipos diferentes, sendo distribuídos na classe Insecta (nove ordens e 26 famílias) e à classe Arachnida (uma ordem).

O souto com coberto vegetal (CCV) apresentou 1,887 indivíduos, sendo 1,177 predadores, 226 parasitoides e 534 fitófagos. No souto sem presença de coberto vegetal

(SCV) foram registados 2,348 indivíduos, 745 predadores, 16 parasitoides e 1,587 fitófagos. Os demais artrópodes foram classificados como indiferentes.

4.3.1. Riqueza, dominância e diversidade de artrópodes em castanheiros

A abundância de artrópodes no soto CCV distribui-se da seguinte forma: as aranhas (Araneae) foram o grupo com maior número de capturas representando 42,57% do total. O segundo grupo com maior abundância foi de Cicadellidae (12,09%), seguido por Parasitoide (10,24%), Diptera (7,56%), Aphididae (6,97%), Tingidae (5,16%), Coccinellidae (4,62%), e Chrysopidae (2,49%). Os restantes grupos apresentam muito menor importância (Figura 25).

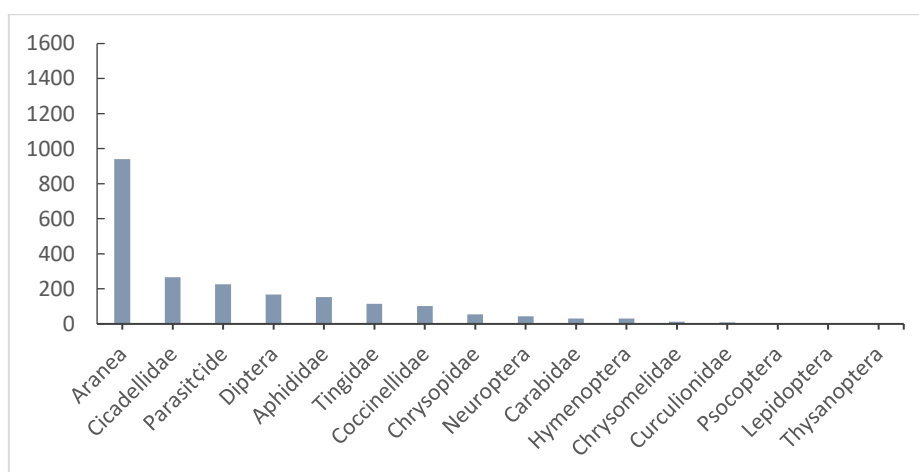


Figura 25. Distribuição de abundância de artrópodes no soto com coberto vegetal (CCV).

No soto SCV os cicadelídeos (Cicadellidae) apresentaram as maiores contagens (54,74%), seguido por Aranea (21,25%), Parasitoide (5,65%), Diptera (4,88%), Lepidoptera (3,57%), Aphididae (2,7%), Coccinellidae (2,44%), Chrysopidae (1,05%) (Figura 26).

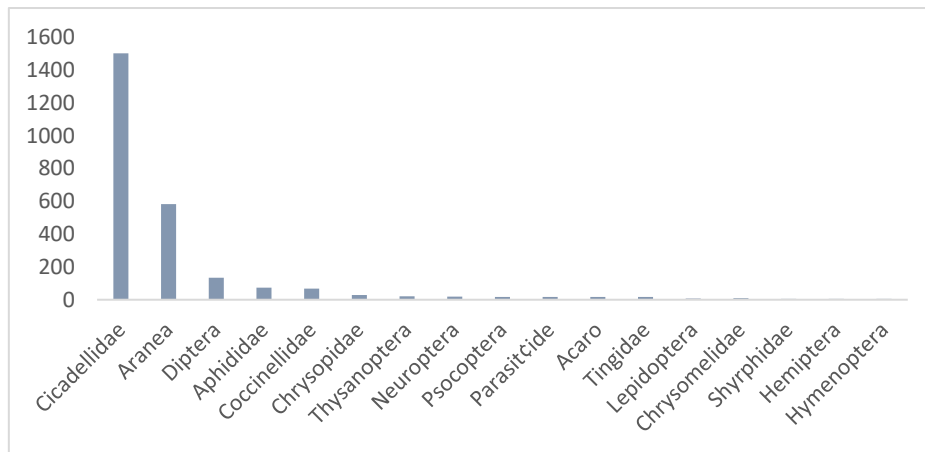


Figura 26. Distribuição de abundância de artrópodes no suto sem coberto vegetal (SCV).

A curva de rarefação da Figura 27 mostra a relação geral entre o número de morfotipos capturados e a diversidade total do suto. A curva contínua representa o número real de morfotipos realmente observados e a linha tracejada é uma projeção do número de capturas. A parte sombreada representa o intervalo de confiança de 95%.

O suto CCV apresenta uma tendência de assíntota bem definida indicando que a amostragem realizada foi suficiente para amostrar a diversidade presente no suto, ao contrário do suto sem coberto vegetal SCV que não apresenta uma tendência de assíntota bem definida. A projeção de um número maior de indivíduos colhidos indica o aumento da diversidade de morfotipos amostrados.

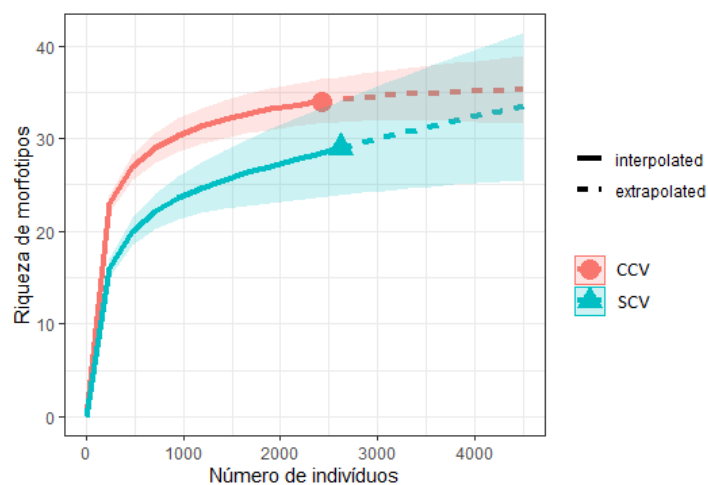


Figura 27. Curvas de rarefação da comunidade de artrópodes coletadas em dois sutos em Trás-Os-Montes, Portugal. CCV - com coberto vegetal; SCV - sem coberto vegetal.

O perfil de diversidade das duas localidades usando a Série de Hill é mostrado na Figura 28. Quando o valor de q (parâmetro de ordem de diversidade) é igual a zero o índice é igual a riqueza total de morfotipos, o número acumulado foi maior no CCV (34) que no SCV (29). Conforme as abundâncias vão sendo alteradas de modo a haver menor equabilidade, a curva fica mais inclinada (ou seja, com valores mais variados) e estabilizam a partir de ' q ' igual a 8, indicando a partir deste ponto uma estabilização no número de morfotipos amostrados. O souto CCV apresenta menor dominância de espécies que o SSV.

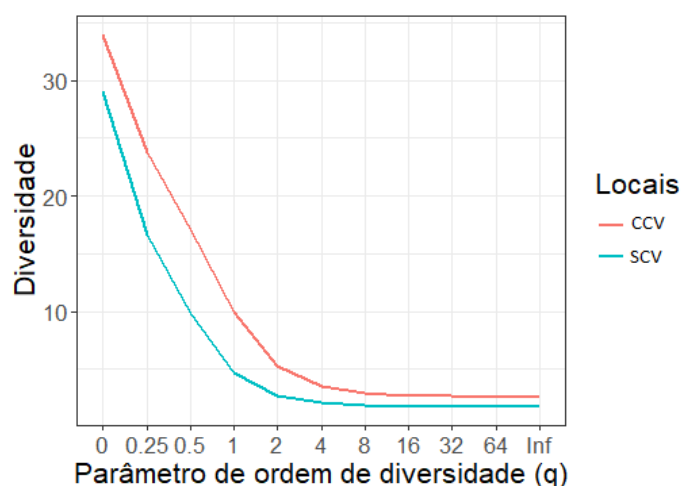


Figura 28. Série de Hill mostrando as ordens ' q ' de diversidade da comunidade de artrópodes capturados pela técnica das pancadas em dois soutos na região de Trás-os-Montes, Portugal.

4.3.2. Diversidade funcional

Os indivíduos capturados nos dois soutos estudados foram separados por grupos funcionais (predadores, parasitoides, fitófagos e indiferentes) apresentados no Quadro 6 (excluído os indiferentes). O souto com coberto vegetal (CCV) apresentou maior abundância de parasitoides ($p < 0,05$) e menor abundância de fitófagos ($p > 0,01$) em comparação como souto sem coberto vegetal (SCV). Não houve diferença na média de predadores nos dois soutos.

Quadro 6. Abundância total (N) e média (\pm desvio padrão) dos diferentes grupos recolhidos ao longo do período de amostragem em soutos com e sem coberto vegetal, em Trás-os-Montes, 2020.

	Com coberto vegetal (CCV)		Sem coberto vegetal (SCV)		valor de p
	N total	Média e desvio padrão	N total	Média e desvio padrão	
Predadores					
Aranea	940	18,08 \pm 10,77 a	583	8,97 \pm 5,72 b	p<0,01
Coleoptera					
Coccinellidae	102	1,96 \pm 1,88 a	68	1,05 \pm 3,1 b	p<0,01
Staphylinidae	11	0,21 \pm 0,66 a	1	0,02 \pm 0,14 b	p<0,05
Diptera					
Shyrphidae	2	0,04 \pm 0,19 a	5	0,08 \pm 0,36 a	p = 0,62
Dermaptera					
Forficulidae	1	0,02 \pm 0,14 b	8	0,15 \pm 0,46 a	p<0,05
Hymenoptera					
Formicidae	16	0,31 \pm 0,69 a	3	0,06 \pm 0,23 b	p<0,05
Neuroptera					
Chrysopidae	55	1,06 \pm 1,69 a	29	0,56 \pm 0,82 a	p = 0,19
Outros Neuroptera	98	1,88 \pm 2,95 a	48	0,92 \pm 1,00 a	p = 0,22
soma	1225	7,39 \pm 9,84 a	745	5,37 \pm 5,72 a	p = 0,96
Parasitoide					
Hymenoptera	226	4,35 \pm 5,5 a	16	0,25 \pm 1,61 b	p<0,05
Fitófagos					
Coleoptera					
Chrysomelidae	91	1,75 \pm 1,87 a	10	0,19 \pm 0,48 b	p<0,01
Hemiptera					
Aphididae	154	2,96 \pm 4,27 a	74	1,42 \pm 2,58 a	p = 0,06
Auchenorhyncha	289	5,56 \pm 4,62 b	1503	28,9 \pm 22,78 a	p<0,01
soma	534	3,8 \pm 3,76 b	1587	17,7 \pm 20,45 a	p<0,01

Em relação aos artrópodes predadores, não houve diferença no total dos indivíduos capturados, entretanto, o souto com presença de coberto vegetal (CCV) apresentou maiores capturas de indivíduos Aranea (p<0,01), Coleoptera das famílias Coccinellidae (p<0,01) e Staphylinidae (p<0,05), Hymenoptera da família Formicidae (p<0,05) e Dermaptera da família Forficulidae (p<0,05). Não houve diferença significativa entre Diptera da família Syrphidae, Chrysopidae e outros insetos da ordem Neuroptera.

Os resultados obtidos corroboram com a bibliografia existente (p.e. Blaauw & Isaacs, 2012; Chaplin-Kramer *et al.* 2011; Dennis, 1994; Petto, 1990; Redhead *et al.* 2020;

Thomas *et al.* 1991). Os inimigos naturais têm uma forte resposta positiva à complexidade da paisagem e o uso de plantas de cobertura cria um habitat mais fornecendo abrigo, alimento e locais de acasalamento. Esses locais desenvolvem um microclima favorável que podem tornar-se habitats adequados para artrópodes que, normalmente, habitam a floresta, especialmente aranhas.

4.4. Conclusões

O souto com coberto vegetal apresentou maior abundância e diversidade, e menor dominância de morfotipos em relação ao souto sem presença de coberto vegetal.

A distribuição de morfotipos difere nos locais observados, o uso de coberto vegetal no souto sugere um aumento no número de alguns artrópodes predadores, especialmente aranhas e parasitoides e menor número de insetos fitófagos, especialmente Cicadélídeos.

Áreas seminaturais em locais de agricultura aumentam a riqueza média e a diversidade funcional de polinizadores e inimigos naturais. A mobilização do solo provavelmente levará a declínios na riqueza de insetos benéficos e na diversidade funcional.

4.5. Bibliografia

Basset, Y., Novotny, V., Miller, S. E., & Springate, N. D. (1998). Assessing the impact of forest disturbance on tropical invertebrates: some comments. *Journal of Applied Ecology*, 35(3), 461-466.

Begon, M., Townsend, C. R., e Harper, J. L. (2007). *Ecologia: de indivíduos a populações*. Porto Alegre: Artmed.

Bento, A., Pereira, S., & Pereira, A. (2007). Pragas associadas à castanha em Trás-os-Montes: biologia e estragos. *In* II Congresso Ibérico do Castanheiro. Vila Real. 254-258, 4 p.

Blaauw, B. R., & Isaacs, R. (2012). Larger wildflower plantings increase natural enemy density, diversity, and biological control of sentinel prey, without increasing herbivore density. *Ecological Entomology*, 37(5), 386-394.

- Chaplin-Kramer, R., O'Rourke, M. E., Blitzer, E. J., & Kremen, C. (2011). A meta-analysis of crop pest and natural enemy response to landscape complexity. *Ecology Letters*, 14(9), 922-932.
- Debach, P. (1968). *Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas*. Editora Continental, S.A., México. 927 p.
- Dennis, E. A. (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *The Journal of biological chemistry*, 269(18), 13057-13060.
- Hanson, H. I., Birkhofer, K., Smith, H. G., Palmu, E., & Hedlund, K. (2017). Agricultural land use affects abundance and dispersal tendency of predatory arthropods. *Basic and Applied Ecology*, 18, 40-49.
- Hill, M. O. (1973). Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54(2), 427-432.
- INE. (2019). *Estatísticas Agrícolas 2018. Edição de 2019*. Instituto Nacional de Estatística, I.P
- Jacobson, A. P., Riggio, J., Tait, A. M., & Baillie, J. E. M. (2019). Global areas of low human impact ('Low Impact Areas') and fragmentation of the natural world. *Scientific Reports*, 9(1), 1-13.
- Kremen, C. (1992). Assessing the indicator properties of species assemblages for natural areas monitoring. *Ecological applications*, 2(2), 203-217.
- Mayfield, M. M., & Levine, J. M. (2010). Opposing effects of competitive exclusion on the phylogenetic structure of communities. *Ecology letters*, 13(9), 1085-1093.
- Petto, R. (1990). Abundance and prey of *Coelotes terrestris* (Wider) (Araneae, Agelenidae) in hedges. *Bulletin of the British Arachnological Society*, 8(6), 185-193.
- Redhead, J. W., Oliver, T. H., Woodcock, B. A., & Pywell, R. F. (2020). The influence of landscape composition and configuration on crop yield resilience. *Journal of Applied Ecology*, 57(11), 2180-2190.
- Souza, É. S. H. (2012). *Estrutura da comunidade de insetos (Arthropoda, Insecta) em sistemas de produção de hortaliças e agrofloresta no Distrito Federal*.
- Thomas, M. B., Wratten, S. D., & Sotherton, N. W. (1991). Creation of 'island' habitats in farmland to manipulate populations of beneficial arthropods: predator densities and emigration. *Journal of Applied Ecology*, 906-917.



Capítulo 5

Eficiência do fungo entomopatogénico *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) no controlo microbiológico das pragas carpófagas do castanheiro, *Cydia splendana* (Lepidoptera, Tortricidae) e *Curculio elephas* (Coleoptera, Curculionidae).

Capítulo 5 – Eficiência de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) no controlo microbiológico das pragas carpófagas *Cydia splendana* (Lepidoptera, Tortricidae) e *Curculio elephas* (Coleoptera, Curculionidae).

Resumo

Os fungos entomopatogénicos são bastante comuns na natureza e alguns deles demonstraram ter efeitos adversos contra insetos considerados pragas de culturas. O bichado-da-castanha (*Cydia splendana* Hübner) e o gorgulho (*Curculio elephas* Gyllenhal) causam elevados prejuízos aos produtores e empresas que transformam e comercializam a castanha. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, em condições de campo, a eficácia de duas concentrações de conídios de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. sobre a infeção e a mortalidade de larvas de *C. splendana* e *C. elephas*. Para o efeito, foi pulverizada a superfície de vasos com duas concentrações da estirpe ATCC 74040 5×10^7 (T1) e 1×10^8 (T2) conídios/ml. O controlo (T0) pulverizou-se com água destilada. As larvas foram colocadas à superfície dos vasos para se enterrarem no substrato. Os vasos foram cobertos por tela e enterrados num soto em outubro de 2020. A contaminação e a mortalidade das larvas foram avaliadas em cinco datas. Após retirar as larvas dos vasos, foram desinfetadas, colocadas em meio de cultura e isoladas até obter culturas puras do fungo. A confirmação do fungo presente na larva foi realizada por análise molecular. Não se observaram diferenças significativas na taxa de mortalidade entre os tratamentos T1 e T2, porém, foram significativamente mais elevados que o controlo. Analisando a infeção das larvas, o tratamento T2 obteve melhores resultados, seguido de T1 e T0. Maiores taxas de mortalidade e contaminação foram observadas aos 100 e 220 dias. Os resultados sugerem que *C. elephas* é mais suscetível ao fungo entomopatogénico *B. Bassiana* que *C. splendana*.

Palavras-chave: Fungo entomopatogénico, controlo biológico, castanheiro.

Abstract

Entomopathogenic fungi are quite common in nature and some of them have been shown to have adverse effects against insects considered crop pests. The chestnut moth (*Cydia splendana* Hübner) and the weevil (*Curculio elephas* Gyllenhal) cause high losses to producers and companies that process and sell chestnuts. The objective of the present work was to evaluate, under field conditions, the efficacy of two conidia concentrations of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. On the infection and mortality of *C. splendana* and *Curculio elephas* larvae. For this purpose, the surface of pots was sprayed with two concentrations of strain ATCC 74040 5×10^7 (T1) and 1×10^8 (T2) conidia/ml. The control (T0) was sprayed with distilled water. The larvae were placed on the surface of the pots to bury themselves in the substrate. The pots were covered with mesh and buried in a chestnut tree in October 2020. Larval contamination and mortality were assessed on five dates. After removing the larvae from the pots, they were disinfected, placed in a culture medium, and replicated until pure cultures of the fungus were obtained. The confirmation of the fungus present in the larva was performed by molecular analysis. No significant differences were observed in the mortality rate between treatments T1 and T2, however, they were significantly higher than the control. Analyzing the infection of the larvae, the T2 treatment obtained better results, followed by T1 and T0. Higher mortality and contamination rates were observed at 100 and 220 days. The results suggest that *C. elephas* is more susceptible to the entopathogenic fungus *B. Bassiana* than *C. splendana*.

Keywords: Entomopathogenic fungus, biological control, chestnut.

5.1. Introdução

As pragas de insetos são responsáveis por uma perda de 18% a 26% da produção agrícola anual mundial, o que corresponde a um valor estimado de US\$ 470 bilhões (Culiney, 2014). O uso extensivo e muitas vezes irresponsável de produtos químicos resultou em resistência em mais de 500 espécies de artrópodes-pragas (Omkar, 2016), ressurgimento de pragas secundárias e interrupção ou eliminação de complexos de inimigos naturais, reduzindo assim a eficácia dos processos de controle natural. Esses fatores, somados às preocupações sobre o impacto ambiental e na saúde humana, reforçam a necessidade de desenvolvimento de estratégias ambientalmente mais seguras, econômicas e confiáveis no controle de artrópodes (Mantzoukas & Eliopoulos, 2020).

Fungos entomopatogênicos que atacam insetos são agentes importantes para o biocontrole e têm um papel vital na promoção do meio integrado de pragas (Cooke, 1977). Estes microrganismos apresentam várias vantagens quando comparado aos inseticidas convencionais, incluindo custo-benefício, alto rendimento, menos resíduos químicos no meio ambiente e aumento da biodiversidade em ecossistemas geridos pelo homem (Inglis *et al.* 2001; Shah & Goettel, 1999).

Os gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* são os mais usados em produtos à base de fungos, formulados para uso contra uma ampla gama de pragas em ambientes florestais, de campo, estufas e de armazenamento.

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill. é um dos agentes mais eficazes no controle biológico, é encontrado em todos os tipos de solo (Jamal, 2008; Lambert, 2010). Diferentes isolados foram identificados para atacar uma ampla gama de insetos (707 espécies pertencem a 15 ordens) e ácaros (13 espécies) (Lambert, 2010; Zimmermann, 2007).

Um simples contato de *B. bassiana* com o inseto é suficiente para desencadear a infecção do hospedeiro suscetível, em condições ambientais e fisiologia do inseto adequadas. Assim, este fungo entomopatogênico mata tanto os estágios adultos quanto os imaturos (ovos, larvas) causando a chamada doença da “muscardina branca” (Barrón, 2001).

Em condições de laboratório, o fungo pode matar insetos de 3 a 6 dias após a infecção (Inglis *et al.* 2001). As condições de campo podem ser sub ótimas, levando ao início e progressão prolongados da doença no hospedeiro; o efeito letal esperado pode demorar mais (Sabbahi, 2008).

O castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.) no nordeste transmuntano é atacado por um complexo de insetos entre as quais espécies carpófagas desempenham um papel principal. O curculionídeo, *Curculio elephas* (Gyllenhal) e o tortricídeo, *Cydia splendana* (Hübner) estão entre as espécies que mais prejuízos causam, uma vez que suas larvas se alimentam dentro da castanha (Romero, 2013).

Estudos em condições de campo, sobre a eficácia do uso de *B. bassiana* são escassos e uma vez que as condições climáticas podem influenciar a fisiologia do fungo, a sua capacidade de infetar o hospedeiro, a progressão da infecção dentro do hospedeiro vivo ou morto, a esporulação do cadáver, a capacidade de disseminação e sobrevivência dos conídios infecciosos, também a suscetibilidade ou resistência do hospedeiro à infecção (Sabbahi, 2008). O objetivo do estudo foi avaliar a infecção e a mortalidade de larvas de *C. splendana* e *C. elephas* quando são aplicadas duas concentrações de conídios da estirpe ATCC 74040 de *B. bassiana* em condições ambientais de temperatura do solo e humidade do ar no nordeste transmuntano.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Tratamentos

Para avaliação da eficácia do fungo *B. bassiana* como agente de luta biológica contra o bichado-da-castanha (*Cydia splendana*) e o gorgulho (*Curculio elephas*), realizou-se um ensaio de semi-campo (vasos) com o produto comercial Naturalis® baseado em *B. bassiana*, estirpe ATCC74040 em duas suspensões de conídios diferentes. Portanto, avaliaram-se três tratamentos, Controlo (T0), 5×10^7 (T1) e 1×10^8 (T2) conídios/ml.

Para cada tratamento utilizaram-se 15 repetições (vasos) e 10 larvas de *C. splendana* e 10 larvas de *C. elephas* por vaso (150 larvas de cada inseto por tratamento). Os vasos do

tratamento controlo foram pulverizados com água destilada. Para aplicação utilizou-se o pulverizador BFL0860 BricoFerr®.

5.2.2. Preparação dos vasos

Vasos de polietileno perfurados no fundo (7 cm de diâmetro, 23 cm de profundidade) foram isolados no fundo com uma rede de polietileno de malha muito fina e preenchidos com 5 cm de argila expandida, novamente isolados com rede e completados com um substrato (solo, extrato de cultivo e perlite na proporção 2:1:1). Essa mistura foi esterilizada por autoclavagem a 120 °C durante 20 min antes de usar. Colocou se à superfície de cada vaso 10 larvas de *C. splendana* e 10 larvas de *C. elephas* para que se enterrem. Os vasos foram cobertos com uma rede que impossibilite a saída das larvas ou a entrada de outros animais (Figura 29).

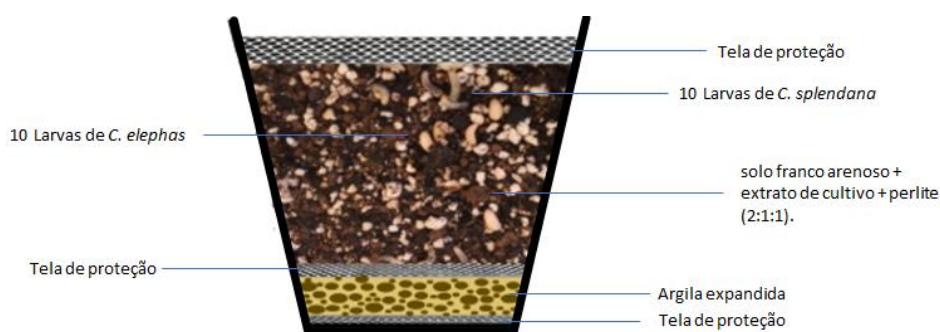


Figura 29. Esquema de montagem dos vasos utilizados no ensaio.

5.2.3 Insetos

As larvas de *C. splendana* (L4/L5) e *C. elephas* (L3) foram colhidas manualmente numa indústria local de processamento de castanhas. As larvas foram colocadas em bandejas e imediatamente levadas para o laboratório e usadas no bioensaio dentro de algumas horas.

5.2.3. Instalação

No tratamento T2 utilizou-se 2,17 ml e no tratamento T3 utilizou-se 4,35 ml do produto comercial Naturalis® diluídos em 800 ml de água destilada. Em cada tratamento, a superfície dos vasos foi pulverizada com a concentração de esporos correspondentes, ou água destilada no tratamento controlo.

24 horas após a pulverização, as larvas foram colocadas à superfície para se enterrarem ao substrato para pupar. Após a colocação das larvas nos vasos, todas se enterraram no substrato após alguns minutos. Posteriormente, os vasos foram cobertos por tela e colocados em condições naturais num souto localizado na freguesia de Samil, distrito de Bragança, Portugal (6°45'52.97" N, 41°46'50.14"W) a 797 m de altitude, enterrados até quase o topo para simular as condições em que as larvas se encontram na natureza (Figura 30). Os vasos de cada tratamento foram identificados e distribuídos casualmente.



Figura 30. Local onde foram enterrados os vasos do tratamento.

5.2.4. Avaliação da mortalidade e contaminação das larvas

A eficácia da aplicação de *B. bassiana* sobre as lagartas de *C. splendana* e sobre as larvas de *C. elephas* foi avaliada em cinco datas distintas (Quadro 7).

Quadro 7. Data de retirada dos vasos do solo e dias após o tratamento com *Beauveria Bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.

	R1	R2	R3	R4	R5
Data de Retirada	25/11/2020	02/12/2020	18/01/2021	24/02/2021	15/06/2021
Dias após tratamento	08	15	62	100	220

Em cada data foram retirados do campo 3 vasos (repetições) de cada tratamento com um total de 30 larvas de cada inseto, por tratamento.

Os vasos foram transportados para o laboratório e o substrato de cada vaso/repetição colocado num tabuleiro para facilitar a retirada das larvas hibernantes de *C. splendana* e pupas de *C. elephas*. As larvas/pupas foram contabilizadas como vivas ou mortas. Para quantificar as taxas de mortalidade das larvas utilizaram-se as que se encontravam mortas na data da retirada. Para a taxa de infecção utilizaram-se todas as larvas, vivas e mortas.

Depois de recolhidas dos vasos (vivas ou mortas), as larvas foram desinfetadas seguindo o seguinte procedimento: um minuto em álcool 70%, cinco minutos em hipoclorito de sódio (5%), um minuto em álcool 70% e um minuto em água destilada estéril repetido três vezes. Posteriormente, as larvas foram colocadas em papel absorvente esterilizado e colocadas em meio de cultura PDA adicionado a antibióticos (streptomycin 60 mg e penicillin G potassium 60 mg). As placas foram colocadas a incubar a 25 ± 1 °C na ausência de luz para determinar a presença de esporulação externa segundo Zimmermann (1986) e Llácer *et al.* (2013). Após 8 dias registou-se o crescimento de *B. bassiana* nas larvas (vivas e mortas) pela observação do crescimento do fungo à superfície da larva no meio de cultura e contabilizado o número de larvas contaminadas. O fungo obtido a partir de cada larva foi repicado para nova placa de PDA e colocada novamente a 25 ± 1 °C na ausência de luz. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de culturas puras e observação de produção de esporos. Os isolados puros foram repicados para tubos de Falcon 50 ml com PDA inclinado para manutenção de coleção de trabalho.

5.2.5. Análise molecular

Para análise molecular a cultura foi reativada em placas de PDA e enviadas ao laboratório de genética molecular do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV). De cada placa de Petri foi recolhido o micélio para um tubo Eppendorf e extraído o DNA com o Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen). A identificação molecular da espécie foi feita com base na sequenciação da região ITS, amplificada por PCR com os primers universais ITS5/ITS4. Os produtos amplificados foram purificados e

sequenciados e as sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa BLAST da base de dados GenBank (NCBI).

5.2.6. Dados do clima

Utilizaram-se os dados da estação meteorológica da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (ESA/IPB), localizada na quinta Santa Apolónia em Bragança para aferir a humidade relativa do ar e a temperatura do solo (na superfície e a 15 cm de profundidade).

5.2.7. Análise dos dados

Os dados foram registados em ficheiro excel (.ccv) e avaliados por meio dos testes de Shapiro-Wilk para normalidade dos dados, Levene para homogeneidade de variância e ANOVA seguida por um teste de Duncan para comparação múltipla de médias entre os diferentes tratamentos e as datas de retirada ($\alpha = 0,05$). Estas análises foram realizadas no programa RStudio versão 1.1.1717. Os resultados são apresentados como a percentagem original e são a média das três repetições em cada data analisada. A mortalidade dos insetos foi corrigida pelo tratamento controlo (mortalidade natural) usando a fórmula de Schneider-Orelli (Püntener, 1981), descrita a seguir:

$$\%Mcor = \frac{(\%Mobs - \%Mcont)}{100 - \%Mcont} \times 100$$

Onde:

%Mcor = % Mortalidade corrigida

%Mobs = % Mortalidade observada no tratamento

%Mcont = % Mortalidade no grupo controlo

A análise regressão de Probit (Finney, 1971) foi usada para obtenção dos valores da mortalidade letal média (LT50) e respetivos intervalos de confiança a 95% (IC-95%). O programa MedCalc® foi utilizado para execução das análises de Probit e construção das curvas de dose-resposta.

Para analisar a interação entre os tratamentos e os insetos, os dados das taxas de mortalidade e infecção aos 100 e 220 dias foram agrupados e os analisados em esquema de parcelas subdivididas do Delineamento Inteiramente casualizado pelo teste da ANOVA e teste t de comparação múltipla de médias ($p < 0,05$).

5.1. Resultados

O ensaio realizado em vasos de solo autoclavado confirmou que a estirpe fúngica ATCC 74040 de *B. bassiana* foi capaz de infectar e matar larvas de *C. splendana* e *C. elephas* nas duas concentrações de conídios, nas condições testadas em condições de semi-campo.

5.1.1. Dados do clima

Durante o período do ensaio as menores temperaturas ocorreram no mês de janeiro, variando de $-10,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ à superfície do solo e $-10,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ à 15 cm de profundidade. As temperaturas mais elevadas foram registadas no mês de junho, $14,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ à superfície do solo e $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 15 cm de profundidade (Figura 31).

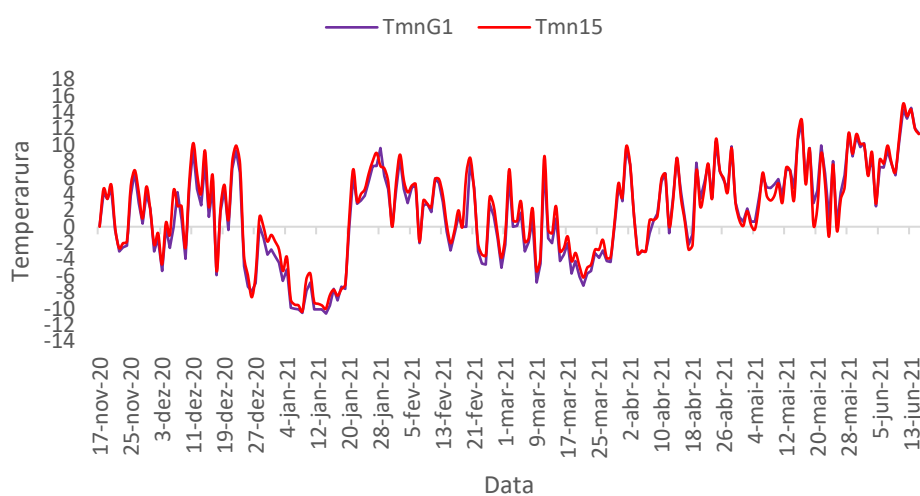


Figura 31. Dados da temperatura do solo a superfície (TmnG1) e a 15 cm de profundidade (Tmn15) registados pela estação meteorológica da Escola Superior Agrária de Bragança.

O período com maiores taxas de humidade (98%) coincide com as menores temperaturas, em janeiro. Enquanto em junho, as temperaturas começaram a elevar-se e a humidade diminuiu, chegando a mínima de 36% (Figura 32).

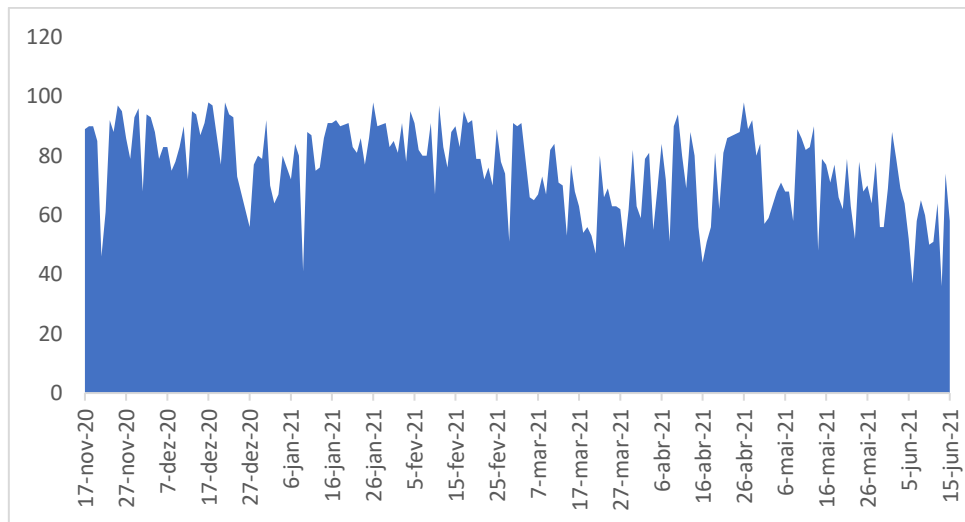


Figura 32. Dados da humidade relativa do ar durante a condução do ensaio registados pela estação meteorológica da Escola Superior Agrária de Bragança.

5.3.2. Mortalidade das larvas

A taxa de mortalidade das larvas refere-se apenas ao número de larvas mortas na data de retirada dos vasos, como referido anteriormente.

As concentrações 5×10^7 (T1) e 1×10^8 (T2) apresentaram maior mortalidade das larvas tanto de *C. splendana* ($p = 0,012$) como *C. elephas* ($p < 0,001$) em comparação com o tratamento controlo (T0) ($\alpha = 0,05$). No entanto, observou-se uma grande variação dos dados ao longo do tempo. As retiradas D8, D15 e D62 apresentaram taxas de mortalidade inferiores a $25,46 \pm 1,19$ e $33,33 \pm 0,27$ para *C. splendana* e *C. elephas* respetivamente. Aos 220 dias essas taxas foram de 58,33% para *C. splendana* e 88,75% para *C. elephas* (Quadro 8).

Quadro 8. Taxa de mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) e *Curculio elephas* (Gyllenhal) nos diferentes tratamentos.

<i>Cydia splendana</i>						<i>p-valor</i>
	D8 c	D15 bc	D62 bc	D100 ab	D220 a	<0,001
T0 B	0	0	4,17±0,54	10,71±0,47	12±0 B	0,3639
T1 A	0 c	25±1,25 bc	19,73±0,47 bc	48±1,41 ab	54,55±0,47 Aa	0,0178
T2 A	0 c	29,17±0,7 b	25,46±1,19 b	36,53±1,44 b	58,33±1,44 Aa	0,05
p-valor	0,012	-	0,6249	0,3984	0,1991	0,0216

<i>Curculio elephas</i>						<i>p-valor</i>
	D8 b	D15 b	D62 b	D100 a	D220 a	<0,001
T0 B	0	12,5±0,27	12,5±0,47 B	11,11±0,47 B	11,11±0,47 B	0,5251
T1 A	6,67±0,27 d	7,64±0,72 c	22,29±0,72 Ab	83,93±0 Aa	85±0,27 Aa	<0,001
T2 A	3,33±0,27 d	26,11±0,82 c	33,33±0,27 Ac	61,21±0,72 Ab	88,75±0 Aa	<0,001
p-valor	<0,001	0,2963	0,182	0,0493	<0,001	<0,001

A, B: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$); a, b: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

5.3.3. Infecção das larvas com *Beauveria Bassiana*

A infecção das larvas foi calculada utilizando todas as larvas retiradas dos vasos, uma vez que a temperatura no início do período do ensaio não era suficiente para causar a morte das larvas, optou-se por investigar também se o fungo era capaz de infetar o inseto nessas condições (Quadro 9).

O tratamento T2 apresentou a maior taxa de infecção das larvas de *C. splendana* com o EFP, seguido de T1 e o tratamento controlo a menor ($p < 0,001$; $\alpha = 0,05$). Apesar de não apresentar mortalidade 8 dias após o tratamento T1 e T2 apresentaram uma taxa de contaminação de 21,74±0,47% cada nesse período. No tratamento T1 a taxa de infecção das larvas de *C. splendana* com o EFP variou de 16,08±0,47% em D62 a 54,55±0,47% em D220. O tratamento T2 apresentou taxas de infecção entre 21,74±0,94% (D8) e 88,64±0,47% (D220). O tratamento controlo apresentou taxas de entre 4,17±0,27% (D8) e 10,71±0,47% (D100).

Quadro 9. Taxa de contaminação de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) e *Curculio elephas* (Gyllenhal) nos diferentes tratamentos.

<i>Cydia splendana</i>							<i>p-valor</i>
	D8 b	D15 b	D62 b	D100 b	D220 a		
T0 C	4,17±0,27	6,67±0,27 B	8,33±0,27 B	10,71±0,47 B	10,71±0 C		0,0064
T1 B	21,74±0,47 b	24,11±0,27 Ab	16,08±0,47 Bb	36,53±0,72 Ab	54,55±0,47 Ba		0,0017
T2 A	21,74±0,94 b	37,5±0,27 Ab	45,45±0,72 Ab	40±0,47 Ab	88,64±0,47 Aa		0,0014
p-valor	<0,001	0,2843	0,0091	0,0085	0,039	<0,001	
<i>Curculio elephas</i>							<i>p-valor</i>
	D8 b	D15 b	D62 b	D100 a	D220 a		<0,001
T0 B	0 B	3,33±0,27	8,33±0,27	7,4±0 B	11,11±0,47 B		0,5251
T1 A	10±0,82 Ab	17,95±0,82 b	25,82±0,54 b	88,42±0,27 Aa	88,75±0 Aa		<0,001
T2 A	3,33±0,27 Bc	28,66±0,47 b	36,36±0,98 b	73,93±0,27 Aa	88,75±0,72 Aa		<0,001
p-valor	<0,001	0,0247	0,087	0,1322	<0,001	<0,001	

A, B: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$); a, b: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

A taxa de contaminação das larvas de *C. elephas* foi maior nos tratamentos T1 e T2 que no tratamento controlo ($p < 0,001$). Assim como a taxa de mortalidade, D100 e D220 apresentaram taxas superiores de contaminação que nas outras datas analisadas. T1 variou de 10±0,82% (D8) a 88,42±0,27% (D100) e 88,75±0% (D220). T2 apresentou variação entre 3,33±0,27 (D8) e 73,93±0,27% (D100) e 88,75±0,72% (D220).

5.3.4. Tempo letal médio LT50

As análises de regressão Probit (Análise de dose - resposta) mostram que o tempo letal médio das larvas de *C. splendana* variaram pouco de acordo com a concentração, dentro do intervalo de confiança (Figura 33). No tratamento T1 o LT50 foi de 238 dias (nível de significância $p < 0,0001$; chi quadrado = 22,467; DF = 1) enquanto o tratamento T2 apresentou LT50 de 236 dias (nível de significância $p < 0,0001$; chi quadrado = 22,289; DF = 1).

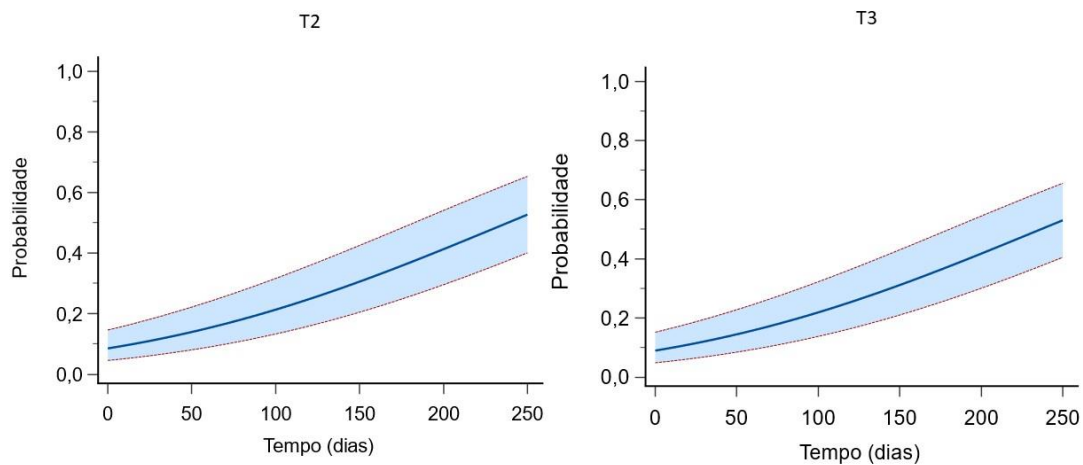


Figura 33. Regressão Probit do tempo letal médio (LT50) de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) nos tratamentos T2 e T3.

O tempo letal médio das larvas de *C. elephas* também variaram pouco com o aumento da concentração, dentro do intervalo de confiança (Figura 34). Obteve-se 50% de mortalidade no tratamento T1 em 161 dias ($p < 0,0001$; chi quadrado = 42,569; DF = 1) e no tratamento T2 o LT50 foi de 166 dias ($p < 0,0001$; chi quadrado = 37,622; DF = 1).

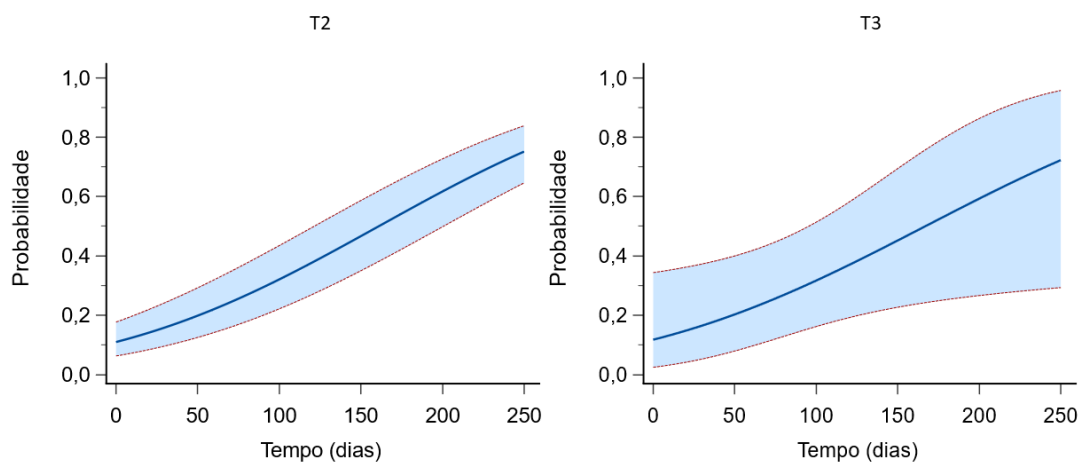


Figura 34. Regressão Probit do tempo letal médio (LT50) de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) nos tratamentos T2 e T3.

Curculio elephas apresentou LT50 menor que *C. splendana* nas duas concentrações testadas, no tratamento T1 as larvas morreram 77 dias antes e no tratamento T2, 70 dias.

Os dados da regressão confirmam os dados da ANOVA de que não existe diferença significativa na mortalidade das larvas de *C. splendana* e *C. elephas* entre as duas diluições testadas e sugere que o *C. elephas* seja mais suscetível a estirpe ATCC 74040 de *B. bassiana*.

5.3.5. Interação Inseto por tratamento em D100 e D220.

A ANOVA e a regressão Probit mostram um efeito significativo do tempo de incubação nas taxas de mortalidade e infecção das larvas com *B. bassiana*. Tanto *C. splendana* como *C. elephas* apresentaram taxas superiores aos 100 e 220 dias. Para análise da interação entre os tratamentos e os insetos estudados agrupou-se somente os dados dessas duas datas de análises.

5.3.5.1. Mortalidade das larvas

A ANOVA mostrou uma taxa de mortalidade maior dos dois insetos quando se utilizou *B. bassiana* (T2 e T3) comparado ao tratamento controlo e não houve diferença entre as doses do produto utilizado. Houve interação significativa entre os fatores inseto e tratamento ($p < 0,05$), o *C. elephas* apresentou maior mortalidade que *C. splendana* tanto no tratamento T2 como T3, mostrando-se mais suscetível a essa estirpe do fungo entomopatogénico (Quadro 10).

Quadro 10. Taxa de mortalidade e interação inseto por tratamento em larvas de *Cydia splendana* (Hübner) e *Curculio elephas* (Gyllenhal) nos diferentes tratamentos.

Inseto	Tratamento			p-valor
	T0 b	T1 a	T2 a	
<i>Cydia splendana</i> B	11,32±0,24 A b	51,39±0,63 Ba	47,38±1,1 Ba	0,005
<i>Curculio elephas</i> A	11,11±0,33 Ab	84,48±0,16 Aa	75,21±0,65 Aa	<0,001
p-valor	0,0469	0,6121	0,0069	0,0232

A, B: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de t ($p < 0,05$); a, b: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

5.3.5.2. Larvas contaminadas

Observou-se a mesma tendência quanto à contaminação das larvas, *C. elephas* mostrou-se mais suscetível a *B. bassiana* que *C. splendana* e no geral. Quando analisamos o efeito do tratamento T1 nos dois insetos observou-se uma maior taxa de infecção com o fungo entomopatogénico em *C. elephas*, não havendo diferença entre os insetos no tratamento T0 e T2 (Quadro 11).

Quadro 11. Taxa de contaminação e interação inseto por tratamento em larvas de *Cydia splendana* (Hübner) e *Curculio elephas* (Gyllenhal) nos diferentes tratamentos.

Inseto	Tratamento			p-valor
	T0 b	T1 a	T2 a	
<i>Cydia splendana</i> B	9,43±0,23 Ab	48,6±0,57 Ba	63,19±1,05 Aa	0,0037
<i>Curculio elephas</i> A	9,26±0,28 Ab	88,6±0,16 Aa	81,32±0,44 Aa	<0,001
p-valor	0,002	0,2918	p<0,001	0,1629

A, B: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de t ($p < 0,05$); a, b: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste t ($p < 0,05$); Letras iguais não diferem entre si significativamente.

5.4. Discussão

Segundo nosso conhecimento, até a atualidade grande parte dos estudos efetuados foram realizados em condições de laboratório (e.g., Aldebis *et al.* 2017; Mkiga *et al.* 2020; Oliveira, 2013; Sarker *et al.* 2020; Torrini *et al.* 2018), sendo que o nosso estudo é pioneiro a simular o efeito da aplicação de *B. bassiana* sobre *C. splendana* e *C. elephas* em sotos em condições ambientais reais.

Fungos entomopatogénicos usados como agentes de controlo biológico frequentemente apresentam ampla gama de hospedeiros (Faria & Wraight, 2007). Diversos estudos laboratoriais mostram a eficácia de *B. bassiana* em insetos da família Tortricidae e Curculionidae testados em ambiente controlado. Sarker *et al.* (2020) relatou que *B. bassiana* pode ser um potencial agente de controlo biológico contra *Grapholita molesta* (Busck). Mkiga *et al.* (2020) observou taxas de mortalidade entre 57,6% e 84,6% para três isolados de *B. bassiana* em *Thaumatotibia leucotreta* (Meyrick). Torrini *et al.* (2018), obteve mortalidade larval de *C. elephas* com a estirpe comercial ATCC 74040 de 77% após 14 dias e 80% após 28 dias. Oliveira (2013) testou quatro isolados de *B. bassiana* em larvas de *C. splendana* e obteve 100% de mortalidade a partir de 5, 10 e 25 dias após a incubação em concentrações 5×10^7 ; 1×10^8 conídios/mL.

Alguns ensaios de campo corroboram os obtidos em laboratório. Sahayaraj & Namachivayam (2011) em estudo de campo com pragas do amendoim na Índia concluiu que o uso de *B. bassiana* aumentou a produção e mostrou persistência no campo para o próximo cultivo. Papparatti & Speranza (2004), num ensaio de campo realizado em Itália entre outubro e maio de 2002, concluiu que as gaiolas tratadas com *B. bassiana* apresentaram um aumento de 35% na mortalidade de larvas de *C. elephas*.

5.4.1. Temperatura do solo durante o ensaio e biologia dos insetos

Geralmente, fungos entomopatogénicos sobrevivem bem na natureza entre 10 °C e 30°C (Mc Coy *et al.* 1988). *Beauveria bassiana* apresenta uma temperatura ótima de crescimento de cerca de 23-28 °C e um mínimo de 5-10 °C e máximo de 30-38 °C (Zimmermann, 2007). Processos dependentes da temperatura, como taxa de

desenvolvimento da doença e nível de doença são maiores na temperatura ótima (Padmaja, 2005).

As condições de temperatura do solo podem representar uma das principais razões para o elevado LT50 das duas espécies, quando comparado a ensaios laboratoriais, onde *B. bassiana* permanece em condições ótimas de temperatura e humidade. Somente 202 dias após a aplicação dos tratamentos, a temperatura do solo permaneceu acima de 10 °C.

A biologia dos insetos estudados neste ensaio é caracterizada pela saída das larvas das castanhas para o estágio de larva hibernante e pupa no solo no outono, período que coincide com temperaturas do solo abaixo do ótimo de desenvolvimento de *B. bassiana*. Contudo, esses insetos mantêm-se enterrados no solo como larva hibernante e pupa até o final da primavera do ano seguinte, período em que a temperatura do solo aumenta e se torna favorável ao crescimento desse fungo. As primeiras capturas de adultos na região de Trás-os-Montes em 2020 foram registadas no final de julho.

O importante no uso de *B. bassiana* como método de controlo microbiológico dessas duas espécies é que na altura da penetração das larvas no solo elas sejam contaminadas. Posteriormente, quando o solo atingir a temperatura e a humidade necessários para o desenvolvimento, o fungo vai crescer e provocar a morte dos insetos antes.

Esta capacidade foi confirmada nos resultados da última data de retirada de vasos (D220) no dia 15/06, com taxas de mortalidade de 58,33% (T2) e 88,75% (T2) respetivamente para *C. splendana* e *C. elephas*, os resultados também apontam para presença de *B. bassiana* em 88% (T3) das larvas de *C. splendana* e 88,75% (T2 e T3) de *C. elephas*.

A estratégia de realizar o ensaio no solo tem a ver com a estratégia que pensamos ser mais conveniente para o sucesso do controlo destes insetos, uma vez que aplicações à árvore, na altura em que as larvas eclodem e penetram nos ouriços, coincide com período de humidade atmosférica muito baixas e radiação solares muito altas, os principais fatores de inativação de *B. bassiana*. Acresce a dificuldade de tratamento de árvores de grande dimensão. A aplicação ao solo, na altura de queda da castanha (finais de outubro), com pulverização apenas na projeção da copa permite um trabalho mais fácil, rápido e com melhores condições de sobrevivência do fungo por maiores períodos.

Nessa altura a radiação solar é bem menos, a humidade do solo elevada e possibilita o contato do fungo com a larva quando saem da castanha e enterram-se no solo.

5.5. Conclusões

O presente estudo apresenta resultados promissores de desempenho para *B. bassiana* estirpe ATCC 74040 como agente de controlo biológico contra insetos carpófagos, pragas-chave da cultura do castanheiro, com taxas de 90% de infeção quando atingidas condições ideais de temperatura e humidade para desenvolvimento do fungo e colonização em *C. splendana* e *C. elephas*.

Não houve diferenças significativas na taxa de mortalidade entre os tratamentos T1 (5×10^7) e T2 (1×10^8), porém, foram significativamente mais elevados que o controlo. Analisando a infeção das larvas, o tratamento T2 obteve melhores resultados, seguido de T1 e T0.

O tratamento dirigido às larvas quando se enterram no solo para pupar, coincide com condições ambientais menos letais para o fungo, embora também com temperaturas baixas, o que retarda o desenvolvimento do fungo no interior dos insetos e a sua morte. A eficácia do fungo entomopatogénico nessas condições de estudo deve ser considerada durante o período de tempo em que os insetos passam enterrados no solo, ultrapassando muito os valores obtidos em ensaios de laboratório, porém, com baixa emergência de adultos na primavera e adultos com capacidade de causar prejuízo e se reproduzir possivelmente comprometida.

Os nossos resultados sugerem que *C. elephas* é mais suscetível ao fungo entomopatogénico *B. bassiana* que *C. splendana*.

Para estudos futuros sugere-se observar a sanidade dos adultos emergidos após o contato com *B. bassiana*.

5.6. Bibliografia

Aldebis, H. K., Romero, Á., Hatem, A., & Vargas-Osuna, E. (2017). Carpophagous insects of holm oak in southern Spain and their susceptibility to *Beauveria bassiana* native isolates. 127, 1-5.

Barrón, G. (2001). George Barrons Website on Fungi. Obtenido de *Beauveria bassiana*: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>. Acedido em novembro de 2021.

Cooke, R. (1977). The biology of symbiotic fungi. John Wiley e Sons.

Culliney, T. W. (2014). Crop losses to arthropods. *In* Integrated pest management (pp. 201-225). Springer, Dordrecht.

Faria, M. R., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological control*, 43(3), 237-256.

Finney, D. J. (1971). Probit analysis, Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Inglis, G. D., Goettel, M. S., & Butt, T. M. (2001). for Managing Insect Pests. Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential, 23.

Jamal, Z. (2008). Application de *Beauveria bassiana* contre la punaise terne *Lygus lineolaris* (palisot de beauvois) (hémiptères: miridés) dans les vignobles. Université du Québec à Montréal.

Lambert, N. (2010). Lutte biologique aux ravageurs: applicabilité au Québec (Doctoral dissertation, Université de Sherbrooke (Canada)).

Llácer, E., Santiago-Álvarez, C., & Jacas, J. A. (2013). Could sterile males be used to vector a microbiological control agent? The case of *Rhynchophorus ferrugineus* and *Beauveria bassiana*. *Bulletin of entomological research*, 103(2), 241-250.

Mantzoukas, S., & Eliopoulos, P. A. (2020). Endophytic entomopathogenic fungi: A valuable biological control tool against plant pests. *Applied Sciences*, 10(1), 360.

Mc Coy, C.W., Samson R.A. & Boucias D.G. (1988). Entomogenous fungi. *In*: Ignoffo C.M. (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 296

Mkiga, A. M., Mohamed, S. A., du Plessis, H., Khamis, F. M., Akutse, K. S., & Ekesi, S. (2020). *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: pathogenicity, horizontal transmission, and their effects on reproductive potential of *Thaumatotibia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of economic entomology*, 113(2), 660-668.

Oliveira, I. V. (2013). Entomopathogenic fungi associated to *Prays oleae*: isolation, characterization and selection for biological control (Doctoral dissertation, Universidade do Minho (Portugal)).

Omkar, O. (2016). Ecofriendly Pest Management for Food Security. Elsevier Ltd.

Padmaja, V. (2005). Role of entomopathogenic fungi in insect pest management. *Green Pesticides for Insect Pest Management*, 172.

Paparatti, B., & Speranza, S. (2004). Biological control of hazelnut weevil (*Curculio nucum* L., Coleoptera, Curculionidae) using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. (Deuteromycotina, Hyphomycetes). In VI International Congress on Hazelnut 686 (pp. 407-412).

Püntener, W. (Ed.). (1981). Manual for field trials in plant protection. Ciba-Geigy.

Romero, P. (2013). El control de los insectos carpófagos del castaño (*Castanea sativa*) en Andalucía mediante captura masiva con feromona sexual y evaluación de la actividad insecticida de hongos entomopatógenos.

Sabbahi R. (2008). Use of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in a strategy of phytosanitary management of the main insect pests in strawberry plantations. University of Quebec (Canada).

Sahayaraj, K., & Namachivayam, S. (2011). Field evaluation of three entomopathogenic fungi on groundnut pests. *Tropicicultura*, 29(3), 143-147.

Sarker, S., Woo, Y. H., & Lim, U. T. (2020). Laboratory Evaluation of *Beauveria bassiana* ARP14 Against *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Current Microbiology*, 77(9), 2365-2373.

Shah, P. A., & Goettel, M. S. (1999). Directory of microbial control products. Society for invertebrate pathology, Division of microbial control.

Torrini, G., Benvenuti, C., Binazzi, F., Marianelli, L., Paoli, F., Sabbatini Peverieri, G., & Roversi, P. F. (2018). Entomopathogenic fungi and nematodes against larvae of the chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae): A laboratory evaluation. *International Journal of Pest Management*, 64(4), 287-293.

Zimmermann, G. (1986). The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of applied Entomology*, 102(1-5), 213-215.

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553-596.