

**Potencial de Controlo Biológico de *Beauveria bassiana* (Bals.-
Criv.) Vuill. sobre as Pragas-Chave do Castanheiro em Trás-os-
Montes**

Marcos Eli dos Santos Kohler

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau
de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade
Tecnológica Federal do Paraná - campus Pato Branco*

Orientado por

Albino António Bento

Maria Eliza Cota e Souza

Thiago de Oliveira Vargas

Bragança

2024

Marcos Eli dos Santos Kohler

**Potencial de Controlo Biológico de *Beauveria bassiana* (Bals.-
Criv.) Vuill. sobre as Pragas-Chave do Castanheiro em Trás-os-
Montes**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Pato Branco.

Bragança

Instituto Politécnico de Bragança – IPB

2024

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me guiar e orientar, fortalecendo meu ser e proporcionando luz em momentos de dificuldades. "Não temas, pois eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te esforço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça." **Isaías 41:10:**

A toda minha família que desde cedo incentivou meus estudos e fez o possível e impossível para me ver conquistar meus sonhos me acompanhando, incentivando e apoiando toda minha jornada acadêmica, e trazendo conforto nos meus dias mais difíceis, sem vocês nada disso seria possível, vocês são minha base meu alicerce e inspiração.

Ao meu orientador Prof. Dr Albino Antônio Bento e co orientadora do IPB Maria Eliza Cota e Souza, ao meu co orientador da UTFPR Prof. Dr Thiago de Oliveira Vargas, por todo apoio prestado e paciência durante meu processo, me ajudando tanto na evolução acadêmica quanto pessoal. Grato por me guiarem.

A todos meus amigos que acompanharam esse sonho torcendo por mim me incentivando e ajudando como podiam, com palavras de conforto apoio e afeto, vocês são de fundamental importância na minha vida. Especialmente a Cami P. Richter por estar do meu lado ao decorrer de todo esse processo de mestrado, sendo luz, aconchego, conforto e carinho nos momentos de dificuldade, me mantendo determinado e resiliente. A todos vocês meu mais sincero carinho e admiração por tudo que são e fizeram por mim, nos momentos ruins e bons, celebrando cada conquista comigo, sou grato por cada um de vocês em minha vida.

E por fim meus agradecimentos às instituições que tornaram possível a realização deste sonho. Ao programa de Dupla Diplomação entre a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e o Instituto Politécnico de Bragança (IPB), que me proporcionou toda essa oportunidade de aprendizado, crescimento pessoal e profissional.

Obrigado.

RESUMO

O castanheiro europeu *Castanea sativa* (Mill.) e seus frutos são uma importante fonte de renda em Portugal na região de Trás-os-Montes. Dentre as pragas que atacam a espécie, destacam-se a *Cydia splendana* (Hübner, 1799) e o *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836): insetos que causam danos significativos nas castanhas inviabilizando o produto e gerando perda de produção. Buscando diminuir o dano destas pragas, e o impacto negativo que os químicos podem trazer ao meio ambiente, surgem alternativas de controlo biológico. Entre elas, está o uso de fungos entomopatogénicos como a *Beauveria bassiana*, porém, sua efetividade varia de acordo com a cepa que é utilizada, com as condições ambientais e experimentais que está submetida e com as características dos insetos. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi avaliar em campo a eficácia de três estirpes de *B. bassiana* contra *C. splendana* e *C. elephas* em três diferentes tempos de aplicação das larvas, no intuito de avaliar o período da viabilidade de uma aplicação do fungo no solo. O experimento foi conduzido em um souto localizado na freguesia de Samil, no distrito de Bragança, Portugal. Foram avaliados quatro tratamentos, isolado LC39GF10 (TA) e isolado A67GF09 (TB) (regionais), Controlo - água destilada (TC) e isolado ATCC74040 (TD) (comercial) - com concentração de conídios de (1×10^8) em todos respetivamente. Cada tratamento possuiu 18 vasos, cada um com dez larvas de cada uma das pragas, colocadas na superfície dos vasos, em três diferentes tempos após a pulverização dos fungos nos respetivos vasos e instalação em campo. (T1) colocadas após 1 dia da instalação, (T2) após oito dias e (T3) após 15 dias. As larvas foram retiradas em duas estações, em que após, as culturas fúngicas foram isoladas em laboratório e a confirmação da mortalidade pelo fungo foi feita por análise molecular. Os resultados obtidos demonstraram que nas condições testadas, os isolados regionais (TA) e (TB) tiveram um melhor desempenho que o comercial (TD); com maior eficácia de infecção das larvas nos tempos (T1) e (T2); com mortalidade superior para *C. splendana*. *B. bassiana* nas condições testadas, demonstra potencial de uso na proteção integrada de pragas.

Palavras-chave: *Castanea sativa*; *Cydia splendana*; *Curculio elephas*; *Beauveria bassiana*; controlo de pragas; condições de campo

ABSTRACT

The European chestnut *Castanea sativa* (Mill.) and its fruits are an important source of income in Portugal, particularly in the Trás-os-Montes region. Among the pests affecting this species, *Cydia splendana* (Hübner, 1799) and *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836) stand out as insects causing significant damage to the chestnuts, rendering the product unviable and leading to production losses. In an effort to reduce the damage caused by these pests and the negative environmental impact of chemical treatments, biological control alternatives have emerged. One such method is the use of entomopathogenic fungi like *Beauveria bassiana*. However, its effectiveness varies depending on the strain used, environmental and experimental conditions, and the characteristics of the insects. In this context, the objective of the study was to evaluate, in the field, the efficacy of three *B. bassiana* strains against *C. splendana* and *C. elephas* across three different larval application times, aiming to assess the duration of the fungus's viability when applied to the soil. The experiment was conducted in a chestnut orchard located in the parish of Samil, in the district of Bragança, Portugal. Four treatments were evaluated: the LC39GF10 isolate (TA) and the A67GF09 isolate (TB) (regional isolates), a control with distilled water (TC), and the ATCC74040 isolate (TD) (commercial isolate), all applied at a conidial concentration of (1×10^8) . Each treatment involved 18 pots, each containing ten larvae of each pest species placed on the surface of the pots at three different times after the fungal spray application and field installation. The timings were: (T1) one day after installation, (T2) eight days after, and (T3) 15 days after. The larvae were retrieved in two stages, after which fungal cultures were isolated in the laboratory, and mortality due to the fungus was confirmed by molecular analysis. The results demonstrated that, under the tested conditions, the regional isolates (TA and TB) performed better than the commercial isolate (TD), achieving higher infection efficacy on the larvae during (T1) and (T2) timings, with greater mortality observed for *C. splendana*. *B. bassiana*, under the tested conditions, shows potential for use in integrated pest management.

Key-words: *Castanea sativa*; *Cydia splendana*; *Curculio elephas*; *Beauveria bassiana*; pest control; field conditions

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 2.1 Castanheiro europeu <i>Castanea sativa</i> (mill.) | 3 |
| 2.2 Importância econômica | 5 |
| 2.3 Pragas alvo de pesquisa | 9 |
| 2.3.1 <i>Cydia splendana</i> (Hübner, 1799)..... | 9 |
| 2.3.2 <i>Curculio elephas</i> (gorgulho) (Gyllenhal, 1836)..... | 13 |
| 2.4 Controlo biológico | 17 |
| 2.4.1 Fungos entomopatogénicos..... | 19 |
| 2.4.2 <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.- Criv.) Vuill..... | 20 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 3.1 Tratamentos | 23 |
| 3.2 Preparação dos vasos | 23 |
| 3.3 Insetos | 24 |
| 3.4 Instalação | 24 |
| 3.5 Avaliação da mortalidade das larvas | 25 |
| 3.6 Isolado fúngico | 26 |
| 3.7 Dados meteorológicos | 26 |
| 3.8 Análise de dados | 27 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 29 |
| 4.1 Eficiência de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.- Criv.) Vuill no controlo da praga <i>Cydia splendana</i> (Hübner, 1799) | 29 |
| 4.1.1. Eficácia das cepas de <i>B. bassiana</i> na mortalidade de <i>C. splendana</i> em diferentes tempos de aplicação das larvas..... | 29 |
| 4.1.2. Influência dos diferentes tempos de aplicação das larvas na eficácia das cepas de <i>B. bassiana</i> na mortalidade de <i>C. splendana</i> | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.3 Discussão..... | 42 |
| 4.2 Eficiência de <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.- Criv.) Vuill no controlo da praga <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal, 1836)..... | 45 |
| 4.2.1. Eficácia das cepas de <i>B. bassiana</i> na mortalidade de <i>C. elephas</i> em diferentes tempos de aplicação das larvas | 45 |
| 4.2.2. Influência dos diferentes tempos de aplicação das larvas na eficácia das cepas de <i>B. bassiana</i> na mortalidade de <i>C. elephas</i> | 51 |
| 4.2.3 Discussão..... | 55 |
| 4.3 Dados meteorológicos | 57 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 58 |
| 6 REFERÊNCIAS | 59 |
| 7 ANEXOS | 72 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Castanheiro europeu <i>Castanea sativa</i> (Mill.). | 4 |
| Figura 2. (a). ouriço; (b). formato da castanha. | 5 |
| Figura 3. Produção Mundial de castanhas por região em 2022 (adaptado de FAOSTAT, 2022). | 6 |
| Figura 4. Distribuição da produção de castanha (<i>Castanea sativa</i> Mill.) na Europa. A área apresentada pela coloração verde mostra a distribuição nativa do castanheiro europeu, e em amarelo-escuro a distribuição introduzida e naturalizada. Fonte: Caudullo <i>et al.</i> , 2017. | 6 |
| Figura 5. Área colhida de castanhas com casca em Portugal. (adaptado de FAOSTAT, 2022). | 7 |
| Figura 6. Produção de castanhas no continente em toneladas por região (Adaptada de INE, 2024). | 8 |
| Figura 7. Destinos e quantidades exportadas em toneladas no ano de 2013 e 2023 (Adaptada de INE, 2024). | 8 |
| Figura 8. Larva de <i>Cydia splendana</i> (Hübner). | 11 |
| Figura 9. Dano causado pela larva de <i>Cydia splendana</i> (Hübner). | 11 |
| Figura 10. Ovos de <i>Cydia splendana</i> (Hübner). Fonte: Souza (2022). | 12 |
| Figura 11. Inseto adulto de <i>Cydia splendana</i> (Hübner). Fonte: GBIF (2024). | 12 |
| Figura 12. Larva <i>Curculio elephas</i> (L. Gyllenhal). | 15 |
| Figura 13. Larva de <i>Curculio elephas</i> (L.Gyllenhal) e o hibernáculo de terra onde hibernam. Fonte: Souza (2022). | 16 |
| Figura 14. Inseto adulto de <i>Curculio elephas</i> (L.Gyllenhal). Fonte: GBIF (2024). | 16 |
| Figura 15. Esquema resumido da metodologia prática em ordem de ação. | 24 |
| Figura 16. Local onde foram enterrados os vasos na aldeia de Samil, Bragança. | 25 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Placa com fungos isolados..... | 26 |
| Figura 18. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T1 – um dia pós aplicação das larvas) sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$). | 30 |
| Figura 19. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T2 – oito dias após aplicação das larvas) sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam que não houve diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$). | 31 |
| Figura 20. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T3 – 15 dias após aplicação das larvas) sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 32 |
| Figura 21. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T1 – um dia após aplicação das larvas) sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 34 |
| Figura 22. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T2 – oito dias após aplicação das larvas) sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 35 |
| Figura 23. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T3 – 15 dias após aplicação das larvas) sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 36 |
| Figura 24. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TA: LC39GF10) na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).. | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 25. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TB: A67GF09), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 40 |
| Figura 26. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TC: controle), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 41 |
| Figura 27. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 42 |
| Figura 28. Mortalidade de larvas de <i>Curculio elephas</i> (L.Gyllenhal) em (T1 - um dia após aplicação das larvas), sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferenças significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 46 |
| Figura 29. Mortalidade de larvas de <i>Curculio elephas</i> (L.Gyllenhal) em (T2 - oito dias após aplicação das larvas), sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferenças significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 47 |
| Figura 30. Mortalidade de larvas de <i>Curculio elephas</i> (L.Gyllenhal) em (T3 - 15 dias após aplicação das larvas), sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferenças significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 48 |
| Figura 31. Mortalidade de larvas de <i>Curculio elephas</i> (L.Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TA: LC39GF10), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 51 |
| Figura 32. Mortalidade de larvas de <i>Curculio elephas</i> (L.Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TB: A67GF09), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 52 |

| | |
|---|----|
| Figura 33. Mortalidade de larvas de <i>Curculio elephas</i> (L.Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)..... | 53 |
| Figura 34. Dados de temperatura média em cada mês durante a condução do ensaio registados pela estação meteorológica da Escola Superior Agrária de Bragança... .. | 71 |
| Figura 35. Dados da humidade relativa do ar durante a condução do ensaio registados pela estação meteorológica da Escola Superior Agrária de Bragança... .. | 72 |

Índice de quadros

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Classificação taxonómica do castanheiro europeu. | 3 |
| Quadro 2. Classificação taxonómica do bichado-da-castanha, <i>Cydia splendana</i> (Hübner, 1799). | 10 |
| Quadro 3. Classificação taxonómica de <i>Curculio elephas</i> (L. Gyllenhal). | 14 |
| Quadro 4. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$). | 29 |
| Quadro 5. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$). | 33 |
| Quadro 6. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, dentro de cada tratamento (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Sem presença de letras indica que não houve diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$). | 37 |
| Quadro 7. Mortalidade de larvas de <i>Cydia splendana</i> (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, dentro de cada tratamento (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$). | 38 |
| Quadro 8. Mortalidade de larvas de <i>Curculio elephas</i> (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no | |

inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).
..... 46

Quadro 9. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Sem presença de letras indica que não houve diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$). 49

Quadro 10. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, dentro de cada tratamento (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).
..... 50

Quadro 11. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, dentro de cada tratamento (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Sem presença de letras indica que não houve diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).
..... 54

1. INTRODUÇÃO

Das espécies que compõem o gênero *Castanea*, pertencente a família das Fagaceae, a *Castanea sativa* (Mill) se destaca por representar grande potencial econômico e cultural em diversas regiões, com destaque na Europa onde é nativa da região (Ferreira-Cardoso & Pimentel-Pereira, 2007). A *C. sativa*, ou em nome comum, o castanheiro europeu, além de contribuir para a preservação da biodiversidade e na manutenção de ecossistemas, apresenta valor na produção de madeira e na indústria alimentícia. Em Portugal, a castanhicultura (Gomes-Laranjo *et al.*, 2007) tem destaque na região Norte do país, em especial na zona de Trás-os-Montes, que é responsável por cerca de 77,6% da produção nacional da castanha europeia (INE, 2024).

Porém, a produção da castanha apresenta alguns desafios, que incluem condições ambientais e mudanças climáticas, e o ataque de pragas e doenças; fatores que podem impactar o cultivo e o rendimento da produção (Bounous & Marinoni, 2005). Quanto às pragas, o manejo é historicamente dependente de pesticidas químicos e compostos químicos sintéticos, que em contrapartida ao controlo das pragas-alvo, seu uso indiscriminado tem causado prejuízos ao meio ambiente, afetando outras espécies e levando ao surgimento de pragas secundárias, gerando outros problemas associados e a longo prazo, gera ineficácia contra a praga-alvo (Agro Estadão, 2019; Marques *et al.*, 2004).

Por meio do problema apresentado, pesquisadores e agricultores têm buscado alternativas sustentáveis e eficazes para realizar o controlo de pragas (Avtzis *et al.*, 2019). Assim, o controlo biológico vem se destacando como promissora estratégia para minimizar ou até substituir o uso de defensivos químicos. Seu princípio é usar agentes biológicos para realizar o controlo natural de pragas, com a introdução de determinados organismos, como por exemplo, fungos entomopatogénicos, no local de controlo da praga-alvo, assim, realizando o controlo com eficácia e com redução dos impactos ambientais (Hoy *et al.*, 1998).

Com o escopo de ajudar no contexto apresentado, foi desenvolvido um estudo com *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., um fungo entomopatogénico amplamente investigado e utilizado como agente de controlo microbiológico de pragas agrícolas. Uma promissora ferramenta para a proteção integrada de pragas do castanheiro europeu. Sua

capacidade de infetar e controlar efetivamente um amplo espectro de insetos-praga, aliada à sua relativa segurança para o meio ambiente e aos organismos não-alvo, torna-o uma opção atrativa para os sistemas de produção agrícola (Souza *et al.*, 2023).

Duas das principais pragas que atacam o castanheiro europeu na região de Trás-os-Montes são a *Cydia splendana* (Hübner, 1799) e *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836), (Souza, 2022) e por serem consideradas pragas-chave da cultura, foram os insetos em estudo.

No tópico 2, "Referencial Teórico", realizou-se uma revisão bibliográfica que demonstra a importância econômica e cultural do castanheiro europeu, bem como as características dos insetos em estudo, *C. splendana* e *C. elephas*, para contextualizar o potencial dano que estas pragas podem causar, e entender seus mecanismos de ação, auxiliando na escolha das condições experimentais ideais. Ainda, ressaltaram os princípios do controlo biológico, com foco no controlo por fungos entomopatogénicos, com destaque para *B. bassiana* devido ao seu potencial de eficácia no controlo microbiológico, o que evidencia a relevância do estudo.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de três diferentes isolados do fungo entomopatogénico *B. bassiana* sendo duas estirpes nativas e uma comercial no controlo de duas pragas-chave da cultura do castanheiro, *C. Splendana* e *C. elephas* em três diferentes tempos de contato das pragas com o fungo, no intuito de avaliar o período da viabilidade de diferentes estirpes do fungo no solo em uma aplicação em Trás-os-Montes – Bragança, Portugal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

No capítulo atual será apresentado uma revisão de conteúdos bibliográficos para dar contexto ao estudo, começando com uma breve apresentação do castanheiro europeu. Em seguida, aborda-se sua importância económica e posteriormente uma introdução ao controlo biológico com foco no controlo microbiológico e no fungo entomopatogénico estudado, *B. bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.

2.1 Castanheiro europeu *Castanea sativa* (mill.)

A castanha apresenta grande importância em Portugal, em vários setores como económicos culturais e ambientais, com destaque em diversas regiões do país. Uma árvore que pertence à ordem Fagales, família Fagaceae, e género *Castanea* de espécie arbórea angiosperma dicotiledónea, (Quadro 1). A espécie apresenta em determinada época do ano, perda das folhas, pois secam e caem, essa característica é chamada de caducifólia. As folhas possuem pecíolo e estipula e são dispostas de forma alternada (Gomes-Laranjo *et al.*, 2007). Possui tamanho de médio a grande porte chegando a atingir de 30 a 35 metros de altura (Conedera *et al.*, 2016).

Quadro 1. Classificação taxonómica do castanheiro europeu.

| | |
|-------------|-------------------------------------|
| Reino | Plantae |
| Sub-reino | Embryophyta (Cornophyta) |
| Divisão | Spermatophyta (Anthophyta) |
| Sub-Divisão | Angiospermae (Magnoliophytina) |
| Classe | Dicotyledonae (Magnoliopsida) |
| Sub-Classe | Hamamelidae |
| Ordem | Fagales |
| Família | Fagaceae |
| Sub-Família | Castaneoideae |
| Gênero | <i>Castanea</i> |
| Espécie | <i>Castanea sativa</i> Mill., 1768. |

Segundo Gomes-Laranjo *et al.*, (2007), o castanheiro (Figura 1) representa uma espécie florestal autóctone que desempenha funções cruciais na conservação da biodiversidade e na preservação da integridade do solo contra a erosão.



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

A nível mundial existem doze espécies de castanheiro (Barreira, 2010). Que são divididos entre América do Norte, Europa e Ásia (Gomes-Laranjo *et al.*, 2007). Dentro do continente europeu a única espécie que se apresenta de forma natural é *C. sativa* (Henriques & Borges, 2017). Trata-se da variedade cultivada na Europa, que demonstra uma excelente capacidade tanto para a produção de frutos quanto para a obtenção de madeira, seja em sistemas de cultivo de talhadia ou em fustas altas (Gomes-Laranjo *et al.*, 2007)

Os frutos do castanheiro encontram-se envolvidos por um invólucro espinhoso, conhecido como ouriço (Figura 2 (a)). As castanhas possuem um formato achatado (Figura 2 (b)) e podem ser encontrados de uma a três castanhas por invólucro (Henriques & Borges, 2017).

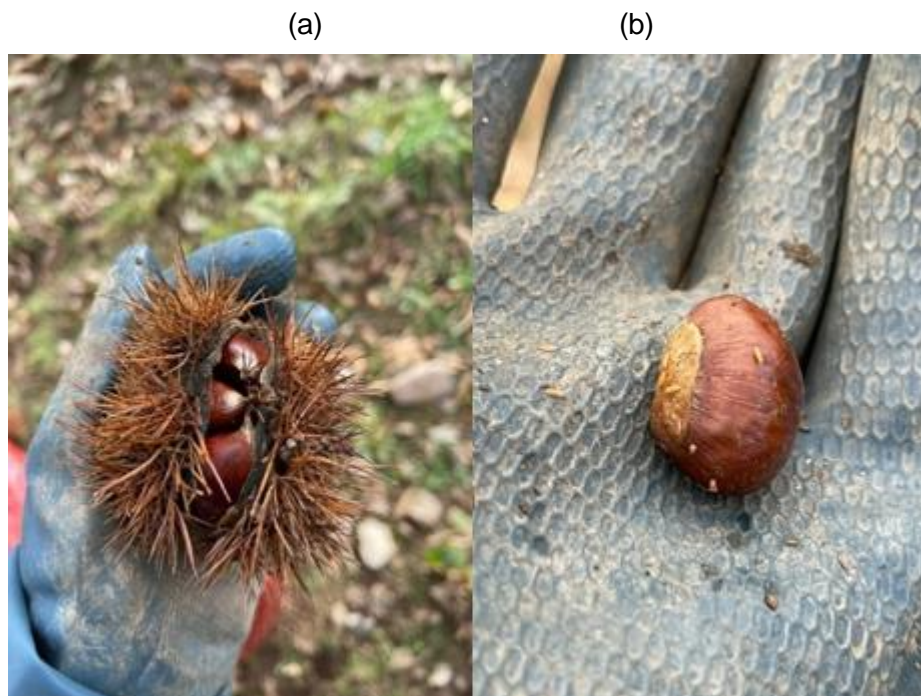


Figura 2. (a). Ouriço; (b). Castanha.

A cultura se torna mais favorável em regiões mediterrânicas devido a sua adaptação ao clima e à altitude. Segundo Conedera *et al.*, (2016), a espécie tem preferência por zonas de solos frescos e bem drenados, com 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.

2.2 Importância econômica

A castanha desempenha um papel crucial na indústria alimentar, na alimentação humana e animal, contribui para a produção de derivados alimentícios e produção de madeira de boa qualidade (Baltazar, 2015). Segundo dados da FAOSTAT (2022), a castanha possui uma produção mundial liderada pela Ásia que contribui com 1.725.15,33 toneladas (t), responsável por 80,29% da produção em 2022. Já a Europa conta com 15% da produção mundial no ano de 2022 totalizando 318.920,08 t (Figura 3).

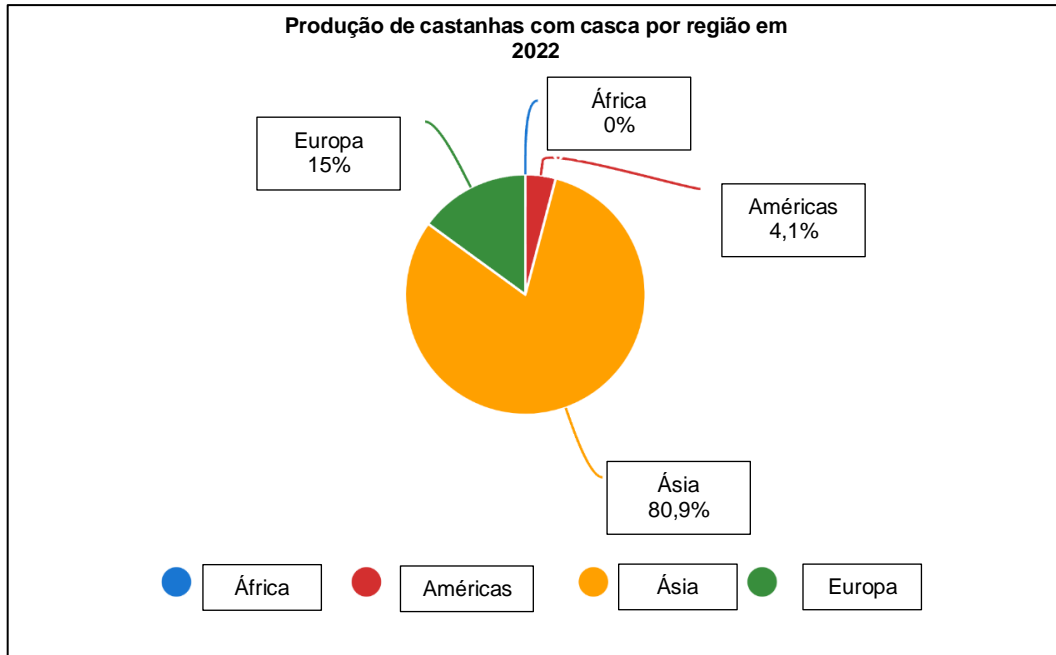


Figura 3. Produção mundial de castanhas por região em 2022 (adaptado de FAOSTAT, 2022).

Segundo a FAOSTAT (2022), dentro dos 27 países da união europeia dez possuem produção significativa. Os quatro maiores produtores são Itália, Grécia, Portugal e Espanha. Portugal com uma produção de 29.360 t de castanha com casca. A distribuição da produção de castanha na Europa apresentada na (Figura 4), mostra a área nativa do castanheiro europeu, e a distribuição introduzida e naturalizada.



Figura 4. Distribuição da produção de (*Castanea sativa* Mill.) na Europa. A área apresentada pela coloração verde mostra a distribuição nativa do castanheiro europeu, e em amarelo-escuro a distribuição introduzida e naturalizada. Fonte: Caudullo *et al.*, 2017.

Para Portugal, a produção de castanha e seus produtos derivados não apenas contribui para a economia, mas também contribui significativamente para a criação de empregos, principalmente em regiões rurais por exigir mão de obra. Também ostenta um valor cultural e histórico marcante em Portugal, constituindo uma tradição enraizada em várias regiões do país (Gomes-Laranjo *et al.*, 2007).

A cada ano a cultura do castanheiro europeu ganha mais espaço em Portugal, no ano de 2011 a área colhida foi cerca de 34.648 hectares, não tiveram muitas mudanças no tamanho da área colhida até o ano de 2016, a partir de 2017 até 2019 a área colhida por castanheiros teve um aumento significativo para a produção do país (Figura 5), saindo de 35 mil hectares e chegando a 51 mil hectares, já no ano de 2022, Portugal teve 49 mil hectares de área colhida, onde observa-se que houve uma leve queda dessa área colhida de castanha (FAOSTAT, 2022).

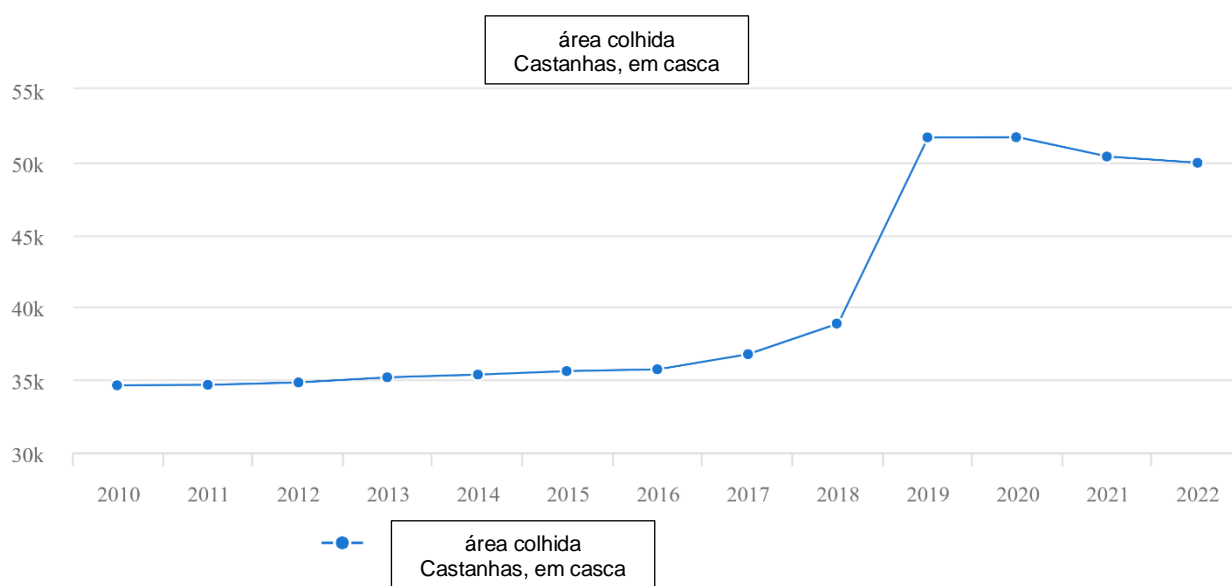


Figura 5. Área colhida de castanhas com casca em Portugal. (adaptado de FAOSTAT, 2022).

Conforme disponibilizado pelo Instituto Nacional de Estatística em Portugal (INE, 2024), no ano de 2011 a produção foi de 21.800 t e para o ano de 2023 a produção de 23.825 t, dentro do ano de 2023 no continente a região norte concentrou a maior produção com 18.477 t, aproximadamente 77,6% da produção do ano, seguido pela região central com 4.734 t (Figura 6).

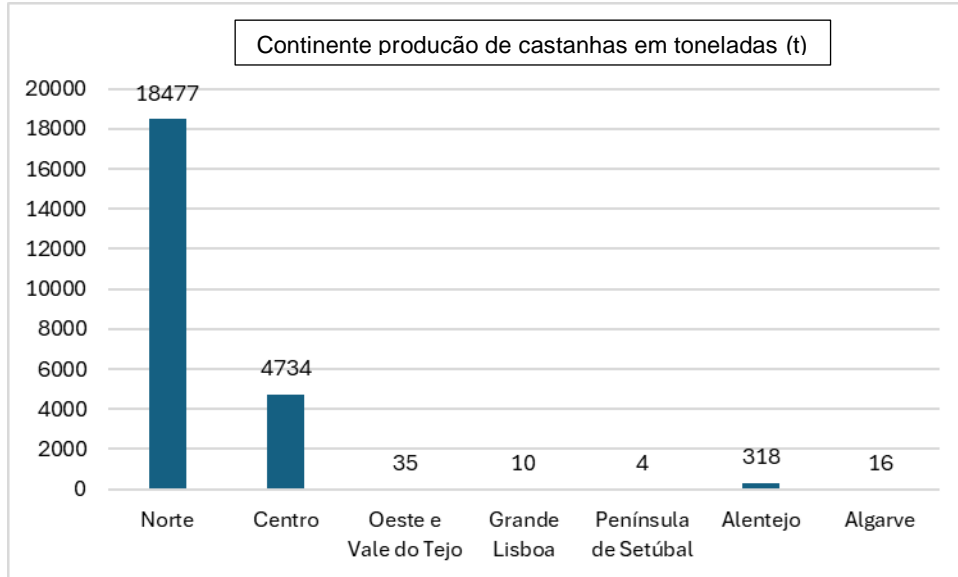


Figura 6. Produção de castanhas no continente em toneladas por região (Adaptada de INE, 2024).

A castanha proveniente de Portugal é conhecida pela sua qualidade no mercado externo. Os principais destinos para exportação são: França, Itália, Espanha e Brasil, dentre todos os países o maior importador de castanhas frescas ou secas, com casca de Portugal no ano de 2023 foi a Espanha com 4.746 t de castanhas compradas (Figura 7) (INE, 2024).

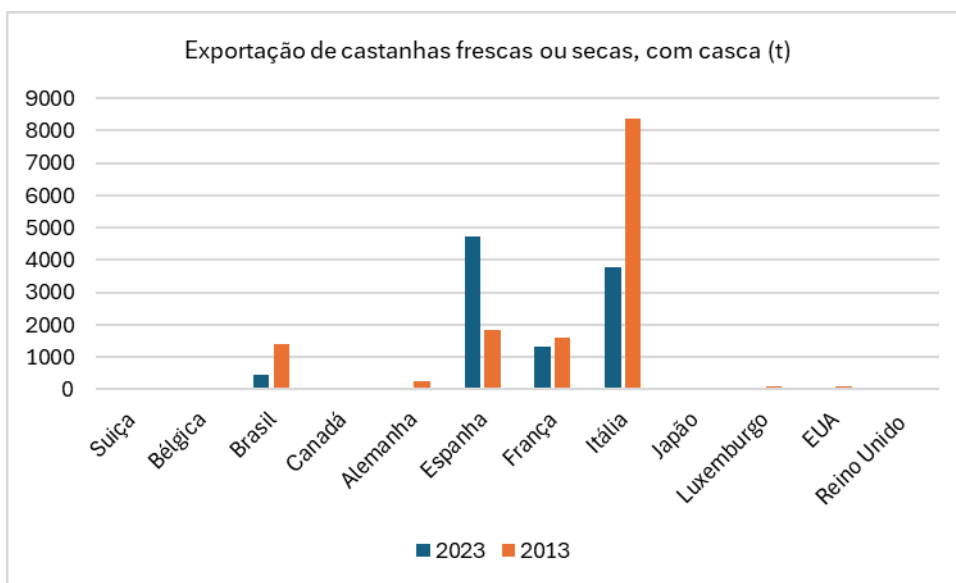


Figura 7. Destinos e quantidades exportadas em toneladas no ano de 2013 e 2023 (Adaptada de INE, 2024).

2.3 Pragas alvo da pesquisa

O ataque de um complexo de pragas é identificado como um dos principais problemas nas áreas cultivadas com castanheiros, ou soutos. O ataque dessas pragas pode causar danos significativos às castanhas. Esses danos depreciam seu valor comercial e resultam em perdas de rendimento para agricultores e empresas de comercialização e transformação (Bento *et al.*, 2007). A seguir será abordado informações referentes a duas pragas importantes na cultura do castanheiro, *Cydia splendana* (Hübner, 1799) e *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836).

2.3.1 *Cydia splendana* (Hübner, 1799)

A *C. splendana* possui distribuição por toda Europa e na região de Trás-os-Montes é responsável por principais prejuízos nos frutos da castanha (Bento *et al.*, 2007). Distribuída por parte da Europa, encontrada em países como Hungria, Grécia, Itália, França e Turquia, atacando principalmente castanheiros e carvalhos (Jósvai *et al.*, 2016). A espécie se adaptou bem em diferentes ambientes, o que facilitou a dispersão nas áreas onde essas plantas são predominantes, também foi registada na Tunísia, mostrando a expansão de seu alcance (Bengtsson *et al.*, 2014; Ezzine *et al.*, 2022).

É um inseto que se alimenta dos frutos e possui uma geração anual, ataca plantas do género *Castanea*, *Quercus*, *Fagus* e *Juglans* (Navarro, 2019). O principal hospedeiro do bichado da castanha é o castanheiro-europeu, mas também ataca frutos de outras espécies de carvalho, como *Quercus robur* L. e *Quercus rubra* L. (Myczko *et al.*, 2017; Giannetti *et al.*, 2022).

Conhecida como uma das principais pragas da castanha em Portugal, atingindo prejuízos de até 40% de castanhas atacadas (Bento *et al.*, 2022). Com exceção a seus danos diretos, sua presença também implica em custos de manejo adicionais e além de reduzir a comercialização dos frutos afetados (Cuestas *et al.*, 2020; Ferracini *et al.*, 2020).

O bichado da castanha como é conhecida a *C. splendana* pertence à família Tortricidae e ordem Lepidoptera (Quadro 2). Passam por um processo de desenvolvimento conhecido

como metamorfose completa, contendo quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. *C. splendana*, completa um ciclo reprodutivo anual, os adultos emergindo para voar durante o período de junho a julho na Europa Central e de julho a setembro no sul da Europa e Hungria (Conedera *et al.*, 2016).

Quadro 2. Classificação taxonómica do bichado-da-castanha, *Cydia splendana* (Hübner, 1799).

| Taxonomia <i>Cydia splendana</i> (Hübner, 1799). | |
|---|------------------------|
| Reino | Animalia |
| Filo | Arthropoda |
| Classe | Insecta |
| Ordem | Lepidoptera |
| Família | Tortricidae |
| Gênero | <i>Cydia</i> |
| Espécie | <i>Cydia splendana</i> |

Fonte: GBIF (2024).

Durante o estágio larval, (Figura 8) esses insetos se alimentam dos frutos, criando galerias em seu interior resultando na perda completa do seu valor comercial. Conforme descrito no trabalho de Bento *et al.*, (2007) pode-se observar que na região de Trás-os-Montes há a presença de adultos entre início de julho até outubro mostrando valores maiores perto do final de agosto e início de setembro.



Figura 8. Larva de *Cydia splendana* (Hübner).

Os danos às castanhas são ocasionados pela alimentação das larvas (Figura 9), que as perfuram, resultando em perda de valor comercial. A lagarta se desenvolve ao longo de

cinco estágios, possui uma coloração branca translúcida, um pouco amarelada e um comprimento de 12 a 16 mm, no último estágio. Conforme o interior danificado, repleto de excrementos, frequentemente apresenta infestações fúngicas (Pereira *et al.*, 2018).



Figura 9. Dano causado pela larva de *Cydia splendana* (Hübner) em castanhas de *C. sativa*.

Em relação a fisiologia dos ovos de *C. splendana* (Figura 10), estes possuem coloração esbranquiçada quando feito a postura com um tamanho aproximado de 0,55 x 0,72 mm, posteriormente pode se identificar o embrião por conta de um anel visível na cor vermelho-púrpura (Bento *et al.*, 2022). Estes são posturados geralmente nas nervuras das folhas mais próximas aos ouriços jovens, sem preferência de lado para postura (Bogenschütz, 1991). Depois de posturados os ovos se dá o tempo de eclosão das larvas de no máximo três semanas, assim se deslocando ao ouriço abrindo fendas e penetrando nas castanhas (Bento *et al.*, 2022).

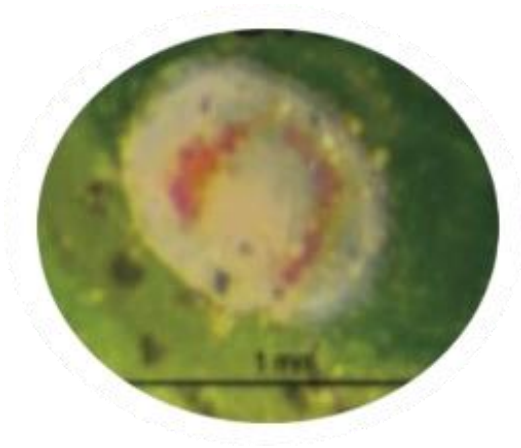


Figura 10. Ovos de *Cydia splendana* (Hübner). Fonte: Souza (2022).

Após desenvolvimento dentro do fruto da castanha a lagarta faz um buraco a abandonando e cai no solo para se enterrar, formar casulo e hibernar, onde permanece o inverno e primavera nesta fase para posteriormente ir a fase de pupa (Navarro, 2019). Os insetos adultos (Figura 11) possuem hábitos noturnos. Os machos vivem de 10 a 12 dias, máximo 21 dias (Romero, 2013) Os ovos são depositados durante 4 a 5 dias, podendo haver postura de até 300 ovos (Pombo *et al.*, 2018; Romero, 2013).



Figura 11. Inseto adulto de *Cydia splendana* (Hübner). Fonte a: GBIF (2024).

Como observado por Bento *et al.*, (2007) analisando a curva de voo da *C. splendana* em Trás-os-Montes, a população do inseto é variável entre localizações e também varia a cada ano, podendo ser associados a práticas culturais. Os fatores limitantes naturais para populações de *C. splendana* incluem condições ambientais e agentes de controle biológico. Estressores abióticos, como a seca, podem influenciar as taxas de infestação,

reduzindo a disponibilidade de hospedeiros adequados para as larvas (Canelo *et al.*, 2021). Souza (2022) relate que os insetos são suscetíveis ao ataque de parasitoides em todas as fases de desenvolvimento, entretanto, características de pupação e mobilidade na fase adulta dificultam a exposição dos insetos a predadores. Em relação a inimigos naturais são citados alguns na Europa sendo eles parasitoides como *Endromopoda detrita* (Holmgreen, 1860), *Glypta parvicaudata* (Bridgmanos, 1889) e dípteros como *Bessa selecta* (Meigen, 1824) e *Pseudoperichaeta nigrolineata* (Walker, 1853) (Meijerman & Ulemberg, 2000; Yu *et al.*, 2004).

O monitoramento efetivo das populações é essencial para o manejo da praga nas culturas de castanha. Armadilhas com feromonas são comumente utilizadas para monitorar as populações adultas, permitindo intervenções no momento adequado (Delisle *et al.*, 2004; Aguin-Pombo *et al.*, 2008). Essas armadilhas, que atraem os machos com feromonas específicos, ajudam a estimar a densidade populacional e o período de emergência, essenciais para prever potenciais danos (Jósvai *et al.*, 2016).

Produtos associados a luta química que são autorizados em Portugal são as substâncias ativas deltametrina, clorantroliprol (Bento *et al.*, 2022). O controle químico, embora eficaz, deve ser usado com moderação para evitar impactos ambientais e o desenvolvimento de resistência (Ferracini *et al.*, 2020; Tarasco *et al.*, 2023).

O momento das aplicações de inseticidas deve coincidir com o ciclo de vida da mariposa, preferencialmente durante o período de postura/penetração das larvas nos frutos (Marrão *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2023).

2.3.2 *Curculio elephas* (gorgulho) (Gyllenhal, 1836)

O *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836) conhecido como gorgulho ou gorgulho-da-castanha, se trata de um besouro (Coleóptera) pertencente à família Curculionidae (Quadro 3), mais comumente encontrado em castanheiro e plantas do género *Quercus* como o carvalho e o sobreiro. Sua possível origem é da região paleártica oriental da Europa, de partes do norte da África e da Turquia no Oriente Médio (Venette *et al.*, 2003). Pode ser encontrado nas regiões mediterrâneas, abrangendo o sul da Europa, incluindo países como Espanha, Itália e Grécia, estendendo-se até partes do norte da África (Velez-Gavilan, 2022; CABI & EPPO, 2023).

Quadro 3. Classificação taxonômica de *Curculio elephas* (L. Gyllenhal).

| Taxonomia <i>Curculio elephas</i> | |
|-----------------------------------|---|
| Reino | Animalia |
| Filo | Arthropoda |
| Classe | Insecta |
| Ordem | Coleoptera |
| Família | Curculionidae |
| Gênero | <i>Curculio</i> C.Linnaeus, 1758 |
| Espécie | <i>Curculio elephas</i> L.Gyllenhal, 1836 |

Fonte: GBIF (2024).

O gorgulho passa por metamorfose completa, incluindo quatro estágios sendo eles: ovo, larva, pupa e adulto. Como afirmado por Venette *et al.*, 2003, é um inseto que se reproduz apenas uma vez por ano com ciclo vida definido que acontece dentro de um ano, sem contar a fase de larval que pode apresentar diapausa no solo geralmente por 2 a 3 anos a mais. A diapausa faz com que as larvas não morram com condições desfavoráveis, como seca ou falta de alimento, que são comuns em climas mediterrâneos (Soula & Menu, 2003). O ciclo do gorgulho se da com emergência de adultos para acasalamento e postura, ocorre geralmente de agosto ao início de outubro, com o começo das chuvas de outono (Menu, 1993). Os insetos adultos emergem do solo durante o final do verão, em meados de agosto até o início de outubro, juntamente com a maturação das castanhas (Menu & Desouhant, 2002).

A fase de pupa ocorre no solo, com as larvas se transformando em pupas até o final da primavera ou início do verão do ano seguinte. O tempo de pupação e a emergência como adultos são influenciados por fatores ambientais, como os níveis de umidade, que afetam a condição do solo e a disponibilidade de castanhas (Soula & Menu, 2005). As larvas (figura 12) geralmente hibernam no solo após perfurá-lo, onde podem permanecer por um a três anos antes de se tornarem pupas e emergirem como adultos (Drekić & Mihajlović, 2011).



Figura 12. Larva *Curculio elephas* (L. Gyllenhal).

As fêmeas depositam seus ovos dentro das castanhas, os quais podem ser encontrados entre os meses de agosto e setembro, geralmente deixando um único ovo por castanha (Bonal & Muñoz, 2009). A fertilidade média de uma fêmea é de 30 até 50 ovos e o período de acasalamento acontece após 7 a 15 dias a seguir a emergência (Santos *et al.*, 2020). A (Figura 13) demonstra a larva em conjunto com seu hibernáculo de terra que é o local onde passa o período de hibernação.



Figura 13. Larva de *Curculio elephas* (L.Gyllenhal) e o hibernáculo de terra onde hibernam. Fonte: Souza (2022).

Os adultos (Figura 14) possuem aparelho bucal comprido e medem entre 6 e 10 mm de comprimento, possui formato oval, com predominância de cor amarelada.



Figura 14. Inseto adulto de *Curculio elephas* (L.Gyllenhal). Fonte: GBIF (2024).

Além disso, a relação entre *C. elephas* e os castanheiros é influenciada por fatores ecológicos mais amplos, incluindo a presença de outros parasitas e estresses ambientais, como secas e doenças (Keleş, 2024; Waldboth & Oberhuber, 2009). A doença do cancro da castanheira, causada pelo fungo *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr, complica ainda mais a dinâmica, pois pode enfraquecer as árvores e torná-las mais suscetíveis a infestações por pragas como o gorgulho (Keleş, 2024; Waldboth & Oberhuber, 2009).

É considerado uma praga secundária na cultura do castanheiro. As larvas do inseto penetram as castanhas deixando um orifício pouco perceptível onde fazem galerias dentro da castanha deixando excrementos no seu interior a tornando inviável para comercialização. Segundo Santos *et al.*, (2020) no ano de 2018 os danos causados pelo gorgulho registaram valores entre 1 a 7% de castanhas atacadas.

Técnicas de monitoramento eficazes envolvem o uso de armadilhas com iscas de feromonas para capturar adultos do gorgulho, especialmente durante o período de oviposição (Leskey & Wright, 2004). Outras formas de monitorização de adultos, são armadilhas de *pitfall* que são recipientes enterrados no solo onde os insetos caem de tal forma que não conseguem sair ou a técnica de pancadas que consiste em abanar os ramos do castanheiro no interior de um saco entomológico (Bento *et al.*, 2022). Sua monitorização é dificultada por conta destes métodos não serem tao eficazes na captura

de indivíduos devido ao seu ciclo de desenvolvimento ser a maior parte no solo dificultando a estimativa da praga. Dado a dificuldade para monitorização do inseto seu controlo passa a ser mais complicado por não ser fácil determinar a fase exata para aplicar as técnicas de controlo. Na Espanha é identificado a ação do parasitoide *Schizoprymnus longiseta* (Herrich-Schaffer, 1838) (Hymenoptera: Braconidae), um inimigo natural de *C. elephas* (Romero, 2013).

Com a adoção de práticas culturais como remoção ou destruição dos frutos atacados, que se encontram nos sotos e mobilização de solo pouco profunda, pode ser possível reduzir os níveis de população desta praga, outra prática que pode ser adotada que auxilia na diminuição da infestação é o armazenamento das castanhas em locais adequados como locais cimentados, que evitam que as larvas pupem no solo (Bento *et al.*, 2022).

Métodos de controlo biológico, como o uso do fungo entomopatogénico *B. bassiana*, demonstraram eficácia no controlo de populações de *C. elephas* em condições de campo, testando uma cepa do fungo *B. bassiana* em diferentes concentrações (Souza *et al.*, 2023). Como adoção do controlo químico para a luta contra o inseto, Portugal possui as substâncias ativas deltametrina, clorantroliprol, que estão autorizadas, recomendando sua aplicação na altura da postura da praga ao fim dos meses de agosto e setembro (Bento *et al.*, 2022).

2.4 Controlo biológico

Utilizando organismos vivos o controlo biológico regula as pragas no ambiente, gerando equilíbrio nos ecossistemas (Jeffers & Chong, 2021). Busca diminuir o uso de químicos e seus possíveis impactos negativos, por meio de uma abordagem mais sustentável. O controle é feito por meio da inserção de predadores, patógenos, parasitoides e competidores naturais, promovendo o controlo das pragas de forma eficaz (Parra *et al.*, 2024).

O controle é feito por meio de diversas formas, como introdução de organismos exóticos no ambiente, conservação e promoção de inimigos naturais já presentes, e uso de produtos biológicos específicos para o controlo de pragas e doenças (Parra *et al.*, 2024). Inimigos naturais, podem atuar como controlo biológico regulando as populações de pragas agrícolas. Os inimigos naturais podem ser introduzidos gerando um equilíbrio no

ecossistema, controlando as pragas quando atingem níveis danosos aos produtores, buscando obter alimentos de maneira mais sustentável (Fontes & Valadares-Ingliš, 2020).

Por exemplo, colaborando com a regulação natural da (traça da maçã) *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) alguns parasitoides himenópteros foram identificados no seu controlo (Beers *et al.*, 2016; Mills *et al.*, 2016). Outra estratégia utilizada na regulação de pragas que apresentou eficiência é a disrupção de acasalamento. Como afirmado por Ferracini *et al.*, 2021 estudos demonstram que essa técnica com intermédio de feromonas, oferece uma alternativa funcional para reduzir populações de pragas em pomares. Eles invadem o inseto hospedeiro e liberam bactérias que causam doenças, levando à morte da praga (Tarasco *et al.*, 2023).

Já dentro dos estudos de controlo biológico inclui-se o controlo microbiológico, que é uma forma de controlo biológico que faz o uso de microrganismos, dentre eles bactérias e fungos, como objetivo para controlo de pragas ou doenças (Parra *et al.*, 2024). Em seu estudo, Geraldo (2024), observou que microrganismos do gênero *Bacillus* tem alto potencial como agentes de controlo, bactérias pouco utilizadas como *Bacillus lutfi* (Liu *et al.*, 2017) (S2965), *Bacillus pumilus* (Meyer e Gottheil, 1901) (S2942), *Bacillus toyonensis* (Jiménez *et al.*, 2013) (S2929) e *Priestia megaterium* (de Bary, 1884) (S2936) mostram eficácia como uma estratégia a diversificar as tecnologias do mercado.

Além disso, o uso de nematóides entomopatogénicos representa uma via promissora para o controlo biológico, pois junto com suas bactérias simbióticas, são reconhecidos por sua eficácia no manejo de várias populações de pragas de insetos. Os nematoides entomopatogénicos, *Heterorhabditis baujardi* (Phan *et al.*, 2003), *Heterorhabditis indica* (Poinar *et al.*, 1992) e *Heterorhabditis noenieputensis* (Malan *et al.*, 2014) são promissores agentes de controlo da traça-minadora *Holocacista capensis* (Van Nieukerken & Geertsema, 2015) como demonstrado no estudo de Steyn *et al.* (2019) realizado na África do Sul. Porto & Garcia (2022) falam do uso de um produto com o microrganismo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) na mortalidade de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae), e de utilizar o fungo como forma de controlo alternativo do percevejo e apresentando o resultado de 80% de mortalidade dos insetos após quatro dias de inoculação e 100% de mortalidade após seis dias.

O mercado de produtos biológicos apresenta alto crescimento por demonstrar inovações aliadas a microrganismos nativos do solo que atuam na defesa das plantas e podendo as

fazer crescer, sendo incorporados no substrato de plantio e aplicação foliar (Mariano *et al.*, 2004).

O controlo biológico é dividido em três modalidades: o clássico, com a introdução de inimigos naturais que estabelecem controlo; o aumentativo, com liberações de forma programada para controlo imediato; e o de conservação, que pretende proteger a microfauna e microflora naturais do ecossistema, reduzindo o uso de químicos e promovendo ambientes adequados (Jeffers & Chong, 2021).

2.4.1 Fungos entomopatogénicos

Os fungos entomopatogénicos são ótimas ferramentas no controlo biológico. Colonizam várias espécies de pragas, as controlando com menos problemas ao meio ambiente em comparação com os produtos químicos, e mantendo uma alta eficiência e facilidade de produção (Santos *et al.*, 2021). Com diversos mecanismos, eles conseguem infetar as pragas, ocasionando a epizootia, seguindo seu ciclo de vida liberando esporos, e assim, colonizam novos hospedeiros (Ekka, 2023).

Dos principais gêneros em pesquisas de controlo biológico destacam-se *Beauveria*, *Metarhizium* e *Lecanicillium*, cada um com suas características específicas para infetar os alvos a serem controlados e faixas específicas de hospedeiros (Amutha & Banu 2015; Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2021). Em seu trabalho, Waquil *et al.* (2006), é exposto que fungos, bactérias e vírus entomopatogénicos têm-se demonstrado altamente eficientes na redução das populações de pragas em zonas agrícolas.

Os fungos entomopatogénicos conseguem reduzir a população de pragas se fixando na superfície externa desses insetos e, então, penetrando nas camadas de proteção destes hospedeiros, já que liberam enzimas como quitinases e lipases. A infecção é facilitada, portanto, pois estas enzimas quebram as barreiras naturais dos insetos (Meng *et al.*, 2022; Hasaballah *et al.*, 2017). Uma vez dentro do hospedeiro os fungos se multiplicam causando uma infecção no corpo todo e levando eventualmente à morte do inseto. Em condições de temperatura e humidade ideais, o esporo entrando em contato com o inseto, penetra a cutícula alcançando a hemolinfa. As hifas se desenvolvem e colonizam todo o corpo do inseto, resultando em sua morte (Amaro, 2003). Esse processo de infecção pode

desencadear epizootias, onde um grande número de insetos sucumbe à infecção fúngica, impactando significativamente as populações de pragas (Beemrote *et al.*, 2024).

Porem possuem limitações que podem afetar a sua utilização, fatores como temperatura, precipitação, radiação solar e humidade (Inglis *et al.*, 2001). Para que qualquer agente de controlo microbiano seja eficaz, o desempenho técnico é fundamental, entretanto isso deve ser ligado a outros parâmetros sendo eles, a eficácia prática que se trata de custo-benefício, sua viabilidade comercial visando a rentabilidade, sua sustentabilidade buscando o controlo a longo prazo e a segurança que pode fornecer ao público utilizador (Gelernter & Lomer, 2000).

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

Beauveria bassiana é um fungo muito pesquisado e com várias formulações registadas, que se diferenciam pelas cepas e concentração. Mostra ser eficiente na proteção integrada de pragas (Xiao *et al.*, 2012). Segundo trabalhos de Xiao *et al.*, (2012); Zhang *et al.*, (2020); Melo *et al.*, (2008), o fungo pode atuar em diversos insetos como besouros, moscas e mosquitos transmissores de doenças. Pertence à família Clavicipitaceae e é classificado na ordem Hypocreales. Pode viver em diversos ambientes naturais diferentes como solo ou insetos. Os fungos sobrevivem no solo tanto como micélio saprofítico quanto como propágulos dormentes até encontrar um hospedeiro adequado no entorno ou estabelecendo relações com plantas como endófitos (Imoulan *et al.*, 2017).

Quando entra em contato com o hospedeiro, os esporos assexuados se desenvolvem, e as hifas invadem o corpo do inseto, levando a uma infecção generalizada. Esse processo causa morte do hospedeiro, e depois o fungo esporula e libera novos conídios para infetar novos hospedeiros (Melo *et al.*, 2008). Sua capacidade viral pode variar com influência de fatores climáticos e diversidade genética (Zhang *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2012).

A ação da *B. bassiana* é afetada por fatores ambientais. Sua temperatura ótima de desenvolvimento é de 25°C, e o tempo letal médio também é afetado pela temperatura (Vestergaard *et al.*, 1995; Zimmermann, 2007; Zhumatayeva *et al.*, 2022). Conforme a temperatura sofre alteração, a viabilidade e a patogenicidade podem ser impactadas.

Temperaturas fora da faixa ideal podem comprometer a ação do fungo, por dificultarem o crescimento dos esporos e diminuir a atividade do fungo (Medo *et al.*, 2021).

Outro fator que afeta a ação do fungo comprometendo a eficácia é exposições a radiação ultravioleta (UV). A radiação UV junto com altas temperaturas causam perda da viabilidade dos conídios a campo e podem levar a sua destruição e perda de infetividade (Yu *et al.*, 2022). Santiago-Alvarez *et al.*, (2006) apresentaram que a radiação UV afeta significativamente a eficácia de *B. bassiana* contra o percevejo, *Lygus lineolaris* (Linnaeus, 1758), em morangos, reduzindo a viabilidade dos conídios expostos.

A humidade também afeta o desempenho de *B. bassiana*. Para que os esporos tenham um crescimento de forma eficiente e para que o fungo tenha altas taxas de infeção, a humidade deve estar em uma média de 85% (Lozano-Gutiérrez & España-Luna, 2008). As mudanças climáticas podem gerar períodos de seca, o que pode resultar na diminuição dos níveis de humidade e, conseqüentemente, a redução da eficiência do fungo. Por exemplo, uma humidade mais baixa pode comprometer a sobrevivência e a habilidade viral do fungo, já que a ativação dos esporos depende da humidade (Lozano-Gutiérrez & España-Luna, 2008). Altas temperaturas aliadas a baixa humidade podem ser especialmente danosas para a sobrevivência dos esporos de *B. bassiana* (Jaronski, 2010).

O tempo necessário para que *B. bassiana* infete e cause a morte do inseto-alvo varia conforme a espécie de inseto, o estágio de desenvolvimento do inseto, a concentração de conídios aplicada e as condições ambientais (Pedrini, 2022; Lee *et al.*, 2014; Sukhu *et al.*, 2019). Perante condições de laboratório no controlo do percevejo, *Thaumastocoris peregrinus* (Carpintero & Dellapé, 2006) (Hemiptera: Thaumastocoridae) isolados de *B. bassiana* testados causaram mortalidade confirmada entre 37% e 80,1% após 10 dias da aplicação, apresentando maior percentual médio de mortalidade diária 39,9% no quarto dia após o contato do inseto com o substrato pulverizado (Lorencetti *et al.*, 2018). Segundo trabalho de Tonet & Reis (1979) ninfas de quinto estágio de desenvolvimento, tiveram um índice de mortalidade de 100%, dez dias após a pulverização do inóculo.

O tempo de aplicação e as práticas de manejo também são fatores a ser levados em conta, em especial em climas e lugares que as condições naturais podem diminuir a capacidade de ação do fungo (Yu *et al.*, 2022; Lozano-Gutiérrez & España-Luna, 2008;

Zhang *et al.*, 2020). Win *et al.*, (2022) falam que a capacidade viral de *B. bassiana* tende a diminuir ao longo do tempo que os esporos assexuados permanecem sem contato com um hospedeiro, também demonstram que a eficácia do fungo contra o percevejo-do-feijão, *Riptortus pedestris* (Fabricius, 1775) (Hemiptera: Alydidae), depende de uma aplicação no momento adequado, já que a exposição prolongada a condições desfavoráveis pode inviabilizar os conídios e sua capacidade de infecção.

No trabalho de Zhang *et al.*, (2020) compreende-se que os conídios do fungo podem permanecer viáveis no ambiente por longos períodos de tempo, mas sua concentração e habilidade viral podem diminuir devido aos fatores aos quais é exposto como radiação UV, níveis de humidade, temperatura e competição microbiana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tratamentos

Com objetivo da avaliação da eficácia do fungo *B. bassiana* como agente de controlo biológico contra as pragas *C. splendana* e *C. elephas*, realizou-se um ensaio a semi-campo (vasos) com três isolados de *B. bassiana*, LC39GF10 e A67GF09 da coleção de microorganismos entomopatogénicos da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança e a estirpe ATCC74040 do produto comercial Naturalis® (CBC (Europa) S.R.L. – BIOGARD Division, Cesena, Itália). Foram avaliados 4 tratamentos, LC39GF10 (TA), A67GF09 (TB), Controlo com água destilada (TC), ATCC74040 (TD). Para cada tratamento foram utilizados 18 vasos, cada vaso possuía 10 larvas de *C. splendana* e 10 de *C. elephas* totalizando (180 larvas de cada inseto por tratamento). Foi utilizada a mesma concentração de conídios (1×10^8) para todos os tratamentos e no tratamento controlo foi utilizada água destilada.

As larvas foram colocadas após a instalação dos vasos a campo e respetivamente nos tempos de aplicação, (T1) um dia após a instalação, (T2) oito dias após a instalação e (T3) quinze dias após a instalação. Os vasos de cada tratamento (Figura 15) foram identificados e distribuídos casualmente.

3.2 Preparação dos vasos

Os vasos feitos de polietileno com dimensões de (7 cm de diâmetro, 23 cm de profundidade) possuíam furos em seu fundo, os quais foram isolados com uma rede de polietileno malha fina e preenchidos com 5 cm de argila expandida e novamente isolados com rede, após isso, completado com o substrato (solo e perlita na proporção de 1:1). Esta mistura foi esterilizada em autoclave duas vezes a 120°C por 20 minutos. Após o preenchimento dos vasos, foi realizada a pulverização das estirpes e da água destilada com um borrifador manual, as pulverizações foram feitas 24 horas antes da instalação dos vasos. Colocaram-se se à superfície de cada vaso as larvas de *C. splendana* e de *C. elephas* para que se enterrem. Os vasos foram cobertos com uma rede malha fina que impossibilita a saída das larvas ou a entrada de outros animais.

A (Figura 15) representa um esquema ilustrativo resumido da metodologia prática em ordem de ação para melhor entendimento do planeamento experimental.



Figura 15. Esquema resumido da metodologia prática em ordem de ação.

3.3 Insetos

As larvas de *C. splendana* (estágio larval 4 e 5) e *C. elephas* (estágio larval 3) foram coletadas manualmente de forma aleatória em uma indústria local de nome social Alcino Augusto Nunes, de processamento das castanhas, logo após a saída dos frutos correspondendo ao início de novembro. Em seguida, levadas para o laboratório e separadas para adicionar a superfície dos vasos dentro de algumas horas.

3.4 Instalação

No dia 6 de novembro de 2023, os vasos foram enterrados dispostos de forma aleatória em um souto localizado na freguesia de Samil, distrito de Bragança, Portugal (6°45'52.97" N, 41°46'50.14"W).



Figura 16. Instalação dos vasos na aldeia de Samil, Bragança.

3.5 Avaliação da mortalidade das larvas

A eficácia da aplicação das estirpes de *B. bassiana* sobre as larvas de *C. splendana* e de *C. elephas* foi avaliada em 2 retiradas distintas correspondendo a inverno e primavera, após a ação dos tratamentos.

Para cada data de retirada foram coletados 9 vasos para cada um dos quatro tratamentos e sendo assim 3 vasos por tempo de aplicação, totalizando 36 vasos por retirada com um total de 90 larvas de cada inseto por tratamento fúngico. Os vasos foram transportados até o laboratório onde foi utilizado um tabuleiro para colocar o substrato de cada repetição como forma de facilitar a remoção das larvas hibernantes dos insetos em estudo.

As larvas de cada espécie, após serem coletadas dos vasos (mortas ou vivas), 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, cortadas em quatro partes com bisturi e colocadas em meio de cultura ágar batata dextrose (PDA), com adição de antibióticos (Chloramphenicol Supplement, Oxoid Ltda., Wade Road, UK). As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C na

ausência de luz para determinar a presença de esporulação externa de acordo com (Zimmermann 1986; Llácer *et al.*, 2013). Após 8 dias de incubação, o crescimento de *B. bassiana* nas larvas foi registado observando o crescimento do fungo na superfície das larvas no meio de cultura.

3.6 Isolado fúngico

O fungo obtido de cada larva foi transferido e repicado para uma nova placa de PDA e colocado novamente a 25 ± 1 °C na ausência de luz. Este procedimento foi repetido até que culturas puras fossem obtidas e a produção de esporos fosse observada, para manter a coleção da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (ESA-IPB) (Figura 17).



Figura 17. Placa com fungos isolados.

3.7 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos foram recolhidos diariamente durante o período em que os vasos estiveram enterrados no campo pela estação automática (Vantage Pro2 Sensor Suite ou (ISS) Weather Station) da Escola Agrária de Bragança do Instituto Politécnico de Bragança (ESA/IPB), localizado na Quinta Santa Apolónia em Bragança, Portugal. A temperatura média foi medida em graus Celcius (°C), a precipitação foi medida em milímetros (mm/dia), e a humidade relativa do ar em percentagem (%).

3.8 Análise de dados

A análise estatística foi realizada utilizando o software R (R Core Team, 2021) pacotes de R Utilizados: agricolae: para o teste de Tukey HSD com agrupamento / dplyr: para manipulação e resumo dos dados. Para ajustar os resultados considerando a mortalidade natural, aplicou-se a correção de Abbott (Abbott, 1925). A fórmula utilizada foi:

$$\%Mcor = (\%Mobs - \%Mcont) \times 100 / 100 - \%Mcont$$

onde:

%Mcor = % de mortalidade corrigida;

%Mobs = % de mortalidade observada no tratamento;

%Mcont = % de mortalidade no grupo controle.

Valores negativos resultantes desta correção foram ajustados para zero. Para estabilizar a variância e aproximar os dados de uma distribuição normal, aplicou-se uma transformação arco-seno à raiz quadrada das percentagens corrigidas:

$$\text{Dados Transformados} = \arcseno(\sqrt{(\text{Mortalidade Corrigida} / 100)})$$

Realizou-se uma Análise de Variância (ANOVA) de fator único nos dados transformados para avaliar as diferenças entre os tratamentos. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0.05$). Para comparações post-hoc entre os tratamentos, aplicou-se o teste de Tukey HSD (Honestly Significant Difference). As diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas com um nível de confiança de 95%.

Os resultados foram resumidos calculando-se a média da percentagem de mortalidade corrigida e o erro padrão para cada tratamento.

As análises climáticas foram tabuladas em planilhas Excel.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A discussão dos resultados foi dividida em duas partes, uma para cada inseto, sendo apresentados os resultados e posteriormente as discussões.

4.1 Eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.- Criv.) Vuill no controlo da praga *Cydia splendana* (Hübner, 1799)

4.1.1. Eficácia das cepas de *B. bassiana* na mortalidade de *C. splendana* em diferentes tempos de aplicação das larvas

4.1.1.1 Inverno

No inverno (Quadro 4), podem-se observar os seguintes resultados.

Quadro 4. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

| Tempo de aplicação | Tratamento | <i>Cydia splendana</i> | p-valor |
|--------------------|------------|------------------------|---------|
| T1 | A | 76,8 ± 6,42 a | < 0,001 |
| | B | 80,48 ± 7,84 a | |
| | C | 5,88 ± 3,4 b | |
| | D | 49 ± 7,84 a | |
| T2 | A | 43,5 ± 11,3 a | 0,066 |
| | B | 9,61 ± 4,52 a | |
| | C | 8,23 ± 8 a | |
| | D | 20,7 ± 8,08 a | |
| T3 | A | 20,98 ± 3,54 a | 0,036 |
| | B | 19,64 ± 10,63 a | |
| | C | 2,38 ± 1,19 b | |
| | D | 2,84 ± 0,73 b | |

No primeiro tempo de aplicação (T1) (Figura 18) o tratamento (TA) apresentou uma mortalidade média de $76,8 \pm 6,42$, enquanto o tratamento (TB) obteve $80,48 \pm 7,84$, o tratamento (TD) apresentou mortalidade de $49 \pm 7,84$. O controlo apresentou uma média de $5,88 \pm 3,40$. (TA) e (TB) mostraram diferença de superioridade em comparação com o (TC) em (T1), entretanto (TD) apresenta semelhança com os demais tratamentos e com (TC) ($p < 0,001$).

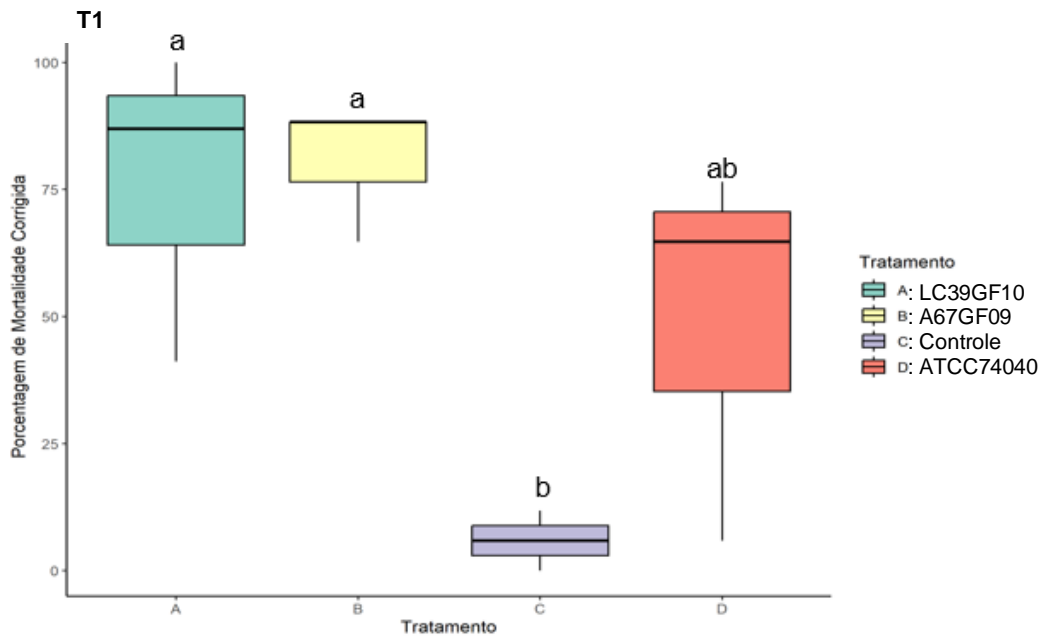


Figura 18. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T1 - um dia após aplicação das larvas), sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferenças significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

No segundo tempo de aplicação (T2) (Figura 19), no tratamento (TA) obteve-se o valor de $43,5 \pm 11,3$, e o tratamento (TB) de $9,61 \pm 4,52$. O tratamento (TD) evidenciou o valor de $20,7 \pm 8,08$, enquanto o controlo registou $8,23 \pm 8$. Nenhum tratamento obteve diferença significativa entre si ($p = 0,066$).

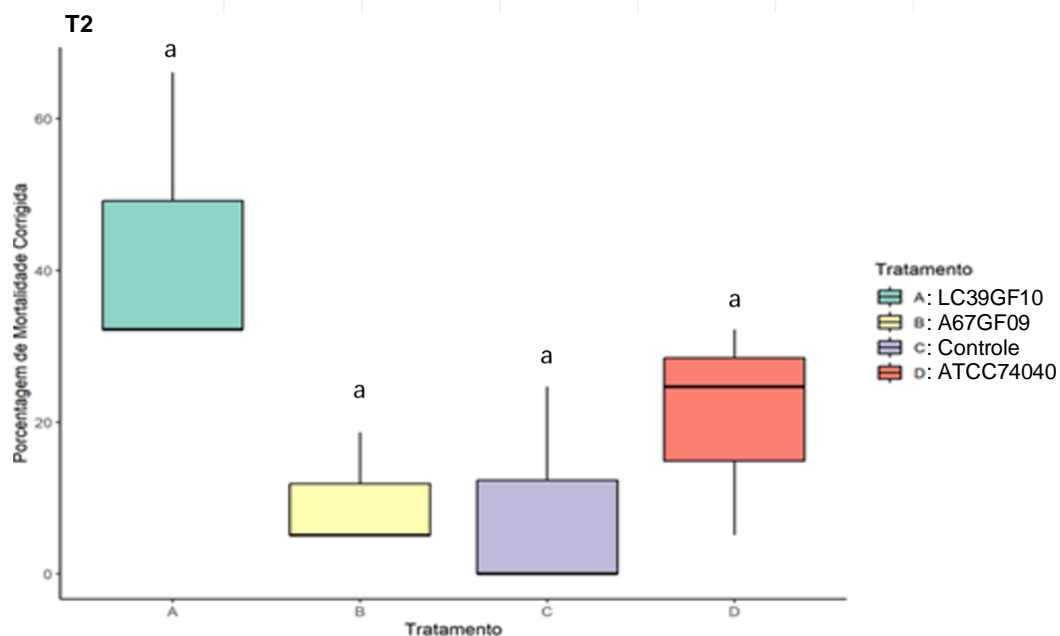


Figura 19. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T2 – oito dias após aplicação das larvas), sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferenças significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

No terceiro tempo de aplicação (T3) (Figura 20), (TA) e (TB) apresentaram mortalidade de $20,98 \pm 3,54$ e $19,64 \pm 10,63$, respectivamente, e (TD) de $2,84 \pm 0,73$, enquanto o controle (TC) revelou o valor de $2,38 \pm 1,19$. Foi possível observar que os tratamentos (TA) e (TB) não apresentaram diferença estatística entre si, mas (TA) é superior a (TC) e (TD) ($p < 0,001$).

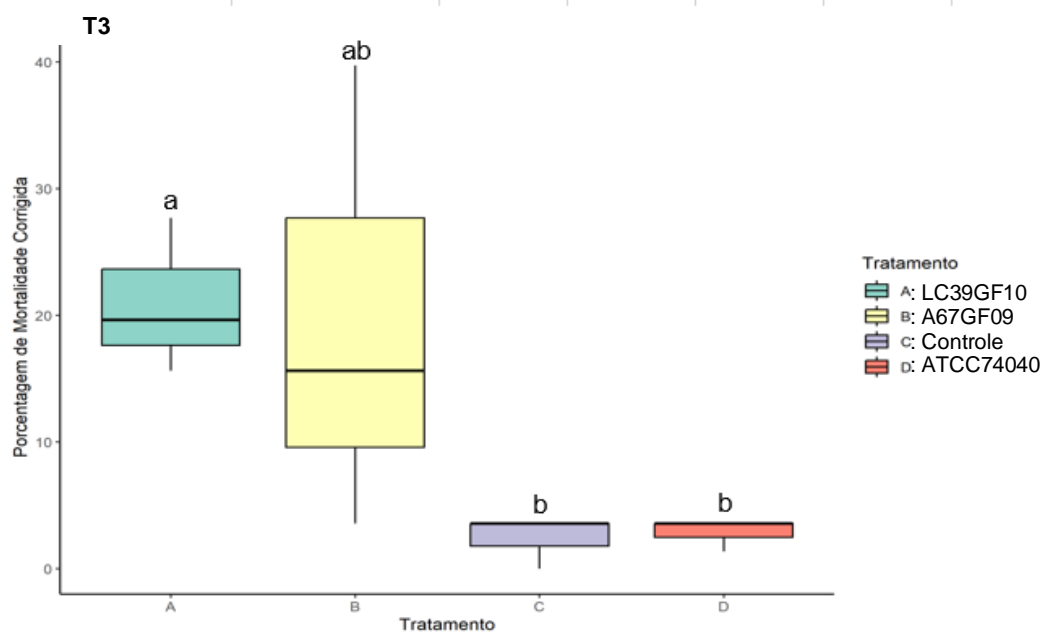


Figura 20. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T3 - 15 dias após aplicação das larvas) sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferenças significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

4.1.1.2 Primavera

Na primavera (Quadro 5), podem-se observar os seguintes resultados.

Quadro 5. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

| Tempo de aplicação | Tratamento | <i>Cydia splendana</i> | <i>p</i>-valor |
|---------------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------|
| T1 | A | 40,5 ± 16,9 a | 0,171 |
| | B | 76,8 ± 23,2 a | |
| | C | 17,9 ± 17,9 a | |
| | D | 34,2 ± 22,6 a | |
| T2 | A | 17,6 ± 13,8 ab | 0,0426 |
| | B | 72,4 ± 27,6 a | |
| | C | 5,32 ± 2,66 b | |
| | D | 5,73 ± 5,73 b | |
| T3 | A | 49,4 ± 4,75 a | < 0,001 |
| | B | 38,0 ± 8,28 ab | |
| | C | 2,90 ± 2,90 c | |
| | D | 12,7 ± 3,69 bc | |

Em (T1) um dia após instalação do experimento (Figura 21), o controlo (TC) apresentou uma mortalidade corrigida média no valor de 17,9 ± 17,9. O tratamento (TA) mostrou uma mortalidade de 40,5 ± 16,9, enquanto (TB) atingiu 76,8 ± 23,2, já o tratamento (TD) apresentou uma mortalidade de 34,2 ± 22,6. Os tratamentos não demonstraram diferença entre si ($p = 0,171$).

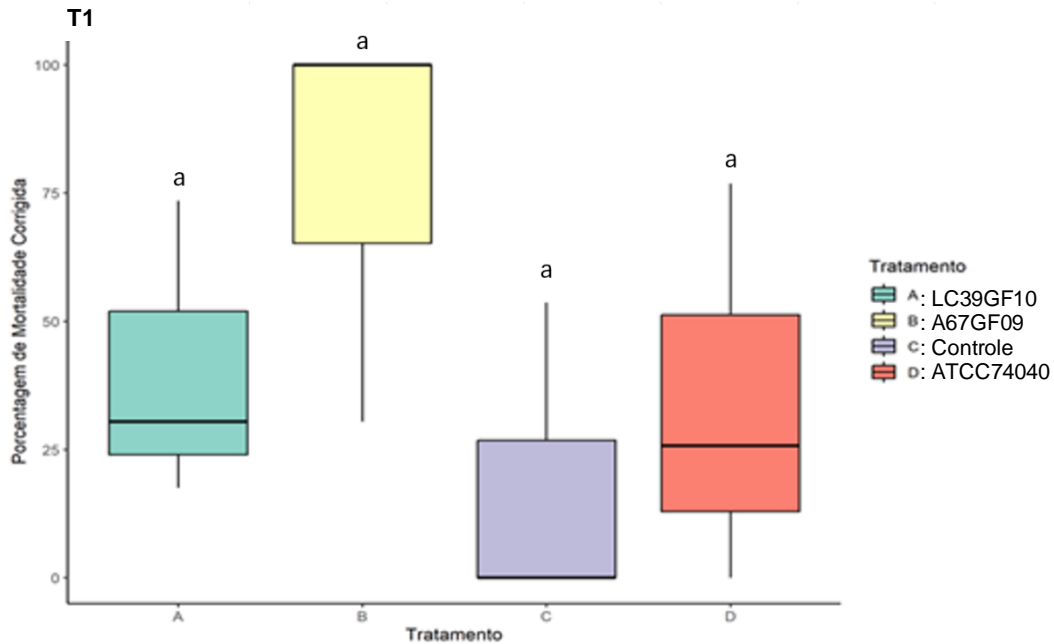


Figura 21. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T1 – um dia após aplicação das larvas) sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

No tempo de aplicação (T2) (Figura 22) a mortalidade do tratamento (TC) foi de $5,32 \pm 2,66$, enquanto (TB) apresentou valores de $72,4 \pm 27,6$, já (TA) teve $17,6 \pm 13,8$ de mortalidade e (TD) com valores de $5,73 \pm 5,73$. O tratamento (TB) não apresenta diferença com relação a (TA), mas mostra-se superior aos tratamentos (TC) e (TD); já (TA) não difere de nenhum dos outros tratamentos ($p = 0,042$).

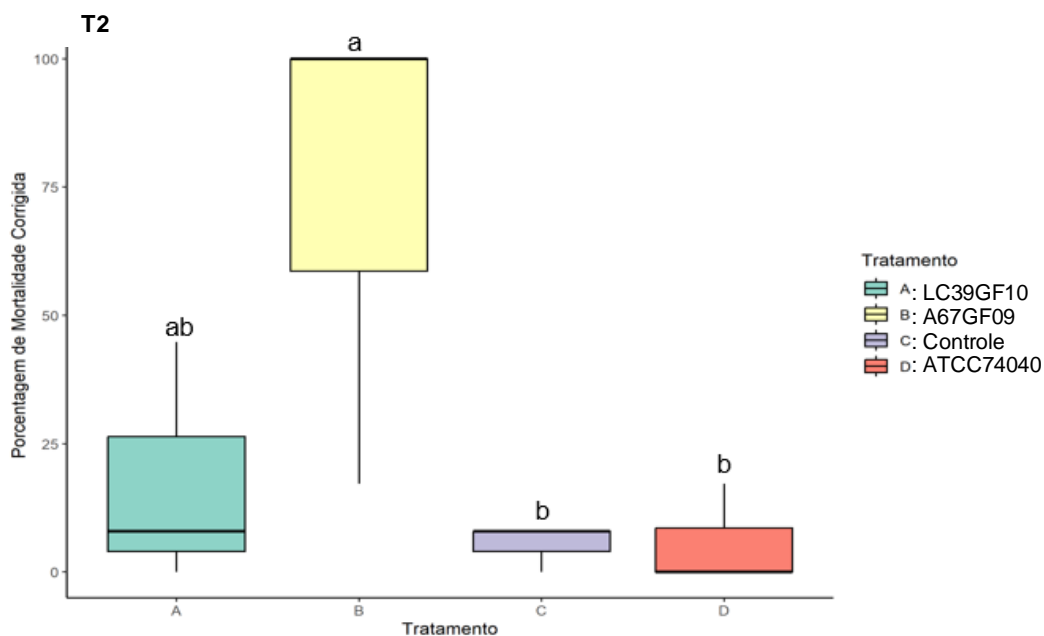


Figura 22. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T2 – oito dias após aplicação das larvas) sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

No tempo de aplicação (T3) (Figura 23) a mortalidade do controle (TC) foi de $2,90 \pm 2,90$ ($p < 0,001$), enquanto os tratamentos (TA) e (TB) apresentaram valores de $49,4 \pm 4,75$ e $38,0 \pm 8,28$, respectivamente, e não se diferenciam entre si. O tratamento (TD) teve uma mortalidade de $12,7 \pm 3,69$, não apresentando diferença com (TB) e (TC). (TC) é inferior aos tratamentos (TA) e (TB).

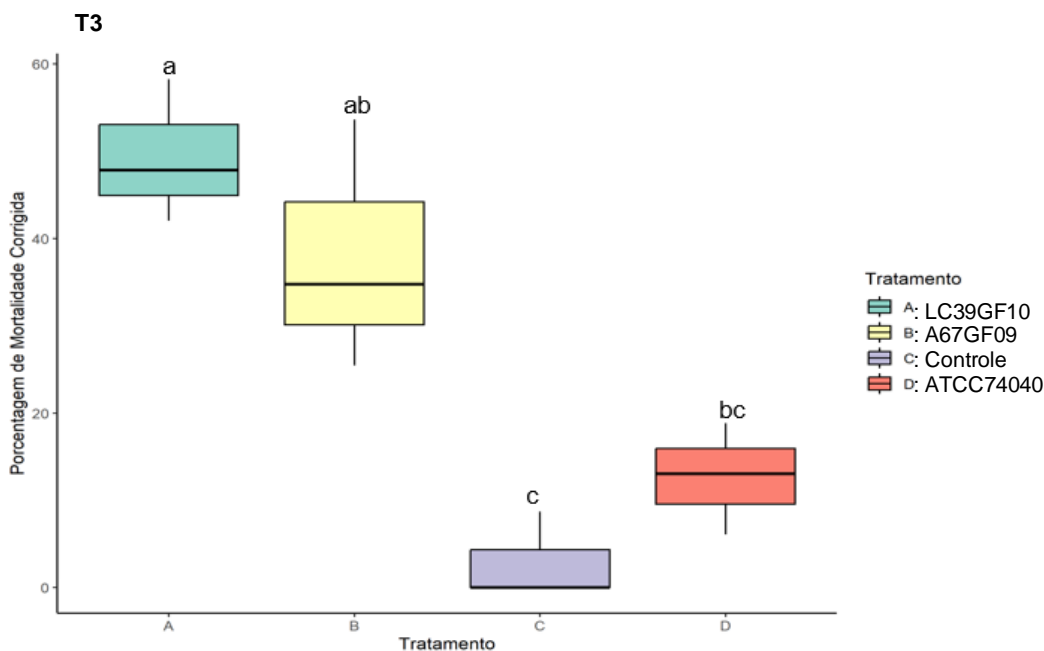


Figura 23. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T3 – 15 dias após aplicação das larvas) sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

4.1.2. Influência dos diferentes tempos de aplicação das larvas na eficácia das cepas de *B. bassiana* na mortalidade de *C. splendana*

4.1.2.1 Inverno

Para avaliar os resultados da comparação dos tempos de aplicação dentro de cada tratamento foi elaborado o (Quadro 6), apresentando os resultados de inverno. O tratamento (TC) não apresentou diferença entre os tempos de aplicação, em (T1) apresentou uma mortalidade média de $15 \pm 7,64$, $26,2 \pm 9,25$ em (T2) e $17,0 \pm 2,96$ em (T3) ($p = 0,531$). O tratamento (TA) foi de $44,9 \pm 14,1$ em (T1) para $37,3 \pm 7,92$ em (T2) e $17,8 \pm 2,13$ em (T3) sem diferença entre os tempos de aplicação ($p = 0,147$; $\alpha = 0,05$). O tratamento (TB) ($p = 0,094$) demonstra que os tempos de aplicação não diferiram entre si, e passou de $47,2 \pm 15,2$ em (T1) para $21,8 \pm 4,96$ em (T2) chegando a $17,1 \pm 5,07$ em (T3). O tratamento (TD) não apresentou diferença entre os tempos de aplicação, com

valores começando em $30,6 \pm 8,61$ em (T1) para $26,8 \pm 5,30$ em (T2) e chegando a $8,50 \pm 4,06$ em (T3) ($p = 0,055$).

Quadro 6. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, dentro de cada tratamento (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Sem presença de letras indica que não houve diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

| Tratamento | Tempo de aplicação | <i>Cydia splendana</i> | p-valor |
|------------|--------------------|------------------------|---------|
| A | T1 | $44,9 \pm 14,1$ | 0,147 |
| | T2 | $37,3 \pm 7,92$ | |
| | T3 | $17,8 \pm 2,13$ | |
| B | T1 | $47,2 \pm 15,2$ | 0,0944 |
| | T2 | $21,8 \pm 4,96$ | |
| | T3 | $17,1 \pm 5,07$ | |
| C | T1 | $15 \pm 7,64$ | 0,531 |
| | T2 | $26,2 \pm 9,25$ | |
| | T3 | $17,0 \pm 2,96$ | |
| D | T1 | $30,6 \pm 8,61$ | 0,0553 |
| | T2 | $26,8 \pm 5,30$ | |
| | T3 | $8,50 \pm 4,06$ | |

4.1.2.2 Primavera

Avaliando os resultados da comparação dos tempos de aplicação dentro de cada tratamento foi elaborado o (Quadro 7).

Quadro 7. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, dentro de cada tratamento (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

| Tratamento | Tempo de aplicação | <i>Cydia splendana</i> | <i>p</i> -valor |
|------------|--------------------|------------------------|-----------------|
| A | T1 | 50,2 ± 8,89 a | 0,0342 |
| | T2 | 32,0 ± 7,92 ab | |
| | T3 | 17,4 ± 6,87 b | |
| B | T1 | 64,1 ± 13,1 a | 0,00775 |
| | T2 | 57,9 ± 13,6 a | |
| | T3 | 9,63 ± 5,93 b | |
| C | T1 | 46,1 ± 14,5 a | 0,0357 |
| | T2 | 39,6 ± 4,81 ab | |
| | T3 | 4,17 ± 4,17 b | |
| D | T1 | 46,3 ± 10,9 a | 0,00251 |
| | T2 | 28,2 ± 6,16 ab | |
| | T3 | 2,08 ± 2,08 b | |

No tratamento (TA: LC39GF10) (Figura 24), a mortalidade corrigida foi de 50,2 ± 8,89 em (T1), 32,0 ± 7,92 em (T2) e 17,4 ± 6,87 em (T3). É possível observar que (T1) não difere de (T2), e (T2) não difere de (T3), mas (T1) é maior do que (T3) ($p = 0,034$).

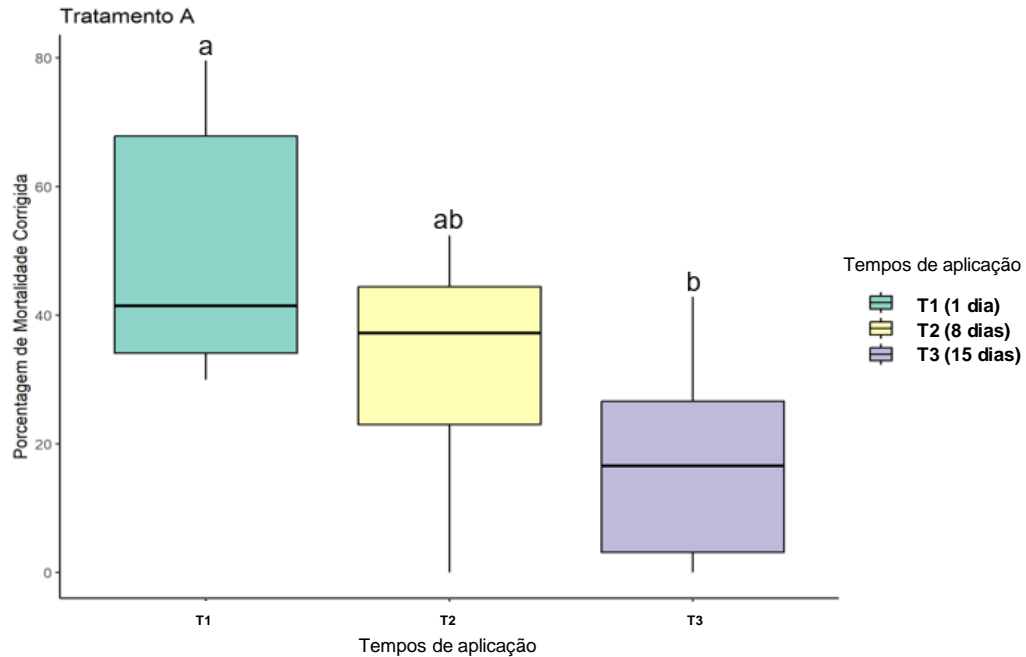


Figura 24. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TA: LC39GF10), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

O tratamento (TB) (Figura 25) apresentou o valor de $64,1 \pm 13,1$ de mortalidade corrigida em (T1). Em (T2), a mortalidade foi de $57,9 \pm 13,6$, sem diferença estatística com (T1). No entanto, em (T3), a mortalidade foi de $9,63 \pm 5,93$, sendo inferior a ambos (T1) e (T2), ($p = 0,007$).

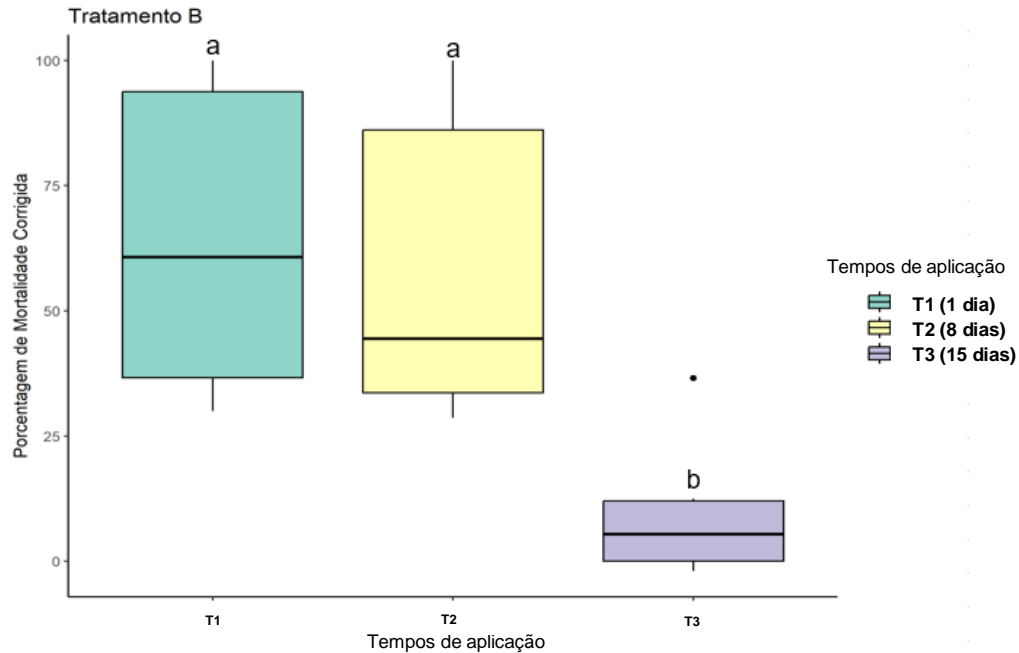


Figura 25. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TB: A67GF09), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

No tratamento (TC) (controlo) (Figura 26), ($p = 0,035$) a mortalidade corrigida começou em $46,1 \pm 10,9$ em (T1), foi para $28,2 \pm 6,16$ em (T2), e atingiu $2,08 \pm 2,08$ em (T3). (T1) e (T2) não diferem entre si, enquanto (T3) difere de (T1) com (T1) sendo superior, mas não de (T2).

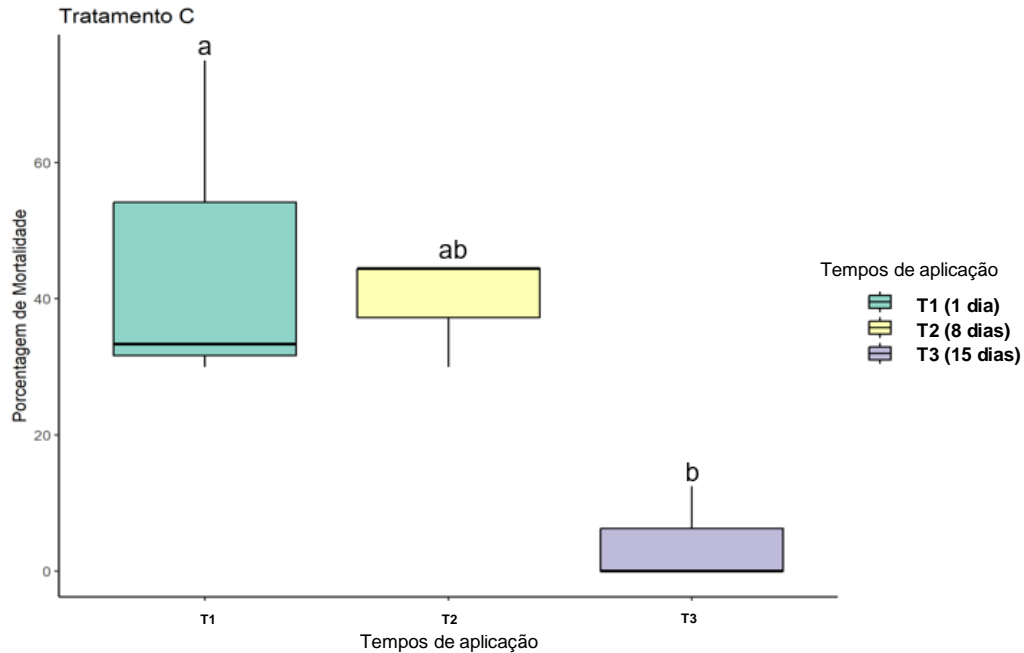


Figura 26. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TC: controle), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

O tratamento (TD) (Figura 27), teve uma mortalidade de $46,3 \pm 10,9$ em (T1), em (T2), a mortalidade foi de $28,2 \pm 6,16$ e em (T3), a mortalidade foi de $2,08 \pm 2,08$. Os tempos de aplicação (T1) e (T2) não apresentaram diferença entre si, e (T3) é igual apenas a (T2), mas inferior a (T1) ($p = 0,002$).

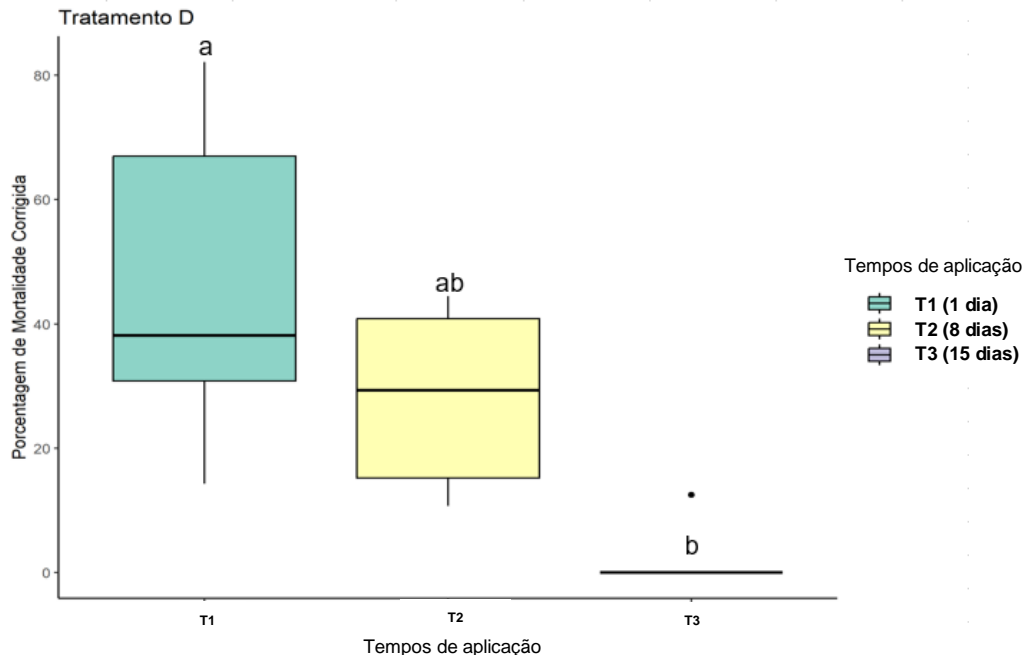


Figura 27. Mortalidade de larvas de *Cydia splendana* (Hübner) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TD: ATCC74040), na primavera. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

4.1.3 Discussão

No inverno, em (T1), segundo McCoy *et al.*, (1992) em um levantamento bibliográfico dos fatores que influenciam fungos entomopatogênicos, aponta que as cepas fúngicas de forma geral apresentam diferentes condições ótimas de operação entre si em função da temperatura, humidade e influência genética por fatores internos e externos. As cepas utilizadas nos tratamentos (TA) e (TB) são isolados provindos da coleção da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança por serem isolados locais mais adaptados as condições da região apresentaram alta virulência se comparadas a cepa comercial do tratamento (TD) que obteve um resultado inferior.

Em (T2) é admissível que a combinação dos fatores tempo de aplicação das larvas nos vasos e condições ambientais tenha afetado o desempenho de mortalidade das cepas. A premissa de que a combinação de todos esses fatores é crucial no desempenho de um fungo entomopatogénico como controlo de pragas é citada por McCoy *et al.*, (1992) que

realizou um levantamento bibliográfico dos fatores que afetam fungos entomopatogênicos, incluindo *B. bassiana*.

Em (T3) o tratamento (TA) apresentou taxas de mortalidade superiores, (TB) não diferiu de (TA) e nem do controle. (TD) não teve diferença significativa em comparação ao controle, ou seja, a influência do tempo de 15 dias exposto ao ambiente afetou mais o isolado comercial nas condições avaliadas. Zhang *et al.*, (2020) avaliou que a diversidade genética de *B. bassiana* pode influenciar na concentração e viabilidade dos conídios em função do tempo em que o fungo permanece no solo sem um hospedeiro para infectar, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Na primavera, nos resultados de (T1) é possível observar que não houve diferença estatística entre nenhum tratamento e com o controle, porém pode-se notar as diferentes percentagens de mortalidade de acordo com o isolado utilizado, demonstrando a virulência entre as cepas.

Em (T2) o tratamento (TB) foi superior aos tratamentos (TC) e (TD) indicando um aumento de aproximadamente 67% de mortalidade sobre ambos os tratamentos. Papparatti & Speranza (2004), em um trabalho realizado em campo usando o fungo entomopatogênico *B. bassiana* contra a praga *Curculio nucum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: curculionidae), na Itália entre os meses de outubro e maio de 2002, concluiu que as gaiolas tratadas com *B. bassiana* apresentaram um aumento de 35% na mortalidade de larvas de *C. nucum*. Em (TA) embora não demonstre diferença estatística, pode-se uma tendência de eficácia do isolado pois ele não difere de (TB).

No tempo de (T3) o tratamento (TA) apresentou maior mortalidade, (TB) não diferenciou de (TA) e nem de (TD), e (TD) não teve diferença em relação ao controle. Dhaliwal *et al.*, (2018) que avaliaram oito diferentes isolados de *B. bassiana* contra *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) e Wraight *et al.*, (2022) (Lepidoptera: Crambidae), em um estudo do potencial de diversas cepas de *B. bassiana* isoladas de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: curculionidae) em comparação com uma cepa comercial do mesmo fungo; descobriram que a virulência de diferentes isolados de *B. bassiana*, é influenciada por contextos ecológicos específicos, indicando que cepas locais podem ter desenvolvido mecanismos para otimizar as taxas de infecção em condições específicas que aumentam sua virulência e infetividade contra populações de pragas locais. Esses estudos entram em concordância com os resultados apresentados, pois evidenciam que toda a

combinação dos fatores influencia na mortalidade, e dessa forma, explicam-se as diferenças das eficácias entre as cepas quando submetidas as condições de (T3).

Por meio dos resultados apresentados na retirada de inverno e na retirada de primavera onde se avalia as cepas dentro dos diferentes tempos de aplicação das larvas, se destaca a virulência das cepas (TA) e (TB) isolados oriundos da coleção da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança em comparação com o isolado comercial (TD) que obteve um desempenho inferior nos tempos de aplicação. Esses resultados podem ser apoiados por Zhang *et al.*, (2020) e Xiao *et al.*, (2012) que falam que a virulência de diferentes cepas de *B. bassiana* pode variar significativamente, influenciada por fatores como diversidade genética e condições ambientais. Por fim isolados (TA) e (TB) por se tratar de cepas locais mais adaptadas as condições climáticas da região apresentaram um efeito de controlo maior que a cepa comercial (TD).

Na retirada de inverno, avaliando os tempos de aplicação das larvas em cada cepa, reforça a premissa de que a eficácia de *B. bassiana* é a partir da conciliação de vários aspetos. Na Guiana um estudo contra larvas da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea centrella* (Möschler, 1883) (Lepidoptera: crambidae), mostrou que após aplicação do fungo a mortalidade das larvas aconteceu entre quatro e dez dias, variando conforme a concentração de conídios e estágios das larvas (Sukhu *et al.*, 2019). Foi observado que o aumento na produção de toxinas variava de acordo com a espécie do inseto e as condições ambientais, como temperatura e humidade, que influenciava o tempo para a mortalidade dos hospedeiros, a expressão de genes que codificam metabólitos secundários em *B. bassiana* na infeção de diferentes espécies de insetos hospedeiros, mostrou o processo de infeção desde a adesão dos conídios à cutícula até a morte dos insetos, analisando como a produção de toxinas variou ao longo do tempo (Pedrini., 2022).

Na primavera, é possível observar um padrão de comportamento demonstrando queda linear na mortalidade de cada tratamento em função de um maior tempo em que o fungo persiste no solo sem um hospedeiro. Todos os tratamentos apresentaram maior mortalidade em (T1) quando as larvas foram expostas um dia após instalação do experimento.

Perante resultados apresentados por Vicentini *et al.*, (2001) onde selecionou isolados de *B. bassiana* sobre ninfas de primeiro ínstar de *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889), apresentou após sete dias da inoculação, os valores de mortalidade média de 25,7%,

variando de 6,1 a 92,3% depois de 14 dias da pulverização. É possível afirmar que a diferença genética entre isolados impacta diretamente no comportamento que o fungo tem em resposta ao tempo de aplicação. O estudo com a cepa M130 de *B. bassiana* no controle da mosca-branca de estufa, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856), avaliou que o tempo de mortalidade dos insetos variou entre 3 a 7 dias após a aplicação do fungo, foi possível observar que condições ótimas de temperatura e humidade com altas concentrações de conídios, causaram uma morte mais rápida dos insetos, porém fora dessas condições ideais o tempo de infecção aumentou e a eficácia diminuiu (Lee *et al.*, 2014).

Como observado e confirmado nos resultados de (R1) e (R2), quando as larvas foram expostas aos tratamentos 24 horas e 8 dias após pulverização, se manteve boa eficiência dos isolados para controle do inseto, porém ao avaliar os valores de (R3) referentes as larvas expostas 15 dias após a pulverização a mortalidade decresce claramente, indicando a perda de viabilidade da aplicação do fungo no período em que ficou exposto as condições ambientais na primavera.

4.2 Eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.- Criv.) Vuill no controle da praga *Curculio elephas* (Gyllenhal, 1836)

4.2.1. Eficácia das cepas de *B. bassiana* na mortalidade de *C. elephas* em diferentes tempos de aplicação das larvas

4.2.1.1 Inverno

No inverno (Quadro 8), podem-se observar os seguintes resultados.

Quadro 8. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

| Tempo de aplicação | Tratamento | <i>Curculio elephas</i> | <i>p</i> -valor |
|--------------------|------------|-------------------------|-----------------|
| T1 | A | 51,9 ± 9,26 ab | 0,017 |
| | B | 16,9 ± 9,72 ab | |
| | C | 9,41 ± 5,75 b | |
| | D | 60,1 ± 12,09 a | |
| T2 | A | 43,3 ± 28,5 ab | 0,049 |
| | B | 93,3 ± 6,67 a | |
| | C | 6,67 ± 3,33 b | |
| | D | 48 ± 19,1 ab | |
| T3 | A | 16 ± 8,1 ab | 0,033 |
| | B | 63,5 ± 7,68 a | |
| | C | 9,88 ± 6,53 b | |
| | D | 28,5 ± 11,2 b | |

No tempo de aplicação (T1) (Figura 28), o controle (TC) apresentou uma mortalidade corrigida de $9,41 \pm 5,75$ ($p = 0,017$). Já o tratamento (TA) apresentou uma mortalidade de $51,9 \pm 9,26$. O tratamento (TB) teve uma mortalidade de $16,9 \pm 9,72$. O tratamento (TD) apresentou a maior mortalidade entre todos os tratamentos $60,1 \pm 12,09$. Os tratamentos (TA) e (TB) não se diferenciam de (TC) e (TD) e entre si, mas (TD) é superior a (TC).

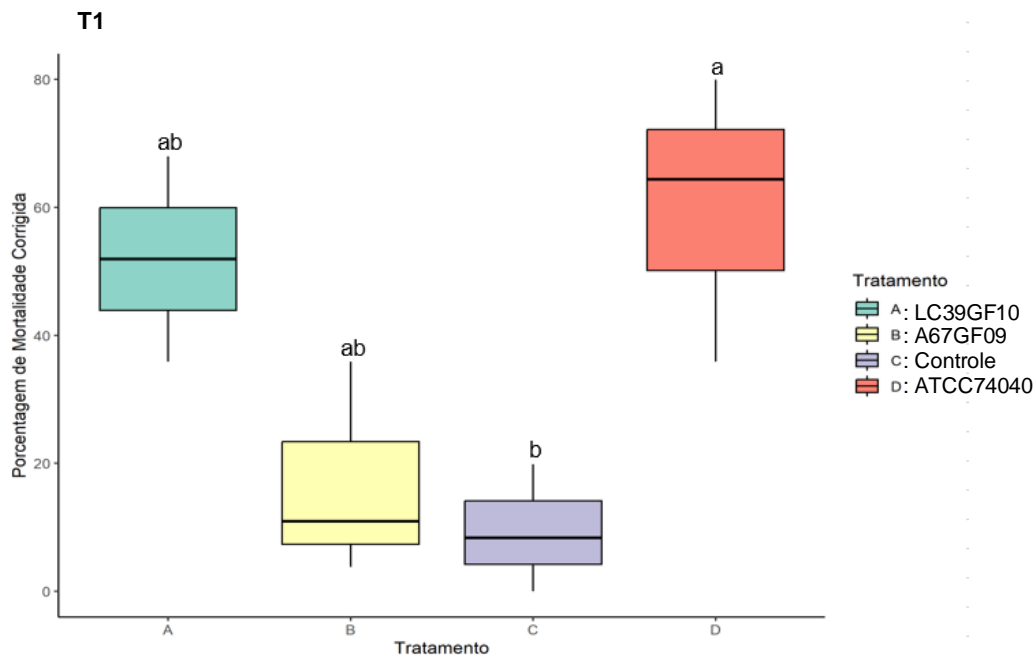


Figura 28. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1 - um dia após aplicação das larvas), sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferenças significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

No segundo tempo de aplicação (T2) (Figura 29), o controle (TC) apresentou uma mortalidade de $6,67 \pm 3,33$. O tratamento (TA) demonstrou uma mortalidade de $43,3 \pm 28,5$. O tratamento (TB) teve uma mortalidade de $93,3 \pm 6,67$. O tratamento (TD) apresentou uma mortalidade de $48 \pm 19,1$. O tratamento (TB) foi superior a (TC), mas ainda igual a (TA) e (TD), que não diferem entre si e nem com o tratamento (TC) ($p = 0,049$).

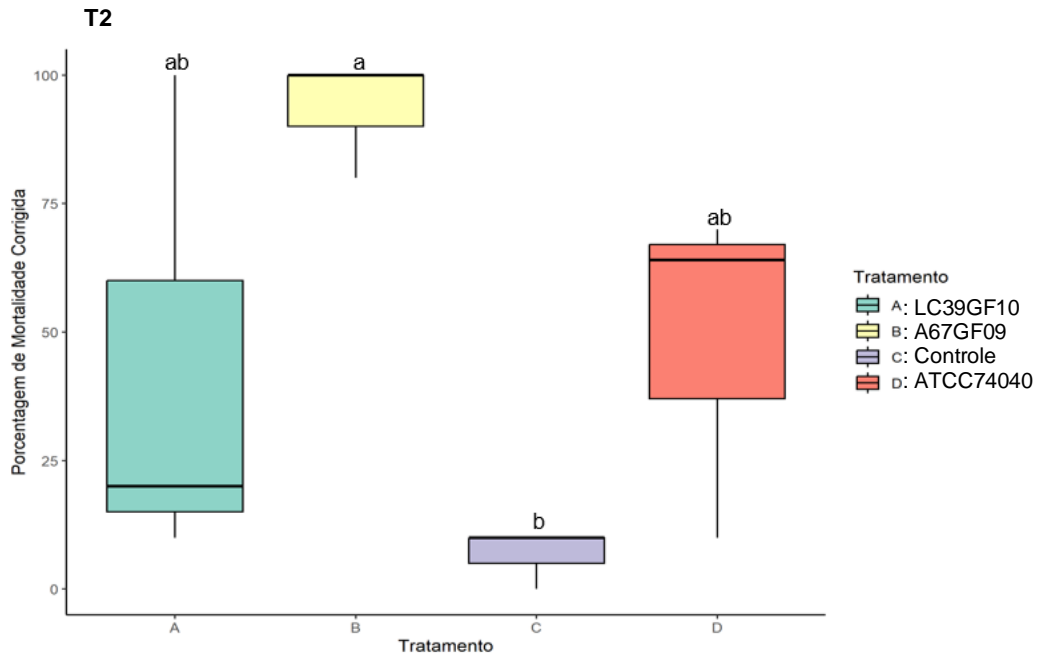


Figura 29. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T2 - oito dias após aplicação das larvas), sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste t ($p < 0,05$).

No terceiro tempo de aplicação (T3) (Figura 30), o controle (TC) teve uma mortalidade de $9,88 \pm 6,53$. O tratamento (TA) obteve uma mortalidade de $16 \pm 8,1$. O tratamento (TB) apresentou mortalidade de $63,5 \pm 7,68$. O tratamento (TD) teve uma mortalidade de $28,5 \pm 11,2$. As diferenças entre os tratamentos permaneceram estatisticamente significativas, com (TB) sendo semelhante a (TA) e (TD), mas superior a (TC), e (TA) e (TD) sendo iguais a (TC) ($p = 0,033$).

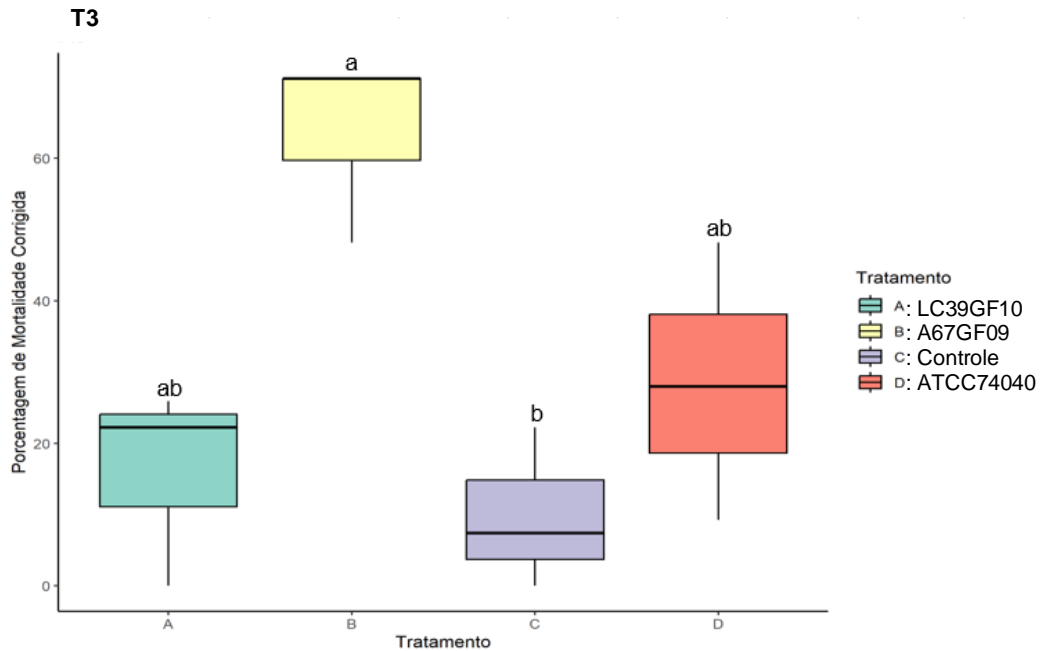


Figura 30. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T3 - 15 dias após aplicação das larvas), sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferenças significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

4.2.1.2 Primavera

Na primavera (Quadro 9), podem-se observar os seguintes resultados.

Quadro 9. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, sujeitas a diferentes tratamentos (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Sem presença de letras indica que não houve diferença significativa pelo teste t ($p < 0.05$).

| Tempo de aplicação | Tratamento | <i>Curculio elephas</i> | <i>p</i>-valor |
|---------------------------|-------------------|--------------------------------|-----------------------|
| T1 | A | 46,3 ± 23,1 | 0,266 |
| | B | 46,4 ± 14,2 | |
| | C | 15,6 ± 11,8 | |
| | D | 5,44 ± 2,72 | |
| T2 | A | 75 ± 14,4 | 0,227 |
| | B | 75 ± 25 | |
| | C | 33,3 ± 33,3 | |
| | D | 11,7 ± 7,26 | |
| T3 | A | 19,8 ± 12,8 | 0,812 |
| | B | 24,7 ± 21,7 | |
| | C | 8,33 ± 8,33 | |
| | D | 29,2 ± 14,6 | |

No primeiro tempo de aplicação (T1), o tratamento (TA), apresentou uma mortalidade de 46,3 ± 23,1, enquanto o tratamento (TB), teve uma mortalidade de 46,4 ± 14,2. O tratamento (TD) apresentou uma mortalidade de 5,44 ± 2,72, e o controle (TC) de 15,6 ± 11,8. As diferenças entre os tratamentos não foram significativas ($p = 0,266$).

No segundo tempo de aplicação (T2), o tratamento (TA) demonstrou uma mortalidade de 75 ± 14,4, já o tratamento (TB) apresentou uma mortalidade de 75 ± 25. O tratamento (TD) registou uma mortalidade de 11,7 ± 7,26, e o controle (TC) de 33,3 ± 33,3. Nenhum dos tratamentos se diferenciou ($p = 0,227$).

Em (T3) o controle (TC) registou uma mortalidade de 8,33 ± 8,33, o tratamento (TA) apresentou uma mortalidade de 19,8 ± 12,8. O tratamento (TB) teve uma mortalidade de 24,7 ± 21,7 e o tratamento (TD) apresentou mortalidade de 29,2 ± 14,6. As diferenças entre os tratamentos não foram significativas nessa repetição ($p = 0,812$).

4.2.2. Influência dos diferentes tempos de aplicação das larvas na eficácia das cepas de *B. bassiana* na mortalidade de *C. elephas*

4.2.2.1 Inverno

Para avaliar os resultados da comparação dos tempos de aplicação dentro de cada tratamento foi elaborado o (Quadro 10), apresentando os resultados de inverno. O controle (TC) apresentou mortalidade de $37,6 \pm 9,05$ em (T1), $44,4 \pm 5,56$ em (T2), e $22,9 \pm 11,9$ em (T3). Não houve variação estatisticamente significativa entre os tempos de aplicação ($p = 0,309$).

Quadro 10. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, dentro de cada tratamento (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

| Tratamento | Tempo de aplicação | <i>Curculio elephas</i> | p-valor |
|------------|--------------------|-------------------------|---------|
| A | T1 | $45,7 \pm 6,73$ a | 0,0306 |
| | T2 | $48,0 \pm 11,3$ a | |
| | T3 | $10,9 \pm 9,02$ b | |
| B | T1 | $28,9 \pm 6,99$ a | 0,0283 |
| | T2 | $69,4 \pm 11,7$ a | |
| | T3 | $39,8 \pm 10,1$ b | |
| C | T1 | $37,6 \pm 9,05$ a | 0,309 |
| | T2 | $44,4 \pm 5,56$ a | |
| | T3 | $22,9 \pm 11,9$ a | |
| D | T1 | $49,7 \pm 8,72$ a | 0,0283 |
| | T2 | $50,0 \pm 8,09$ a | |
| | T3 | $19,0 \pm 8,17$ b | |

O tratamento (TA) (Figura 31), apresentou uma mortalidade de $45,7 \pm 6,73$ em (T1), $48,0 \pm 11,3$ em (T2) e em (T3) a mortalidade foi de $10,9 \pm 9,02$. A análise estatística mostra que há diferença entre os tempos de aplicação ($p = 0,0306$), com (T1) e (T2) diferenciando de (T3) com valores maiores de mortalidade.

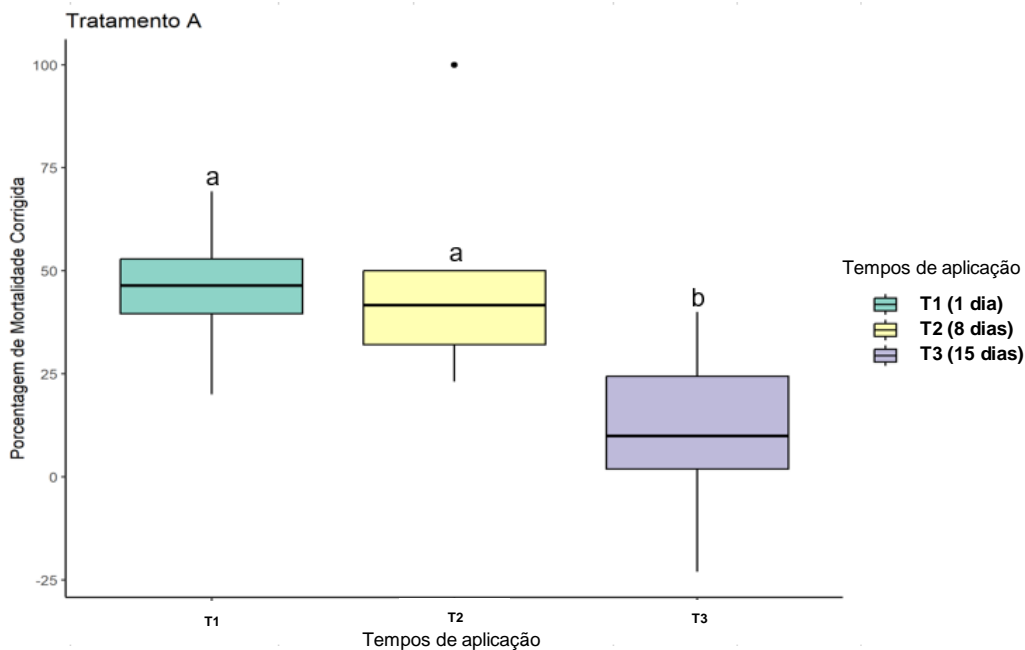


Figura 18. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TA: LC39GF10), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

O tratamento (TB) (Figura 32) apresentou em (T1) uma mortalidade de $28,9 \pm 6,99$, já de $69,4 \pm 11,7$ em (T2), e em (T3), a mortalidade foi de $39,8 \pm 10,1$. As análises estatísticas indicam que há diferença entre os tempos de aplicação, com (T2) sendo maior em relação a (T1), e (T3) não apresentando diferença com ambos ($p = 0,0283$).

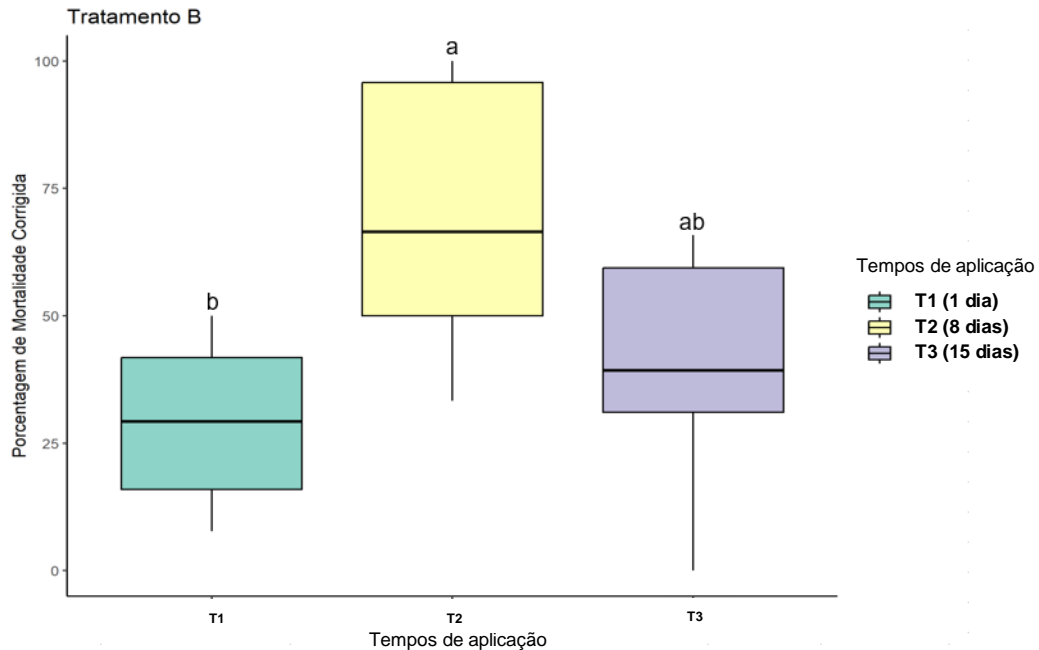


Figura 19. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TB: A67GF09), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

O tratamento (TD) (Figura 33), apresentou mortalidade de $49,7 \pm 8,72$ em (T1), $50,0 \pm 8,09$ em (T2), e mortalidade de $19,0 \pm 8,17$ em (T3). Observa-se pela análise estatística que (T1) e (T2) não se diferem entre si, mas são superiores a (T3) ($p = 0,0283$).

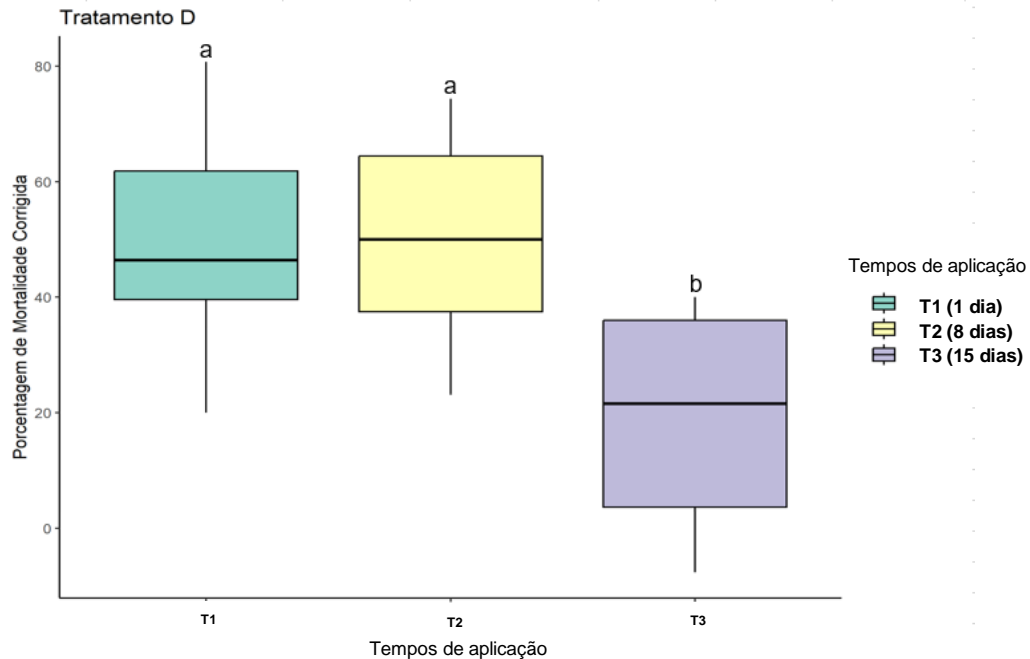


Figura 33. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, no tratamento (TD: ATCC74040), no inverno. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$).

4.2.2.2 Primavera

Avaliando os resultados da comparação dos tempos de aplicação dentro de cada tratamento foi elaborado o (Quadro 11). O controle (TC) mostrou uma mortalidade de $45,6 \pm 13,7$ em (T1), $33,3 \pm 33,3$ em (T2) e $11,1 \pm 11,1$ em (T3). O tratamento controle não apresentou diferença entre os tempos de aplicação ($p = 0,558$), refletindo a mortalidade natural dos insetos.

Quadro 11. Mortalidade de larvas de *Curculio elephas* (Gyllenhal) em (T1) um dia após aplicação das larvas, (T2) oito dias após e (T3) 15 dias após, dentro de cada tratamento (TA: LC39GF10), (TB: A67GF09), (TC: controle) e (TD: ATCC74040), na primavera. Sem presença de letras indica que não houve diferença significativa pelo teste t ($p < 0.05$).

| Tratamento | Tempo de aplicação | <i>Curculio elephas</i> | p-valor |
|------------|--------------------|-------------------------|---------|
| A | T1 | 48,2 ± 12,9 | 0,076 |
| | T2 | 54,8 ± 18,8 | |
| | T3 | 10,3 ± 6,55 | |
| B | T1 | 51,9 ± 8,34 | 0,125 |
| | T2 | 54,8 ± 20,7 | |
| | T3 | 15,4 ± 10,3 | |
| C | T1 | 45,6 ± 13,7 | 0,558 |
| | T2 | 33,3 ± 33,3 | |
| | T3 | 11,1 ± 11,1 | |
| D | T1 | 32,3 ± 9,52 | 0,577 |
| | T2 | 23,8 ± 15,9 | |
| | T3 | 15,1 ± 6,78 | |

No tratamento (TA), a mortalidade foi de 48,2 ± 12,9 em (T1) e 54,8 ± 18,8 em (T2) e em (T3) foi de 10,3 ± 6,55. Não houve diferença entre os tempos de aplicação ($p = 0,076$).

O tratamento (TB), apresentou os valores de mortalidade de 51,9 ± 8,34 em (T1), 54,8 ± 20,7 em (T2), e de 15,4 ± 10,3 em (T3). As diferenças entre os tempos de aplicação não foram significativas ($p = 0,125$).

No tratamento (TD), a mortalidade foi de 32,3 ± 9,52 em (T1), 23,8 ± 15,9 em (T2) e de 15,1 ± 6,78 em (T3). Os valores não são estatisticamente diferentes entre si ($p = 0,577$).

4.2.3 Discussão

No inverno, em (T1) é possível observar que a associação dos fatores do tempo de aplicação de 24 horas após a inoculação do fungo com as características das larvas de gorgulho e a cepa ATCC74040 do produto comercial Naturalis®, gerou bons resultados de mortalidade. Souza (2022) em um estudo de campo que avaliou a eficácia da cepa

ATCC74040 de *B. bassiana* no controlo biológico de *C. elephas*, demonstrou que a estirpe apresenta boas taxas de mortalidade contra o inseto.

A diferença da performance de (TB) entre (T1) e (T2) pode ser associada a adaptação da cepa. Em (T1), os esporos foram pulverizados e as larvas introduzidas um dia depois, o que pode ter exposto os esporos a condições de estresse ambiental, por diferenças no cultivo em laboratório para o campo sem que eles tivessem tempo suficiente para se adaptar ou germinar adequadamente.

Costa (2019) testando uma cepa comercial de *B. bassiana* contra *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) obteve 52% de mortalidade em 13 dias. Em comparação com a cepa comercial testada no devido trabalho (TD) em (T3), não foi possível observar diferença com o controlo, todavia a cepa do tratamento (TB) teve um desempenho similar ao do autor citado no mesmo período avaliado.

Na primavera, a análise de todos os tratamentos (TA), (TB), (TC) e (TD) dentro dos tempos de aplicação das larvas (T1), (T2) e (T3) não houve diferença estatística entre nenhum deles. Porém se destaca a virulência das cepas (TA) e (TB) isolados oriundos da coleção da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança em comparação com o isolado comercial (TD) que obteve valores de mortalidade inferiores nas repetições.

Por fim isolados (TA) e (TB) por se tratar de cepas locais mais adaptadas as condições climáticas da região apresentaram um efeito de controlo maior que a cepa comercial (TD) para o gorgulho.

Na retirada de inverno, avaliando os tempos de aplicação das larvas em cada cepa, é possível inferir que o controlo (TC) não demonstrou diferença estatística entre os tempos de aplicação. Entretanto, nos demais tratamentos (TA), (TB) e (TD) observa-se um padrão de comportamento de melhores eficácias em (T1) um dia e (T2) 8 dias, com (T3) 15 dias sendo inferior. Nesse sentido, analisa-se que em (T3), onde as larvas foram expostas ao fungo em um maior intervalo de tempo, as cepas de *B. bassiana* perdem sua eficácia em função do tempo expostas as condições ambientais. Guinossi (1997) em um estudo que avaliou a disseminação e persistência dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok (1883) nas culturas de soja e trigo, demonstraram que a persistência dos fungos foi mais elevada durante a primeira semana após a

aplicação e afirmam que as probabilidades de causar infeção nas populações de insetos suscetíveis são maiores neste período.

Na retirada de primavera, avaliando os tempos de aplicação das larvas em cada cepa, os testes estatísticos evidenciam que nenhum dos tempos de aplicação houve diferença significativa, entretanto os valores apresentados em (T1), (T2) e (T3) demonstram a queda linear da eficácia da aplicação conforme o fungo permanece no solo exposto as condições ambientais, em (T1) e (T2) o tempo de aplicação não influencia consideravelmente na viabilidade ainda resultando na mortalidade dos insetos, mas a partir de 15 dias (T3) pode-se observar a queda dos valores para todos os tratamentos, demonstrando que uma única aplicação após 15 dias já não apresenta considerável eficácia contra as pragas.

Os resultados apresentados na retirada de inverno e na retirada de primavera onde foi avaliado os tempos de aplicação das larvas em cada cepa, demonstram a influencia que as condições ambientais exercem na viabilidade da aplicação do fungo no solo, apresentando que nos períodos testados em (T1) um dia e (T2) 8 dias a aplicação ainda é efetiva no controlo do inseto, já em (T3) a viabilidade da aplicação é comprometida, mostrando a queda nos valores de mortalidade.

4.3 Dados meteorológicos

Os dados recolhidos de temperatura e umidade, respetivamente, ao longo do período analisado (Figuras 34 e 35 – Anexo 1)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo evidenciam o potencial significativo de *Beauveria bassiana* como uma ferramenta eficaz no manejo biológico das pragas do castanheiro em questão - *Cydia splendana* e *Curculio elephas*, em condições de campo na região de Trás-os-Montes.

Ao avaliar a eficácia das diferentes estirpes do fungo entomopatogénico, observou-se que os isolados (LC39GF10 e A67GF09), (TA) e (TB) respetivamente, demonstraram uma virulência maior nas pragas-alvo, salientando que a viabilidade da aplicação testada, referente a (R1) 24 horas e (R2) 8 dias, apresenta maior sucesso na infeção das pragas em estudo. Enfatiza-se que as estirpes regionais, por estarem mais adaptadas às condições locais, apresentaram um melhor desempenho.

A estirpe comercial ATCC74040 (Naturalis®) apresentou, no geral, um desempenho inferior ao longo das repetições (R1), (R2) e (R3) em comparação aos isolados da coleção de cultura da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, sugerindo e corroborando com mais estudos citados neste trabalho que estirpes de amplo espectro podem ter uma eficácia inferior em nichos específicos.

Como aplicação prática pode-se concluir que, os isolados locais (LC39GF10 e A67GF09) provindas da coleção da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança apresentam uma maior virulência quando comparados ao isolado comercial ATCC74040 (Naturalis®), e que apenas uma única aplicação do fungo no início da queda das castanhas pode não ser o suficiente para cobrir todo o período, por conta da viabilidade da aplicação apresentar um decréscimo considerável na mortalidade dos insetos após 15 dias, evidenciando assim que quanto menos tempo o fungo permanecer no solo sem um hospedeiro, exposto as condições climáticas, melhor será sua eficácia. Futuras investigações devem focar na otimização das condições de aplicação visando fazer mais de uma aplicação do fungo no solo para que envolva o período todo da queda das castanhas, assim otimizando o controlo dos insetos.

6 REFERÊNCIAS

Abbott, W. S. (1925). Um método de calcular a eficácia de um inseticida. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.

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. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.784.27>.

Agro Estadão (2019). Agrotóxicos da agricultura moderna e seus impactos no meio ambiente. Disponível em: <https://agro.estadao.com.br/summit-agro/agrotoxicos-da-agricultura-moderna-e-seus-impactos-no-meio-ambiente>. Acedido em outubro de 2024.

Amaro, P. (2003). A proteção integrada (pp. 1-458). ISAPress.

Amutha, M., & Banu, J. G. (2015). Pathogenesis of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin., on mealybug, *Paracoccus marginatus* (Williams and Granara de Willink)(Homoptera: Pseudococcidae).

Avtzis, D. N., Melika, G., Matošević, D., & Coyle, D. R. (2019). The Asian chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*: a global invader and a successful case of classical biological control. *Journal of pest science*, 92, 107-115. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1046-1>.

Baltazar, E.C.S. (2015). Otimização de protocolos de micropropagação de *Castanea sativa* Mill e estudo da tolerância de genótipos de castanheiro à doença da tinta. (Master's thesis). Universidade de Coimbra, Coimbra.

Barreira, J. C. M. (2010). Caracterização biológica, química e nutricional de *Castanea sativa* Miller e *Prunus dulcis* (Miller) D. A. Webb [Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto].

Beemrote, A., Srinivasan, M. R., Jeyarani, S., Mohan Kumar, S., Kalaiselvi, T., Pravallika, P., & Singh, K. S. (2024). Isolation and identification of entomopathogenic fungi from soils of Manipur (NE India). *Indian Journal of Agricultural Research*, 58(4). <https://doi.org/10.18805/IJARE.A-6124>.

Beers, E., Horton, D., & Miliczky, E. (2016). Pesticides used against *Cydia pomonella* disrupt biological control of secondary pests of apple. *Biological Control*, 102, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.05.009>.

Bengtsson, M., Boutitie, A., Jósvali, J., Toth, M., Andreadis, S., Rauscher, S., ... & Witzgall, P. (2014). Pheromone races of *Cydia splendana* (Lepidoptera, Tortricidae) overlap in host plant association and geographic distribution. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 46. <https://doi.org/10.3389/fevo.2014.00046>.

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).

Bento, A., Sousa, M. E. C., Silva, L., Santos, A. L., Marrão, R., Moura, L., Sousa, E., & Coutinho, J. (2022). Estratégias integradas de luta contra pragas-chave em espécies de frutos secos. CNCFS.

Bogenschütz, H. (1991). Eurasian species in forestry. In L. P. S. van der Geest & H. H. Evenhuis (Eds.), *Tortricid pests* (Cap. 7, pp. 673-709). Elsevier.

Bonal, R., & Munoz, A. (2009). Seed weevils living on the edge: Pressures and conflicts over body size in the endoparasitic *Curculio* larvae. *Ecological Entomology*, 34(3), 304-309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2008.01078.x>.

Bounous, G., & Marinoni, D. (2005). Chestnut: A multipurpose resource for the new millennium. *Acta Horticulturae*, 693, 33-40. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.693.1>.

CABI & EPPO. (2023). *Curculio elephas* (Gyllenhal). [Mapa de distribuição]. Disponível em <https://www.cabidigitallibrary.org/journal/dmmp>. Acedido em setembro de 2024.

Canelo, T., Gaytán, Á., Pérez-Izquierdo, C., & Bonal, R. (2021). Effects of longer droughts on holm oak *Quercus ilex* L. acorn pests: consequences for infestation rates, seed biomass and embryo survival. *Diversity*, 13(3), 110. <https://doi.org/10.3390/d13030110>.

Caudullo, G., Welk, E., San-Miguel-Ayanz, J., 2017. Chorological maps for the main European woody species. *Data in Brief* 12, 662-666. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.05.007>.

Conedera, M., Tinner, W., Krebs, P., de Rigo, D., & Caudullo, G. (2016). *Castanea sativa* in Europe: Distribution, habitat, usage, and threats. European Forest Genetic Resources Programme.

Costa, F. N. (2019). Patogenicidade de *Beauveria bassiana*, *Isaria javanica* e *I. farinosa* sobre *Tetranychus urticae*.

Cuestas, M., Martín, M., Aldebis, H., Mena, J., Martín, L., & Osuna, E. (2020). Differential response among chestnut traditional varieties to the attack of *Cydia splendana*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 168(3), 259-265. <https://doi.org/10.1111/eea.12888>.

Delisle, J., Marcotte, M., Boutitie, A., Chapoux, M., Bengtsson, M., & Witzgall, P. (2004, October). Pheromone Trials for the Monitoring of *Cydia splendana* in Chestnut Plantations of France. In III International Chestnut Congress 693 (pp. 605-610). <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.693.80>.

Dhaliwal, A. K., Kaur, J., Brar, D. S., & Jindal, J. (2018). Biocontrol potentiality of *Beauveria bassiana* Balsamo (Vuillemin) against *Chilo partellus* (Swinhoe) under controlled conditions. *Journal of Biological Control*. 32. 203-208. <https://doi.org/10.18311/jbc/2018/16055>.

Drekić, M., & Mihajlović, L. (2011). A contribution to the study of biology of *Curculio elephas* Gyll. (Coleoptera, Curculionidae). *Glasnik Šumarskog Fakulteta*, (104), 19-28. <https://doi.org/10.2298/GSF1104019D>.

Ekka, P., Ram, S. L., & Azariah, B. (2023). Isolation of potential entomopathogenic fungi from tea soil of dibrugarh and tinsukia district of Assam. *Journal of Advanced Scientific Research*, 14(09), 23-30. <https://doi.org/10.55218/JASR.202314904>.

Ezzine, O., Hausmann, A., & Jamâa, M. L. B. (2022). First record of two tortricidae and one curculionidae species on quercus suber's acorns in Tunisia. *Redia*, 105, 81-82.

Ferracini, C., Pogolotti, C., Lentini, G., Saitta, V., Busato, E., Rama, F., ... & Alma, A. (2020). Performance of pheromone-baited traps to monitor the seasonal abundance of tortrix moths in chestnut groves. *Insects*, 11(11), 807. <https://doi.org/10.3390/insects11110807>.

Ferracini, C., Pogolotti, C., Rama, F., Lentini, G., Saitta, V., Mereghetti, P., ... & Alma, A. (2021). Pheromone-mediated mating disruption as management option for *Cydia* spp. in chestnut orchard. *Insects*, 12(10), 905. <https://doi.org/10.3390/insects12100905>.

Ferreira-Cardoso, J., & Pimentel-Pereira, M. (2007). Capítulo 3: O castanheiro de fruto em Portugal. In J. Gomes-Laranjo, J. Ferreira-Cardoso, E. Portela & C. G. Abreu (Eds.), *Castanheiros* (pp. 23-42). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. ISBN: 978-972-669-844-9.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acedido em outubro de 2024.

Fontes, E. M. G., & Valadares-Inglis, M. C. (Eds.). (2020). *Controlo biológico de pragas da agricultura*. Brasília, DF: Embrapa. ISBN: 978-65-86056-01-3 Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1121825>. Acedido em setembro de 2024.

Gandarilla-Pacheco, F. L., de Luna-Santillana, E. D. J., Alemán-Huerta, M. E., Pérez-Rodríguez, R., & Quintero-Zapata, I. (2021). Isolation of native strains of entomopathogenic fungi from agricultural soils of northeastern Mexico and their virulence on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 104(4), 245-252. <https://doi.org/10.1653/024.104.0401>.

GBIF (a), Global Biodiversity Information Facility. Taxonomia do *Curculio elephas*. (2024). Disponível em: <https://www.gbif.org/species/123418846/verbatim>. Acedido em outubro de 2024.

GBIF (b), Global Biodiversity Information Facility. Backbone Taxonomy (2024). Checklist dataset. Disponível em: <https://doi.org/10.15468/39omei>. Acedido em setembro de 2024.

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

Geraldo, L. C. (2024). Prospecção de rizobactérias do gênero *Bacillus* e avaliação do potencial no controlo de pragas agrícolas.

Giannetti, D., Schifani, E., Castracani, C., Spotti, F., Mori, A., & Grasso, D. (2022). The introduced oak *Quercus rubra* and acorn-associated arthropods in europe: an opportunity for both carpophagous insects and their ant predators. *Ecological Entomology*, 47(4), 515-526. <https://doi.org/10.1111/een.13136>.

Gomes-Laranjo, J., Coutinho, J. P., Peixoto, F., & Araújo, J. A. (2007). Capítulo 5: Ecologia do castanheiro (*C. sativa* Mill.). In J. Gomes-Laranjo, J. Ferreira-Cardoso, E. Portela, & C. G. Abreu (Eds.), *Castanheiros* (pp. 109-130). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. ISBN: 978-972-669-844-9.

Guinossi, H. M. (1997). Disseminação e persistência dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. nas culturas de soja e trigo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/handle/1884/87798>.

Hasaballah, A. J., Fouda, M. A., Hassan, M. I., & Omar, G. M. (2017). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on adult housefly, *Musca domestica* L. *Egypt Acad. J. Biol. Sci.*, 10, 79-86. <https://doi.org/10.21608/eajb.2017.12176>.

Henriques, C. A., & Borges, A. J. (2017). Manual técnico do castanheiro: Estado da produção. CNCFS. Bragança.

Hoy, C. W., Feldman, J., Gould, F., Kennedy, G. G., Reed, G., & Wyman, J. A. (1998). Naturally occurring biological controls in genetically engineered crops. In P. Barbosa (Ed.), *Conservation Biological Control* (pp. 185-205). Academic Press.

Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P., El Meziane, A., & Yao, Y.-J. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20, 1204-1212. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.08.015>.

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. E. R. M. A. N. N. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (pp. 23-69). Wallingford UK: CABI publishing.

INE (2022). Indicadores - Main crops production (t) by geographic localization (agrarian region) and species. Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000021&contexto=bd&selTab=tab2. Acedido em março de 2024.

Jaronski, S. T. (2010). Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*, 55(2), 159-185.

Jeffers, A., & Chong, J. H. (2021). Biological control strategies in integrated pest management (IPM) programs. Clemson Univ. Cooperative, Land-Grant Press Clemson Ext., LGP, 1111, 1-

Jósvai, J. K., Voigt, E., & Tóth, M. (2016). A pear ester-based female-targeted synthetic lure for the chestnut tortrix, *Cydia splendana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 159(3).

Keleş, S. Ö., Ünal, S., Akan, S., & Karadeniz, M. (2024). Chestnut blight (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr) disease incidence and its effect on the morphological and anatomical features of *Castanea sativa* trees. *Forest Pathology*, 54(1), e12843.

Lee, J., et al. (2014). A technique for the prevention of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) using the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* M130. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 1-7. <https://doi.org/10.4014/jmb.1306.06033>

Leskey, T. and Wright, S. (2004). Influence of host tree proximity on adult plum *Curculio* (coleoptera: curculionidae) responses to monitoring traps. *Environmental Entomology*, 33(2), 389-396. <https://doi.org/10.1603/0046-225x-33.2.389>

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*. *Bull. Entomol.*103, 241–250.

Lorencetti, G. A. T., Potrich, M., Mazaro, S. M., Lozano, E. R., Barbosa, L. R., Menezes, M. J. S., & Gonçalves, T. E. (2018). Eficiência de *Beauveria bassiana* Vuill. e *Isaria* sp. para o controle de *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero & Dellapé (Hemiptera: Thaumastocoridae). *Ciência Florestal*, 28, 403-411.

Lozano-Gutierrez, J., & Espana-Luna, M. P. (2008). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the white grub *Laniifera cyclades* (Lepidoptera: Pyralidae) under field and greenhouse conditions. *Florida Entomologist*, 91(4), 664-668.

Mariano, R. D. L. R., da Silveira, E. B., de Assis, S. M. P., Gomes, A. M. A., Nascimento, A. R. P., & Donato, V. M. T. S. (2004). Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, 1, 89-111.

Marques, R. P., Monteiro, A. C., & Pereira, G. T. (2004). Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). *Ciência Rural*, 34, 1675-1680.

Marrão, R., Lopes, E., & Bento, A. (2021). O bichado-da castanha, *Cydia splendana* (Hübner)(Lepidoptera: Tortricidae) em Portugal. *Millenium: Journal of Education, Technologies and Health*, 2(15), 97-107. <https://doi.org/10.29352/mill0215.22311>.

McCoy, C. W., Storey, G. K., & Tigano-Milani, M. S. (1992). Environmental factors affecting entomopathogenic fungi in soil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 27(2), 107-111. Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwiS0unFrNmJAXrgP0HHTBkGokQFnoECBoQAQ&url=https%3A%2F%2Fseer.sct.embrapa.br%2Findex.php%2Fpab%2Farticle%2Fdownload%2F3825%2F1116&usg=AOvVaw15d0lotngesqrlHQwg4hfX&opi=89978449> Acedido em outubro de 2024.

Medo, J., Medová, J., Michalko, J., & Cagáň, L. (2021). Variability in virulence of *Beauveria* spp. soil isolates against *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Applied Entomology*, 145(1-2), 92-103.

Melo, D. R., Fernandes, E. K., Da Costa, G. L., Scott, F. B., & Bittencourt, V. R. (2008). Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to *Ctenocephalides felis felis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 388-390.

Meng, Y., Wellabada Hewage Don, P. D., & Wang, D. (2022). A new strain of *Lecanicillium uredinophilum* isolated from Tibetan Plateau and its insecticidal activity. *Microorganisms*, 10(9), 1832.

Meijerman, L., Ulemberg, S.A. (2000). Arthropods of economic importance. Eurasian Tortricidae, Version 1.0, CD-ROM. ETI, University of Amsterdam

Menu, F. (1993). Estratégias de emergência do gorgulho da castanha *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae). *Ecologia*, 96(3), 383-390.

Menu, F., & Desouhant, E. (2002). Bet-hedging for variability in life cycle duration: Bigger and later-emerging chestnut weevils have increased probability of a prolonged diapause. *Oecologia*, 132, 167–174. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0969-6>.

Mills, N., Beers, E., Shearer, P., Unruh, T., & Amarasekare, K. (2016). Comparative analysis of pesticide effects on natural enemies in western orchards: a synthesis of laboratory bioassay data. *Biological Control*, 102, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.006>.

Myczko, Ł., Dylewski, Ł., Chrzanowski, A., & Sparks, T. (2017). Acorns of invasive northern red oak (*quercus rubra*) in europe are larval hosts for moths and beetles. *Biological Invasions*, 19(8), 2419-2425. <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1452-y>.

Navarro, M. I. C. (2019). Diversidad genética y resistência del castaño a factores bióticos y abióticos. Tesis Doutoral. Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y del Desarrollo Rural Sostenible por la Universidad de Córdoba y la Universidad de Sevilla.

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).

Parra, J. R. P., de Sene Pinto, A., Nava, D. E., de Oliveira, R. C., & Diniz, A. J. F. (2024). Controlo biológico com parasitoides e predadores na agricultura brasileira. *Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz*.

Pedrini, N. (2022). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* shows its toxic side within insects: expression of genes encoding secondary metabolites during pathogenesis. *Journal of Fungi*, 8(5), 488. <https://doi.org/10.3390/jof8050488>

Pereira, J. A., Rodrigues, I., Lobo Santos, A., & Bento, A. (2018). Pragmas-chave associadas ao castanheiro e amendoeira. *Revista Agrotec*, 28. Disponível em: <http://www.agrotec.pt/noticias/pragas-chave-associadas-ao-castanheiro-e-amendoeira/>. Acedido em abril de 2024.

Pombo, D. A., & Aguiar, A. M. F. (2018). A cultura do castanheiro na Madeira: manual prático. A cultura do castanheiro na Madeira: manual prático.

Porto, N. S., & Garcia, E. Q. (2022). Uso de microrganismos entomopatogênicos no controle populacional de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). *Perquirere*, 19(2), 104-113.

R Core Team. (2021). R: Uma linguagem e ambiente para computação estatística. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria. URL <https://www.R-project.org/>.

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.

Santiago-Álvarez, C., Maranhão, E. A., Maranhão, E., & Quesada-Moraga, E. (2006). Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Bemisia tabaci* and its sporulation on cadavers. *BioControl*, 51, 519-532.

Santos, A., Marrão, R., & Bento, A. (2020). Pragas. In *Manual de boas práticas do castanheiro* (pp. 205-227).

Santos, T. S., Passos, E. M. D., Seabra, M. G. D. J., Souto, E. B., Severino, P., & Mendonça, M. D. C. (2021). Entomopathogenic fungi biomass production and extracellular biosynthesis of silver nanoparticles for bioinsecticide action. *Applied Sciences*, 11(6), 2465.

Souza, M. E. C. (2022). Bioecologia de pragas carpófagas da castanha e controle microbiológico de *Cydia splendana* (Lepidoptera, Tortricidae) e *Curculio elephas* (Coleoptera, Curculionidae) [Master dissertation].

Souza, M. E. C., Nóbrega, F., & Bento, A. A. (2023). Can *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. control the key fruit pests of the European chestnut tree, under field conditions? *Insects*, 14(4), 342. <https://doi.org/10.3390/insects14040342>.

Soula, B., & Menu, F. (2003). Variability in diapause duration in the chestnut weevil: Mixed ESS, genetic polymorphism or bet-hedging? *Oikos*, 100(3), 574-580.

Soula, B., & Menu, F. (2005). Extended life cycle in the chestnut weevil: prolonged or repeated diapause?. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(2), 333-340.

Sukhu, B., et al. (2019). The pathogenicity of *Beauveria bassiana* on *Diatraea centrella* larva of sugarcane in Guyana. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 7(1). <https://doi.org/10.24203/ajafs.v7i1.5708>

Steyn, L. A. I., Addison, P., & Malan, A. P. (2019). Potential of South African entomopathogenic nematodes to control the leaf miner, *Holocacista capensis* (Lepidoptera: Heliozelidae). *South African Journal of Enology and Viticulture*, 40(2), 1-1.

Tarasco, E., Fanelli, E., Salvemini, C., El-Khoury, Y., Troccoli, A., Vovlas, A., & De Luca, F. (2023). Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria: from genes to field uses. *Frontiers in Insect Science*, 3, 1195254.

Tonet, G. L., & Reis, E. M. (1979). Patogenicidade de *Beauveria bassiana* em insetos-pragas da soja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 14(1), 89-95.

Velez-Gavilan, J. (2022). *Curculio elephas* (european chestnut weevil). <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.17027>.

Venette, R. C., Davis, E. E., Heisler, H., & Larson, M. (2003). Mini avaliação de risco: Gorgulho da castanha, *Curculio elephas* (Gyllenhal) [Coleoptera: Curculionidae]. Departamento de Entomologia da Universidade de Minnesota.

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.

Vicentini, S., Faria, M., & de Oliveira, M. R. (2001). Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method. *Neotropical Entomology*, 30, 97-103.

Waldboth, M., & Oberhuber, W. (2009). Synergistic effect of drought and chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) on growth decline of European chestnut (*Castanea sativa*). *Forest Pathology*, 39(1), 43-55.

Waquil, J. M., Viana, P. A., & Cruz, I. (2006). Cultivo do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/487021> . Acedido em agosto de 2024.

Win, T., Lee, J., Woo, R., & Woo, S. (2022). Screening and evaluation of entomopathogenic fungi against the bean bug, *riptortus pedestris* using multiple tools. *Entomological Research*, 52(11), 493-503. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12623>.

Wraight, S. P., Howes, R. L., Castrillo, L. A., Griggs, M. H., Galaini-Wraight, S., Carruthers, R. I., ... & Keith, L. M. (2022). Laboratory studies assessing the microbial biocontrol potential of diverse strains of *Beauveria bassiana* isolated from coffee berry borer, with emphasis on strains from Hawai 'i Island and comparisons to commercial strain GHA. *Journal of invertebrate pathology*, 194, 107819.

Xiao, G., Ying, S. H., Zheng, P., Wang, Z. L., Zhang, S., Xie, X. Q., ... & Feng, M. G. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, 2(1), 483.

Yu, L., Xu, S. Y., Tong, S. M., Ying, S. H., & Feng, M. G. (2022). Optional strategies for low-risk and non-risk applications of fungal pesticides to avoid solar ultraviolet damage. *Pest Management Science*, 78(11), 4660-4667.

Yu, D. S., Achterberg, K. van, Horstman, K. (2004). World Ichneumonidea. Taxonomy, biology, morphology and distribution. Taxapad 2005, CD-ROM, Lexington, Kentucky.

Zhang, Z., Lü, Y., Xu, W., Sui, L., Du, Q., Wang, Y., ... & Li, Q. (2020). Influence of genetic diversity of seventeen *Beauveria bassiana* isolates from different hosts on virulence by comparative genomics. *BMC Genomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06791-9>.

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.

Zhumatayeva, U. T., Duissembekov, B. A., Dutbayev, Y., Kidirbayeva, K. K., Alshynbayev, O. A., & Bekbulatova, G. A. (2022). Effective strains of *Beauveria bassiana* and *B. pseudobassiana* used against the *Asian locust* (*Locusta migratoria* L.) in Kazakhstan. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 22(4), 492-501. Disponível em: <https://thescipub.com/abstract/ojbsci.2022.492.501>.

Acedido em outubro de 2024.

7 ANEXOS

Anexo 1

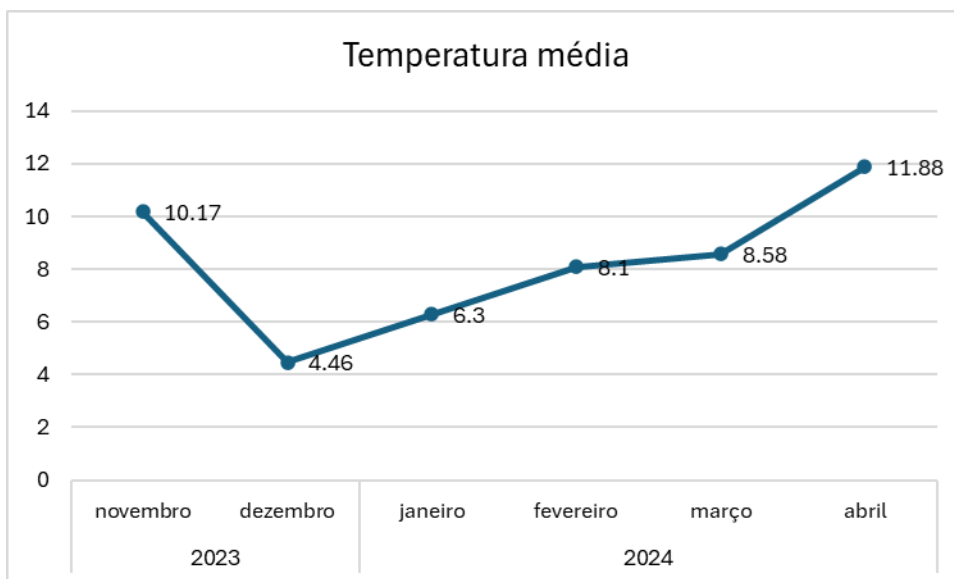


Figura 34. Dados de temperatura média em cada mês durante a condução do ensaio registados pela estação meteorológica da Escola Superior Agrária de Bragança.

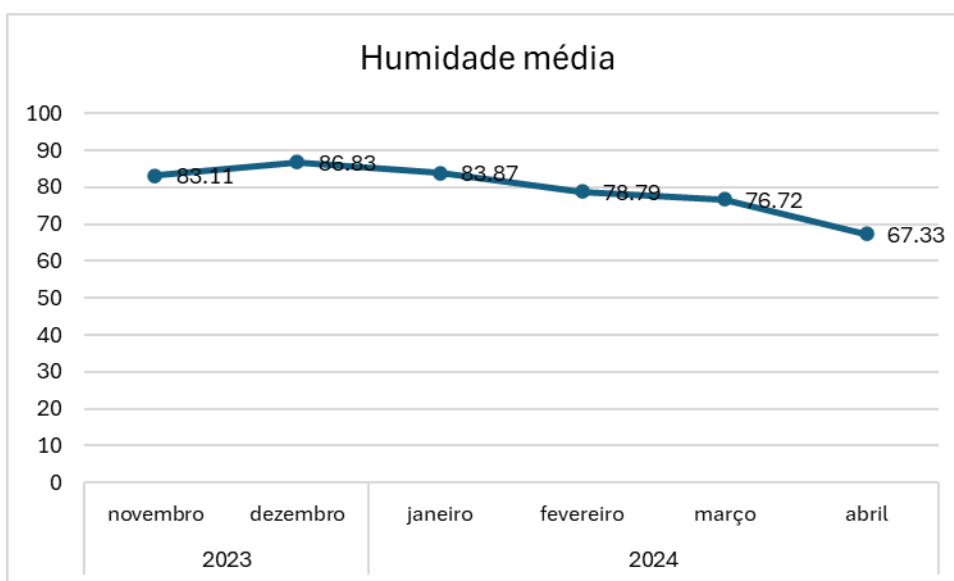


Figura 35. Dados da humidade relativa do ar durante a condução do ensaio registados pela estação meteorológica da Escola Superior Agrária de Bragança.