

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Aphis gossypii* GLOVER, 1877 (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EM PEPINO *Cucumis sativus* L. E DESENVOLVIMENTO DE UM INSETICIDA À BASE DE *Beauveria bassiana* (BALS.)

VUILL

Por

ANA CAROLINE DE AZEVEDO TEIXEIRA

(Sob Orientação do Professor Edmilson Jacinto Marques)

RESUMO

A cultura do pepino tem sua produção afetada pelo ataque do pulgão *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae), que coloniza a planta durante todo seu estágio fenológico. O uso de inseticidas químicos para seu controle tem gerado sérios problemas, como o surgimento de populações resistentes aos princípios ativos utilizados. Este trabalho teve por objetivo avaliar preparações à base de fungo entomopatogênico para controle desse inseto-praga em plantas de pepino e desenvolver um inseticida a base de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Em condições de laboratório, os três isolados mais promissores CG 864, PL 63 e IBCB 66, foram testados, com cinco concentrações de conídios ( $1 \times 10^5$ ;  $1 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^7$ ;  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios/mL) e a testemunha (água esterilizada + Tween 80). Foram realizados estudos envolvendo duas preparações do inseticida biológico: a) suspensão aquosa (conídios puros de *B. bassiana* CG 864 + Tween 80 a 0,01%), utilizada como padrão e b) formulação em dispersão oleosa [conídios puros + óleo vegetal emulsionável], do isolado CG 864, sendo diluída em água para pulverização nas concentrações de 0,5, 1; 2; 4; 8 e 16% de óleo. As preparações do fungo foram padronizadas para  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL na calda aplicada. Isolados do fungo *B. bassiana* foram mais virulentos ao

pulgão *A. gossypii* que os isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. e *Lecanicillium longisporum* (Zimmerman) Zare & Gams. Os isolados CG 864, IBCB 66 e PL 63 de *B. bassiana* foram os mais promissores. Preparações de *B. bassiana* reduziram a população do pulgão *A. gossypii*, com níveis de eficiência de controle de 52,3% a 83,8%, porém, não houve diferença na densidade populacional da praga entre a dispersão oleosa e a suspensão aquosa de conídios.

**PALAVRAS-CHAVE:** Controle microbiano, pulgão, formulação, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium longisporum*.

FUNGI ENTOMOPATHOGENIC EVALUATION FOR *Aphis gossypii* GLOVER 1877  
(HEMIPTERA: APHIDIDAE) CONTROL, IN CUCUMBER *Cucumis sativus* L. AND  
DEVELOPMENT OF A BIOLOGICAL INSECTICIDE FORMULATED TO *Beauveria*  
*bassiana* (BALS.) VUILL BASE

By

ANA CAROLINE DE AZEVEDO TEIXEIRA

(Under the Direction of Professor Edmilson Jacinto Marques)

ABSTRACT

Cucumber crop has its production affected by the attack of the aphid *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae), which colonizes the plant throughout all developmental stages. The use of chemical insecticides to control it has generated serious problems such as the emergence of resistant populations to the active ingredients used. This work aimed to evaluate fungus preparations based on entomopathogenic to control this insect pest in cucumber plants, and develop an insecticide the base of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Under laboratory conditions, the three most promising isolates were tested, CG 864, PL 63 and IBCB 66, with five concentrations of conidia ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  conidia / ml) and control (sterile water + Tween 80). In the third stage of the experiments studies were conducted involving two preparations of biological insecticide: a) an aqueous suspension [pure conidia of *B. bassiana* 864 CG + 0.01% Tween 80; used as a standard] b) formulation of oil dispersion [conidia pure vegetable oil emulsifiable +] CG 864 isolated, and diluted with water for spraying the concentrations of 0.5; 1; 2 and 4% oil. The fungus preparations were standardized to have  $1.0 \times 10^7$  spores / mL in applied spray. Isolates of the fungus *B. bassiana* were more virulent aphid *A.*

*gossypii* that isolates *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. and *Lecanicillium longisporum* (Zimmerman) Zare & Gams. The isolates CG 864, IBCB 66 and PL 63 of the *B. bassiana* were the most virulent. *B. bassiana* preparations reduced the aphid population *A. gossypii*, with control efficiencies of 52.3% to 83.8%, however, there was no difference in the pest population density between the oil dispersion and the aqueous suspension conidia.

KEY WORDS: Biological control, aphid, formulation, biological insecticide, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium longisporum*.

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Aphis gossypii* GLOVER, 1877 (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EM PEPINO *Cucumis sativus* L. E DESENVOLVIMENTO DE UM INSETICIDA À BASE DE *Beauveria bassiana* (BALS.)

VUILL

Por

ANA CAROLINE DE AZEVEDO TEIXEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE – PE

Fevereiro - 2015

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Aphis gossypii* GLOVER, 1877 (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EM PEPINO *Cucumis sativus* L. E DESENVOLVIMENTO DE UM INSETICIDA À BASE DE *Beauveria bassiana* (BALS.)

VUILL

Por

ANA CAROLINE DE AZEVEDO TEIXEIRA

Comitê de Orientação:

Edmilson Jacinto Marques – UFRPE

Miguel Michereff Filho – CNPH

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Aphis gossypii* GLOVER, 1877 (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EM PEPINO *Cucumis sativus* L. E DESENVOLVIMENTO DE UM INSETICIDA À BASE DE *Beauveria bassiana* (BALS.)

VUILL

Por

ANA CAROLINE DE AZEVEDO TEIXEIRA

Orientador: \_\_\_\_\_  
Edmilson Jacinto Marques – UFRPE

Examinadores: \_\_\_\_\_  
Miguel Michereff Filho - CNPH

\_\_\_\_\_  
José Vargas de Oliveira - UFRPE

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade, à Embrapa Hortaliças (CNPQ) e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) por me apoiarem no desenvolvimento do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa.

A minha mãe Aline e ao meu irmão Fernando, pelo incentivo e apoio. Ao Meu irmão Fernando por ter recuperado o meu HD, tornando possível a publicação deste trabalho. Ao meu amado sobrinho Miguel, que ainda não chegou a este mundo, mas já deixa meus dias mais felizes. Aos amigos Clara Ozzy, Leandro Bastos, Maiza Barbosa e Maria pelas horas de conversas, confidências, brincadeiras, incentivos, puxões de orelha e por toda confiança depositada em mim, obrigada por não duvidarem do meu potencial, vocês são fundamentais na minha vida, os amo.

Ao amigo Patrick El pinga pela enorme ajuda de última hora e por todo incentivo.

Ao professor Edmilson Jacinto Marques (UFRPE) e ao pesquisador Miguel Michereff Filho (CNPQ), meus orientadores, pela confiança, incentivo, paciência e amizade, vocês são exemplos de profissionais pra mim.

Aos professores José Vargas, Reginaldo Barros e Jorge Torres pelo conhecimento adquirido em suas aulas, pelas conversas, incentivo e paciência.

Aos amigos do PPGEA, especialmente Aline Fonseca (que não foi muito com a minha cara, mas hoje em dia me ama), por toda ajuda, dicas, amizade, confidências e companheirismo, você assumiu um papel especial na minha vida, te amo, “Nêga”.



Aos amigos do Laboratório de Entomologia da Embrapa Hortaliças (CNPq), em especial a Patrícia Magrela, Nayara Cristina, Rômulo Augusto e Danilo Akio, por toda ajuda, apoio, amizade e pelas conversas sempre tão animadas. À amiga Daniele, do Laboratório de Micologia de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), por sempre se disponibilizar a me ajudar e também aos pesquisadores Dr. Rogério Biaggione Lopes e Marcos Rodrigues de Faria por todo o apoio logístico e ensinamentos na área de Patologia de Insetos.

A todos aqueles que me ajudaram direta e indiretamente, permanecendo ao meu lado nos momentos importantes desta caminhada.

## SUMÁRIO

Página

AGRADECIMENTOS ..... viii

### CAPÍTULOS

1	INTRODUÇÃO .....	1
	LITERATURA CITADA .....	6
2	SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE <i>Aphis gossypii</i> GLOVER, 1877 (HEMIPTERA: APHIDIDAE) E DESENVOLVIMENTO DE UM INSETICIDA BIOLÓGICO FORMULADO À BASE DE <i>Beauveria bassiana</i> (BALS.) VUILL EM PEPINO .....	9
	RESUMO .....	10
	ABSTRACT .....	11
	INTRODUÇÃO .....	12
	MATERIAL E MÉTODOS .....	20
	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
	AGRADECIMENTOS .....	34
	LITERATURA CITADA.....	34

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

Cultivado no Brasil desde o século XVI, o pepino pode ser consumido na forma *in natura* ou em conserva, havendo diferentes sistemas de produção de acordo com a finalidade dessa hortaliça. É fonte de sais minerais, principalmente cálcio, fósforo e ferro, e de vitaminas A, do complexo B e C e selênio, o pepino é alimento ideal para ser incluso na dieta diária (Mascarenhas *et al.* 2007).

O pepino é originário da Índia, e, provavelmente a partir do sopé das montanhas do Himalaia, onde apenas duas variedades botânicas foram descobertas, o pepino var. *sativus* e o pepino selvagem var. *hardwickii* (Royle) Alef. O cultivo do pepino parece ter se espalhado rapidamente da Índia para a Ásia Ocidental, e depois para o sul da Europa (Lv *et al.* 2012). Atualmente o pepino é cultivado em mais de 80 países (Adhkari *et al.* 2012).

A produção de pepino é dificultada por doenças causadas por bactérias (por exemplo, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*), vírus (por exemplo, Vírus do mosaico do pepino), fungos a exemplo de *Sphaerotheca fulginea* (Schltld.) Pollacci, e *Erysiphe cichoracearum* DC, e por oomicetos como, *Phytophthora capsici* L. e *Pseudoperonospora cubensis* (Berk & M.A.Curtis) Rostovzev (Adhkari *et al.* 2012).

Os insetos-praga mais comuns na cultura do pepino são: as broca-das-curcubitáceas (*Diaphania nitidalis* Cramer e *Diaphania hyalinata* L.) a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B), o pulgão *Aphis gossypii* Glover, a mosca-das-frutas *Anastrepha grandis* (Macquart), a lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* (Hufnagel), vaquinha *Diabrotica speciosa* (Germar), a broca-grande-do-fruto *Helicoverpa zea* (Boddie) e o percevejo-escuro *Leptoglossus gonagra* Fabr.

(Mascarenhas *et al.* 2007). Dentre estas pragas, merece destaque o pulgão *A. gossypii*, uma vez que coloniza a planta durante todo seu o ciclo biológico e pode ocasionar perda severa na produção caso não seja controlado eficientemente (Gallo *et al.* 2002, Szymczak *et al.* 2009).

O pulgão *A. gossypii* é uma importante praga de hortaliças, culturas anuais, fruteiras, e ornamentais. É um inseto pequeno, medindo de 1 a 3 mm de comprimento, corpo periforme e pouco esclerotizado, possui colorações que variam do amarelo claro e verde claro ao verde escuro, nas formas ápteras; as formas aladas possuem cabeça e tórax negros e antenas bem desenvolvidas e escuras com presença de cerdas sensoriais denominadas sensilos, aparelho bucal do tipo picador sugador. Possuem dois apêndices laterais de forma tubular, os sinfúnculos, estes estão presentes na extremidade posterior do abdome e se prolongam para trás e para cima do mesmo, esta é a principal característica desse grupo, possui também um abdome central denominado codícula, por onde são expelidas constantemente quantidades de honeydew (Gallo *et al.* 2002, Harrington & Van Emden 2007) (Goff & Tissanot 1932, Szymczak *et al.* 2009). Sua reprodução nos trópicos é por partenogênese telítica, ou seja, a fêmea não depende do macho e produz apenas ninfas fêmeas. Esta praga pode atacar o pepineiro, durante toda sua fenologia; Em regiões com clima quente e seco, sua reprodução é mais rápida, podendo o seu ciclo biológico ser completado em uma semana (Gallo *et al.* 2002, Bueno 2005).

A alimentação de *A. gossypii* trata-se de uma sucção contínua dos tecidos floemáticos da planta, durante esse processo pode ocorrer a injeção de toxinas na planta pelos adultos e pelas ninfas, ocasionando danos nas mudas e plantas jovens e encarquilhamento das folhas, brotos e ramos; afetando a produção de frutos e podendo causar a morte das plantas. O “honeydew” expelido pelos pulgões durante a alimentação, se acumula na superfície das folhas favorecendo o desenvolvimento do fungo *Capnodium* sp. causador da fumagina sobre as folhas e estruturas reprodutivas da planta. Isso prejudica o processo fotossintético e conseqüentemente a produção e

a qualidade dos frutos (Gallo *et al.* 2002; Harrington & van Emden 2007). Este pulgão também pode transmitir de diversos vírus às curcubitáceas, como o mosaico do mamoeiro – estirpe melancia (PRSV-W), o mosaico amarelo da abobrinha-de-moita (ZYMV), o mosaico-2 da melancia (WMV-2) e o mosaico do pepino (CMV) (Zambolim *et al.* 2009).

No Distrito Federal, os sistemas agrícolas tradicionais e orgânicos têm sofrido severas infestações do pulgão *A. gossypii*. Isto tem obrigado os agricultores a utilizar grandes quantidades de inseticidas químicos que, além de poluírem o ambiente e matar os insetos benéficos (polinizadores, parasitóides e predadores), levam à seleção de populações de insetos resistentes aos princípios ativos utilizados. A situação mostra-se mais crítica nos sistemas de produção orgânica, visto que a legislação vigente (Instrução normativa MAPA nº 17 de maio/1999 e lei 10.831 de dezembro/2003) exige que os produtores certificados adotem alternativas aos agrotóxicos para a prevenção e controle de pragas. Dentre as alternativas ao uso de inseticidas químicos, o controle biológico mostra-se como uma ferramenta promissora a ser implementada no manejo integrado de *A. gossypii* na cultura do pepino.

O controle químico tem apresentado eficiência limitada, visto que *A. gossypii* possui resistência a uma grande variedade de classes de inseticidas (Sattar *et al.* 2012), principalmente fosforados, piretróides e carbamatos (Gong *et al.* 2014). Essa praga pode rapidamente se tornar um grande problema quando controle químico mostra-se ineficaz por causa da resistência. Diante disso, é essencial e urgente o desenvolvimento de métodos alternativos ao controle químico e que sejam altamente eficientes contra *A. gossypii* praga (Li *et al.* 2013).

Os fungos entomopatogênicos são inimigos naturais muito comuns em ecossistemas agrícolas e naturais. Os esporos dos fungos aderem-se e penetram no hospedeiro pelo tegumento. Estes patógenos não precisam ser ingeridos para causarem a morte do hospedeiro, diferente de outros microorganismos como as bactérias e vírus, apesar de terem sua eficácia comprovada no

controle de várias espécies de insetos e ácaros, no entanto, o uso de fungos em programas de manejo integrado de pragas (MIP), ainda é baixo (Bueno 2005, Alves & Lopes 2008).

Inseticidas à base de fungos entomopatogênicos representam uma alternativa para o manejo de insetos sugadores, inclusive, quando agrotóxicos não são permitidos, como nos cultivos orgânicos, como consequência, reduzindo as alternativas de controle (Alves & Lopes 2008). Assim, o desenvolvimento de um micopesticida para controle de *A. gossypii* é extremamente interessante por contribuir para a implementação de modelos de agricultura sustentável e reduzir o uso de inseticidas químicos.

A viabilidade e atividade biológica dos fungos entomopatogênicos são altamente influenciadas pelos fatores bióticos e abióticos como: temperatura, umidade, substrato e radiação ultravioleta (Goetel *et al.* 2000). A temperatura atua sobre os fungos entomopatogênicos afetando a produção, estabilidade na estocagem e patogenicidade nas condições de campo (Goetel *et al.* 2000). A radiação solar é um agente causador da inativação de entomopatogênicos. Para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. os efeitos deletérios da exposição a radiação ultra-violeta são muito graves, visto que reduz a persistência do fungo (Inglis *et al.* 1995, Fargues *et al.* 1996).

No Brasil, vários fungos entomopatogênicos têm sido avaliados para o controle de pulgões, com destaque para *B. bassiana* e *Lecanicillium* (*Verticillium*) spp. (Loureiro & Moino Jr., 2006, Medeiros *et al.* 2007, Michereff-Filho *et al.* 2011). Diferentes formulações dos fungos *B. bassiana* e *Lecanicillium* spp. já são comercializadas em outros países para controle de pulgões, mas até o momento, poucos produtos biológicos estão disponíveis no mercado brasileiro e oficialmente registrados para uso (Michereff-Filho *et al.* 2009, Brasil 2014).

Os micopesticidas são produtos à base de propágulos vivos de fungos, com o objetivo de controlar populações de pragas através de aplicações inundativas e inoculativas (Faria & Wraight

2007), esses propágulos podem ser classificados como hifas (micélio) e blastósporos ou conídios, estes últimos podem ser aéreos ou submersos (Wraight *et al.* 2001, Leite *et al.* 2003).

Apesar de muitos produtos serem baseados em tipos específicos de propágulos, o produto final pode conter uma pequena quantidade de outros tipos de propágulos. Produtos baseados em conídios aéreos podem conter hifas e vice-versa e micoinseticidas produzidos através de fermentação líquida podem apresentar uma mistura de conídios submersos, blastósporos e hifas (Leite *et al.* 2003).

Os adjuvantes podem estar incorporados às formulações ou ser utilizados em mistura no tanque, no momento da aplicação. Entre outras propriedades, têm função surfactante, umectantes, protetores contra radiação ultravioleta (fotoprotetora), antievaporante, promotores de virulência ou sinergistas e fagoestimulante (Moore & Caudwell 1997, Jones & Burges 1998, Alves *et al.* 1998).

A maioria dos inseticidas biológicos à base de fungos entomopatogênicos comercializados no país não é formulada, sendo vendida como é produzida (fungo+substrato), ou seja, como concentrados técnicos (TK), sem nenhum tratamento posterior preparações, que lhe assegure maior eficiência de controle, capacidade de armazenamento, persistência no agroecossistema ou praticidade de manuseio (Faria & Magalhães 2001). Os concentrados técnicos (TK) apresentam algumas desvantagens. Com a dificuldade de manuseio durante o preparo e a aplicação, uma vez que são pouco práticos em alguns casos e em outros, podem causar o entupimento de bicos dos pulverizadores. Produtos que dificultam a aplicação levam a um maior custo de aplicação, e insatisfação do produtor (Faria & Magalhães 2001). A utilização de conídios de *B. bassiana* formulados em óleos (dispersão oleosa – OD) tem sido atribuída ao aumento na fixação dos conídios à cutícula hidrofóbica dos artrópodes, maiores taxas de germinação e melhor dispersão

dos conídios, bem como à maior persistência dos conídios na superfície vegetal após a sua aplicação (Faria & Wraight 2007).

Devido ao consumo principalmente *in natura* das hortaliças, toda alternativa que vise o manejo mais racional de pragas, resultará em menor impacto ambiental e risco à saúde dos produtores e na produção de alimentos com melhor qualidade e baixo nível de resíduos tóxicos (Araújo Jr. *et al.* 2008).

### Literatura citada

- Adhikari, B.N., E.A. Savory, B. Vaillancourt, K.L. Childs, J.P. Hamilton, B. Day & C.R. Buill. 2012.** Expression profiling of *Cucumis sativus* in response to infection by *Pseudoperonos cubensis*. PLoS ONE 7: 1-10.
- Alves, S.B. 1998.** Fungos entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1166p.
- Alves, S.B. & R.B. Lopes. 2008.** Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e desafios. Piracicaba, FEALQ, 414p.
- Araujo Jr., J. M. 2008.** Seleção de fungos entomopatogênicos associados ao óleo de nim para controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em couve. Dissertação de mestrado, UFRPE, Recife, 55p.
- Batista, G. C. 1990.** Seletividade de inseticidas e manejo integrado de pragas, p. 199-213. In W. B. Crocomo (org.), Manejo Integrado de Pragas. Botucatu, UNESP, 358p.
- Brasil. 2014.** Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Brasília: MAPA, 2003. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 08 de maio de 2014.
- Bueno, V.H.P. 2005.** Controle biológico de pulgões ou afídeo-praga em cultivo protegido. Inf. Agropec. 28: 9-17.
- Fargues, J., M.S. Goettel, N. Smits, A. Ouedraogo, C. Vidal, L.A. Lacey, C.J. Lomer & M. Rougier. 1996.** Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. Mycopathologia 135: 171-181.



- Faria, M.R. & S.P. Wraight. 2007.** Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* 43: 238-240.
- Faria, M.R. & B.P. Magalhães. 2001.** O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biotec. Ciênc. Desenv.* 22: 18-21.
- Faria, M.R. & S.P. Wraight. 2007.** Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* 4: 237-256.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** *Entomologia Agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Goettel, M.S., G.D. Inglis & S.P. Wraight. 2000.** Fungi, p. 255–282. In: Lacey, L.A. & Kaya, H.K. (eds.), *Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests*. Dordrecht, Kluwer Academic, 911p.
- Goff, C. C. & A. N. Tissot. 1932.** The melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Bull. Fla. Agric. Exp. Stn.*, 23p.
- Gong, Y. H., X. R. Yu, Q. L. Shang, X. Y. Shi & X. W. Gao. 2014.** Oral delivery mediated RNA interference of a carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *PLoS ONE* 9: 1-7.
- Harrington, R. & H.F. Van Emden. 2007.** *Aphids as crop pests*. London, CABI Publis., 717p.
- Inglis, D.G., M.S. Goettel & D.L. Johnson. 1995.** Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biol. Control* 5: 581-590.
- Jones, K.A. & H.D. Burges. 1998.** Technology of formulation and application, p. 7-30. In H.D. Burges (ed.). *Formulation of microbial pesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Dordrecht, Kluwer Academic, 412p.
- Leite, L.G., A. Batista Filho, J.E.M. Almeida & S.B. Alves. 2003.** Produção de fungos entomopatogênicos. Ribeirão Preto, A.S. Pinto, 92p.
- Li, Z. Q., S. Zhang, J. Y. Luo, C. Y. Wang, L. M. Lv, S. L. Dong & J. J. Cui. 2013.** Ecological adaption analysis of the Cotton aphid (*Aphis gossypii*) in different phenotypes by transcriptome comparison. *PlosOne* 8:1-6.
- Lv, J., J. Qi, Q. Shi, D. Shen, S. Zhang, G. Shao, H. Li, Z. Sun, Y. Weng, Y. Shang, X. Gu, X. Li, X. Zhu, J. Zhang, R.V. Treuren, W.V. Dooijeweert, Z. Zhang & S. Huang. 2012.** Genetic diversity and population structure of cucumber (*Cucumis sativus*). *PlosOne* 7: 1-9.

- Loureiro, E.S. & A. Moino Jr. 2006.** Patogenicidade de fungos hifomicetos aos pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Neotrop. Entomol. 35: 660-665.
- Mapa. Agrosoft** – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Brasília: MAPA, 2003. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> Acesso em: 08 de maio de 2014.
- Mascarenhas, M.H.T., W.R. Oliveira, J.C. Simões & L.M.A. Resende. 2007.** Pepino, p.603-610. In T.J. Paula Jr. & M. Venzon, (eds.), 101 Culturas – manual de tecnologias agrícolas. Belo Horizonte, EPAMIG. 800p.
- Medeiros M.B., S.B. Alves, R.B. Lopes, A.S. Barbosa, M.O. Garcia & L.M. Berzaghi. 2007.** Associação de biofertilizante líquido e fungos entomopatogênicos no controle do pulgão *Aphis* sp. em aceroleira (*Malpighia glabra* L.). Rev. Bras. Agroec. 2: 821-824.
- Michereff Filho M., S.O.D. Oliveira, R.S. Liz & M. Faria. 2011.** Cage and field assessments of *Beauveria bassiana*-based mycoinsecticides for *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) control in cabbage. Neotrop. Entomol. 40: 470-476.
- Moore, D., & R. W. Caudwell. 1997.** Formulation of entomopathogens for the control of grasshoppers and locusts. Mem. Entomol. Soc. Canada 171: 49–67.
- Sattar, S., C. A. Quaye, Y. Song, J. A. Anstead, R. Sunkar & G. A. E. Thompson. 2012.** Expression of small RNA in *Aphis gossypii* and its potential role in the resistance interaction with melon. PlosOne 7: 1-13.
- Szymczak, L. S., M. Z. Schuster, C. Rohde & D. Broetto. 2009.** Efeito de inseticidas orgânicos sobre o pulgão *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) na cultura do pepino (*Cucumis sativus*) em condições de laboratório. Rev. Bras. Agroec. 4: 3204-3207.
- Van Emden, H. F. & H. Harrington. 2007.** Aphids as crop pests. p. 10-11. In L. Zambolim, F.X.R. Vale & H. Costa (eds.), Controle de doenças e plantas – hortaliças (apiáceas; beterraba; cucurbitáceas; cultivos hidropônicos; pimentão; quiabeiro; tomate). London, CABI, 878P.

## CAPITULO 2

### SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Aphis gossypii* GLOVER, 1877 (HEMIPTERA: APHIDIDAE) E DESENVOLVIMENTO DE UM INSETICIDA À BASE DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL EM PEPINO<sup>1</sup>

ANA C.A. TEIXEIRA<sup>1,2</sup>; MIGUEL MICHEREFF-FILHO<sup>3</sup> E EDMILSON J. MARQUES<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Departamento de Agronomia – Patologia de insetos, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup> Embrapa Hortaliças - Entomologia, Rodovia Brasília/Anápolis, BR 060, Km 9, Caixa Postal 218, 70359-970 Brasília, DF, Brasil.

---

<sup>1</sup> Teixeira, A.C.A.; Marques, E.J.; Michereff-Filho, M. & M.R. Faria. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) e desenvolvimento de um inseticida à base de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em pepino. Artigo a ser submetido.

RESUMO - Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de isolados de fungos entomopatogênicos no controle de *Aphis gossypii* Glover em pepino e desenvolver um inseticida formulado à base de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Na primeira fase de experimentos, em condições de laboratório, foram avaliados isolados de *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. e *Lecanicillium longisporum* (Zimmerman) Zare & Gams. Cinco isolados de *B. bassiana*, causaram mortalidade superior a 70% destacando-se o padrão GHA, para *M. anisopliae* IBCB 425, com 50,8% da mortalidade das ninfas enquanto o isolado ESALQ 1300 de *L. longisporum* ocasionou 30%. Na segunda fase, os três isolados mais promissores CG 864, PL 63 e IBCB 66, foram testados, com cinco concentrações de conídios ( $1 \times 10^5$ ;  $1 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^7$ ;  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios/mL) e a testemunha. As percentagens de mortalidade acumulada aos sete dias desde a inoculação dos isolados variaram de 2,0 a 95,6%. Os isolados CG 864 (CL<sub>50</sub> de  $6,3 \times 10^6$  conídios/mL) e PL 63 (CL<sub>50</sub> de  $7,1 \times 10^6$  conídios/mL); foram os mais virulentos e não diferiram significativamente entre si, enquanto IBCB 66 (CL<sub>50</sub> de  $3,2 \times 10^7$  conídios/mL; TMS de sete dias) foi menos promissor contra o pulgão. Na terceira fase dos experimentos foram realizados estudos envolvendo duas preparações com o isolado CG 864: a) *suspensão aquosa* e b) *formulação em dispersão oleosa*, sendo diluída em água para pulverização nas concentrações de 0,5; 1; 2; 4 e 8% de óleo. Todas as preparações a base de *B. bassiana* propiciaram alta mortalidade de pulgões, porém sem diferença estatística entre a suspensão aquosa de conídios e a dispersão oleosa.

PALAVRAS-CHAVE: Controle microbiano, pulgão, formulação, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium longisporum*

FUNGI ENTOMOPATHOGENIC EVALUATION FOR *Aphis gossypii* GLOVER 1877  
(HEMIPTERA: APHIDIDAE) CONTROL AND DEVELOPMENT OF A BIOLOGICAL  
INSECTICIDE FORMULATED TO *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill BASE IN CUCUMBER  
*Cucumis sativus* L.

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the entomopathogenic fungal isolates of efficiency in the control of *Aphis gossypii* Glover on cucumber, and develop an insecticide the base of *Beauveria bassiana*. In the first phase of experiments in laboratory conditions, were isolates of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. and *Lecanicillium longisporum* (Zimmerman) Zare & Gams. For *B. bassiana*, five isolates caused mortality exceeding 70% highlighting the isolated pattern GHA, to *M. anisopliae*, isolated IBCB 425, with 50.8% mortality of nymphs while the isolated ESALQ 1300 *L. longisporum* caused 30%. In the second phase, the three most promising isolates were tested, CG 864, PL 63 and IBCB 66, with five concentrations of conidia ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  conidia / ml) and control. The cumulative mortality percentages for seven days from inoculation isolates ranged from 2.0 to 95.6%. The isolates CG 864 (LC50  $6,3 \times 10^6$  conidia / mL; TMS four days) and PL 63 (LC50  $7,1 \times 10^6$  conidia / mL); were the most virulent and did not differ significantly from each other, while IBCB 66 (LC50  $3,2 \times 10^7$  conidia / mL) was less promising against aphid. In the third phase of the experiments were conducted studies involving two preparations of biological insecticide: a) aqueous suspension b) formulation of oily dispersion, CG 864 isolated, and diluted with water for spraying the concentrations of 0.5; 1; 2; 4 and 8% oil. All preparations of *B. bassiana* showed high mortality of aphids, but without significant differences between the aqueous suspension of conidia and oily dispersion.

KEYWORDS: Biological control, aphid, formulation, biological insecticide, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium longisporum*

## Introdução

O pepino (*Cucumis sativus* L.) pertence à família Curcubitaceae, e se trata de uma hortaliça anual que possui grandes folhas lobadas e pilosas, e, pequenas flores amarelas (Mascarenhas *et al.* 2007). A grande quantidade de tricomas presentes no caule, pecíolos e folhas causam irritações, tornando desconfortável o manuseio dessa planta.

A presença de substâncias antioxidantes permite o uso do pepino na produção de cosméticos e medicamentos, prevenindo o envelhecimento precoce das células e agindo de forma protetora contra doenças crônicas como o câncer. Auxilia no crescimento e desenvolvimento de cabelos e unhas e na formação de ossos e dentes por conter vitaminas do complexo B, é uma das hortaliças mais consumidas no mundo (Mascarenhas *et al.* 2007).

Os insetos-praga mais comuns no pepineiro são: as broca-das-curcubitáceas (*Diaphania nitidalis* Cramer e *Diaphania hyalinata* L.), a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B, o pulgão *Aphis gossypii* Glover, a mosca-das-frutas *Anastrepha grandis* (Macquart), a lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* Hufnagel, a vaquinha *Diabrotica speciosa* Germar, a broca-grande-do-fruto *Helicoverpa zea* Boddie e o percevejo-escuro *Leptoglossus gonagra* Fabr. (Mascarenhas *et al.* 2007). Dentre estas pragas, merece destaque o pulgão *A. gossypii*, uma vez que coloniza a planta durante todo seu ciclo biológico e pode ocasionar perda severa na produção caso não seja controlado eficientemente (Gallo *et al.* 2002; Szymczak *et al.* 2009).

O pulgão *A. gossypii* é uma praga importante para diversas culturas em todo o mundo pelo fato de ser sugador de seiva e vetor de vírus de plantas. As interações entre pulgões e plantas compreendem a seleção da planta hospedeira, a penetração dos tecidos vegetais e a sucção da seiva, além da reação das plantas ao ataque do inseto. As atividades de *A. gossypii* pode afetar diretamente o desenvolvimento da planta, causando lesões localizadas ou sistêmicas, enquanto a resposta da planta afeta os processos alimentares e reprodutivos do inseto, podendo, ainda, atrair

agentes de controle biológico. A transmissão de vírus pelos afídeos também resulta dessa interação especializada inseto-planta (Lazzari & Carvalho 2009). Este pulgão pode infestar quase 300 espécies de plantas hospedeiras (Wo *et al.* 2013).

Este inseto apresenta corpo ovalado e pouco esclerotizado possui colorações que variam do amarelo claro e verde claro ao verde escuro, nas formas ápteras. As formas aladas possuem cabeça e tórax negros e antenas escuras com presença de cerdas sensoriais denominadas sensilos, medem de 1 mm a pouco mais de 3 mm e na extremidade posterior do abdome se destacam dois sífúnculos (ou apêndices) que se prolongam para trás e para cima (Goff & Tissanot 1932, Szymczak *et al.* 2009).

Nos trópicos e subtropicais, a partenogênese continua é a forma mais comum de reprodução dos afídeos; a partenogênese telítoca e a alimentação na seiva do floema, desenvolvidas inicialmente na evolução dos afídeos, são os principais fatores que moldaram a ecologia do grupo, resultando na dependência e adaptações de seus ciclos de vida ao hospedeiro. A alternância de hospedeiros permite que muitas espécies possam explorar novos recursos alimentares para continuar a se desenvolver e reproduzir em condições de baixa qualidade da seiva. A polifagia, apesar de rara nos afídeos, é mais comum nos trópicos do que em regiões temperadas em razão da maior diversidade florística e da dificuldade de localização do hospedeiro naquelas regiões (Lazzari & Carvalho 2009).

A excreção do honeydew ocasiona o desenvolvimento do fungo *Capnodium* spp. (fumagina) sobre as folhas e estruturas reprodutivas da planta, o qual prejudica diretamente a fotossíntese, tornando a planta debilitada. A alimentação constante deste inseto também causa o encarquilhamento das folhas, deformações dos brotos e transmissão de mais de 80 viroses como o mosaico do mamoeiro – estirpe melancia (PRSV-W), o mosaico amarelo da abobrinha-de-moita

(ZYMV), o mosaico-2 da melancia (WMV-2) e o mosaico do pepino (CMV) (Gu *et al.* 2013), prejudicando o desenvolvimento da planta e sua produção, ocasionando prejuízos ao produtor.

Dentre as diversas táticas de controle de *A. gossypii*, destacam-se: a instalação de cultivos em locais distantes de plantios mais velhos de curcubitáceas (pepino, melancia, melão, abóboras); implantação prévia de barreiras vivas ou faixas de cultivos ao redor da lavoura; adoção de cultivo em ambiente protegido (estufas) com telado que dificulte a entrada da praga; plantio contra o vento; eliminação de plantas com viroses; plantio de espécies vegetais no entorno e dentro da área de cultivo, que atraiam inimigos naturais dos pulgões (consorcio); manutenção da vegetação nativa entre talhões e o uso de cultivares resistentes às principais viroses transmitidas pelos pulgões (Michereff Filho 2012).

Medidas de controle químico para *A. gossypii* estão se tornando limitadas, visto que esta espécie apresenta populações resistentes a uma grande variedade de classes de inseticidas (Sattar *et al.* 2012), principalmente fosforados, piretróides e carbamatos (Gong *et al.* 2014).

Uma medida bastante promissora é o controle biológico, que se trata de um vasto campo de estudos baseado no fenômeno natural de que muitas espécies se alimentam e vivem às custas de outros organismos, cujas populações são reguladas em um ecossistema. É, portanto, o mais importante aspecto no qual se deve focalizar a proteção das culturas agrícolas e florestais. É o componente fundamental do equilíbrio na natureza, cuja essência está baseada no mecanismo da densidade recíproca, isto é, com o aumento da densidade populacional da presa, ou do hospedeiro, os predadores, ou parasitos, tendo maior quantidade de alimento disponível, também aumentam em número. Desta maneira, inimigos naturais causam um declínio na população da praga (Berti Filho 1990).

Os inimigos naturais mais conhecidos de pulgões são insetos predadores, como joaninhas (Coleoptera: Coccinellidae) e bicho-lixeiro (Neuroptera: Chrysopidae), que precisam se alimentar



de inúmeros indivíduos para finalizar seu ciclo. Os parasitoides de pulgões, em sua maioria, são vespas diminutas (Hymenoptera) que se desenvolvem no interior dos corpos destes (Gallo *et al.* 2002), existem também microorganismos entomopatogênicos, como bactérias, vírus e protozoários que causam doenças, que matam os pulgões (Batista 1990). O uso de entomopatogênicos não substitui o controle químico, mas pode incrementar a taxa de mortalidade na população.

O uso de fungos entomopatogênicos para o controle de pulgões tem mostrado resultados positivos, a exemplo do estudo feito por Araújo Jr (2008), no qual verificou-se que isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok.e *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams podem ser utilizados para controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) em cultura de couve-folha. Determinadas características de alguns Ascomycota, como germinação e conidiogênese, sendo rápidas, permitem que o processo de infecção do inseto seja finalizado em poucas horas, ocorrendo grande produção de conídios, potencializando a disseminação destes no ambiente (Helyer *et al.* 1995, Wraight *et al.* 2000, Loureiro & Moino Jr. 2006).

Os propágulos dos fungos entomopatogênicos são geralmente aplicados em suspensão em água, óleo ou outro veículo líquido. As formulações de micélio necessitam de máquinas especiais para aplicação. Em geral, estruturas de fungos não possuem resistência às pressões, temperaturas elevadas e a radiação ultravioleta. Dependendo da formulação, assim como do tamanho dos conídios e esporos, esses produtos à base de fungos aplicados em suspensões aquosas necessitam de bicos especiais e filtros para evitar prováveis entupimentos. Produtos com fungos podem também ser aplicados nos diversos tipos de formulações como pó, líquido, grânulos e outros (Alves 1998).

A produção de fungos representa apenas uma fase no desenvolvimento desses agentes como produto microbiano. As fases consecutivas representadas pela formulação e estudos de

preservação devem ser também seriamente consideradas em qualquer projeto de controle microbiano (Alves 1998).

A formulação se refere à mistura do ingrediente ativo (propágulo vivo do fungo) com adjuvantes, e que no caso de produtos biológicos visa: a) manter o agente biológico estável durante a produção, distribuição e armazenamento; b) facilitar manuseio e aplicação do produto; c) proteger o agente biológico contra adversidades ambientais (radiação ultravioleta, baixa umidade, temperaturas elevadas) melhorando sua persistência no ambiente; d) aumentar a atividade do agente biológico, incrementando sua reprodução, contato e interação com a praga-alvo e, e) aumentar a segurança do produto ao usuário, reduzindo os riscos de inalação, irritação aos olhos, etc. (Jones & Burges 1998).

Existem alguns produtos à base de fungos entomopatogênicos utilizados no Brasil: 1) Concentrado técnico (TK), nas preparações constituídas com grãos+fungo - grãos de cereais (geralmente arroz cozido) colonizados pelo fungo; outro à base de grãos triturados+ fungo - semelhante ao anterior, porém, os grãos+fungo são triturados antes de sua comercialização na forma de pó molhável; e concentrado técnico líquido – suspensão líquida constituída predominantemente por esporos aéreos (conídios), para mistura direta à água sem necessidade de espalhantes adesivos; nos concentrados técnicos baseados em substratos sólidos os propágulos consistem em conídios e hifas, enquanto nos produtos produzidos em meio líquido, misturas de conídios submersos, blastósporos ou hifas podem estar presentes (Alves *et al.* 1998); 2) Material técnico (TC) (conídios puros) - os conídios são separados do substrato pelo fabricante, gerando um produto final com uma alta concentração de conídios, o qual pode ser utilizado posteriormente na formulação ou diluição em água e aplicação no campo, mas, a exemplo das categorias anteriores, neste último caso se faz necessário a adição de espalhante adesivo à calda; e 3) Dispersão oleosa (OD) – é a formulação propriamente dita; um produto pronto para uso, em que

os conídios puros, são misturados a um óleo emulsionável, para que o inseticida biológico seja diretamente misturado à água sem a necessidade de espalhantes adesivos (Faria & Wraight 2007).

A utilização de conídios de formulados em óleos (OD) tem sido atribuída ao aumento na fixação dos conídios à cutícula hidrofóbica dos artrópodes, maiores taxas de germinação e melhor dispersão dos conídios, bem como à maior persistência dos conídios na superfície vegetal após a sua aplicação (Jones & Burges 1998; Faria & Wraight, 2007), portanto, a disponibilização de produtos formulados à base de fungos entomopatogênicos, com alta concentração e viabilidade de estruturas infectivas, fácil aplicação, preço competitivo e com eficiência de controle previsível, são fundamentais para o avanço do controle microbiano de pulgões no Brasil.

Batta (2003), ao testar o fungo *M. anisopliae* formulado numa emulsão invertida (formulação água-em-óleo) com uma preparação de óleo de coco / soja observou que os conídios permaneceram viáveis na formulação 4,6 meses a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Em comparação, os conídios não formulados, sob as mesmas condições, estavam inviáveis após dois meses.

A necessidade de se formular um microorganismo entomopatogênico surge quando se deseja utilizá-lo, em condições de campo, como um bioinseticida, da mesma maneira que se usa um inseticida organossintético, porém, o uso de fungos em campo tem sido severamente limitado pela dependência de umidades próximas à saturação para germinação de propágulos infectivos. Estudos em laboratório mostraram que a dependência de alta umidade poderia ser eliminada pela formulação de fungos em óleos e emulsões (Prior *et al.* 1988; Bateman *et al.* 1997)

Uma boa formulação é a base para o sucesso de um inseticida microbiano e o seu estudo deve ser abrangente. A possibilidade de serem obtidos produtos adequados depende das próprias características do microorganismo e sua relação com os adjuvantes e o ambiente de armazenamento. O emprego de conídios puros como ingrediente ativo e de óleos minerais ou

vegetais emulsionáveis como adjuvantes têm propiciado maior eficiência aos micoinseticidas (Alves 1998).

Os óleos emulsificantes são excelente alternativa de uso como adjuvante na calda de pulverização, pois são emulsionáveis em água, permitindo a aplicação do micoinseticida com equipamentos convencionais já utilizados pelos produtores rurais (Alves 2008), também têm a vantagem de promover excelente adesão na cutícula hidrofóbica do inseto (Prior & Jollands 1988), facilitando sua penetração.

Algumas formulações comerciais de fungos entomopatogênicos para o controle de pulgões em cultivos protegidos já podem ser encontradas no mercado internacional, reduzindo populações da praga, principalmente em plantas ornamentais (Helyer *et al.* 1995, Wraight *et al.* 2000; Loureiro & Moino Jr 2006).

Loureiro & Moino Jr. (2006) testaram os efeitos dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (isolado IBCB 66), *M. anisopliae* (isolado IBCB 121), *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) ABSBr & G.Sm (isolado IBCB 141) e *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* (Zimmermann) Zare et W. Gams (isolado JAB 02) sobre ninfas de 3º ínstar de *A. gossypii* e *Myzus persicae* Sulzer. Após inoculação de 1 mL de suspensões fúngicas realizadas com concentrações que variaram de  $1,0 \times 10^6$  a  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL de cada fungo, foi observado que *B. bassiana* e *M. anisopliae* causaram mortalidade de 100% no 7º dia após a inoculação, para ambas espécies. *L. lecanii* foi o fungo que provocou mortalidade mais tardia nos pulgões e *M. persicae* foi mais suscetível aos fungos que *A. gossypii*.

Michereff Filho *et al.* (2011) utilizaram conídios aéreos do isolado CG864, de *B. bassiana*, produzido em arroz cozido, formulados como dispersão oleosa preparada com óleo emulsionável (Natur'oil), para controle de *M. persicae* em plantas de repolho, observaram que as preparações

não formuladas tiveram 57-65% de eficiência, enquanto a formulação oleosa atingiu 76-83% de eficiência.

Almeida *et al.* (2007), ao testar diferentes concentrações do fungo *B. bassiana* (produto comercial Boveril®) em folhas de repolho observaram que as concentrações intermediárias (0,08 a 0,5g/L), nesse mesmo período, causaram mortalidades confirmadas em torno de 30% a 60%, de *B. brassicae* e as maiores concentrações (1,0 a 2,0g/L) entre 80 a 90%. Observou-se também, que, o valor da mortalidade aumentou aproximadamente 2,21 vezes quando a concentração passou de 0,05 para 0,08g/L (14 e 31%, respectivamente), e, que a partir de 0,12g/L o incremento na mortalidade pelo aumento da concentração do fungo foi menor, atingindo até 85% de mortalidade com 1,0g/L. com estes resultados, pôde ser considerada a possibilidade de controle desta praga com pulverizações de suspensões a base de *B. bassiana*, sendo que, as concentrações menos eficientes (0,31 e 0,50 g/L) apresentam-se como as mais viáveis economicamente, pois, as menores concentrações possibilitam que um número maior de pulverizações seja realizado para o controle do pulgão ao mesmo custo econômico de uma aplicação com concentrações elevadas (1,0 a 2,0 g/L).

Assim, para o avanço do controle microbiano de pulgões no Brasil pesquisas devem garantir a disponibilização de produtos formulados à base de fungos entomopatogênicos, com alta concentração e viabilidade de estruturas infectivas, fáceis de utilizar, com preço competitivo e com eficiência de controle previsível. Desta forma, esse trabalho teve como objetivos a seleção de isolados de fungos entomopatogênicos e o desenvolvimento de um inseticida formulado à base de *B. bassiana* para o controle do pulgão *A. gossypii* em pepino.

## Material e Métodos

**Local e Período de Realização do Trabalho.** O trabalho foi realizado em 2014, no Laboratório de Micologia de Invertebrados (LMI), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e no Laboratório de Entomologia, da Embrapa Hortaliças (CNPB), ambos localizados em Brasília-DF.

**Insetos e Isolados.** Foram utilizadas ninfas de terceiro ínstar da espécie *A. gossypii*, oriundas de criação em plantas de pepino (cv. Caipira) estabelecida em casa de vegetação na Embrapa Hortaliças, Brasília - DF.

Dezessete isolados de *B. bassiana* foram utilizados neste experimento, quatro isolados de *M. anisopliae*, e um isolado de *Lecanicillium longisporum* (Zimmerman) Zare & Gams pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, bem como aqueles previamente cedidos por outras instituições (Tabela 1).

**Revigoração de Isolados dos Fungos Entomopatogênicos.** Para recuperar a capacidade infectiva dos isolados, ninfas de terceiro instar, sadias, foram imersas durante cinco segundos, em suspensão padronizada na concentração de  $1,0 \times 10^8$  conídios mL de água e Tween 80 a 0,05%. Posteriormente, foram transferidas para placas de Petri, contendo uma folha de pepino acondicionada sobre ágar a 1% (v/v). Estas placas foram fechadas e mantidas em incubadora B.O.D. ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $72 \pm 10\%$  de UR e fotofase de 12 horas), durante 10 dias. Após a conidiogênese do fungo sobre o hospedeiro (sete dias em câmara úmida), cada isolado foi cultivado em meio BDA + A (Batata-dextrose-ágar + Sulfato de estreptomicina) por duas vezes antes de ser submetido à produção massal e utilizado nos estudos.

**Produção de Fungos e Obtenção de Conídios Puros (Material Técnico).** Nos experimentos foram utilizados conídios aéreos oriundos de produção massal em sacolas de polipropileno,

contendo meio semi-sólido constituído por arroz parboilizado (com 30% de água v/p) e em placas de Petri, com meio de cultura BDA+A, conforme Leite *et al.* (2003). Para a obtenção de conídios puros dos fungos, os lotes de fungo+substrato foram previamente secados (até 8% de teor de água) em dessecadores contendo sílica gel (20% p/p), durante sete dias. Posteriormente, a massa de fungo+substrato foi submetida à extração em conjunto de peneiras sob agitação em incubadora com agitador refrigerada (modelo C25, marca New Brunswick Scientific Ltd., Hertfordshire, Inglaterra) a 400 rpm, mediante três baterias de agitação a intervalos de 10 minutos. O material obtido foi armazenado em temperatura de 8° C.

A viabilidade dos conídios foi avaliada por meio de duas placas de Petri contendo meio BDA + A, nas quais foram colocados 0,1 mL da suspensão de conídios (a mesma utilizada para determinação de concentração), espalhando-se com alça de Drigaslky. As placas foram incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D. a 25° C UR superior a 80% e fotofase de 12 h, por 24 horas. As leituras foram efetuadas em microscópio ótico, mediante a determinação do percentual de conídios germinados e não germinados, contando-se 100 conídios por placa, totalizando 200 conídios em cada avaliação, conforme proposto por Alves *et al.* (1998). Desta forma garantiu-se o uso de conídios puros com 92-98% de viabilidade.

**Seleção de Isolados para *Aphis gossypii* em Folhas de Pepino** - Este estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira fase foram avaliados dezessete isolados de *B. bassiana*, quatro isolados de *M. anisopliae* e um isolado de *L. longisporum*. O isolado GHA de *B. bassiana* foi utilizado como padrão por sem o ingrediente ativo de vários micopesticidas renomados (Mycotrol® WP, BotaniGard® ES, Botanigard® WP) e um dos agentes de controle biológico mais estudados internacionalmente (Faria & Wraight 2007).

Foram utilizadas folhas, com até 12 dias de idade, destacadas de plantas de pepino e previamente lavadas com água destilada estéril e secas em câmara de fluxo laminar. Quinze ninfas

de terceiro ínstar foram transferidas para cada placa de Petri de vidro (9,0 cm de diâmetro), que continha uma folha de pepino acondicionada sobre camada de agar-água a 1% (v/v), com pecíolo e bordas da folha submersos nesse meio (Loureiro & Moino Jr 2006). Em seguida, as folhas foram pulverizadas com suspensão aquosa de conídios puros de cada isolado na concentração de  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL, em Torre de Potter (marca Burkard Manufacturing Co Ltd., Hertfordshire, Inglaterra), calibrada a 15 libras/pol<sup>2</sup>, aplicando-se 2,0 mL da suspensão (2 $\mu$ l/cm<sup>2</sup>). A testemunha foi tratada apenas com água destilada estéril e Tween 80 a 0,05%.

Após secagem da suspensão, os recipientes com os insetos foram fechados com filme plástico e mantidos em câmara B.O.D. ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  de UR e fotofase de 12 horas) durante sete dias. Os insetos pulverizados foram transferidos, com um pincel de cerdas macias, para folhas limpas (troca de alimento) a cada três dias (Yeo *et al.* 2003). Diariamente foram removidas todas as ninfas geradas pelos pulgões adultos e avaliou-se sua mortalidade. Para confirmação da mortalidade, os insetos mortos foram lavados em álcool 70% por 10 segundos e enxaguados em água destilada estéril por 20 segundos, para descontaminação externa. Em seguida, foram transferidos para câmara úmida, que consistiu em uma placa de Petri plástica (5,0 cm de diâmetro), contendo papel filtro esterilizado umedecido e um chumaço de algodão molhado. Os insetos permaneceram nestes recipientes por sete dias ou até a exteriorização do micélio e conidiogênese.

Determinou-se a mortalidade acumulada corrigida em relação à testemunha pela fórmula de Abbott (1925) e a mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos nos quais ocorreu conidiogênese do fungo). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 repetições e 150 insetos por isolado. Os dados de mortalidade acumulada corrigida e confirmada avaliadas aos 3,0 e 7,0 dias após a inoculação dos fungos foram submetidos à análise de variância



com arranjo em parcelas subdivididas, onde a subparcela correspondeu às épocas de avaliação. As médias de tratamentos foram comparadas pelos testes de Skott-Knott e t para dados pareados.

Na segunda fase, foram testados os três isolados mais promissores da primeira etapa (>75% de mortalidade confirmada) e cinco concentrações de conídios ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  conídios/mL) em suspensão aquosa, além da testemunha (água esterilizada + Tween 80 a 0,05%), empregando-se a mesma metodologia do experimento anterior. As placas foram mantidas em incubadora B.O.D. ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $72 \pm 10\%$  de UR e fotofase de 12 horas) durante sete dias, avaliando-se diariamente a mortalidade dos insetos.

Os dados foram submetidos, respectivamente, à análise de variância e teste de Tukey para comparação da mortalidade confirmada acumulada, à análise de Probit para determinação da  $CL_{50}$  e à análise de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier para estimativa do tempo mediano de sobrevivência (TMS), geração de curvas de sobrevivência e comparação entre pares de isolados pelo teste de Log-rank, tomando-se como base a concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL.

A análise de probit foi realizada com o software Polo-PC (Leora 1987), enquanto para a análise de sobrevivência utilizou-se o procedimento Lifetest do software SAS (SAS Institute 2001). Pulgões perdidos durante os experimentos foram desconsiderados de todas as análises (Hesketh *et al.* 2008). A mortalidade confirmada ao longo do tempo foi utilizada como parâmetro para diferenciação dos níveis de virulência entre os isolados, pois através da ocorrência de esporulação sobre os cadáveres foi possível certificar-se de que a mortalidade foi provocada pelo fungo. Além disso, a ocorrência de esporulação (conidiogênese) é importante e necessária para manutenção e disseminação do entomopatógeno no campo, contribuindo para a ocorrência de epizootias, importante característica do controle biológico por fungos (Alves 1998; Butt & Goettel 2000).

**Preparações do Fungo** - Nos experimentos anteriores sobre seleção de fungos entomopatoênicos, o isolado CG 864 de *B. bassiana* foi o mais virulento contra *A. gossypii* em folhas de pepino, sendo selecionado para o desenvolvimento do inseticida biológico. Assim, nos experimentos seguintes do presente trabalho, foram utilizados conídios aéreos do isolado CG 864.

A suspensão aquosa de conídios foi obtida pela pipetagem de Tween 80 a 0,05% (v/v) em água destilada estéril dentro de tubo de ensaio, seguida pela mistura gradual de conídios puros e secos de *B. bassiana* (material técnico com  $9,0 \times 10^{10}$  conídios viáveis/g) sob forte agitação em vortex durante 25 minutos, em temperatura ambiente.

Como veículo para preparo da formulação dispersão oleosa foi utilizado o óleo vegetal Natur'Oil (Stoller do Brasil), o qual é constituído basicamente por óleo de soja, com ésteres de ácidos graxos correspondendo a 930 mL/L de p.c. (93% v/v) e Nonil Fenol Etoxilado na concentração de 70 mL /L de p.c. (7% v/v) (informações fornecidas pelo fabricante). Este óleo emulsionável foi selecionado por ser aceito em formulações de produtos biológicos para uso na agricultura orgânica. Essa formulação foi preparada pela pipetagem de óleo vegetal em tubo de ensaio, seguida pela mistura gradual de conídios puros e secos de *B. bassiana* (material técnico com  $9,0 \times 10^{10}$  conídios viáveis/g) sob agitação leve durante 20 minutos, em temperatura ambiente.

O preparo da formulação suspensão aquosa de conídios e sua respectiva diluição em água para aplicação foram realizados 30 minutos antes de cada experimento. Após o preparo, a suspensão foi agitada em vortex, por 15 minutos; já a dispersão oleosa de conídios após diluição em água foi agitada manualmente, visando evitar a desestabilização da emulsão, na qual gotas de óleo coalescem e aderem às paredes do recipiente sob forte agitação mecânica (Ugine *et al.* 2005).

Desta forma, foram obtidas duas preparações do inseticida biológico: a) *suspensão aquosa* [conídios puros de *B. bassiana* CG 864 + Tween 80 a 0,05%; utilizada como padrão] e b) *formulação em dispersão oleosa* [conídios puros + óleo vegetal emulsionável em diferentes concentrações].

**Efeito dos Componentes da Formulação na Viabilidade de Conídios** - A viabilidade dos conídios de *B. bassiana* foi determinada, em laboratório, nas preparações: a) suspensão aquosa de conídios puros, em Tween 80 a 0,05%; b) formulação em dispersão oleosa de conídios puros, em óleo emulsionável nas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 4% e 8% v/v na calda aplicada; e c) testemunha, a qual foi constituída por água destilada estéril e Tween 80 a 0,05%.

Para a suspensão aquosa, a viabilidade dos conídios foi avaliada por meio de duas placas de Petri contendo meio BDA + A, nas quais foram colocados 0,1 mL da suspensão de conídios ( $1 \times 10^8$  conídios/mL), espalhando-se com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D., a 25° C, UR superior a 80% e fotofase de 12 h, por 24 horas. As leituras foram efetuadas em microscópio óptico, mediante a determinação do percentual de conídios germinados e não germinados, contando-se 100 conídios por placa, totalizando 200 conídios em cada avaliação, conforme proposto por Alves 1998, em seguida, foram calculadas as porcentagens de germinação.

Para a formulação em dispersão oleosa adotou-se os procedimentos de Magalhães *et al.* (1997), que consiste em espalhar a dispersão oleosa sobre meio de cultura e cobrir com uma lamínula. Assim, 10 µl da dispersão ( $1 \times 10^8$  conídios/mL) foram espalhados sobre blocos (1,0 x 1,0 x 0,2 cm) do meio de cultura BDA+A, acondicionada em placas de Petri. Em seguida, a suspensão foi firmemente coberta com uma lamínula estéril. Em seguida, o conjunto foi transferido e mantido em incubadora B.O.D. (25±2° C, 75±8% de UR e fotofase de 12 h), com observações realizadas 8h, 18h e 24h pós- inoculação, e, calculadas as porcentagens de

germinação. Para cada preparação e momento de avaliação, foram utilizadas três repetições, cada repetição sendo representada por três amostras em placa de Petri.

**Eficiência de Pré-Formulações do Inseticida** - Conforme resultados obtidos nos experimentos anteriores, realizou-se um experimento sob condições de laboratório para determinar o efeito da preparação do inseticida na infecção do pulgão *A. gossypii*. Os tratamentos testados foram: 1) preparação em suspensão aquosa [conídios + água esterilizada + Tween 80 a 0,05%]; 2) Óleo emulsionável + água, nas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 4% e 8% v/v, sem conídios; 3) preparação em dispersão oleosa [conídios + água esterilizada + óleo emulsionável nas concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 4% e 8% v/v], e 4) testemunha absoluta, apenas água destilada estéril. Todas as preparações com *B. bassiana* foram padronizadas para concentração de  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL na calda aplicada.

Foram utilizadas folhas, com até 12 dias de idade, destacadas de plantas de pepino e previamente lavadas com água destilada estéril e secas em câmara de fluxo laminar. Quinze ninfas de terceiro ínstar foram transferidas para cada placa de Petri de vidro (9 cm de diâmetro), que continha uma folha de pepino acondicionada sobre camada de agar-água a 1% (v/v), com pecíolo e bordas da folha submersos nesse meio (Loureiro & Moino Jr. 2006).

Em seguida, as folhas foram pulverizadas com os tratamentos durante 10 segundos mediante uso de um atomizador portátil de bico rotativo movido à pilha (Micro Ulva, Micron Sprayers Ltd., Bromyard, Inglaterra), fixado em suporte a 20 cm de altura do alvo. Este equipamento foi regulado para a rotação de 1.5000 rpm, taxa de fluxo de 20 mL/minuto e gotas com tamanho de 35-45  $\mu$  (manual do fabricante). Após secagem das folhas, os recipientes com os insetos foram fechados com filme plástico e mantidos em câmara B.O.D. (25° C, >80% de UR e fotofase de 12 h) durante sete dias.

Os insetos pulverizados foram transferidos, com um pincel de cerdas macias, para folhas limpas (troca de alimento) a cada três dias (Yeo *et al.* 2003). Diariamente foram removidas todas as ninfas geradas pelos pulgões adultos e avaliou-se a mortalidade dos insetos (Hesketh *et al.*, 2008). Para confirmação da mortalidade pelo entomopatógeno, foi repedito protocolo mencionado anteriormente.

Determinou-se a mortalidade acumulada corrigida em relação à testemunha pela fórmula de Abbott (1925) e a mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos nos quais ocorreu conidiogênese do fungo). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. Os dados de mortalidade acumulada corrigida e confirmada avaliadas aos 3,0 e 7,0 dias após a inoculação (dia) dos fungos foram submetidos à análise de variância com arranjo em parcelas subdivididas, onde a subparcela correspondeu às épocas de avaliação. As médias de tratamentos foram comparadas pelos testes de Skott-Knott e t para dados pareados ( $P < 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas com o software SAS (SAS Institute 2001).

## **Resultados e Discussão**

**Seleção de Isolados para *Aphis gossypii* em Folhas de Pepino.** Detectou-se interação isolado x época de avaliação significativa para a mortalidade corrigida ( $F_{21, 104} = 2,10$ ;  $P = 0,0075$ ) e mortalidade confirmada ( $F_{21, 104} = 4,40$ ;  $P < 0,0001$ ), indicando diferenças na infectividade de alguns isolados ao longo do tempo. No terceiro dias após a inoculação, apenas os isolados de *B. bassiana* CG 864 e PL 63 foram altamente patogênicos, com níveis de mortalidade corrigida e confirmada acima de 60% (Tabela 2). Ao sétimo dia os isolados CG 864 e PL 63 novamente proporcionaram os maiores níveis de mortalidade corrigida e confirmada (acima de 80%), porém não diferiram estatisticamente do isolado padrão GHA e IBCB 66. Para *M. anisopliae*, o melhor

isolado foi IBCB 425, proporcionando mortalidades corrigida e confirmada, respectivamente, entre 50% e 54%. Já o isolado ESALQ 1300 de *L. longisporum* ocasionou mortalidades corrigida e confirmada de 22% a 30%, respectivamente. Esses resultados demonstram o potencial de uso de *B. bassiana* para controle microbiano de *A. gossypii*, e estão de acordo com Loureiro & Moino Jr. 2006, os quais demonstraram que *B. bassiana* é patogênico ao pulgão *A. gossypii* e os seus isolados são mais virulentos que isolados de *Metarhizium* e *Lecanicillium*, atingindo até 100% de mortalidade confirmada aos sete dias da inoculação.

Na segunda etapa da seleção, considerando-se a virulência, foram avaliados os isolados CG 864, PL 63 e IBCB 66 de *B. bassiana*. As percentagens de mortalidade confirmada acumulada aos sete dias da inoculação dos fungos variaram de 4,2 a 95,6% para o isolado CG 864; de 9,0 a 91,1% para o isolado PL 63; e de 2,0 a 95% para o isolado IBCB 66 (Tabela 3). Para todos os isolados constatou-se que a mortalidade confirmada foi crescente à medida que a concentração de conídios aumentou.

A mortalidade confirmada demonstrou diferença significativa entre os isolados nas concentrações de  $1 \times 10^5$  ( $F_{2,7} = 9,150$ ;  $P = 0,0111$ ),  $1 \times 10^6$  ( $F_{2,7} = 5,013$ ;  $P < 0,0445$ ) e  $1 \times 10^7$  conídios/mL ( $F_{2,7} = 9,624$ ;  $P = 0,0098$ ). Nestas concentrações, os isolados CG 864 e PL 63 propiciaram níveis de mortalidade superiores ao isolado IBCB 66. Por outro lado, os isolados não diferiram estatisticamente entre si nas concentrações de  $1 \times 10^8$  ( $F_{2,7} = 1,551$ ;  $P = 0,2638$ ) e  $1 \times 10^9$  conídios/mL ( $F_{2,7} = 3,69$ ;  $P = 0,0840$ ), com níveis de mortalidade confirmada entre 69,5% e 95,6% (Tabela 3). Para os isolados CG 864 e PL 63, a mortalidade ocasionada pela concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL foi significativamente maior que o observado para  $1 \times 10^7$ , porém não diferiu da mortalidade com  $1 \times 10^9$  conídios/mL. Para todos os isolados a maior mortalidade de pulgões ocorreu na concentração  $1 \times 10^9$  conídios/mL, diferindo estatisticamente das demais concentrações avaliadas apenas para IBCB 66.

Resultados semelhantes foram observados por Almeida *et al.* (2007), com diferentes concentrações do produto comercial Boveril® WP (isolado PL 63;  $1 \times 10^8$  conídios viáveis/g) para controle do pulgão *Brevicoryne brassicae* (L.) em folhas destacadas de repolho. Nas concentrações  $4,0 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^5$  conídios/mL, o isolado PL63 propiciou mortalidade confirmada de 30% a 60%, enquanto nas concentrações  $5,0 \times 10^5$  a  $5,0 \times 10^8$  conídios/mL ocasionou entre 80% e 90% de mortalidade confirmada. Segundo Araújo Jr (2008), o isolado CG 001 de *B. bassiana* pulverizado na concentração de  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL sobre folhas destacadas de couve causou 76% de mortalidade em *Lipaphis erysimi* (Kalt.).

Pela análise de Probit (Tabela 4), os isolados CG 864, PL 63 e IBCB 66 se adequaram ao modelo. A sobreposição dos intervalos de confiança entre as  $CL_{50}$  demonstra que os isolados CG 864 e PL 63 foram similares entre si e diferiram estatisticamente do isolado IBCB 66. Pela comparação das curvas de sobrevivência dos pulgões na concentração de  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL ao longo de sete dias de observação, a ação dos isolados foi mais contrastante a partir do terceiro dia da inoculação (Fig. 1).

Os valores elevados de mortalidade ao terceiro dia indicam ação rápida do entomopatógeno sobre a praga. Para insetos capazes de transmitir viroses e com grande capacidade de dispersão, como é o caso de *A. gossypii* em cucurbitáceas, torna-se necessário seu controle de forma imediata como meio de impedir a disseminação da doença na cultura. A rapidez com que o entomopatógeno mata seu hospedeiro é uma característica desejável para o controle de muitas pragas agrícolas, contudo, não deve ser considerada como única. É imprescindível também que o isolado seja capaz de proporcionar elevada mortalidade final, exigindo desta maneira pulverizações menos frequentes e possibilitando reduzir os custos de controle das pragas (Harrewijn & Minks 1989; Harrington & Van Emden 2007).

A maior velocidade em causar mortalidade pelos isolados CG 864 e PL 63 foi confirmada pelos valores para o tempo mediano de sobrevivência (TMS), o qual é um parâmetro gerado pela análise de Kaplan-Meier (método não paramétrico) equivalente ao  $TL_{50}$  (Tabela 5). O TMS para o isolado IBCB 66 foi estatisticamente maior em comparação aos demais isolados (teste de Log-rank,  $P < 0,01$ ). Assim, os isolados CG 864 ( $CL_{50}$  de  $6,3 \times 10^6$  conídios/mL; TMS de 4,0 dias) e PL 63 ( $CL_{50}$  de  $7,1 \times 10^6$  conídios/mL; TMS de 5,0 dias) foram os mais virulentos e não diferiram estatisticamente entre si, enquanto IBCB 66 ( $CL_{50}$  de  $3,2 \times 10^7$  conídios/mL; TMS de 7,0 dias) foi menos promissor contra o pulgão (Tabelas 4 e 5). Na prática, baseado no TMS, pulgões inoculados com o isolado IBCB 66 potencialmente estariam aptos sobre longo período de tempo para produzir prole antes de sucumbir à infecção do fungo, permitindo o aumento do tamanho da população. Hipoteticamente, sob condições de campo existiriam mais oportunidades para aumento populacional nos pulgões tratados com este isolado em relação ao CG 864 e PL 63.

Segundo Paccola-Meirelles (1998), diferenças na patogenicidade e na virulência dos isolados são uma indicação da variabilidade genética natural existente dentro da espécie. Para *B. bassiana* esta variabilidade genética já foi demonstrada por vários autores (Paccola-Meirelles & Azevedo 1990; Tigano & Riba 1990; Maurer *et al.* 1997; Aquino de Muro *et al.*, 2003; Rehner *et al.*, 2006), bem como a produção de beauvericina (toxina altamente potente aos artrópodes) pode variar amplamente entre os isolados deste entomopatógeno (Roberts & Krasnoff 1998).

Embora seja difícil comparar resultados destes estudos por causa da ampla faixa de condições e metodologias utilizadas, houve grande variabilidade no desempenho de *B. bassiana* sobre os pulgões. Os isolados mais virulentos foram capazes de causar alta mortalidade (90-100%) em laboratório, com baixas concentrações de conídios ( $CL_{50}$   $0,53-9,15 \times 10^6$  conídios/mL e em curto período de tempo ( $TL_{50}$  1,6-6,2 dias). Para o isolado IBCB 66, Loureiro & Moino Jr. (2006) não constataram diferença estatística na mortalidade confirmada de ninfas de 3º instar de



*A. gossypii* ao longo de oito dias de avaliação, entre as dosagens de  $1,0 \times 10^6$  a  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL aplicadas sobre folhas destacadas de algodoeiro. Também verificaram pequena diferença no tempo de sobrevivência dos insetos, com  $TL_{50}$  de 3,1 e 2,4 dias, respectivamente, para  $1,0 \times 10^6$  a  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL.

Comparando-se os resultados obtidos nos dois experimentos de laboratório e a origem dos isolados (Tabela 2), constata-se que não houve relação direta entre a taxa do hospedeiro original e a virulência do isolado de *B. bassiana* sobre *A. gossypii*. Este fenômeno também foi relatado por Feng & Johnson (1990), que testaram isolados de *B. bassiana* oriundos de coleóptero, do pulgão *Schizaphis graminum* (Rond.) e de outros hemiptera sobre o pulgão do trigo *Diuraphis noxia* (Kurdjumov). Isto mostra que o hospedeiro de origem ou a relação filogenética entre hospedeiros potenciais nem sempre é um indicador confiável da provável virulência de um isolado de fungo sobre um hospedeiro específico, embora epizootias naturais de *B. bassiana* sobre pulgões não sejam comuns (<1% de infecção) e tenham baixa relevância na supressão populacional desses insetos no campo, este fungo tem apresentado amplo espectro hospedeiro, causando doença em espécies de insetos e ácaros de diversas ordens e famílias. Esta característica tem contribuído para que este agente seja muito estudado e explorado para o desenvolvimento de micopesticidas em todo mundo (Alves 1998).

A determinação da  $CL_{80}$ , para fungos entomopatogênicos, é importante para estabelecimento da dosagem que servirá como embasamento para uma possível utilização em campo. A  $CL_{80}$  estimada para os isolados CG 864 e PL 63 no presente estudo correspondeu à concentração de  $1,3-2,0 \times 10^8$  conídios/mL (para 200L de calda/ha equivalendo a  $2,6-4,0 \times 10^{13}$  conídios/ha), enquanto para IBCB 66 foi de  $7,8 \times 10^8$  conídios/mL (=  $1,6 \times 10^{14}$  conídios/ha). Para experimentos de campo, usualmente a faixa de dosagem de conídios com micoinseticidas a base de fungos mitospóricos varia de  $1 \times 10^{13}$  a  $1 \times 10^{14}$  conídios/ha (Bateman 1997; Poprawski *et al.* 1999;

Wraight *et al.* 2000; Vandenberg *et al.* 2001, Malsam *et al.* 2002, Feng *et al.* 2004, Hatting *et al.* 2004, Shi *et al.* 2008). Entretanto, os resultados desta pesquisa não podem ser extrapolados diretamente para prever a mortalidade dos pulgões em campo, exigindo experimentos nessas condições para se conhecer o potencial epizootico dos isolados testados.

**Efeito dos Componentes da Formulação na Viabilidade dos Conídios.** Muitos são os produtos fitossanitários que possuem óleos nas suas formulações, tanto de origem vegetal como mineral (Alves 1998). A viabilidade dos conídios de *B. bassiana* neste trabalho não foi afetada pelas diferentes concentrações de óleo vegetal emulsionável (0,5% a 8%) e nem pelo agente molhante Tween 80 a 0,05%. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva (2006) ao verificarem a compatibilidade dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces* sp. com produtos à base de óleo mineral e vegetal, quando empregados conjuntamente em caldas. Estes autores também relataram alta germinação de conídios (94,5%) do isolado CG 432 de *B. bassiana* quando misturado ao Natur'Óleo na concentração 1,5% (v/v). Luz & Batagin (2005) também observaram altos níveis de germinação de conídios do isolado CG 14 de *B. bassiana* em 11 óleos vegetais na concentração de 10% após oito dias de incubação.

**Eficiência de Pré-Formulações do Inseticida Biológico.** A interação tratamento x época de avaliação foi significativa para a mortalidade corrigida ( $F_{12, 133} = 12,31$ ;  $P < 0,0001$ ) e mortalidade confirmada ( $F_{6, 69} = 9,04$ ;  $P < 0,0001$ ).

O óleo vegetal emulsionável causou mortalidade corrigida de *A. gossypii* superior a 50% no terceiro dias após a aplicação do tratamento (3 d.a.t.), quando utilizado nas concentrações acima de 2% na calda pulverizada (Tabela 6). Por outro lado, esta mesma concentração aos 7,0 d.a.t. propiciou mais de 60% de mortalidade corrigida. Houve incremento na mortalidade do pulgão com o aumento da concentração de óleo emulsionável, em ambas as épocas de avaliação. Isto mostrou a ação inseticida deste adjuvante quando aplicado isoladamente, porém em concentração

(>1%) muito acima do tolerado pelas folhas do pepino, causando danos severos à planta. Muitos são os agrotóxicos que possuem óleos nas suas formulações, sendo utilizados como inseticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas e espalhantes adesivos. Óleos vegetais são considerados promissores para o manejo integrado de pragas, atuando por contato, ingestão, fumigação e repelência (Almeida *et al.* 2005, Sousa *et al.* 2005, Brito *et al.* 2006). Além de mortalidade, os óleos vegetais podem afetar o desenvolvimento e a alimentação de insetos e ácaros, reduzir a sua oviposição, a viabilidade dos ovos e a emergência de adultos (Boeke *et al.* 2004, Ketoh *et al.* 2005, Pereira *et al.* 2008). A toxicidade de óleos vegetais a insetos e ácaros depende da composição, formulação e forma aplicação dos óleos. A ação inseticida de óleo de soja e misturas de óleos vegetais tem sido muito relatada para pulgões, moscas-branca, cochonilhas e ácaros (Pless *et al.* 1995, Fenigstein *et al.* 2001, Moustafa *et al.* 2002).

Considerando exclusivamente a mortalidade corrigida no sétimo dia após a aplicação (Tabela 6), constatou-se que o fungo *B. bassiana* nas diferentes preparações (suspensão aquosa e dispersão oleosa) propiciou índices de mortalidade significativamente maiores que às observadas para o óleo vegetal emulsionável empregado isoladamente, assim confirmando a alta virulência do isolado CG 864 ao pulgão.

Houve diferença estatística na mortalidade confirmada (conidiogênese observada) de *A. gossypii* entre as preparações de *B. bassiana* no terceiro dias após a aplicação dos tratamentos (Tabela 6). Todos os tratamentos com dispersão oleosa de conídios [0,5% a 8% de óleo vegetal na calda] propiciaram índices de mortalidade confirmada estatisticamente maiores (61-73%) que a suspensão aquosa de conídios (52%). Não verificou-se diferença na mortalidade confirmada entre dispersões oleosas de conídios preparadas com diferentes concentrações do óleo emulsionável. Já no sétimo dia da aplicação não houve diferença entre as preparações de *B. bassiana*. Nesta avaliação, a suspensão aquosa de conídios foi tão eficiente (83% de mortalidade confirmada)

quanto os tratamentos com dispersão oleosa (75-82%). Entretanto, na comparação das duas épocas de avaliação, o fungo em dispersão oleosa de conídios ocasionou mortalidade de *A. gossypii* mais rápida (menor tempo de sobrevivência) que a suspensão aquosa de conídios. Também não houve incremento na mortalidade confirmada de *A. gossypii* com o aumento da concentração (principalmente 4-8%) de óleo emulsionável na calda pulverizada. Isto provavelmente ocorreu em razão da morte das ninfas antes mesmo da evolução da doença (crescimento do fungo e conidiogênese) nas concentrações de óleo emulsionável acima de 1%, tendo em vista que nestas concentrações o óleo por si só, já ocasionou alta mortalidade do pulgão após o terceiro dia da aplicação.

É necessário aprimoramento e validação da formulação dos conídios de *B. bassiana*, para se propiciar maior eficiência de controle e menor população sobrevivente de *A. gossypii* após a aplicação, bem como a disponibilização de um produto com alta viabilidade de estruturas infectivas, de longa vida de prateleira (> de 6,0 meses, sob condições não refrigeradas), de fácil manuseio e aplicação. Isto contribuirá para a redução no uso de inseticidas químicos, com reflexos positivos na qualidade de vida do produtor, na qualidade dos alimentos produzidos e na preservação do meio ambiente.

### **Agradecimentos**

A todos que ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor.

### **Literatura Citada**

**Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.

- Almeida, G.D., D. Pratisoli, R.A. Polanczyk, A.M. Holtz & V.B. Vicentini. 2007.** Determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) de *Beauveria bassiana* para o controle de *Brevicoryne brassicae*. IDESIA 25: 69-72.
- Alves, S.B. 1998.** Fungos entomopatogênicos, p.289-381. In S.B.Alves (ed.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, 1166p.
- Aquino de Muro, M., S. Mehta & D. Moore. 2003.** The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. FEMS Microbiol. Lett. 229: 249-257.
- Araujo Jr, J.M. 2008.** Seleção de fungos entomopatogênicos associados ao óleo de nim para controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em couve. Dissertação de mestrado, UFRPE, 55p.
- Bateman, R. 1997.** Methods of application of microbial pesticide formulations for the control of grasshoppers and locusts. Mem. Entomol. Soc. Canadá 171: 69–81.
- Batta, Y.A. 2003.** Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsc.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Crop Prot. 22: 415-422.
- Batista, G.C. 1990.** Seletividade de Inseticidas e Manejo integrado de pragas, p.199-213. In W. B. Crocomo (org.), Manejo Integrado de Pragas, Botucatu, UNESP, 358p.
- Berti Filho, E. 1990.** Controle Biológico dos insetos-praga, p. 87-89. In W. B. Crocomo (org.), Manejo Integrado de Pragas, Botucatu, UNESP, 358p.
- Brito, J.P., J.E.M. Oliveira & S.A. Bortoli. 2006.** Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). Rev. Biol. Ciên. Terra 6: 96-103.
- Butt, T.M. & M.S. Goettel. 2000.** Bioassays of entomogenous fungi, p. ????. In A. Navon & K.R.S. Ascher (eds.), Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. Wallingford, CABI Publishing, 3368 p.
- Faria, M.R. & S.P. Wraight. 2007.** Mycoinsecticides and mycoaraticides: A comprehensive list with worldwide coverade and international classification of formulation types. Biol. Control 43: 238-240.
- Feng, M.G., J.B. Johnson & L.P. Kish. 1990.** Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species of cereal aphids (Homoptera: Aphididae). Environ. Entomol. 19: 815–820.
- Feng, M.G., X.Y. Pu, S.H. Uing & Y.G. Wang. 2004.** Field trials of an oil-based emulsifiable formulation of *Beauveria bassiana* conidia and low application rates of imidacloprid for

control of False-eye leafhopper *Empoasca vitis* on tea in southern China. *Crop Prot.* 23: 489-496.

**Fenigstein, A.M., M.S. Eliyahu & D. Veierov. 2001.** Effects of five vegetable oils on the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytop* 29: 197–206.

**Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes, C. Omoto. 2002.** *Entomologia Agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p.

**Goff, C. C. & A. N. Tissot. 1932.** The melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Bull. Fla. Agric. Exp. Stn.*, 23p.

**Gong, Y. H., X. R. Yu, Q. L. Shang, X. Y. Shi & X. W. Gao. 2014.** Oral delivery mediated RNA interference of a Carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the Cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *PLoS ONE* One 9: 1-7.

**Gu, S. H., K. M. Wu, Y. Y. Guo, L. M. Field, J. A. Pickett, Y. J. Zhang & J. J. Zhou. 2013.** Identification and expression profiling of odorant binding proteins and chemosensory proteins between two wingless morphs and a winged morph of the cotton aphid *Aphis gossypii* Glover. *PlosOne* 8: 1-6.

**Harrewijn, P. & A.K. Minks. 1989.** Integrated aphid management: General aspects, p.267-272. In A.K. Minks & P. Harrewijn (eds.), *World crop pests - aphids: their biology, natural enemies and control*. Vol. C. New York, Elsevier, 312p.

**Harrington, R. & H.F. Van Emden. 2007.** *Aphids as crop pests*. London, CABI Publ., 717p.

**Hatting, J., S. Wraight & R.M. Miller. 2004.** Efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) for control of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) on resistant wheat under field conditions. *Biocontrol. Sci. Technol.* 144: 459–473.

**Helyer, N. & L.R. Wardlaw. 1995.** Control of Western flower thrips *Frankliniella occidentalis*, (Pergande) pupae in compost. *Ann. App. Biol.* 129: 405-412.

**Hesketh, H., P.T. Alderson, B.J. Pye & J.K. Pell. 2008.** The development and multiple uses of a standardised bioassay method to select hypocrealean fungi for biological control of aphids. *Biol. Control* 46: 242–255.

**Jones, K.A. & H.D. Burges. 1998.** Technology of formulation and application, p. 7-30. In H.D. Burges. (ed.), *Formulation of microbial pesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Dordrecht, Kluwer Academic. 412p.

**Ketoh, G.K., H.K. Koumaglo & J.A. Glitho. 2005.** Inhibition of *Callosobruchus maculatus* (F.) *Cymbopogon scholmanthus* L. Spreng (Poaceae), and the Wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Sto. Oxf.* 41: 363-371.

- Lazzari, S.M.N. & R.C.A. Carvalho. 2009.** Sugadores de seiva (Aphidoidea), p. 767-836. In A.R. Panizzi & J.R.P. Parra. Bioecologia e nutrição de insetos, base para o manejo integrado de pragas. Embrapa informação Tecnológica, 1164p.
- Li, Z.Q., S. Zhang, J.Y. Luo, C.Y. Wang, L.M. Lv, S.L. Dong & J.J. Cui. 2013.** Ecological adaption analysis of the cotton aphid (*Aphis gossypii*) in different phenotypes by transcriptome comparison. Plos ONE 8: 1-6.
- Loureiro, E.S. & A. Moino Jr. 2006.** Patogenicidade de fungos hifomicetos aos pulgões *Aphis gossypii* Glover e *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Neotrop. Entomol., 35:660-665.
- Luz, C. & I. Batagin. 2005.** Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. Mycopathology 160: 51-62.
- Magalhães, B., M. Faria & H.A. Frazão. 1997.** Technique to estimate the conidial viability of *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal (Hyphomycetes) formulated in vegetable oil. An. Soc. Entomol. Brasil 26: 569-572.
- Malsam, O., M. Kilian, E.C. Oerke & H.W. Dehne. 2002.** Oils for increased efficacy of *Metarhizium anisopliae* to control whiteflies. Biocontrol Sci. Technol. 12: 337-348.
- Mascarenhas, M.H.T., W.R. Oliveira, J.C. Simões & L.M.A. Resende. 2007.** Pepino, p.603-610. In T.J. Paula Jr. & M. Venzon (eds.), 101 Culturas – Manual de tecnologias agrícolas. Belo Horizonte, EPAMIG, 800p.
- Maurer, P., Y. Couteaudier, P.A. Girard, P.D. Bridge & G. Riba. 1997.** Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. Mycol. Res. 101: 159-164.
- Michereff-Filho, M., A.P. Moura, J.A. Guimarães, C.P. Reyes, A.D.F. Carvalho, G.B. Amaro, J.F. Lopes & R.S. Liz. 2012.** Recomendações técnicas para o controle de pragas do pepino. Circular técnica 109, Brasília/Anápolis, Embrapa Hortaliças, 15p.
- Moustafa, O.K., H.M. Abou-Yousef & Z.M. El-Attal. 2002.** Efficiency of three types of oils against *Aphis fabae* and *Tetranychus urticae*. Egypt J.Agric. Res. 80: 1133–1140.
- Paccola-Meirelles, L.D. 1998.** Genética e melhoramento de fungos agentes de controle biológico, p.171-200. In I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.), Controle biológico. Jaguariúna, EMBRAPA, 262p.
- Paccola-Meirelles, L.D. & J.L. Azevedo. 1990.** Natural variability in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Arq. Biol. Biotec. 33: 657-672.
- Pereira, A.C.R.L., J.V. Oliveira, M.G.C. Gondim Jr. & C.A.G. Câmara. 2008.** Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr. 1775)

(Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Ciênc. Agrotéc. 32: 717-724.

**Pless, C.D., D.E. Deyton & C.E. Sams. 1995.** Control of San Jose scale, terrapin scale, and European red mite on dormant fruit trees with soybean oil. Hort. Sci. 30: 94–97.

**Poprawski, T.J., P.E. Parker & J.H. Tsai. 1999.** Laboratory and field evaluation of hyphomycete insect pathogenic fungi for control of brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae). Environ. Entomol. 28: 315–321.

**Prior, C., P. Jollands & L.E. Patourel. 1988.** Infectivity of oil and water formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). J. Invert. Pathol. 52: 66-72.

**Rehner, S.A., F. Posada, E.P. Buckley, F. Infante, A. Castillo & F.E. Vega. 2006.** Phylogenetic origins of african and neotropical *Beauveria bassiana* pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. J. Invert. Pathol. 93: 11-21.

**Roberts, D.W. & S.B. Krasnoff. 1998.** Toxinas e enzimas de fungos entomopatogênicos, p.967-985. In: S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

**SAS Institute, 2001.** SAS user's guide: statistics, version 8.2, 6th edn. SAS Institute, Cary, NC, 943.

**Sattar, S., C.A. Quaye, Y. Song, J.A. Anstead, R. Sunkar & G.A.E. Thompson. 2012.** Expression of small RNA in *Aphis gossypii* and its potential role in the resistance interaction with Melon. Plos ONE 7: 1-13.

**Shi, W.B., L.L. Zhang & M.G. Feng. 2008.** Field trials of four formulations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for control of Cotton spider mites (Acari: Tetranychidae) in the Tarim Basin of China. Biol. Control 45: 48-55.

**Silva, R.Z., P.M.O.J. Neves, P.H. Santoro & S.A. Cavaguchi. 2006.** Efeito de agroquímicos à base de óleo mineral e vegetal sobre a viabilidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Paecilomyces* sp. Disponível em: <[http:// www.bioassay.org.br/articles/1.1/BA1.1.pdf](http://www.bioassay.org.br/articles/1.1/BA1.1.pdf) > Acesso em 24 ago. 2008.

**Souza, J.L. & P. Resende. 2003.** Manual de horticultura orgânica. Viçosa, Aprenda Fácil, 564p.

**Szymczak, L. S., M. Z. Schuster, C. Rohde & D. Broetto. 2009.** Efeito de inseticidas orgânicos sobre o pulgão *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) na cultura do pepino (*Cucumis sativus*) em condições de laboratório. Rev. Bras. Agroec. 4: 3204-3207.

**Tigano, M.S. & G. Riba. 1990.** Polimorfismo das  $\alpha$ -esterases e a patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. An. Soc. Entomol. Brasil 19: 315-327.



- Ugine, T.A., S.P. Wraight & J.P. Sanderson. 2005.** Acquisition of lethal doses of *Beauveria bassiana* conidia by western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, exposed to foliar spray residues of formulated and unformulated conidia. *J. Invert. Pathol.* 90: 10–23.
- Vandenberg, J.D., L.E. Sandvol, S.T. Jaronski, M.A. Jackson, E.J. Souza & S.E. Halbert. 2001.** Efficacy of fungi for control of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) in irrigated wheat. *Southwest. Entomol.* 26: 73-85.
- Wraight, S.P., R.I. Carruthers, S.T. Jaronski, C.A. Bradley, C.J. Garza & S. Galaini-Wraight, 2000.** Evaluation of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol. Control* 17: 203-217.
- Wu, W., X.L. Liang, H.Y. Zhao, T.T. Xu & X.D. Liu. 2013.** Special plant species determines diet breadth of phytophagous insects: a study on host plant expansion of the host-specialized *Aphis gossypii* Glover. *PlosOne* 8: 1-6.
- Yeo, H., L.K. Pell, P.G. Alderson, S.J. Clark & B.J. Pye. 2003.** Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manage. Sci.* 59: 156–165.

Tabela 1. Procedência e hospedeiros de isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nos estudos com *Aphis gossypii*.

Fungo <sup>1</sup>	Isolado/produto	Procedência	Hospedeiro
Bb	CG 149	Goiânia – GO	<i>Deois flavopicta</i>
Bb	CG 154	Jataí – GO	<i>Deois flavopicta</i>
Bb	CG 228	Manaus – AM	Chrysomelidae
Bb	CG 251	Colinas do Sul – GO	Formicidae
Bb	CG 319	Pelotas – RS	<i>Diabrotica speciosa</i>
Bb	CG 369	Belém – PA	Solo
Bb	CG 458	Londrina – PR	<i>Anthonomus grandis</i>
Bb	CG 464	Francisco Beltrão – PR	<i>Diabrotica speciosa</i>
Bb	CG 479	Santana do Ipanema – AL	Vespidae
Bb	CG 701	Campos de Julio – MT	Scarabaeidae
Bb	CG 864	Saquarema – RJ	<i>Homalinotus coriaceus</i>
Bb	CG 877	Juazeiro do Norte – CE	<i>Cosmopolites sordidus</i>
Bb	ESALQ 447	Mato Grosso – MT	<i>Solenopsis invicta</i>
Bb	ESALQ 604	Recife – PE	Solo
Ll	ESALQ 1300	Vertirril® WP; Bebedouro – SP	<i>Orthezia praelonga</i>
Bb	GHA	Mycotrol® WP; EUA	<i>Diabrotica undecimpuncta</i>
Ma	IBCB 10	Campinas – SP	<i>Mahanarva fimbriolata</i>
Bb	IBCB 66	São José do Rio Preto – SP	<i>Hypothenemus hampei</i>
Ma	IBCB 425	Iporanga – SP	Solo
Ma	IBCB 348	Sertãozinho – SP	<i>Mahanarva fimbriolata</i>
Ma	PL 43	Fleixeira – AL	<i>Mahanarva posticata</i>
Bb	PL 63	Boveril® WP; Piracicaba – SP	<i>Solenopsis</i> sp.

<sup>1</sup>Bb = *Beauveria bassiana*; Ma – *Metarhizium anisopliae*; Ll = *Lecanicillium longisporum*

Tabela 2. Mortalidades (média  $\pm$  EPM) acumulada corrigida e confirmada de ninfas de *Aphis gossypii* em folha destacada de pepino, ao terceiro e sétimo dia após a inoculação dos isolados de fungos entomopatogênicos na concentração de  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL. Sob temperatura  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  de UR e fotofase de 12 horas.

Isolado (Produto comercial)	Fungo <sup>1</sup>	Mortalidade acumulada (%)			
		Corrigida <sup>2</sup>		Confirmada <sup>3</sup>	
		3 d.a.i <sup>4</sup>	7 d.a.i	3 d.a.i	7 d.a.i
CG 864	Bb	76,7 $\pm$ 7,1 aA	89,2 $\pm$ 3,0 aA	64,6 $\pm$ 3,9 Ab	86,2 $\pm$ 4,4 aA
PL 63	Bb	60,2 $\pm$ 3,3 aB	85,2 $\pm$ 2,4 aA	60,5 $\pm$ 2,1 Ab	80,7 $\pm$ 2,5 aA
IBCB 66	Bb	48,6 $\pm$ 2,7 bB	80,6 $\pm$ 3,9 aA	46,0 $\pm$ 5,1 aB	78,1 $\pm$ 3,9 aA
GHA	Bb	52,2 $\pm$ 2,6 bB	75,8 $\pm$ 2,6 aA	46,3 $\pm$ 3,9 Ab	70,6 $\pm$ 2,3 aA
CG 877	Bb	19,1 $\pm$ 2,9 cB	66,2 $\pm$ 1,7 bA	16,9 $\pm$ 2,1 dB	63,9 $\pm$ 2,2 bA
ESALQ 604	Bb	38,4 $\pm$ 3,1 cB	64,8 $\pm$ 2,1 bA	18,3 $\pm$ 3,7 dB	62,6 $\pm$ 2,3 bA
CG 464	Bb	43,1 $\pm$ 1,3 cB	63,1 $\pm$ 2,2 bA	41,7 $\pm$ 2,8 bB	61,2 $\pm$ 2,2 bA
CG 319	Bb	54,3 $\pm$ 3,3 bA	61,8 $\pm$ 3,2 bA	56,3 $\pm$ 2,7 aB	59,1 $\pm$ 1,1 bA
CG 458	Bb	43,3 $\pm$ 1,3 cB	55,0 $\pm$ 3,3 bA	39,9 $\pm$ 3,5 bB	53,7 $\pm$ 3,0 bA
IBCB 425	Ma	52,0 $\pm$ 2,9 bA	54,0 $\pm$ 2,9 bA	51,6 $\pm$ 2,1 aA	50,8 $\pm$ 2,9 cA
CG 251	Bb	46,0 $\pm$ 1,6 cB	60,5 $\pm$ 3,6 bA	51,2 $\pm$ 3,8 aA	54,0 $\pm$ 2,1 bA
CG 228	Bb	36,6 $\pm$ 6,3 cA	38,0 $\pm$ 4,3 cA	29,6 $\pm$ 2,9 cB	32,5 $\pm$ 2,4 dA
PL 43	Ma	6,7 $\pm$ 5,7 eB	41,2 $\pm$ 1,6 cA	4,3 $\pm$ 2,4 eB	36,0 $\pm$ 1,5 dA
CG 149	Bb	43,3 $\pm$ 3,5 cA	44,1 $\pm$ 4,3 cA	40,1 $\pm$ 4,1 bB	37,0 $\pm$ 2,6 dA
IBCB 10	Ma	40,0 $\pm$ 3,1 cB	44,8 $\pm$ 3,3 bA	36,9 $\pm$ 3,5 bA	43,5 $\pm$ 3,7 cA
ESALQ 447	Bb	20,1 $\pm$ 3,0 cB	56,0 $\pm$ 5,0 bA	19,6 $\pm$ 2,6 dB	42,3 $\pm$ 2,4 cA
CG 479	Ma	31,4 $\pm$ 7,4 cA	31,8 $\pm$ 7,3 dA	24,3 $\pm$ 2,1 dA	30,4 $\pm$ 4,1 dA
CG 367	Bb	12,0 $\pm$ 2,0 dB	22,2 $\pm$ 6,3 dA	10,4 $\pm$ 3,7 dB	31,3 $\pm$ 3,2 dA
CG 701	Bb	26,7 $\pm$ 3,2 cA	27,5 $\pm$ 5,4 dA	25,5 $\pm$ 3,2 cA	30,0 $\pm$ 2,2 dA
ESALQ 1300	Ll	15,0 $\pm$ 1,3 dA	22,2 $\pm$ 6,5 dA	10,5 $\pm$ 3,0 dB	30,0 $\pm$ 3,0 dA
IBCB 348	Ma	20,0 $\pm$ 2,0 cA	20,0 $\pm$ 8,2 dA	15,8 $\pm$ 2,8 dB	30,0 $\pm$ 2,1 dA
CG 154	Bb	7,5 $\pm$ 2,5 eA	7,1 $\pm$ 5,6 dA	3,2 $\pm$ 1,1 eA	12,5 $\pm$ 6,3 eA
CV (%)		35,6	36,3	39,8	37,4

<sup>1</sup>BB = *Beauveria bassiana*; MA = *Metarhizium anisopliae*; LL = *Lecanicillium longisporum*.

<sup>2</sup>Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925), considerando-se a mortalidade da testemunha (10,1 $\pm$ 1,3%). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si, respectivamente pelo teste de Scott-Knott e pelo teste t para dados pareados ( $P \geq 0,05$ ). Dados transformados em  $\arcseno\sqrt{(x/100)}$  para as análises estatísticas.

<sup>3</sup>Mortalidade confirmada pela conidiogênese do fungo.

<sup>4</sup>d.a.i. = dias após a inoculação.

Tabela 3. Mortalidade confirmada acumulada (%) de ninfas de *Aphis gossypii* ao sétimo dia após a inoculação dos isolados de *Beauveria bassiana*, em razão da concentração de conídios ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios/mL). Sob temperatura  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $80 \pm 10\%$  de UR e fotofase de 12 horas.

Concentração (conídios/mL)	Mortalidade confirmada (%) (média $\pm$ EPM) <sup>1</sup>		
	CG 864	PL 63	IBCB 66
$1 \times 10^5$	5,6 $\pm$ 2,5 dA	9,0 $\pm$ 3,8 cA	2,0 $\pm$ 0,4 cB
$1 \times 10^6$	23,0 $\pm$ 3,5 cA	25,7 $\pm$ 2,8 bA	11,1 $\pm$ 2,0 dB
$1 \times 10^7$	68,8 $\pm$ 2,6 bA	61,4 $\pm$ 3,8 bA	32,8 $\pm$ 3,3 cB
$1 \times 10^8$	85,0 $\pm$ 3,6 aA	78,6 $\pm$ 4,8 aA	69,5 $\pm$ 5,9 bA
$1 \times 10^9$	95,6 $\pm$ 2,2 aA	91,1 $\pm$ 2,9 aA	88,4 $\pm$ 3,6 aA

<sup>1</sup>Mortalidade confirmada pela conidiogênese do fungo. Inoculação por imersão das ninfas durante cinco segundos. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ( $P \geq 0,05$ ). A mortalidade na testemunha foi de  $9,3 \pm 1,2\%$ .

Tabela 4. Estimativas da concentração letal ( $CL_{50}$ ), (conídios/mL), intervalos de confiança (I.C.) e ajuste ao modelo de Probit baseados na mortalidade do pulgão *Aphis gossypii* por isolados de *Beauveria bassiana* ao sétimo dia após a inoculação. Sob temperatura  $25\pm 2^{\circ}C$ ,  $80\pm 10\%$  de UR e fotofase de 12 horas.

Isolado	$CL_{50}$ (conídios/mL) <sup>1</sup>	I.C. (95%)	Equação	$\chi^2$
CG 864	$6,3 \times 10^6$ a	$1,9 \times 10^6 - 1,9 \times 10^7$	$Y = -0,99 + 0,88.\log x$	5,6 n.s.
PL 63	$7,1 \times 10^6$ a	$4,0 \times 10^6 - 1,2 \times 10^7$	$Y = 0,17 + 0,71.\log x$	2,0 n.s.
IBCB 66	$3,2 \times 10^7$ b	$2,0 \times 10^7 - 9,6 \times 10^7$	$Y = -1,57 + 0,87.\log x$	1,0 n.s.

<sup>1</sup>Estimativa baseada na mortalidade do pulgão ao sétimo dia após a inoculação do fungo entomopatogênico. Valores de  $CL_{50}$  seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ), pela sobreposição dos intervalos de confiança.

$\chi^2$  = valor calculado; g.l. = 3 e  $\alpha = 0,05$ .

n = 60 ninfas do pulgão por isolado.

Tabela 5. Sobrevivência (média e mediana), em dias, do pulgão *Aphis gossypii* ao longo de sete dias após a inoculação dos isolados de *Beauveria bassiana* ( $1,0 \times 10^8$  conídios/mL) e valores de *P* associados à comparação das curvas de sobrevivência pelo teste de Log-Rank.

Isolado	N <sup>o</sup> insetos	Tempo de sobrevivência (dias)		Teste Log-Rank <sup>3</sup>	
		Média ( $\pm$ DP) <sup>1</sup>	Mediana (TMS) <sup>2</sup>	CG 864	ESALQ 604
CG 864	60	4,5 $\pm$ 0,2	4 (4-5)		
PL 63	51	5,6 $\pm$ 0,2	5 (4-5)	0,2098	
IBCB 66	55	4,9 $\pm$ 0,2	7 (6-9)	0,0005	0,0146

<sup>1</sup>Desvio padrão.

<sup>2</sup>Tempo mediano de sobrevivência e intervalos de confiança ( $\alpha = 0,05$ ), estimados pelo método de Kaplan-Meier.

<sup>3</sup>Valores de *P* associados à comparação pareada das curvas de sobrevivência de pulgões entre isolados do fungo, pelo teste de Log-Rank.

Tabela 6. Mortalidades (média  $\pm$  EPM) corrigida e confirmada de ninfas de *Aphis gossypii* em folhas destacadas de pepino, ao terceiro e sétimo dia após a aplicação de Óleo emulsionável + água; preparação em suspensão aquosa [conídios + água esterilizada + Tween 80 a 0,01%]; preparação em dispersão oleosa [conídios + água esterilizada + óleo emulsionável] e testemunha absoluta. (25 $\pm$ 2°C, 80 $\pm$ 10% de UR e fotofase de 12 horas).

Tratamentos	Mortalidade (%)			
	Corrigida <sup>1</sup>		Confirmada <sup>2</sup>	
	3 d.a.t. <sup>3</sup>	7 d.a.t	3 d.a.t	7 d.a.t
Óleo emulsionável (0,5%)	4,2 $\pm$ 2,4 dB	37,1 $\pm$ 4,6 dA		
Óleo emulsionável (1%)	14,7 $\pm$ 7,1 dB	41,0 $\pm$ 5,9 dA		
Óleo emulsionável (2%)	43,8 $\pm$ 2,3 cB	65,7 $\pm$ 4,2 cA		
Óleo emulsionável (4%)	50,5 $\pm$ 3,2 cA	73,8 $\pm$ 1,8 bA		
Óleo emulsionável (8%)	61,8 $\pm$ 2,2 bA	75,6 $\pm$ 1,5 bA		
<i>B. bassiana</i> + água + Tween 80 (0,01%)	60,0 $\pm$ 3,0 bB	93,2 $\pm$ 3,0 aA	52,3 $\pm$ 1,3 bB	83,8 $\pm$ 3,5 aA
<i>B. bassiana</i> + Óleo emulsionável (0,5%)	65,8 $\pm$ 3,3 bB	89,9 $\pm$ 2,8 aA	61,7 $\pm$ 3,6 aA	75,1 $\pm$ 3,3 aA
<i>B. bassiana</i> + Óleo emulsionável (1%)	66,7 $\pm$ 2,1 bB	90,9 $\pm$ 3,9 aA	62,4 $\pm$ 1,7 aB	81,0 $\pm$ 3,9 aA
<i>B. bassiana</i> + Óleo emulsionável (2%)	84,6 $\pm$ 3,7 aA	90,6 $\pm$ 3,0 aA	70,9 $\pm$ 5,1 aA	82,4 $\pm$ 4,4 aA
<i>B. bassiana</i> + Óleo emulsionável (4%)	88,4 $\pm$ 7,7 aA	90,8 $\pm$ 2,5 aA	73,1 $\pm$ 4,5 aA	76,1 $\pm$ 2,3 aA
<i>B. bassiana</i> + Óleo emulsionável (8%)	89,3 $\pm$ 5,0 aA	95,4 $\pm$ 3,2 aA	71,8 $\pm$ 3,8 aA	78,7 $\pm$ 3,5 aA
CV (%)	37,8	24,5	32,5	23,2

<sup>1</sup>Mortalidade corrigida pela fórmula de Schneider-Orelli (1947), considerando-se a mortalidade da testemunha (8,1 $\pm$ 3,5%). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si, respectivamente, pelo teste de Scott-Knott e pelo teste t para dados pareados (P $\geq$  0,05). Dados transformados em  $\arcseno\sqrt{(x/100)}$  para as análises estatísticas.

<sup>2</sup>Mortalidade confirmada pelo fungo *Beauveria bassiana*.

<sup>3</sup>d.a.t. = dias após o tratamento.

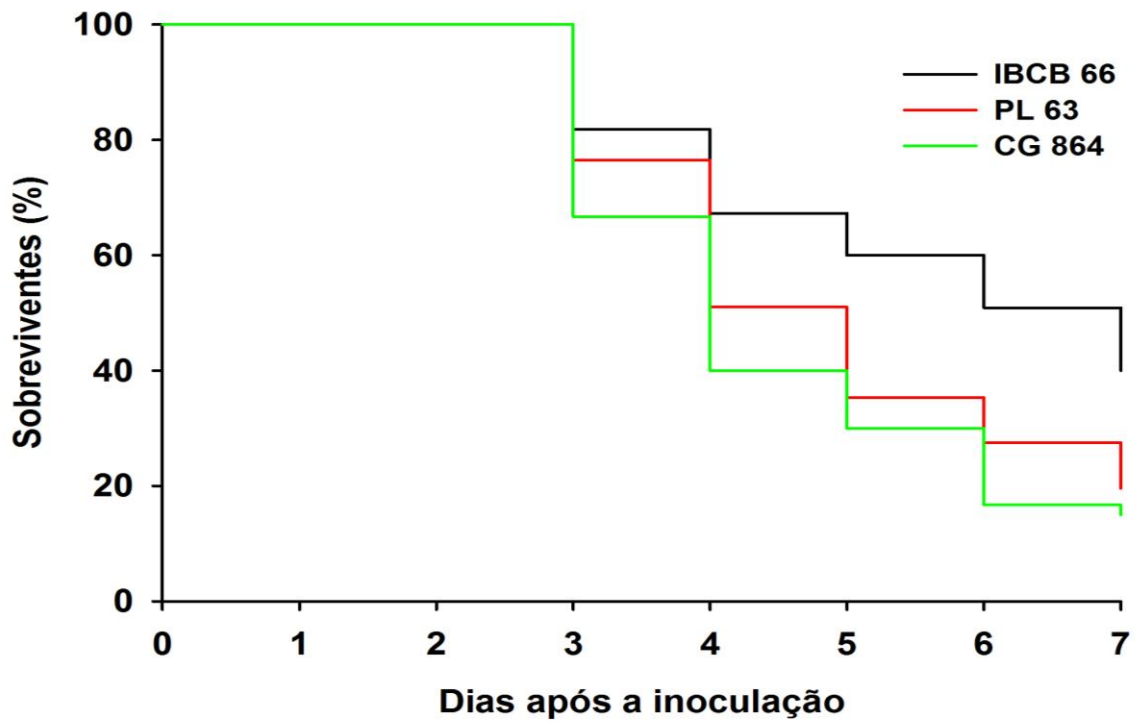


Figura 1. Curvas de sobrevivência de ninfas e adultos de *Aphis gossypii* em folhas de pepino, ao longo de sete dias após a inoculação dos isolados de *Beauveria bassiana*, na concentração de  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL.