

**Seleção de fungos  
entomopatogênicos para  
controle de *Aphis gossypii*  
(Hemiptera: Aphididae)**



Foto: Miguel Michereff Filho



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Hortaliças  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 134***

## **Seleção de fungos entomopatogênicos para controle de *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae)**

Miguel Michereff Filho

Marcos Rodrigues de Faria

Ana Caroline de Azevedo Teixeira

Edmilson Jacinto Marques

Embrapa Hortaliças  
Brasília, DF  
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na

**Embrapa Hortaliças**

Rodovia BR-060, trecho Brasília-Anápolis, km 9

Caixa Postal 218

Brasília-DF

CEP 70.351-970

Fone: (61) 3385.9000

Fax: (61) 3556.5744

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

www.embrapa.br

**Comitê Local de Publicações da Embrapa Hortaliças**

**Presidente:** *Warley Marcos Nascimento*

**Editor Técnico:** *Ricardo Borges Pereira*

**Supervisor Editorial:** *Caroline Pinheiro Reyes*

**Secretária:** *Gislaine Costa Neves*

**Membros:** *Miguel Michereff Filho*

*Milza Moreira Lana*

*Marcos Brandão Braga*

*Valdir Lourenço Júnior*

*Daniel Basílio Zandonadi*

*Carlos Eduardo Pacheco Lima*

*Mirtes Freitas Lima*

**Normalização bibliográfica:** *Antonia Veras de Souza*

**Foto de capa:** *Miguel Michereff Filho*

**Editoração eletrônica:** *André L. Garcia*

**1ª edição**

1ª impressão (2016): 1.000 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610)

**Dados internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Hortaliças

---

Michereff Filho, Miguel.

Seleção de fungos entomopatogênicos para controle de *Aphis-gossypii* (Hemiptera: Aphididae) / Miguel Michereff Filho, Marcos Rodrigues de Faria, Ana Caroline de Azevedo Teixeira, Edmilson Jacinto Marques. - Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2016.

16 p. : il. color. ; 21 cm x 27 cm. (Boletim Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Hortaliças, ISSN 1677-2229; 134).

1. Pulgão. 2. Praga. 3. *Beauveria bassiana*. I. Faria, Marcos M. de

II. Teixeira, Ana Caroline de A. III. Marques, Edmilson Jacinto. IV. Embrapa Hortaliças. V. Série.

CDD 632.96

---

©Embrapa, 2015

# Sumário

Resumo .....	7
Abstract.....	9
Introdução.....	11
Material e Métodos.....	13
Resultados e Discussão.....	15
Conclusões.....	22
Referências .....	23



# Seleção de fungos entomopatogênicos para controle de *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae)

---

*Miguel Michereff Filho*<sup>1</sup>

*Marcos Rodrigues de Faria*<sup>2</sup>

*Ana Caroline de Azevedo Teixeira*<sup>3</sup>

*Edmilson Jacinto Marques*<sup>4</sup>

## Resumo

Preparações à base de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Lecanicillium longisporum* foram testadas, em condições de laboratório, para o controle do pulgão *Aphis gossypii* em plantas de pepino. Na primeira fase dos experimentos foram avaliados diferentes isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *L. longisporum*. Cinco isolados de *B. bassiana*, causaram mortalidade superior a 70% destacando-se CG 864; para *M. anisopliae* IBCB 425, com 50,8% da mortalidade das ninfas; enquanto o isolado E1300 de *L. longisporum* proporcionou 30%

---

<sup>1</sup> Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup>., D. Sc. em Entomologia, pesquisador da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.

<sup>2</sup> Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup>., PhD em Entomologia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>3</sup> Bióloga, mestranda em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE.

<sup>4</sup> Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup>., D. Sc. em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE.

de mortalidade. Na segunda fase, os três isolados mais promissores de *B. bassiana*, 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<sup>-1</sup>) e a testemunha. As percentagens de mortalidade acumulada aos 7 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<sup>-1</sup>) e PL 63 (CL<sub>50</sub> de  $7,1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>; TMS de 7 dias) foi menos promissor contra o pulgão.

**Termos de indexação:** controle microbiano, pulgão, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium longisporum*

# Selection of entomopathogenic fungi to control *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae)

---

## Abstract

Preparations of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Lecanicillium longisporum* were tested in laboratory conditions for control of the aphid *Aphis gossypii*, in cucumber plants. In the first phase of experiments, different isolates of the fungus *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *L. longisporum* were tested. For *B. bassiana*, five isolates caused mortality exceeding 70%, highlighting the isolated CG 864; to *M. anisopliae*, isolated IBCB 425, with 50.8% mortality of nymphs; while the isolated E1300 *L. longisporum* caused 30%. In the second phase, the three most promising isolates of *B. bassiana* 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<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>; TMS four days) and PL 63 (LC50  $7,1 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>); were the most virulent and did not differ significantly from each other, while IBCB 66 (LC50  $3,2 \times 10^7$  conidia mL<sup>-1</sup>) was less promising against aphid.

**Index terms:** biological control, aphid, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium longisporum*



## Introdução

O pulgão *Aphis gossypii* Glover é uma das pragas chaves das cucurbitáceas, principalmente em pepino, melancia, melão e abóboras cultivados em regiões quentes, onde reduz severamente o estande e o vigor das plantas jovens, como também afeta a qualidade dos produtos colhidos (HARREWIJN; MINKS, 1989; HARRINGTON; van EMDEN, 2007).

É um inseto pequeno, medindo de 1 mm 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. Possui dois apêndices laterais de forma tubular, os sinfúnculos, que estão presentes na extremidade posterior do abdome e se prolongam para trás e para cima, sendo esta a principal característica desse grupo. Possui também um abdome central denominado codícula, por onde são expelidas constantemente quantidades de “honeydew” (GOFF; TISSANOT, 1932; GALLO et al., 2002; HARRINGTON; van EMDEN, 2007; SZYMCZAK et al., 2009). A reprodução de *A. gossypii* nos trópicos é por partenogênese telítoca, ou seja, a fêmea não depende do macho e produz apenas ninfas fêmeas. 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).

Tanto adultos como ninfas de *A. gossypii* alimentam-se do floema e durante esse processo ocorre a injeção de toxinas na planta, que causam encarquilhamento das folhas, brotos e ramos, podendo afetar negativamente a produção de frutos ou mesmo ocasionar a morte de mudas e plantas jovens. O “honeydew” expelido pelos pulgões durante a alimentação se acumula na superfície das folhas e favorece a formação de fumagina pelo fungo saprófita *Capnodium* sp. 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 diversos vírus

às cucurbitáceas, 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).

O controle químico tem apresentado eficiência limitada, uma vez que *A. gossypii* possui resistência a uma grande variedade de classes de inseticidas (SATTAR et al., 2012), principalmente organofosforados, piretróides e carbamatos (GONG et al., 2014).

Diante disso, o desenvolvimento de táticas de controle biológico para *A. gossypii* é amplamente vantajoso e desejável, pois não deixa resíduos tóxicos nos alimentos, atua por longo período de tempo ocasionando baixo impacto ambiental, além de ser compatível com outras práticas de manejo integrado de pragas (ALVES, 2001).

Fungos entomopatogênicos destacam-se entre os agentes de controle biológico mais utilizados no país e representam uma alternativa para o manejo de insetos sugadores, especialmente quando agrotóxicos não são permitidos, como em cultivos orgânicos (ALVES, 2001). Os conídios de fungos entomopatogênicos aderem-se e penetram no hospedeiro pelo tegumento (revestimento externo do corpo). Os fungos entomopatogênicos não precisam ser ingeridos para causarem a morte do hospedeiro, diferente de outros micro-organismos como as bactérias e vírus. Apesar de terem sua eficácia comprovada no controle de várias espécies de insetos e ácaros fitófagos, o uso de fungos em programas de manejo integrado de pragas (MIP) ainda é baixo (BUENO, 2005; ALVES; LOPES, 2008).

Vários fungos entomopatogênicos têm sido avaliados para o controle de pulgões, destacando-se *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *lecanii* (GRAYSTONE et al., 1997) e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (LIU et al., 2000; 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 equivalentes encontram-se disponíveis no mercado brasileiro e estão oficialmente registrados para uso (FARIA; WRAIGHT, 2007; MICHEREFF FILHO et al., 2007; BRASIL, 2009).

Assim, este trabalho teve por objetivo selecionar um isolado de fungo entomopatogênico altamente virulento à *A. gossypii*, visando o desenvolvimento de um inseticida biológico para controle dessa praga.

## Material e Métodos

O trabalho foi realizado em 2014, no Laboratório de Micologia de Invertebrados (LMI), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Laboratório de Entomologia, da Embrapa Hortaliças, em Brasília, DF.

Foram avaliados dezessete isolados dos fungos *B. bassiana*, quatro isolados de *M. anisopliae* e um isolado de *L. longisporum* (Tabela 1). O isolado GHA de *B. bassiana* foi utilizado como padrão por ser o ingrediente ativo de vários bioinseticidas 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, que foram destacadas das plantas de pepino, lavadas com água destilada esterilizada e secas em câmara de fluxo laminar. Quinze ninfas de 3º instar 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 JUNIOR, 2006). Em seguida, as placas foram pulverizadas com suspensão aquosa de conídios puros de cada isolado na concentração de  $1,0 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>, em Torre de Potter (marca Burkard Manufacturing Co Ltd., Hertfordshire, Inglaterra), calibrada a 15 libras/pol<sup>2</sup>, aplicando-se 2 mL da suspensão (2µl/cm<sup>2</sup>). A testemunha foi tratada apenas com água destilada esterilizada e Tween 80 a 0,05%. Este produto permite melhor suspensão dos conídios (hidrofóbicos) de fungos entomopatogênicos quando misturados na água.

Após a secagem da suspensão, os recipientes com os insetos foram fechados com filme plástico e mantidos em câmara B.O.D. (25

°C  $\pm$  2 °C, 80%  $\pm$  10% de UR e fotofase de 12 horas) durante 7 dias. Os insetos pulverizados foram transferidos, com um pincel de cerdas macias, para folhas limpas (troca de alimento) a cada 3 dias (YEO et al., 2003).

**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
LI	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*; LI = *Lecanicillium lecanii*

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 cm de diâmetro), contendo papel filtro esterilizado umedecido e um chumaço de algodão molhado. Os insetos permaneceram nestes recipientes por 7 dias ou até a exteriorização do micélio e conidiogênese.

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 e 7 dias após a inoculação dos fungos foram submetidos à análise de variância com arranjo em parcelas subdivididas, onde a sub-parcela correspondeu às épocas de avaliação.

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<sup>-1</sup>) 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 °C ± 1 °C, 72% ± 10% de UR e fotofase de 12 horas) durante 7 dias, avaliando-se diariamente a mortalidade dos insetos.

## Resultados e Discussão

Houve interação significativa entre isolado x época de avaliação 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, com 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*.

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 7 dias da inoculação dos fungos variaram de 4,2 a 95,6% para o isolado CG 864; de 9 a 91,1% para o isolado PL 63; e de 2 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.

Houve diferença estatística na mortalidade confirmada entre 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  $\text{mL}^{-1}$  ( $F_{2;7} = 9,624$ ;  $P = 0,0098$ ). 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  $\text{mL}^{-1}$  ( $F_{2;7} = 3,69$ ;  $P = 0,0840$ ), 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  $\text{mL}^{-1}$  foi significativamente maior que o observado para  $1 \times 10^7$ , porém não diferiu da mortalidade com  $1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . Para todos os isolados a maior mortalidade de pulgões ocorreu na concentração  $1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , diferindo estatisticamente das demais concentrações avaliadas apenas para IBCB 66.

**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<sup>-1</sup>. Temperatura de 25 °C  $\pm$  2 °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 $\pm$ 29 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	LI	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  $\leq$  0,05). Dados transformados em arco-seno  $\sqrt{x/100}$  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<sup>-1</sup>). Temperatura de 25 °C  $\pm$  2 °C, 80%  $\pm$  10% de UR e fotofase de 12 horas.

Concentração (conídios mL <sup>-1</sup> )	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  $\leq$  0,05). A mortalidade na testemunha foi de 9,3  $\pm$  1,2%.

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<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> ocasionou entre 80% e 90% de mortalidade confirmada. Segundo Araújo Junior (2008), o isolado CG 001 de *B. bassiana* pulverizado na concentração de  $1 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> sobre folhas destacadas de couve-folha causou 76% de mortalidade em *Lipaphis erysimi*.

Pela análise de Probit (Tabela 4), os isolados CG 864, PL 63 e IBCB 66 se adequaram ao modelo, por ter ocorrido um  $\chi^2$  não significativo e baixa heterogeneidade dos dados. Considerando a sobreposição dos intervalos de confiança entre as CL<sub>50</sub> verificou-se 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<sup>-1</sup> ao longo de

7 dias de observação, a ação dos isolados foi mais contrastante a partir do terceiro dia da inoculação (Figura 1).

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).

**Tabela 4.** Estimativas da concentração letal ( $CL_{50}$ ), (conídios  $mL^{-1}$ ), 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. Temperatura de  $25\text{ }^{\circ}C \pm 2\text{ }^{\circ}C$ ,  $80\% \pm 10\%$  de UR e fotofase de 12 horas.

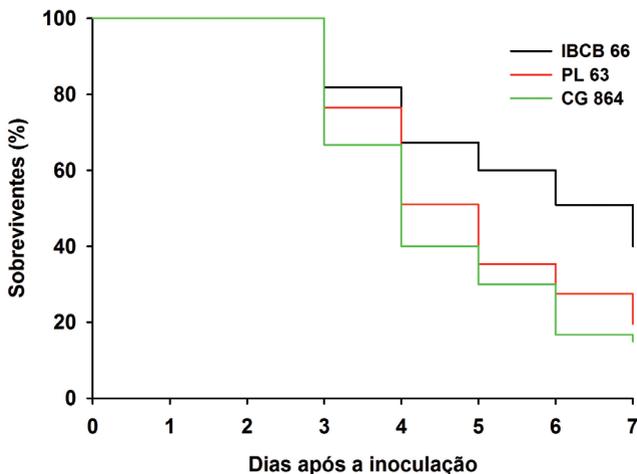
Isolado	$CL_{50}$ (conídios $mL^{-1}$ ) <sup>1</sup>	I.C. (95%)	Equação	$\chi^2$
CG 864	$6,3 \times 10^6$ a	$1,9 \times 10^6$ - $1,9 \times 10^7$	$Y = -0,99 + 0,88.$ log x	5,6 n.s.
PL 63	$7,1 \times 10^6$ a	$4,0 \times 10^6$ - $1,2 \times 10^7$	$Y = 0,17 + 0,71.$ log x	2,0 n.s.
IBCB 66	$3,2 \times 10^7$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

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<sub>50</sub> (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<sub>50</sub> de  $6,3 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>; TMS de 4 dias) e PL 63 (CL<sub>50</sub> de  $7,1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>; TMS de 5 dias) foram os mais virulentos e não diferiram estatisticamente entre si, enquanto IBCB 66 (CL<sub>50</sub> de  $3,2 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>; TMS de 7 dias) foi menos promissor contra o pulgão (Tabelas 4 e 5).



**Figura 1.** Curvas de sobrevivência de ninfas e adultos de *Aphis gossypii* em folhas de pepino, ao longo de 7 dias após a inoculação dos isolados de *Beauveria bassiana*, na concentração de  $1,0 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>.

Na prática, baseado no TMS, pulgões inoculados com o isolado IBCB 66 demorariam mais tempo para morrer em decorrência da infecção do fungo e com isso teriam maior chance de produzir prole para a próxima geração. 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.

**Tabela 5.** Sobrevivência (média e mediana), em dias, do pulgão *Aphis gossypii* ao longo de 7 dias após a inoculação dos isolados de *Beauveria bassiana* ( $1,0 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>) e valores de *P* associados à comparação das curvas de sobrevivência pelo teste de Log-Rank.

Isolado	Nº de 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.

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% a 100%) em laboratório, com baixas concentrações de

conídios ( $CL_{50}$  0,53-9,15  $\times 10^6$  conídios  $mL^{-1}$  e em curto período de tempo ( $TL_{50}$  1,6-6,2 dias). Para o isolado IBCB 66, Loureiro e Moino Junior (2006) não constataram diferença estatística na mortalidade confirmada de ninfas de 3<sup>o</sup> instar de *A. gossypii* ao longo de 8 dias de avaliação, entre as dosagens de  $1,0 \times 10^6$  a  $1,0 \times 10^8$  conídios  $mL^{-1}$  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  $mL^{-1}$ .

Comparando-se os resultados obtidos nos dois experimentos de laboratório e a origem dos isolados, 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 et al. (1990), que testaram isolados de *B. bassiana* oriundos de coleóptero, do pulgão *Schizaphis graminum* (Rondani) 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 entomopatogênico 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).

## Conclusões

-Os isolados do fungo *B. bassiana* são mais virulentos às ninfas de *A. gossypii* que os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Lecanicillium longisporum*, em condições de laboratório;

- Os isolados CG 864 e PL 63 de *B. bassiana* são os mais virulentos nos experimentos de laboratório;
- A concentração ótima de conídios dos isolados CG 864 e PL 63 corresponde a  $1,0 \times 10^8$  conídios viáveis mL<sup>-1</sup>, a qual proporciona mortalidade confirmada de pulgões acima de 85 %.
- Novos estudos serão necessários para o aprimoramento do inseticida biológico à base de conídios de *B. bassiana*, almejando propiciar maior eficiência de controle e menor população sobrevivente de *A. gossypii* após sua aplicação, bem como a disponibilização de um produto formulado com alta viabilidade de estruturas infectivas, de longa vida de prateleira (> de 6 meses, sob condições não refrigeradas), de fácil manuseio e aplicação.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Edmilson Jacinto Marques (UFRPE) pelas valiosas sugestões para a realização deste trabalho, às estudantes Ana Caroline de Azevedo Teixeira (UFRPE) e Sharrine Omari de Oliveira (UFV) pelo seu apoio na execução das pesquisas.

## Referências

ALMEIDA, G. D.; PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R. A.; HOLTZ, A. M.; VICENTINI, V. B. Determinação da concentração letal média (CL50) de *Beauveria bassiana* para o controle de *Brevicoryne brassicae*. **IDESIA**, Arica, v. 25, n. 2, p. 69-72, ago. 2007.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos, In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.

ALVES, S. B. Utilização de entomopatógenos no controle de insetos e ácaros. In: ENCONTRO DE PROCESSOS DE PROTEÇÃO DE PLANTAS:

CONTROLE ECOLÓGICO DE PRAGAS E DOENÇAS, 1, 2001, [Botucatu]. **Resumos...** Botucatu: Agroecológica, 2001. p. 109-116.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414 p.

AQUINO de MURO, M.; MEHTA, S.; MOORE, D. 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 Microbiology Letters**, New York, v. 229, n. 2, 249-257, Dec. 2003.

ARAÚJO JUNIOR, J. M. Seleção de fungos entomopatogênicos associados ao óleo de nim para controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em couve. 2008. 55 f. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

BUENO, V. H. P. Controle biológico de pulgões ou afídeo-praga em cultivo protegido. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, p. 9-17, 2005.

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoaraticides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, New York, v. 43, p. 238-240, Ago. 2007.

FENG, M. G.; JOHNSON, J. B.; KISH, L. P. Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species of cereal aphids (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, n. 3, p. 815-820, June 1990.

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

GOFF, C. C.; TISSOT, A. N. **The melon aphid, *Aphis gossypii* Glover.** Gainesville: Agricultural Experiment Station, 1932. 23 p. (Bulletin of Florida Agricultural Experimental Station).

GONG, Y. H., YU, X. R.; SHANG, Q. L.; SHI, X. Y.; GAO, X. W. 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**, San Francisco, v.9, n. 8, p. 1-7, Aug. 2014.

GRAYSTONE, J. L.; CHARNLEY, A. K.; ALBAJES, R.; CARNERO, A. Disease development strategies of the insect pathogenic fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae*. Integrated control in protected crops, mediterranean climate. **Bulletin-OILB-SROP**, Littlehampton, v. 20, p. 263-267, Jul. 1997.

HARREWIJN, P.; MINKS, A. K. Integrated aphid management: General aspects. In: MINKS, A. K.; HARREWIJN, P. (Ed.). **World crop pests - aphids: their biology, natural enemies and control.** New York: Elsevier, 1989. p. 267-272.

HARRINGTON, H.; van EMDEN, H. F. **Aphids as crop pests.** London: CABI, 2007. 717 p.

LIU, Y. Q.; FENG, M. G.; LIU, S. S.; ZHANG, B. X. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* against *Myzus persicae*. **Chinese Journal of Biological Control**, Beijing, v. 16, p. 56-60, 2000.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Sislegis - sistema de legislação agrícola federal.** Brasília, DF. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>>. Acesso em: 30 abril 2009.

MAURER, P.; COUTEAUDIER, Y.; GIRARD, P. A.; BRIDGE, P. D.; RIBA, G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. **Mycological Research**, New York, v. 101, n. 2, p.159-164, Feb. 1997.

MICHEREFF FILHO, M; FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: Como estamos? Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2007. 28 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Documentos**, 240).

MICHEREFF FILHO, M.; OLIVEIRA, S. O. D.; LIZ, R. S.; FARIA, M. Cage and field assessments of *Beauveria bassiana*-based mycoinsecticides for *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) control in cabbage. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, n. 4, p. 470-476, July/Aug. 2011.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Genética e melhoramento de fungos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, [1998]. p.171-200 p.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; AZEVEDO J. L. Natural variability in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 33, n. 6, p. 657-672, 1990.

REHNER, S. A.; POSADA, F.; BUCKLEY, E. P.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; VEJA, F. E. Phylogenetic origins of african and neotropical *Beauveria bassiana* pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 93, p. 11-21, June 2006.

ROBERTS, D. W.; KRASNOFF, S. B. Toxinas e enzimas de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 967- 985 p.

TIGANO, M. S.; RIBA, G. Polimorfismo das  $\beta$ -esterases e a patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 19, n. 2, p. 315-327, Aug. 1990.

SATTAR, S.; QUAYE, C. A.; SONG, Y.; ANSTEAD, J. A.; SUNKAR, R.; THOMPSON, G. A. E. Expression of small RNA in *Aphis gossypii* and its potential role in the resistance interaction with melon. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. 1-13, Nov. 2012.

SZYMCZAK, L. S.; SCHUSTER, M. Z.; ROHDE, C.; BROETTO, D. Efeito de inseticidas orgânicos sobre o pulgão *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) na cultura do pepino (*Cucumis sativus*) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Pelotas, v. 4, n. 2, p. 3204-3207, Nov. 2009.

YEO, H.; PELL, L. K.; ALDERSON, P. G.; CLARK, S. J.; PYE, B. J. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. **Pest Management Science**, New York, v. 59, n. 2, p. 156–165, Jan. 2003.

