

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Virulência de *Aphanocladium album* e *Verticillium lecanii*
(Deuteromycotina: Hyphomycetes) para o percevejo-de-renda da
seringueira, *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Tingidae) e
comportamento de *V. lecanii* em meio de cultura

Autor: Drauzio Eduardo Naretto Rangel

Orientadora: Prof^a Dr^a Antônia do Carmo Barcelos Correia

Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia (Área de
Concentração Microbiologia)

Jaboticabal, SP

Agosto de 2000

R196v Rangel, Drauzio Eduardo Naretto
Virulência de *Aphanocladium album* e *Verticillium lecanii*
(Deuteromycotina: Hyphomycetes) para o percevejo-de-renda da
seringueira, *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Tingidae) e
comportamento de *V. lecanii* em meio de cultura / Drauzio Eduardo
Naretto Rangel. __ Jaboticabal, 2000
ix, 70p. : il. ; 28cm

Dissertação (Mestre) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2000
Orientadora: Antônia do Carmo Barcelos Correia
Banca examinadora: Aquiles Eugênio Piedrabuena, Antonio
Carlos Monteiro
Bibliografia

1. Fungos entomopatogênicos. 2. Controle microbiano de
insetos. 3. Virulência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

Ficha catalográfica elaborada pelo STATI-SBD
e-mail: drauzionaretto@hotmail.com

DADOS CURRICULARES

Drauzio Eduardo Naretto Rangel, nascido em 17 de abril de 1958 em São Paulo, SP. Biólogo, formado pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Faculdades Franciscanas, Bragança Paulista, SP, agosto de 1983. Realizou estágio no Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP de 1983 a 1986, na área de controle microbiano de insetos vetores da doença de Chagas.

Aos meus pais e irmão,
Drausio, Maria Hilda
e Antonio Carlos,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Antônia do Carmo Barcelos Correia, do Dep. de Fitossanidade, FCAV/UNESP, pelo constante estímulo, carinho e essencialmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, do Dep. de Genética e Evolução, IB/UNICAMP, pela colaboração com as análises de Probit e principalmente pelos ensinamentos que têm contribuído muito para minha formação.

Ao Prof. Dr. Richard Alan Humber, da USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, pela dedicação e disposição com a identificação dos fungos e por transmitir seu conhecimento sobre uma técnica de observação de estruturas dos fungos para identificação.

Ao Dr. Nilton T.V. Junqueira, da EMBRAPA/CPAC, por ceder os isolados de *Verticillium lecanii*.

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa, do Dep. de Ciências Exatas, FCAV/UNESP, pelas orientações com as análises estatísticas.

À Prof^a Dr^a Maria Aparecida Pessoa da Cruz Centurion, Dep. de Fitotecnia, FCAV/UNESP, pelo fornecimento de mudas de seringueiras para criação dos insetos.

Ao Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos, do Dep. de Fitossanidade, FCAV/UNESP, por colaborar com as fotomicrografias dos fungos.

Ao Prof. Dr. Ludwig Pfenning, Dep. Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, por ajudar com a identificação dos isolados.

E a todas as pessoas que contribuíram para execução desta pesquisa.



ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Histórico e importância da heveicultura.....	3
2.2 O percevejo-de-renda.....	5
2.3 Controle químico do percevejo-de-renda.....	6
2.4 Controle microbiano do percevejo-de-renda.....	7
2.5 Os fungos <i>Aphanocladium album</i> e <i>Verticillium lecanii</i>	8
2.6 Comportamento de fungos em meio de cultura.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Isolados	11
3.2. Meios de cultura e Solução de Tween 80 [®]	12
3.3. Restabelecimento da virulência dos isolados.....	13
3.4. Armazenamento dos patógenos.....	14
3.5. Produção e quantificação de unidades infectivas para os bioensaios.....	15
3.6. Inseto hospedeiro.....	15
3.7. Virulência de <i>Aphanocladium album</i> e <i>Verticillium lecanii</i> para ninfas de terceiro instar, quinto instar e adultos de <i>Leptopharsa heveae</i>	16

3.8. Efeito do meio de cultura na virulência de <i>V. lecanii</i> para adultos de <i>L. heveae</i>	18
3.9. Efeito do meio de cultura na virulência de <i>V. lecanii</i> para adultos de <i>L. heveae</i>	20
3.10 Comportamento de <i>Verticillium lecanii</i> em meio de cultura.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Virulência de <i>Aphanocladium album</i> e <i>Verticillium lecanii</i> para ninfas de terceiro instar, quinto instar e adultos de <i>Leptopharsa heveae</i>	25
4.2. Efeito do meio de cultura na virulência de <i>V. lecanii</i> para adultos de <i>L. heveae</i>	39
4.3. Efeito do meio de cultura na virulência de <i>V. lecanii</i> para adultos de <i>L. heveae</i>	42
4.4. Comportamento do fungo <i>Verticillium lecanii</i> em meio de cultura	48
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
7. ABSTRACT.....	69

RESUMO

Dentre as pragas da seringueira, o percevejo-de-renda *Leptopharsa heveae* destaca-se por causar sérios danos. Em condições de laboratório, duas concentrações ($2,4 \times 10^5$ e $2,4 \times 10^7$ conídios/mL) dos fungos *Verticillium lecanii* (isolados CPAC H1, CPAC H3 e CPAC H6) e *Aphanocladium album* (FTRI A1) foram testadas em ninfas e adultos de *L. heveae* para se avaliar a virulência destes patógenos. Na maior concentração, verificou-se que CPAC H1 foi mais virulento para ninfas de terceiro instar e seu TL_{50} foi de 1,9 dias; para o quinto instar, os isolados CPAC H1, FTRI A1 e CPAC H6 apresentaram a mesma virulência e os TL_{50} foram respectivamente 2,6, 2,6 e 3,2 dias; para adultos, o CPAC H3 foi mais virulento e o TL_{50} foi de 2,0 dias. Na menor concentração, nem

todos isolados causaram mortalidade acima de 50%. Referente ao tratamento testemunha, a mortalidade acumulada de insetos de terceiro instar, quinto instar e adultos foi respectivamente 74, 57 e 29%, após uma semana. Verificou-se também o efeito de meios de culturas na virulência de *V. lecanii* com os isolados CPAC H1 e H3. Para se avaliar isto, foram utilizados dois tipos de aplicação do fungo no inseto. No primeiro foi utilizado o método de imersão de insetos na suspensão de conídios e no segundo, efetuou-se a aspersão da suspensão de conídios sobre insetos e na face inferior dos folíolos. Em ambos os ensaios, verificou-se que não houve diferença significativa dos meios com relação a virulência. Entretanto, verificou-se que no primeiro método a mortalidade acumulada causada pelo fungo não passou de 15% até o sexto dia, enquanto no segundo, no sexto dia já havia ocorrido acima de 50% de mortalidade, com exceção de um tratamento. Com relação ao comportamento do fungo *V. lecaniii*, isolado CPAC H1, nos meios de aveia e BDAY, verificou-se maior crescimento no meio de aveia. Quanto à produção de conídios, não houve diferença significativa entre os meios, entretanto, a maior produção de conídios foi obtida no 16º dia para o meio BDAY (1.4×10^8 conídios/mL) e no 18º dia para o meio de aveia ($1,8 \times 10^8$ conídios/mL). Após estes dias, houve redução do número de conídios para ambos os meios. A viabilidade dos conídios produzidos em meio BDAY foi significativamente mais alta que em aveia.

1. INTRODUÇÃO

A heveicultura brasileira tem grande potencial de crescimento e geração de emprego e renda. De importância socioeconômica e ambiental, a cultura exige intensa participação de mão-de-obra especializada na operação de sangria por produzir ao longo de praticamente de todo ano. O segmento movimenta US\$ 150 milhões/ano, gerando 70 mil empregos diretos e 350 mil indiretos. A seringueira apresenta grande capacidade de reciclagem de carbono, transformando-o em látex e madeira, contribuindo para a minimização de problemas ambientais (Reportagem local, 1997; Oliveira & Gameiro, 1999).

O percevejo-de-renda, *Leptopharsa heveae*, é considerado a praga mais prejudicial dos seringais, capaz de provocar uma redução de até 30% na produção de látex. Além disso, provoca a brotação precoce de novas folhas, possibilitando a

proliferação do mal-das-folhas, causado pelo fungo *Microcyclus ulei* (Val, 1994).

Segundo Val (1994), no ano de 1992/1993 a Plantações E. Michelin Ltda. gastou 45 mil dólares com inseticidas para o controle do percevejo-de-renda. Com a implantação do controle biológico com o fungo *Sporothrix insectorum* esta despesa caiu para 10 mil dólares. A preocupação da Michelin em reduzir o tratamento químico não é apenas econômica, mas também de proteção ao meio ambiente, pois os inseticidas afetam a cadeia ecológica, eliminando os inimigos naturais da praga.

Embora o fungo *Sporothrix insectorum* esteja sendo empregado atualmente para o controle desta praga, pesquisas sobre este patógeno ainda são incipientes, principalmente com relação a testes toxicológicos em aves, mamíferos organismos aquáticos e artrópodos benéficos. Entretanto, o fungo *V. lecanii* vem sendo empregado há muito tempo, principalmente na Europa para o controle de afídeos e mosca-branca em casas de vegetação e poderia representar mais uma alternativa para o controle do percevejo-de-renda.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos fungos *A. album* e *V. lecanii*, ainda não citados como patógenos do percevejo-de-renda; selecionar o isolado mais virulento para ninfas e adultos do percevejo-de-renda, por meio de bioensaios em laboratório; verificar o efeito de meios de cultura na virulência dos isolados selecionados anteriormente para adultos de *L. heveae* e, finalmente, obter dados sobre o isolado mais virulento para o percevejo-de-renda, quando cultivado em distintos meios de culturas (crescimento das colônias, início e auge da produção de conídios e viabilidade dos conídios desde o início da produção).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico e importância da heveicultura

Por volta do século XIX, a transferência de plantas exóticas e buscas de plantas selvagens passíveis de domesticação eram atividades desenvolvidas por Europeus a procura de espécies desconhecidas que pudessem servir como matéria-prima, remédio ou ornamento. De todas grandes descobertas botânicas daquela época, nenhuma foi tão importante do que a domesticação das árvores produtoras de borracha. No início do século XX, com o intenso plantio de seringueira no Sudeste Asiático pelos ingleses, a borracha teve seu custo reduzido e o Brasil, primeiro e maior fornecedor de borracha extrativa, teve seu crescimento econômico diminuído e o desenvolvimento da vasta região amazônica caiu na estagnação (Dean, 1989, p.24-25).

A Idéia de cultivo de seringueira no Brasil surgiu bem antes da transferência de sementes de seringueira para o Sudeste Asiático em uma conferencia de Gustavo Schuch de Capanema, proferida em 1856 (Dean, 1989, p.74). Em 1900 João Barbosa Rodrigues, diretor do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, defendeu a urgência do plantio na Amazônia. Rodrigues acreditava que somente nesta região a árvore poderia ser cultivada e que a tentativa britânica de plantar seringueiras no Ceilão estava predestinado ao fracasso (Dean, 1989, p75). Em 1909, o governador do Pará, promulgou uma lei que concedia incentivos aos plantadores, exigindo o plantio de 20 mil árvores por ano (Dean, 1989, p79). No inicio da década de 1920, já haviam cerca de dois milhões de seringueiras plantadas no Brasil, distribuídos na Amazônia, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo (Dean, 1989, p82).

De 1930 a 1997, o consumo internacional de borrachas aumentou mais de 25 vezes, passando de 600 mil para 16,5 milhões de toneladas anuais. Em 1997, a borracha natural respondeu por 39% desse total (Internacional Rubber Study Group citado por Oliveira & Gameiro, 1999). A produção brasileira responde por menos de 1% da produção mundial de borracha natural, enquanto que o consumo representa aproximadamente 2,5% do total mundial consumido (Oliveira & Gameiro, 1999).

Segundo Reportagem Local (1997), o Brasil possuía 250 mil ha de seringueiras em 1997 (sendo que 32% ainda não produziam). Em 1999 a colheita da safra foi aproximadamente de 70 mil toneladas, considerada a maior da década (Reportagem Local, 1999). Somente a região de São José do Rio Preto, SP,

produz 25 mil toneladas por ano e lidera a produção de látex, totalizando 35% do total do país (Silva, 2000).

Oliveira & Gameiro (1999) deixaram claro que sob o ponto de vista técnico, os seringais de cultivo do Brasil tem plenas condições de competir com os seringais dos principais países produtores. A produtividade média dos seringais paulistas é superior à dos três maiores produtores asiáticos (Tailândia, Indonésia e Malásia).

2.2. O percevejo-de-renda

Além de uma doença que constituiu o fator limitante da heveicultura no Brasil, conhecida desde o início do século XX por mal-das-folhas, causada pelo fungo *Microcyclus ulei* (denominado até 1962 por *Dothidella ulei*), também foram identificadas em 1935 por Charles H.T. Townsend 23 espécies de insetos pragas e suas observações na época registraram que essas pragas eram tão danosas às seringueiras quanto o mal-das-folhas (Dean, 1989, p.92; Dean, 1989, p.122). Entre elas, o percevejo-de-renda, *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (considerado a praga mais séria dos seringais) foi registrado pela primeira vez em 1935 em Boa Vista, RR e Rio Tapajós, PA pelo entomologista Charles H. T. Townsend, em folhas de seringueira (Drake & Poor, 1935).

Ninfas e adultos vivem em colônias na face inferior do limbo foliar, onde se alimentam sugando seiva (Abreu, 1996). Esse inseto enfraquece e predispõe as plantas ao ataque de fungos (Junqueira et al., 1987). Quando as folhas são atacadas intensamente, a face superior fica esbranquiçada e a face inferior

apresenta inúmeras pontuações escuras e manchas amarronzadas (Celestino Filho & Magalhães, 1986). Val (1994) enfatizou que *L. heveae* diminui a capacidade fotossintética da planta, reduzindo assim a produção de látex.

O inseto adulto mede aproximadamente 4 mm de comprimento e caracteriza-se por apresentar as asas e o pronoto inteiramente reticulados. Segundo Tanzini (1996), o desenvolvimento de *L. heveae* é paurometábolo, com cinco instares ninfais até a fase adulta. Esta é subdividida em adultos tenerais, que têm coloração branca, movimentos lentos e olhos vermelhos e tem duração média de 3,5 dias, e adultos de coloração palha, com olhos pretos e movimentos ágeis. A duração do estágio ninfal, no laboratório, é de 15,03 dias, com média de 3 dias para cada instar e a longevidade dos adultos é de 20,52 dias à temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$, e fotofase de 14 horas. Em campo, é de 29,6 dias, à temperatura média de $23,1^{\circ}\text{C}$ e UR média de 78%.

2.3. Controle químico do percevejo-de-renda

Não existem estudos referente ao controle químico do percevejo-de-renda, *L. heveae*, entretanto, a Plantações E. Michelin Ltda¹ tem testado inseticidas, como: Metomil, Monocrotofós, Metamidofós, Lambdacihalotrin, Endosulfan e Deltametrina para seu controle. São, ainda, realizados testes de compatibilidade destes produtos com o fungo *Sporothrix insectorum*.

¹ Scomparin, C.H.J. (Plantações E. Michelin Ltda., BR 163, km 16,5, Caixa Postal, 80, Rondonópolis, MT) Comunicação pessoal, 2000.

2.4. Controle microbiano do percevejo-de-renda

O primeiro registro de epizootias causadas por fungos controlando o percevejo-de-renda é de 1937. Nesta referência, Charles (1937) informa que Townsend coletou percevejos-de-renda colonizados por fungos em seringueiras do Pará no ano de 1935. Segundo Charles, as observações realizadas por Townsend nesta época, indicaram que o fungo era bastante efetivo no controle do percevejo-de-renda, praga da seringueira, que já causava preocupação. Posteriormente, o Dr. James R. Weir também enviou insetos colonizados pelo mesmo fungo, com a informação que este patógeno praticamente destruiu os percevejos de uma extensa área em plantações de seringueira. Shimazu et al. (1994) registraram também a ocorrência do fungo *Hirsutella* sp em ninfas e adultos de *L. heveae* em plantações de seringueira da Fazenda Itamarati em Mato Grosso.

Segundo Celestino Filho & Magalhães (1986), foi registrada a primeira ocorrência do fungo *Sporothrix insectorum* em 1986 no Amazonas. O fungo se encontrava na região controlando 93% de ninfas e 76% de adultos do percevejo-de-renda. Segundo Val (1994) os fungos *S. insectorum* e *Hirsutella verticillioides* são inimigos naturais do percevejo-de-renda. Vivem nas folhas das seringueiras, no ambiente quente e úmido da mata tropical. Quando em contato com o inseto, os fungos penetram em seu corpo e após a morte, o inseto fica envolvido pelo fungo e fixado ao folíolo, o que favorece a ocorrência de epizootias na natureza. Foi demonstrado por Junqueira et al. (1988) que *S. insectorum*, aplicado na concentração de 12×10^6 conídios/mL, em seringueiras, controlou 25,5% da

população da praga no período seco e 93,5%, no período úmido.

Atualmente, muitos produtores estão aderindo ao controle microbiano do percevejo-de-renda, embora ainda não se conheça seu impacto sobre outros organismos presentes nos seringais, especialmente os inimigos naturais da praga.

Outros fungos têm sido relatados para o controle de outras espécies de percevejo-de-renda, por exemplo, o inseto *Leptopharsa gibbicularina*, praga de palmeiras oleíferas na Colômbia, que tem sido controlado pelo fungo *Sporothrix insectorum* (Ordóñez-Giraldo, 1993). Também o percevejo-de-renda do plátano *Corythucha ciliata*, na Europa tem sido controlado naturalmente pelos fungos *Acremonium strictum* (Pelagatti et al. 1988), *Verticillium lecanii* (Arzone & Marletto, 1984; Tavella & Arzone, 1987), *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces farinosus* (Arzone & Marletto, 1984).

2.5. Os fungos *Aphanocladium album* e *Verticillium lecanii*

Atualmente existem poucos trabalhos relatando a virulência de *Aphanocladium album* (Preuss) Gams. Os únicos registros são de Lopez Lastra (1990) e Lopez Lastra et al. (1992). O primeiro refere-se ao isolamento e identificação do fungo como patógeno de adultos de *Aedes albifasciatus*, na Argentina. No segundo, os autores avaliaram a virulência deste fungo para larvas de *Culex pipiens*, em laboratório.

Este fungo também tem sido reportado como hiperparasito, capaz de invadir esporos de fungos causadores de ferrugem em gramíneas (Koç & Défago, 1983).

Verticillium lecanii (Zimm.) Viégas é um fungo entomopatígeno muito promissor para controle de insetos e ocorre freqüentemente em cochonilhas (Viégas, 1939), afídeos (Hall & Burges, 1979), tingídios (Tavella & Arzone, 1987) mosca-branca (Osborne & Landa, 1992), tripes (Alves, 1998a) e mosca doméstica (Steenberg & Humber, 1999). A eficiência de *V. lecanii* para controlar naturalmente certas pragas estimulou a produção na Inglaterra, de Vertalec e Mycotal, dois produtos comerciais para controle de afídeos e mosca-branca, em casa-de-vegetação (Hall, 1981). O uso deste fungo para controle do percevejo-de-renda apresenta uma grande vantagem em relação a *S. insectorum*, pois tem sido mais estudado, principalmente com relação a segurança do homem e outros animais. Segundo Hall (1981) não foram observados sintomas adversos e patologias em ratos injetados via intravenosa com suspensão de 10^6 conídios/mL de *V. lecanii*.

2.6. Comportamento de fungos em meios de cultura.

A maioria dos estudos em patologia requer o cultivo do patógeno em meio de cultura para produção de propágulos para inoculação dos hospedeiros. A qualidade do inóculo é tão importante quanto a quantidade, pois o estado nutritivo dos propágulos é freqüentemente relacionado com sua infectividade (Dhingra & Sinclair, 1985).

A exaustão de nutrientes do meio de cultura conduz muitos fungos à produção de esporos, enquanto nutrientes em abundância resultam em vigoroso crescimento vegetativo. Conseqüentemente, as condições nutricionais ótimas para esporulação e para crescimento do micélio freqüentemente diferem (Carlile &

Watkinson, 1994).

Monteiro (1988) avaliou o crescimento e produção de conídios de isolados de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces marquandii* e *Metarhizium anisopliae* em seis meios de cultura (meio mínimo, meio completo, meio completo + amido, BDA, meio de arroz e meio de aveia) e observou que o meio completo e meio completo + amido propiciaram o melhor crescimento dos isolados. *M. anisopliae* também cresceu bem em meio BDA. Quanto à produção de conídios, o meio completo + amido foi o melhor para os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, e BDA foi o melhor para *P. marquandii*.

Orrego Fuente et al., (1996) verificaram que entre seis meios de cultura (BDA, aveia, coco, soja, cenoura e Czapek), os meios de aveia, cenoura e soja (adicionados com 2% de dextrose), induziram maior crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Cylindrocladium* sp. Entretanto, os fungos produziram maior quantidade de esporos nos meios BDA e Czapek.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Entomopatógenos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus Jaboticabal.

3.1. Isolados

Três isolados provenientes da Guiana Francesa, 1990, obtidos de percevejo-de-renda e ácaro vermelho, foram cedidos em 16/11/1998 pelo Dr. Nilton T.V. Junqueira, da micoteca da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC), Planaltina, DF. Havia sido identificados como *Hirsutella verticillioides* pelo Commonwealth Mycological Institute, Kew, England, e nomeados como

CPAC H1, CPAC H3 e CPAC H6. O quarto isolado foi obtido em 26/1/1998 de material oriundo da Triângulo Agroindustrial S.A. de Pontes e Lacerda, MT. Com este trabalho já em andamento, verificou-se que os fungos não correspondiam à descrição de Charles (1937) e nem às ilustrações de Minter & Brady (1980). Os isolados foram então remetidos ao Dr. Richard A. Humber¹ que identificou os três primeiros como *Verticillium lecanii* (depositados no USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Ithaca, NY com os respectivos números de acesso ARSEF 6430, ARSEF 6431 e ARSEF 6432) e o quarto como *Aphanocladium album*, (nomeado como FTRI A1, ARSEF 6433).

3.2. Meios de cultura e solução de Tween 80[®]

Os isolados foram cultivados nos meios BDAY e MA (meio de aveia). O meio BDAY foi preparado extrato obtido a partir de 200g de batatas, 20g de dextrose (Dextrosol[®], Refinações de Milho Brasil Ltda., São Paulo, SP.), 15g de ágar (Oxoid[®] Ltd., Hampshire, England), 10g de extrato de levedura (Merck[®], Darmstadt, Germany) e 1.000mL de água destilada, sendo posteriormente esterilizado em autoclave a 120° C, durante 20 minutos.

O meio MA foi preparado com 30g de aveia em flocos integral (Yoki[®] Alimentos Ltda., São Bernardo do Campo, SP.), 15g de ágar (Oxoid[®]) e 1000mL de água destilada. A aveia foi cozida brandamente em um “sachet” de tecido fino por aproximadamente 2 horas. Após o cozimento, o volume foi completado para

¹ Humber, R.A. (USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Plant Protection Research Unit, US Plant, Soil & Nutrition Laboratory, Ithaca, NY) Comunicação pessoal, 2000.

1.000mL e filtrado em outro tecido, para evitar fragmentos no meio, e esterilizado a 120°C durante 20 minutos.

A solução de Tween 80[®] foi utilizada para colheita dos conídios no meio de cultura, para preparar as suspensões de conídios e pulverização nos insetos. Nos experimentos foram utilizadas as concentrações de 0,1% e 0,01% (v/v) de Tween 80[®].

Para a concentração de 0,1% foi adicionado 1 mL de Tween 80[®] em 999 mL de água destilada e para a concentração de 0,01%, 0,1mL em 999,9mL. Posteriormente foi agitada, distribuída em frascos com 200mL e autoclavada a 120° C, durante 20 minutos.

3.3. Restabelecimento da virulência dos isolados

Os isolados foram inoculados em adultos de *L. heveae* (pois alguns já se encontravam na oitava repicagem). Após a morte dos insetos, os patógenos foram reisolados do hospedeiro e cultivados em placas de Petri com meio BDAY.

Para este fim, foram utilizados para cada isolado 25 insetos adultos distribuídos em 5 placas de Petri de 100mm de diâmetro, forradas com papel filtro e esterilizadas em autoclave. Os insetos e os folíolos foram pulverizados com uma suspensão de cada patógeno e depois mantidos em estufa BOD a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 horas. As placas foram vedadas com filme de PVC, a fim de evitar a perda de umidade. Num pré-teste observou-se que em placas sem papel filtro umedecido e sem vedação o folíolo secava em 24 horas, e ocorria alta

mortalidade dos insetos.

Após a morte, os insetos permaneceram em câmara úmida até a extrusão do patógeno. Para reisolá-lo, posteriormente os insetos foram imersos em hipoclorito de sódio (NaClO) a 1%, em dois ciclos de 20 segundos cada. Depois foram enxaguados duas vezes em água destilada e esterilizada. Em seguida, partes do inseto foram inoculadas em placas de Petri com meio BDAY com Cloranfenicol (125mg/L) e foram incubados a $26 \pm 0,5^{\circ}$

3.4. Armazenamento dos patógenos

Água estéril

Os isolados com virulência restabelecida, foram armazenados em frascos com água estéril, para serem utilizados posteriormente.

Com auxílio de um furador cilíndrico, vários discos do meio de cultura com fragmentos da colônia do fungo foram recortados. Os discos foram transferidos para frascos com água destilada previamente esterilizados. Posteriormente, foram fechados com tampa de borracha esterilizada e lacrados com tampa de alumínio. Os frascos foram mantidos em refrigerador (Alves, 1998b).

Óleo mineral

Os fungos reisolados também foram armazenados em tubos de ensaio com meio BDAY não inclinado. Após a incubação dos tubos não inclinados, os isolados foram cobertos com óleo mineral. Os tubos foram tampados com algodão estéril, envolvidos com filme de PVC e mantidos sob refrigeração (Alves, 1998b).

3.5. Produção e quantificação de unidades infectivas para os bioensaios

Os inóculos foram produzidos em placas de Petri com meio BDAY, incubados por 10 a 15 dias à temperatura de $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 horas. Para cada bioensaio foram utilizadas 20 a 30 placas cultivadas para cada isolado.

Após a incubação, os conídios foram colhidos com solução Tween 80[®], colocando 5mL da solução em cada placa. Foi utilizado um bastão de vidro com ponteira de borracha (rubber policeman) para a remoção dos conídios. A suspensão obtida na placa foi transferida para tubos esterilizados, filtrando-a em Perfex[®] estéril para remover restos de micélio.

Para quantificá-los foi utilizado o método de contagem direta dos conídios ao microscópio ótico, utilizando-se a câmara de Neubauer. Para isto, foram preparadas suspensões de conídios dos isolados em Tween 80[®] e diluídos, se necessário, também em solução estéril de Tween 80[®].

As concentrações utilizadas nos bioensaios foram padronizadas com o auxílio de diluições, utilizando-se a fórmula ($C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$), onde C_1 é a concentração obtida, V_1 o volume obtido, C_2 é a concentração esperada e V_2 o volume esperado.

3.6. Inseto hospedeiro

Foram utilizadas ninfas (terceiro e quinto instar) e adultos de *Leptopharsa heveae* provenientes de uma criação realizada em casa de vegetação. Esta foi

revestida por uma tela anti-afídeo, com o objetivo de impedir a entrada de predadores e parasitos da praga e impedir a saída do percevejo-de-renda. No interior da casa de vegetação foram plantadas mudas de seringueiras do clone RRIM 600, na época adequada e irrigadas sempre que necessário. Os insetos foram coletados em seringueiras e levados para a casa de vegetação para infestar as mudas.

Entretanto, a criação nem sempre supriu a quantidade necessária de insetos para os experimentos; assim, foram coletados insetos de populações naturais de *Hevea brasiliensis* situadas próximo à estufa, ou num seringal da Estação Experimental de Pindorama do Instituto Agrônomo de Campinas, onde não se aplicou agrotóxicos nem patógenos.

3.7. Virulência de *Aphanocladium album* e *Verticillium lecanii* para ninfas de terceiro instar, quinto instar e adultos de *Leptopharsa heveae*

Foram realizados dois ensaios com três isolados do fungo *V. lecanii* e um isolado de *A. album*. Duas concentrações ajustadas para $2,4 \times 10^5$ e $2,4 \times 10^7$ conídios/mL foram realizadas para cada isolado. No primeiro bioensaio foram utilizadas ninfas de terceiro e quinto instar, totalizando 35 insetos para o tratamento controle e para a maior concentração; e 30 percevejos-de-renda para a menor concentração. No segundo foram utilizados 35, 30 e 25 adultos respectivamente para o tratamento testemunha, tratamento com a menor concentração e com a maior concentração. Cada repetição foi composta por cinco insetos. Estes foram coletados na Estação Experimental do IAC de Pindorama,

SP.

Para cada idade do inseto foram realizados nove tratamentos dispostos em esquema inteiramente casualizado, sendo um para o controle e dois tratamentos para cada isolado. Foram utilizadas as mesmas concentrações para cada isolado. No tratamento testemunha a solução de Tween 80[®] a 0,1% foi aplicada. Aproximadamente 1,6mL das suspensões e solução de Tween 80 foram aplicadas sobre os insetos e na face inferior dos folíolos, com o auxílio de um pulverizador manual.

Os testes de viabilidade dos isolados foram realizados em lâminas de microscopia contendo uma camada de 4 mL de substrato ágar-água, confeccionado com ágar a 1%, aquecido até ferver, em forno de microondas. Para cada isolado foram utilizadas duas lâminas com ágar-água; em cada uma colocou-se uma gota da suspensão de conídios à esquerda e outra à direita. Estas foram mantidas em placas de Petri com alta umidade relativa, durante aproximadamente 7 horas a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e então a germinação foi avaliada, pois os tubos germinativos haviam atingido cerca de quatro vezes o comprimento dos conídios. Depois adicionou-se corante azul de metileno sobre a película de ágar-água e foram contados os conídios germinados e os não germinados, até um total de 100 conídios por lâmina. O resultado foi dado em porcentagem de germinação, que foi calculada pela divisão do número de conídios germinados pelo total de conídios contados e multiplicando-se o resultado por 100.

Usou-se placas de Petri (100x15mm), forradas na base com papel de filtro

esterilizado e umedecido com 1mL de água destilada estéril. Cada placa continha um folíolo do clone RRIM 600 de *H. brasiliensis*, submetido à assepsia pela imersão em hipoclorito de sódio a 1% e posteriormente lavado em água destilada.

As placas com os percevejos-de-renda foram vedadas com filme de PVC, para garantir alta umidade relativa do ar no seu interior, e mantidas a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 horas. Os folíolos e as placas com papel de filtro foram trocados a cada 48 horas, umedecendo-se novamente a cada troca. No momento da avaliação da mortalidade, a umidade condensada nas placas era enxugada diariamente com papel de filtro.

A mortalidade foi avaliada diariamente e os insetos mortos foram removidos (para prevenir a propagação da infecção) sendo transferidos para câmara úmida e mantidos em estufa ($26 \pm 05^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14h), para confirmar a mortalidade pelo fungo.

Os cálculos dos TL_{50} e das potências relativas foram determinados utilizando-se o método de Probit (Bliss 1934, Finney 1971), utilizando-se uma planilha programada no Microsoft Excel 97 pelo autor em 1999. Para a análise de Probit foram considerados os insetos cuja morte pelo fungo foi confirmada. O teste de χ^2 (qui-quadrado) foi utilizado para medir o ajuste dos pontos da reta probítica.

3.8. Efeito do meio de cultura na virulência de *V. lecanii* para adultos de *L. heveae*.

Neste bioensaio foi utilizado o isolado CPAC H1 do fungo *Verticillium*

lecanii. Foram realizados 3 tratamentos, sendo o primeiro a testemunha, o segundo, imersão dos insetos na suspensão de conídios produzidos no meio de aveia, e o terceiro, imersão dos insetos na suspensão de conídios produzidos em meio BDAY, com 120 insetos cada, totalizando 360 percevejos-de-renda. Cada repetição foi composta por dez insetos, subdivididos em grupos de cinco. Adultos do percevejo-de-renda foram coletados na casa de vegetação.

O isolado CPAC H1 foi repicado a partir da cultura estoque cultivada em MA. Inóculos da cultura estoque foram repicados nos meios MA e BDAY e incubados durante 15 dias a $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase. A viabilidade dos conídios foi avaliada de acordo com o item 3.7. O fungo produzido em cada meio constituiu um tratamento. Foi utilizada uma concentração ajustada para $9,17 \times 10^7$ conídios/mL para ambos os meios. No tratamento testemunha utilizou-se solução esterilizada de Tween 80[®] a 0,01%, para minimizar a mortalidade, pois segundo Hall (1976), a porcentagem de afogamentos aumenta com o aumento da concentração de Tween 80[®] ou Triton X100[®]. Foi observado que para o afídeo *Macrosiphoniella sanborni* a melhor concentração do agente foi de 0,02%.

Conjuntos de cinco adultos do percevejo-de-renda foram imersos brevemente na suspensão de conídios, para os tratamentos com fungo e em Tween 80[®] a 0,01% para o tratamento controle. A imersão foi realizada usando-se um saquinho feito de tecido (voal) esterilizado. Depois da imersão, o saquinho foi colocado sobre um papel de filtro para absorver o excesso da suspensão e em seguida os insetos foram distribuídos em placas de Petri (100x15mm), mantidos

nas mesmas condições do ensaio anterior (Item 3.7.) com exceção da temperatura e fotofase que foram respectivamente $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 12 horas.

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, as porcentagens de mortalidade foram submetidas à análise de variância (com transformação em arco seno $\sqrt{\%}$) pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para realização da análise estatística foi utilizado o programa ESTAT 2.0, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP.

3.9. Efeito do meio de cultura na virulência de *V. lecanii* para adultos de *L. heveae*

Neste bioensaio foram utilizados os isolados CPAC H1 e CPAC H3 de *V. lecanii*. Realizou-se 5 tratamentos inteiramente casualizados, com 60 adultos cada. Cada repetição foi composta por dez insetos, subdivididos em grupos de cinco.

Culturas estoque dos isolados CPAC H1 e H3 obtidas em meio de aveia, foram utilizadas como inóculo para a repicagem nos meios MA e BDAY. Os isolados foram incubados por 15 dias a $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase. A viabilidade dos conídios foi avaliada 24 horas antes da instalação, de acordo com o item 3.7. O fungo produzido em cada meio constituiu um tratamento. Foi utilizada uma concentração ajustada para $0,54 \times 10^9$ conídios viáveis/mL para os quatro tratamentos. No tratamento testemunha foi empregada a solução

esterilizada de Tween 80[®] a 0,01%.

Foram aplicadas aproximadamente 0,35mL das suspensões de conídios e da solução de Tween 80 diretamente sobre a face inferior dos folíolos, que estavam no interior das placas de Petri, e nos insetos com o auxílio de um aspersor manual.

Os insetos foram mantidos em placas de Petri (100x15mm), forradas na base com papel de filtro esterilizados e umedecido inicialmente com 2mL de água destilada estéril no primeiro dia. Cada placa continha um folíolo do clone RRIM 600 de *H. brasiliensis*, submetido à assepsia. Os pecíolos dos folíolos foram envolvidos com algodão umedecido e este foi encerrado em um canudo plástico de 2cm de comprimento por 0,6cm de diâmetro. O canudo foi destinado a impedir a evaporação de água do algodão e permitir aos folíolos maior durabilidade e evitar a aderência dos insetos no algodão.

O folíolo pulverizado com o fungo permaneceu na placa por quatro dias, permitindo assim o crescimento do fungo sobre a face inferior do folíolo. No terceiro dia após a aplicação foi colocado outro folíolo, junto do antigo. Os folíolos tratados com fungo foram retirados das placas no quarto dia e depois foram examinados em microscópio estereoscópio para se avaliar a ocorrência de crescimento micelial. Posteriormente, foram realizadas sete amostragens dos 14 folíolos utilizados em cada tratamento para se avaliar a ocorrência de esporulação do fungo. Para cada amostragem, foi preparada uma lâmina com fita adesiva transparente, pressionando-se levemente a face colante da fita sobre a colônia, para que hifas, fiálides e conídios ficassem aderidos. Posteriormente, colou-se a

fita numa lâmina de microscopia com uma gotícula de azul de metileno e observou-se ao microscópio ótico.

Do quarto dia em diante os folíolos foram trocados a cada dois dias. A placa de Petri e o papel de filtro foram trocados após o quarto dia e depois a cada 48 horas, umedecendo-se a cada troca com 0,5mL de água destilada estéril. Os insetos foram submetidos as mesmas condições do ensaio anterior (Item 3.7), com exceção da fotofase de 12 horas.

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições. As porcentagens de mortalidade foram submetidas à análise de variância (com transformação em arco seno $\sqrt{\%}$) pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para realização da análise estatística foi utilizado o programa ESTAT 2.0, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP.

3.10. Comportamento de *Verticillium lecanii* em meio de cultura.

Neste experimento foram avaliados o crescimento radial das colônias, a produção e a viabilidade de conídios do isolado CPAC H1, considerado o mais virulento para o percevejo-de-renda. O inóculo deste isolado foi proveniente do reisolamento em insetos, armazenado água destilada estéril. Desta forma, foram inoculados em meio de aveia e incubado por 13 dias a $24 \pm 05^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Crescimento radial da colônia. Para cada meio de cultura, foram

utilizadas 15 placas com 100mm de diâmetro, para se avaliar o crescimento diário do fungo. Em cada placa foram colocados 20mL de meio, dispensando a última gota contida na pipeta. O fungo foi inoculado nos meios de cultura MA e BDAY, pelo método de semeadura por picada no centro da placa.

Na base destas placas, do lado externo, dois traços perpendiculares foram riscados, com caneta para retroprojetor. Nestes traços foram marcados e medidos diariamente (em centímetros) o crescimento radial das colônias, durante o período de 20 dias. As placas de Petri foram mantidas na estufa BOD ($24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 12 h fotofase) invertidas, evitando a formação de novas colônias. Segundo Hall (1981), a faixa ótima de crescimento e esporulação de *V. lecanii* é de 23 a 24°C , ocorrendo declínio acima de 25°C e acima de 30°C cessa o crescimento.

Os dados obtidos no ensaio para avaliar o crescimento radial do fungo foram submetidos a análise de variância sem transformação, usando-se o delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 15 repetições. Estes dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para realização da análise estatística foi utilizado o programa ESTAT 2.0, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP.

Produção de conídios. Neste ensaio o fungo foi semeado em 60 placas de cada meio, da mesma forma que no item anterior. Cada colônia constituiu uma repetição e cinco delas foram avaliadas, durante 20 dias, a cada 24 horas nos 3

primeiros dias e 48 horas nos dias seguintes. Os conídios de cada colônia foram colhidos do meio de cultura por meio da solução de Tween 80[®] a 0,1% (Samuels et al. 1989). Foram vertidos 5mL desta solução sobre a colônia; em seguida, os conídios foram removidos utilizando-se um bastão de vidro com ponteira de borracha (rubber policeman). Após a agitação da placa de Petri, esta suspensão foi transferida para tubos de ensaio estéreis que foram agitados vigorosamente. Na seqüência, foram retiradas amostras para contagens de conídios em câmara de Neubauer (duas contagens para cada repetição). Sempre que necessário foram realizadas diluições da suspensão para facilitar a contagem.

Para análise de variância os dados foram transformados para $7 + \log_{10}$ da concentração. A análise foi realizada utilizando o delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 5 repetições. Estes dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa ESTAT 2.0 (item anterior)

Viabilidade dos conídios. As mesmas suspensões obtidas anteriormente foram utilizadas para avaliar a viabilidade dos conídios, utilizando a metodologia para avaliação da viabilidade descrita anteriormente. Para cada suspensão (repetição) foram realizadas quatro avaliações em duas lâminas com ágar-água, totalizando 20 contagens para as cinco suspensões. Os dados da viabilidade foram transformados em arco seno $\sqrt{\%}$. A análise de variância foi realizada da mesma forma que o item anterior.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Virulência de *Aphanocladium album* e *Verticillium lecanii* para ninfas de terceiro instar, quinto instar e adultos de *Leptopharsa heveae*

Nos insetos tratados em ambos os bioensaios não se observou alterações no comportamento normal, tais como lentidão de movimentos. A colonização externa de ninfas e adultos por hifas do fungo foi geralmente observada no primeiro dia após a morte do hospedeiro (Figura 1a e b) e a esporulação iniciava a partir do terceiro dia (Figura 2a, b e c).

Na face inferior dos folíolos em que foi aplicada a suspensão de conídios, observou-se, desde o primeiro dia após a aplicação, crescimento de hifas sobre gotículas d'água (Figura 3a). Também foi observado após a morte do inseto que o fungo fixava-o ao substrato, propagando-se pelo folíolo, o que deve facilitar a

ocorrência de epizootia nos seringais (Figura 3a e b). Por isso, é provável que a mortalidade obtida nos ensaios teria sido muito maior se os insetos (tanto vivos quanto mortos) tivessem sido mantidos sobre os folíolos tratados com os fungos. Nos seringais, estas duas características dos fungos têm importância, uma vez que podem permitir-lhe propagar e manter-se no ambiente, principalmente durante a época úmida. Outra característica deste fungo foi revelada por Hall (1976). Segundo o autor, *V. lecanii* tem capacidade para esporular nas pernas e antenas de afídeos vivos e ativos, 24h após o tratamento. Isto é muito importante para disseminar a doença no meio de populações de afídeos. Em contraste, a esporulação externa de *Metarhizium anisopliae* em afídeos só ocorreu 7 dias após a morte do inseto (Hall, 1980a).

Ninfas de terceiro instar. Na concentração de $2,4 \times 10^7$ conídios/mL, verificou-se que o isolado CPAC H1 foi muito mais virulento que os outros e que destacou com um TL_{50} de apenas 1,9 dias (Tabela 1). Os demais isolados constituíram um grupo homogêneo, visto que alcançaram o TL_{50} entre 5 e 6 dias.

Quando se aplicou os fungos na concentração de $2,4 \times 10^5$ con./mL, a mortalidade foi muito baixa e apenas CPAC H6 conseguiu atingir o TL_{50} , mas para isso precisou de tempo superior a oito dias. Portanto, observou-se uma nítida diferença entre as duas concentrações. Estes resultados mostram que *V. lecanii* e *A. album*, na concentração de $2,4 \times 10^5$ con./mL, não são efetivos para o controle de ninfas de terceiro instar do percevejo-de-renda, nas condições em que a pesquisa foi desenvolvida.

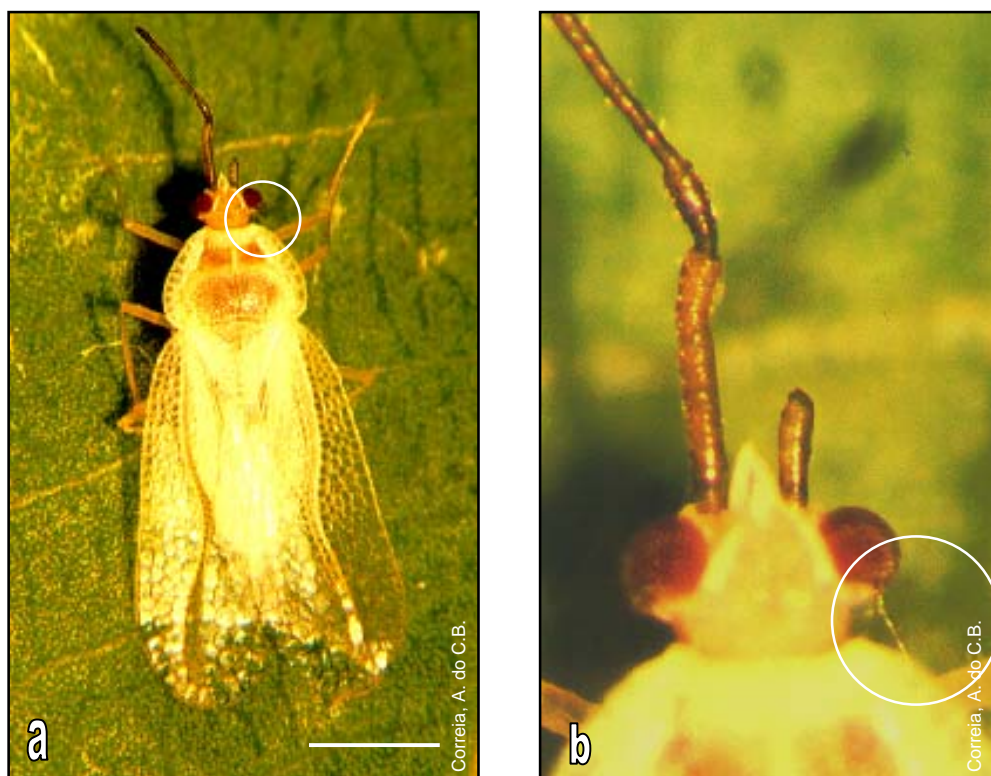


Figura 1. Início da colonização do fungo *Verticillium lecanii* em adulto de percevejo-de-renda, 24 horas após a morte. (a) Barra = 1mm. (b) Aumento de 32x.

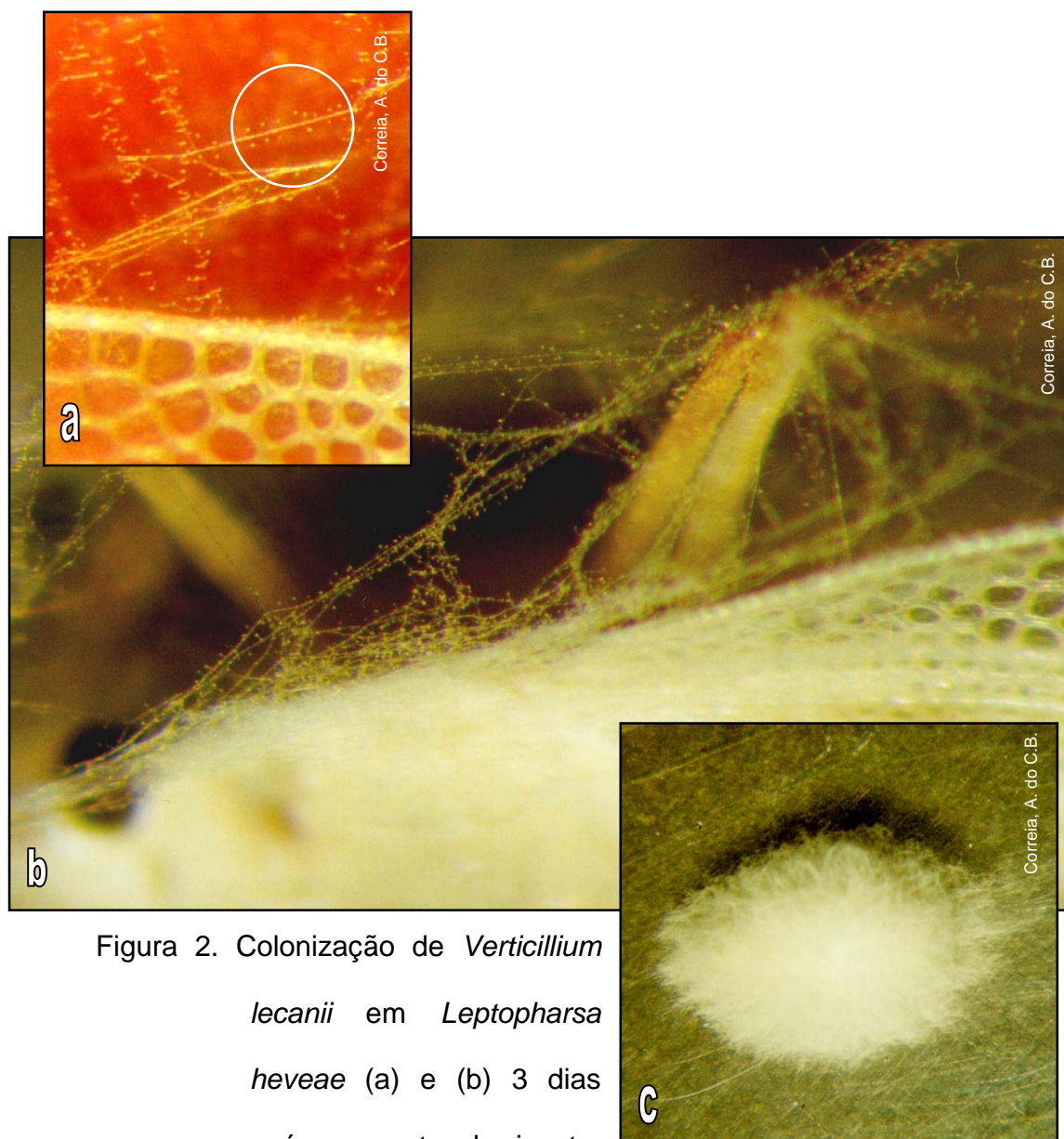


Figura 2. Colonização de *Verticillium lecanii* em *Leptopharsa heveae* (a) e (b) 3 dias após a morte do inseto.

Aumento de 40x. (a) Na área circular, hifas e estruturas reprodutivas (c) Percevejo-de-renda inteiramente coberto por micélio, aos 4 dias. Aumento de 10x.

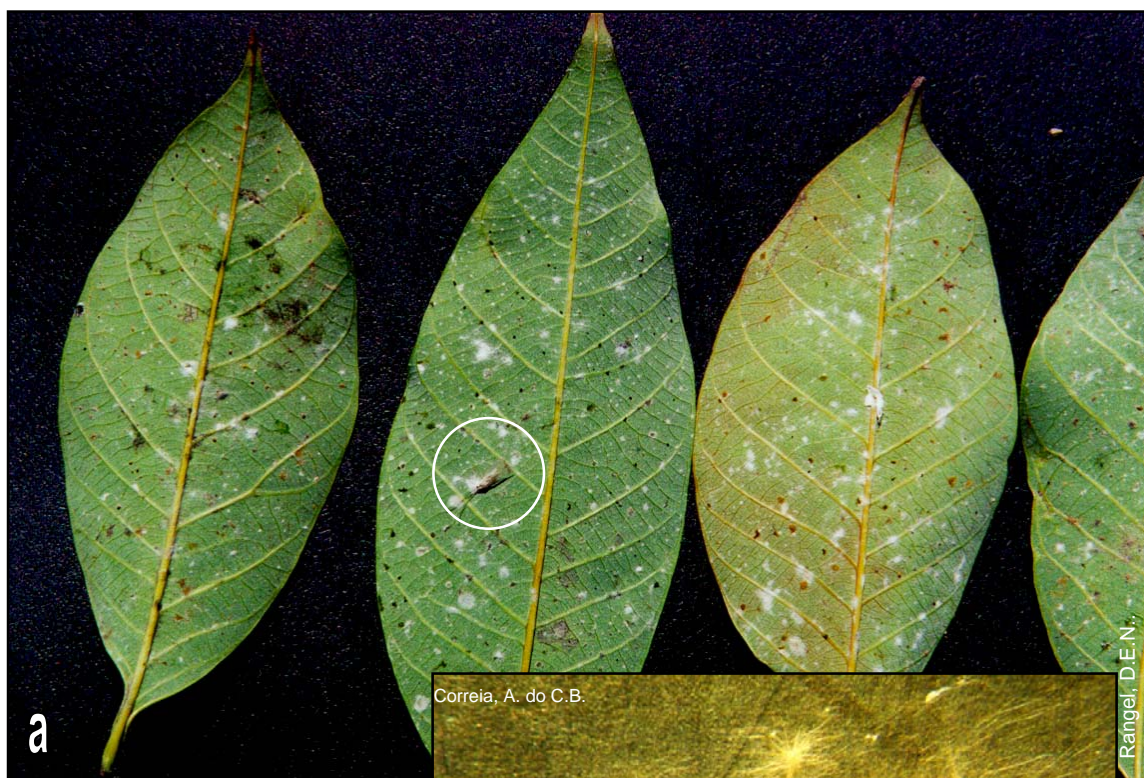


Figura 3. (a) Colonização de *Verticillium lecanii* na face inferior de folíolos de *Hevea brasiliensis*, 2 dias após pulverização

da suspensão de conídios. Na área circular, percevejo-de-renda morto e fixado ao folíolo. (b) Adulto de percevejo-de-renda fixado ao substrato pelo fungo.

Observou-se que os conídios dos três isolados de *V. lecanii* apresentavam cerca de 80% de viabilidade por ocasião da aplicação nas ninfas (Tabela 1). Já *A. album* tinha uma viabilidade muito menor, de apenas 27%. Mesmo assim, a velocidade de ação deste fungo equiparou-se à dos isolados H3 e H6 de *V. lecanii*, o que sugere que em condições de igualdade poderia tê-los superado. Sabe-se que a viabilidade reduzida pode acarretar baixa virulência dos conídios de alguns fungos (Daoust & Roberts 1982). Isto não ocorreu com *A. album*, que apesar de sua reduzida viabilidade, foi tão virulento quanto CPAC H3 e H6.

Tabela 1. Virulência dos fungos *Verticillium lecanii* e *Aphanocladium album* para ninfas de terceiro instar do percevejo-de-renda *L. heveae*, em laboratório, a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 14 horas de fotofase. Jaboticabal, SP.2000.

Isolado	¹ Conídios/mL	² V	³ N	Dias			χ^2	⁶ p	⁷ gl	Potência Relativa		
				TL ₅₀	⁴ ICi	⁵ ICs				Razão	⁴ ICi	⁵ ICs
<i>V. lecanii</i>												
CPAC H1	$2,4 \times 10^7$	77	35	1,9	1,6	2,4	3,4 ^{ns}	>0,10	2	1,0		
CPAC H3	$2,4 \times 10^7$	84	35	5,7	4,3	7,4	0,7 ^{ns}	>0,98	5	4,5	2,0	10,2
CPAC H6	$2,4 \times 10^5$	84	30	8,4	6,2	11,6	1,2 ^{ns}	>0,99	7	6,3	2,5	16,1
CPAC H6	$2,4 \times 10^7$	84	35	6,0	3,7	9,8	0,1 ^{ns}	>0,90	4	4,6	1,3	16,2
<i>A. album</i>												
FTRI A1	$2,4 \times 10^7$	27	35	5,0	3,1	8,0	0,4 ^{ns}	>0,98	4	3,8	1,2	11,4

¹Não constam na tabela dados da menor concentração dos isolados CPAC H1, CPAC H3 e FTRI A1, porque não atingiram o TL₅₀; ²Porcentagem de viabilidade dos conídios; ³Número de insetos utilizados por tratamento; ⁴Intervalo de confiança inferior; ⁵Intervalo de confiança superior; ⁶Probabilidade; ⁷Graus de liberdade.

Neste ensaio, o isolado CPAC H1 na concentração de $2,4 \times 10^7$ conídios/mL apresentou o menor TL₅₀ e por isso foi selecionado como padrão para

análise da potência relativa. Observando-se os dados da Tabela 1, verifica-se que este isolado, nesta concentração, foi 2,8, 3,5 e 3,6 vezes mais potente que os isolados FTRI A1, CPAC H3 e CPAC H6, respectivamente. Na menor concentração, o isolado H6 foi 5,3 vezes menos potente que o padrão. As retas não se afastaram significativamente do paralelismo ($\chi^2 = 8,02$; gl = 4; $p > 0,05$) o que permitiu que os tratamentos fossem comparados entre si.

Desde o primeiro dia após a aplicação dos tratamentos, a testemunha apresentou porcentagens acumuladas de mortalidade (devidas a outras causas que não os fungos) muito elevadas, sendo superada apenas pelo isolado CPAC H1 de *V. lecanii* (Figura 4). Não se tem uma explicação para este fato, que também já ocorreu em algumas outras pesquisas, como na de Hänel (1981), que observou maior mortalidade de cupins *Nasutitermes exituosus* na testemunha que no tratamento com menor concentração do fungo *Metarhizium anisopliae*. Para reduzir a mortalidade do inseto por outras causas, há necessidade de se desenvolver melhores condições para manutenção do percevejo-de-renda em laboratório, principalmente para ninfas, que são mais suscetíveis.

Um dia após a instalação do ensaio, alguns insetos já passaram para o quarto instar e entre o sexto e o sétimo dia, a maioria tornou-se adulto. A partir deste ponto, ocorreu uma estabilização (Figura 4), o que sugere que adultos são mais resistentes às condições estressantes do bioensaio. Esta estabilização evidencia que, com exceção do CPAC H3, os fungos aplicados sobre ninfas praticamente não agiram sobre adultos.

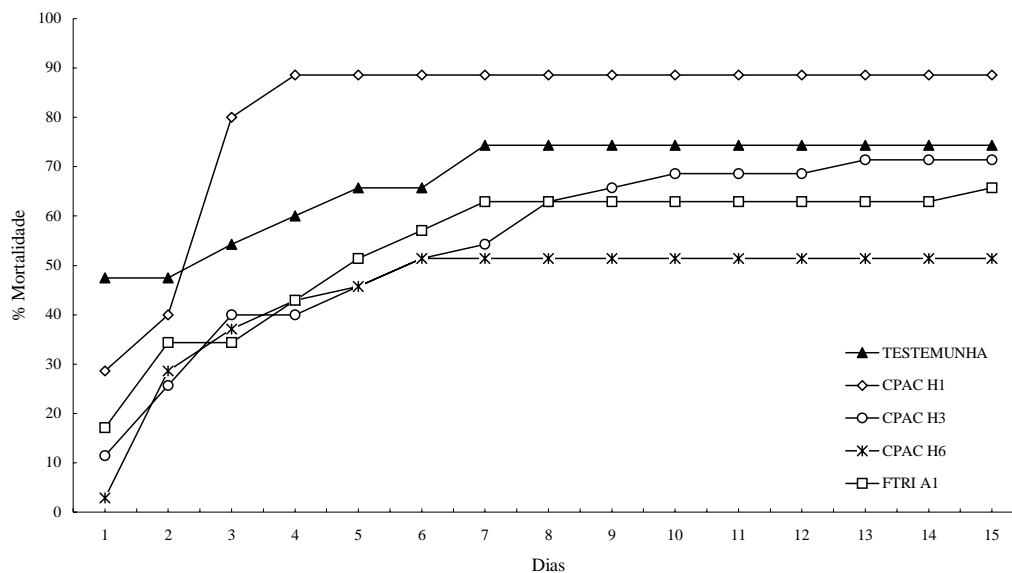


Figura 4. Mortalidade causada pelos fungos *Verticillium lecanii* e *Aphanocladium album*, na concentração $2,4 \times 10^7$ conídios/mL em ninfas de terceiro instar de *L. heveae* ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase 14h). Jaboticabal, SP. 2000.

Observou-se também que alguns insetos (exceto testemunhas), morriam deformados durante a ecdise para o estágio adulto. Tal ocorrência pode estar relacionada com o fato de que regiões do tegumento em formação que são altamente infectadas por fungos apresentam grande redução em espessura e distinta deformação da cutícula (Vey & Fargues, 1977).

Ninfas de quinto instar. Na maior concentração, verificou-se que os isolados CPAC H1 de *V. lecanii* e FTRI A1 de *A. album* foram igualmente virulentos. Eles obtiveram um TL_{50} de 2,6 dias (Tabela 2), seguidos de perto pelos

outros dois isolados, com TL₅₀ entre 3 e 4 dias. FTRI A1, apesar da baixa viabilidade, apresentou alta virulência para estas ninfas.

Na menor concentração, a mortalidade foi baixa e somente os isolados CPAC H3 e H6 conseguiram atingir os TL₅₀ de 4,4 e 10,4 dias, respectivamente. Nesta concentração, apenas o isolado H6 foi efetivo para o controle de ninfas de quinto instar do percevejo-de-renda.

Tabela 2. Virulência dos fungos *Verticillium lecanii* e *Aphanocladium album* para ninfas de quinto instar do percevejo-de-renda *L. heveae*, em laboratório, a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 14 horas de fotofase. Jaboticabal, SP. 2000.

Isolado	¹ Conídios/mL	² V	³ N	Dias			χ^2	⁶ p	⁷ gl	Potência		
				TL ₅₀	⁴ ICi	⁵ ICs				Razão	⁴ ICi	⁵ ICs
<i>V. lecanii</i>												
CPAC H1	$2,4 \times 10^7$	77	35	2,6	2,2	3,2	1,7 ^{ns}	>0,95	7	1,0		
CPAC H3	$2,4 \times 10^5$	84	30	10,4	7,9	13,7	2,5 ^{ns}	>0,90	7	3,2	2,2	4,8
CPAC H3	$2,4 \times 10^7$	84	35	4,0	3,3	4,8	1,7 ^{ns}	>0,70	4	1,5	1,1	2,0
CPAC H6	$2,4 \times 10^5$	84	30	4,4	3,5	5,6	6,9 ^{ns}	>0,30	6	1,6	1,2	2,2
CPAC H6	$2,4 \times 10^7$	84	35	3,2	2,6	3,9	1,6 ^{ns}	>0,90	3	1,2	0,9	1,6
<i>A. album</i>												
FTRI A1	$2,4 \times 10^7$	27	35	2,6	1,9	3,5	0,2 ^{ns}	>0,99	4	1,1	0,9	1,5

¹Não constam na tabela dados da menor concentração dos isolados CPAC H1 e FTRI A1, porque não atingiram o TL₅₀; ²Porcentagem de viabilidade dos conídios; ³Número de insetos utilizados por tratamento; ⁴Intervalo de confiança inferior; ⁵Intervalo de confiança superior; ⁶Probabilidade; ⁷Graus de liberdade.

Conforme comentado acima, CPAC H1 e FTRI A1 apresentaram os mesmos tempos letais. Neste caso, o primeiro isolado foi selecionado como padrão para análise da potência relativa, por já ter sido utilizado para ninfas de

terceiro instar (Tabela 1). De acordo com as potências relativas, observa-se que o isolado CPAC H1 foi 0,5 vezes mais potente que CPAC H3, na maior concentração. Os isolados CPAC H6 e FTRI A1 foram iguais ao padrão, como atestam os intervalos de confiança inferiores da potência relativa menores que 1,0. Comparando-se CPAC H6 e H3, na menor concentração, com o padrão, verifica-se que foram respectivamente 0,6 e 2,2 vezes menos potentes. A mesma concentração para os outros dois isolados não foi eficiente para o controle de ninfas de quinto instar. Novamente, as retas dos tratamentos não se afastaram significativamente do paralelismo ($\chi^2 = 4,23$; gl = 5; $p > 0,05$).

Com exceção do primeiro dia de avaliação, a mortalidade da testemunha foi sempre inferior (até o 10º dia e do 14º ao 15º dia) ou igual (do 11 ao 13º dia) aos tratamentos em que foram aplicados os fungos (Figura 5).

A mortalidade de ninfas de quinto instar na testemunha, apesar de ainda alta, foi menor que a de terceiro instar; por exemplo, no sétimo dia foi de 57% para o quinto instar contra 74% para o terceiro. No segundo dia após a aplicação dos tratamentos a maioria dos insetos se transformou em adultos e é interessante observar que continuaram ocorrendo mortes, não se verificando a estabilização discutida para ninfas de terceiro instar (Figura 5). Interessante também é o fato de até no último dia de avaliação (15º dia) ainda ocorrerem algumas mortes por ação de CPAC H1 e H6. Arzone (1984), verificou que a mortalidade de ninfas de quinto instar do percevejo-de-renda do plátano *Corythucha ciliata* pelo fungo *V. lecanii* ($2,5-3 \times 10^7$ conídios/ml) foi de 58 e 73% ($T \approx 30^\circ\text{C}$) nos dias 9 e 12

respectivamente, enquanto que no mesmo período para ninfas de quinto instar de *L. heveae* foi de 74,3 e 80%, correspondente a media dos isolados de *V. lecanii*; portanto, ocorreu maior mortalidade.

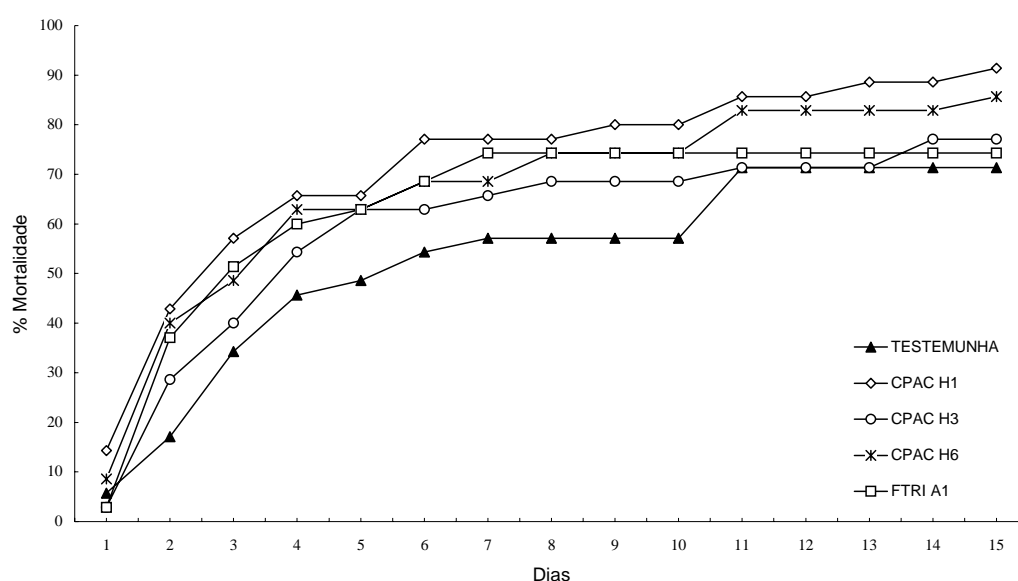


Figura 5. Mortalidade causada pelos fungos *Verticillium lecanii* e *Aphanocladium album*, na concentração $2,4 \times 10^7$ conídios/mL em ninfas de quinto instar de *L. heveae* ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase 14h). Jaboticabal, SP. 2000.

Adultos. Na concentração de $2,4 \times 10^7$ conídios/mL, verificou-se que o isolado CPAC H3 foi muito mais virulento, destacando-se com um TL_{50} de apenas 2,0 dias (Tabela 3). FTRI A1 e CPAC H6 tiveram virulências intermediárias entre o H3 e o H1. Nota-se que, embora este último isolado tenha sido o melhor para ninfas, foi o pior para adultos, ficando abaixo até da menor concentração dos

isolados CPAC H3 e H6.

Neste ensaio, a porcentagem de conídios viáveis foi mais alta que no ensaio anterior, variando entre 89% para FTRI A1 e 95% para CPAC H6. É importante ressaltar que novamente FTRI A1 apresentou a menor viabilidade e nem por isso teve a menor virulência.

Tabela 3. Virulência dos fungos *Verticillium lecanii* e *Aphanocladium album* para adultos do percevejo-de-renda *L. heveae*, em laboratório, a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 14 horas de fotofase. Jaboticabal, SP. 2000.

Isolado	¹ Conídios/mL	² V	³ N	Dias			χ^2	⁶ p	⁷ gl	Potência Relativa		
				TL ₅₀	⁴ ICi	⁵ ICs				Razão	⁴ ICi	⁵ ICs
<i>V. lecanii</i>												
CPAC H1	$2,4 \times 10^7$	94	30	8,1	5,3	12,0	2,2 ^{ns}	>0,80	5	4,1	-	-
CPAC H3	$2,4 \times 10^5$	93	25	7,7	4,8	12,2	0,3 ^{ns}	>0,50	1	3,9	-	-
CPAC H3	$2,4 \times 10^7$	93	30	2,0	1,7	2,3	0,1 ^{ns}	>0,80	1	1,0	-	-
CPAC H6	$2,4 \times 10^5$	95	25	7,2	5,3	9,6	2,1 ^{ns}	>0,70	4	3,6	-	-
CPAC H6	$2,4 \times 10^7$	95	30	3,9	2,9	5,5	6,0 ^{ns}	>0,10	3	2,0	-	-
<i>A. album</i>												
FTRI A1	$2,4 \times 10^7$	89	30	3,7	2,8	4,8	0,4 ^{ns}	>0,90	3	1,9	-	-

¹Não consta na tabela o dado da menor concentração do isolado CPAC H1, porque não atingiu o TL₅₀. Também não foi realizado o tratamento com o isolado FTRI A1 na menor concentração; ²Porcentagem de viabilidade dos conídios; ³Número de insetos utilizados por tratamento; ⁴Intervalo de confiança inferior; ⁵Intervalo de confiança superior; ⁶Probabilidade; ⁷Graus de liberdade.

O isolado CPAC H3 apresentou, na concentração de $2,4 \times 10^7$ conídios/mL, o menor TL₅₀ e por isso foi tomado como padrão (Tabela 3). Os isolados FTRI A1, CPAC H6 e CPAC H1 foram, respectivamente, 0,9, 1,0 e 3,1 vezes menos potentes que o padrão, na mesma concentração. Já na menor concentração, CPAC H6 e H3 foram 2,6 e 2,9 vezes menos potentes. CPAC H1

nem sequer chegou a controlar 50% dos adultos. Verificou-se que as retas não se afastam do paralelismo ($\chi^2 = 14,39$, gl = 5, $p < 0,05$) e neste caso, as potências relativas foram calculadas diretamente pela divisão do TL_{50} da Amostra pelo TL_{50} do Padrão, e os intervalos de confiança não foram determinados.

A mortalidade da testemunha foi sempre menor que a dos tratamentos com fungos, com exceção do primeiro dia (Figura 6) e também foi bem menor que a das testemunhas com ninfas de terceiro instar (Figura 4) e de quinto instar (Figura 5).

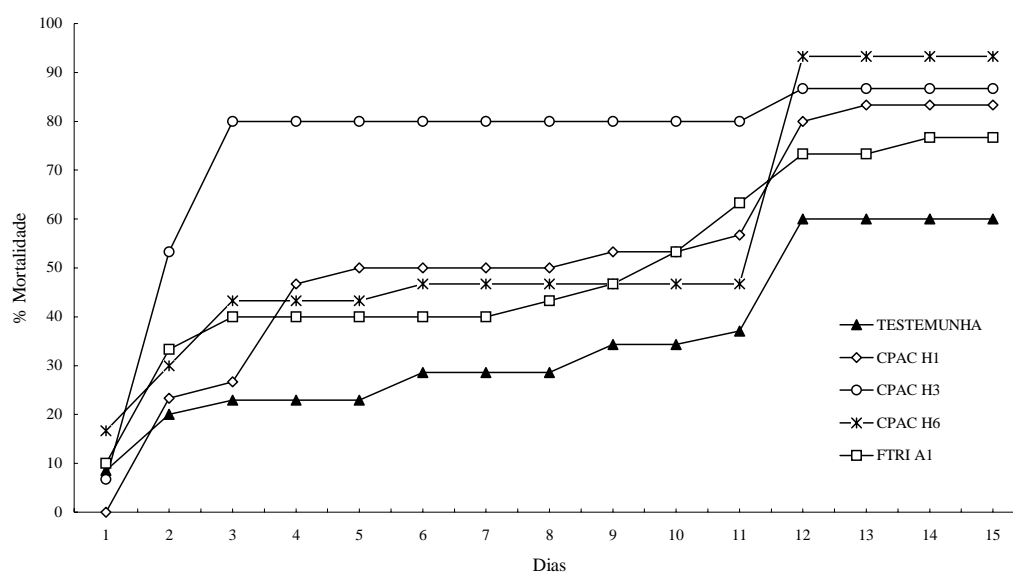


Figura 6. Mortalidade causada pelos fungos *Verticillium lecanii* e *Aphanocladium album*, na concentração $2,4 \times 10^7$ conídios/mL em adultos de *L. heveae* ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase 14h). Jaboticabal, SP. 2000.

A mortalidade dos insetos no tratamento testemunha no sétimo dia foi de

29%, por outras causas que não o fungo (Figura 6). Ela foi semelhante a obtida por Lara & Tanzini (1997), em que a mortalidade de adultos de *L. heveae*, mantidos em condições semelhantes e no mesmo período, variou de 20,8 a 41,7% (de acordo com o clone da planta utilizada para alimentação). Pode-se concluir que esta metodologia para manutenção do inseto ainda requer aprimoramento, mesmo para adulto.

Não ocorreram mortes por outras causas no ensaio com adultos, apenas pelos fungos, o que confirmou que os percevejos-de-renda, na fase adulta, foram mais resistentes às condições estressantes do ensaio. Os fungos agiram desde o primeiro até o quarto dia, depois a mortalidade tornou-se relativamente estável até o 11^o dia. Entre este e o 12^o dia ocorreu acentuada mortalidade em todos tratamentos. Não se encontrou explicação plausível para este fato.

Conforme Arzone et al. (1984), a mortalidade de adultos do percevejo-de-renda do plátano, *Corythucha ciliata*, pelo fungo *V. lecanii* ($2,5-3 \times 10^7$ conídios/ml) foi de 43, 60 e 80% ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$) respectivamente nos dias 9, 12 e 15. Pode-se observar na Figura 7, que os isolados de *V. lecanii*, com exceção do CPAC H3 que já havia controlado 80% dos insetos em três dias, controlaram em média 50, 86 e 88% respectivamente para o período acima; portanto, a mortalidade foi superior à obtida por Arzone.

Este trabalho evidenciou que os fungos *V. lecanii* e *A. album* são patogênicos para o percevejo-de-renda e promissores como agentes para seu controle. Além disso, mostrou que há diferenças entre os três isolados de *V.*

lecanii, no que diz respeito à virulência, bem como entre estes e o *A. album*.

4.2. Efeito do meio de cultura na virulência de *V. lecanii* para adultos de *L. heveae*

A viabilidade do isolado CPAC H1 de *V. lecanii* foi de 87,5 e 88%, respectivamente para os meios BDAY e MA.

Os meios de cultura não influenciaram na virulência do isolado para adultos de *L. heveae* (Tabela 4 e Figura 7). A interação meio x dias não foi significativa ($F= 0,78$), indicando que o efeito meios é independente do efeito dias e desta forma, não houve o desdobramento da interação (Tabela 4).

O coeficiente de variação (CV) tanto para meios quanto para dias foram altos. Isto foi devido à grande variação das porcentagens de mortalidade acumulada, variando desde o início ao fim do experimento de zero a 70% respectivamente.

Desde o primeiro até o sexto dia de avaliação a mortalidade dos insetos tanto do tratamento testemunha quanto nos tratamentos com o fungo, não variou muito, ficando abaixo de 15% (Figura 7). Neste período, pode-se observar que apenas nos dias três e quatro a mortalidade das testemunhas foi maior que os outros tratamentos. Entre o sexto e o sétimo dia, houve maior mortalidade de insetos dos três tratamentos.

Tabela 4. Valores médios obtidos na análise de variância para porcentagem de mortalidade de adultos de percevejo-de-renda, *L. heveae* pelo isolado CPAC H1 de *Verticillium lecanii* cultivado em dois meios de culturas. Jaboticabal, SP. 2000.

Meio	CPAC H1
Aveia	3,3279 A
BDAY	3,1902 A
Teste F	0,09 ^{ns}
dms (5%)	0,9698
Dias	¹ Média
1	0,3953 E
2	0,7906 DE
3	1,0541 DE
4	1,6357 CD
5	2,3876 BC
6	3,1137 B
7	5,1959 A
8	5,6880 A
9	6,0386 A
10	6,2911 A
Teste F	76,36 ^{**}
dms (5%)	1,2099
F Interação Meios X Dias	0,78 ^{ns}
CV meios	111,11
CV dias	40,20

Para a análise de variância foi utilizada a porcentagem da mortalidade acumulada com transformação dos dados em arco seno $\sqrt{\%}$.

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si nas colunas pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹ Média dos meios da interação Meio x Dias

^{NS} não significativo a 5% de probabilidade

^{**} significativo a 1% de probabilidade

A porcentagem média da mortalidade acumulada do tratamento testemunha, no sétimo dia foi aproximadamente a mesma observada no ensaio anterior (Figuras 6 e 7), em torno de 26%. Entretanto, a mortalidade foi baixa nos

tratamentos com fungo, não ultrapassando 45% de controle no décimo dia (Figura 7), contra aproximadamente 52% de mortalidade para o ensaio anterior no mesmo período (Figura 6).

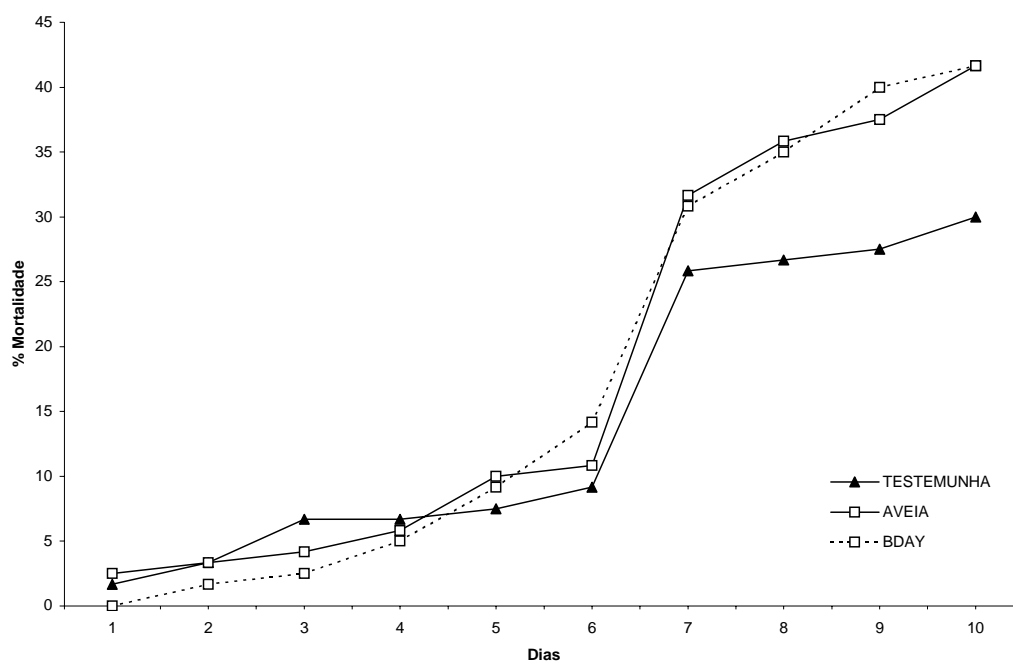


Figura 7. Mortalidade média acumulada de adultos de *Leptopharsa heveae* causada por *Verticillium lecanii*, isolado CPAC H1, ($9,17 \times 10^7$ conídios/mL) cultivado em meios de aveia e em BDAY ($24 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase 12h). Jaboticabal, SP. 2000.

A baixa mortalidade neste experimento, pode ser devida à metodologia empregada. É possível que, em virtude da cerosidade do inseto, ao imergi-lo na suspensão de conídios, poucos tenham se fixado ao percevejo-de-renda. Além disso, os folíolos utilizados neste ensaio não foram pulverizados com a suspensão

de conídios. No experimento anterior (Figura 6), em cinco dias o mesmo isolado já havia controlado aproximadamente 50% de adultos.

4.3. Efeito do meio de cultura na virulência de *V. lecanii* para adultos de *L. heveae*

A viabilidade de *V. lecanii* foi de 95,5 e 98,6% para o isolado CPAC H1, cultivado respectivamente nos meios de aveia e BDAY; para o isolado CPAC H3, observou-se 99,6 e 98% de conídios viáveis nos mesmos meios.

Não foram observadas diferenças estatísticas na porcentagem de mortalidade de adultos de *L. heveae* pelos dois isolados cultivados em meios diferentes (Tabelas 5 e 6). A interação isolado-meio x dias foi significativa ($F = 4,77$), indicando que o efeito isolado-meio é dependente do efeito dias e desta forma, houve o desdobramento da interação para a Tabela 6. O CV isolado-meio foi elevado devido a variação das porcentagens de mortalidade, entre 0 e 70% (Tabela 5).

A porcentagem da mortalidade acumulada das testemunhas variou de aproximadamente 5 a 38%, respectivamente do primeiro ao décimo dia (Figura 8). Apenas no primeiro dia a mortalidade deste tratamento foi superior aos tratamentos com fungo. Após uma semana, a mortalidade dos insetos foi de aproximadamente 33%, que comparada com os dois últimos ensaios com adultos, não apresentou grande variação no mesmo período, que foram respectivamente 29 e 26% aproximadamente.

Tabela 5. Valores médios obtidos na análise de variância para porcentagem de mortalidade de adultos do percevejo-de-renda, *L. heveae*, por *Verticillium lecanii* (isolados CPAC H1 e CPAC H3) cultivados em dois meios de cultura. Jaboticabal, SP. 2000.

Isolado	Meio	¹ Média
CPAC H1	Aveia	6,1651 A
CPAC H1	BDAY	6,0754 A
CPAC H3	Aveia	5,7931 A
CPAC H3	BDAY	5,8817 A
Teste F		0,13 ^{ns}
dms (5%)		1,8616
Dias		
	1	1,5585 E
	2	3,7857 D
	3	5,7345 C
	4	6,4005 BC
	5	6,8109 AB
	6	6,9636 AB
	7	6,9989 AB
	8	7,0840 AB
	9	7,1691 A
	10	7,2823 A
Teste F		151,99 **
dms (5%)		0,6816
F Interação isolado-meio x dias		4,77 **
CV isolados-meios		60,91
CV dias		12,46

Para a análise de variância foi utilizada a porcentagem da mortalidade acumulada com transformação dos dados em arco seno $\sqrt{\%}$.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹ Média da mortalidade, interação isolado-meio x dias

^{NS} não significativo a 5% de probabilidade

** significativo a 1% de probabilidade

Os dois isolados provocaram mortalidade mais acentuada até o quinto dia. O isolado CPAC H3 cultivado em meio de aveia controlou os insetos mais rapidamente que os outros tratamentos, mas a partir do terceiro dia tornou-se relativamente estável não alcançando 50% de mortalidade (Tabela 6 e Figura 8).

Tabela 6. Desdobramento da interação isolados/meios x dias para porcentagem média de mortalidade acumulada de adultos de percevejo-de-renda, *L. heveae* por *Verticillium lecanii* (isolado CPAC H1 e CPAC H3) cultivados em dois meios de cultura, Jaboticabal, SP. 2000.

Dias	CPAC H1		CPAC H3		Teste F
	Aveia	B DAY	Aveia	B DAY	
1	1,5811 abD	0,5270 bD	3,0719 aB	1,0541 abD	3,95 *
2	3,0719 bC	3,3806 abC	5,4509 aA	3,2394 bC	4,10 *
3	6,0498 aB	5,8147 aB	5,6184 aA	5,4552 aB	0,22 ^{ns}
4	6,6085 aAB	6,7727 aAB	5,8841 aA	6,3369 aAB	0,50 ^{ns}
5	7,0129 aAB	7,0836 aAB	6,1378 aA	7,0094 aA	0,67 ^{ns}
6	7,3700 aAB	7,0836 aAB	6,2790 aA	7,1219 aA	0,74 ^{ns}
7	7,3700 aAB	7,2249 aA	6,2790 aA	7,1219 aA	0,79 ^{ns}
8	7,4944 aA	7,4408 aA	6,2790 aA	7,1219 aA	1,04 ^{ns}
9	7,4944 aA	7,6567 aA	6,4034 aA	7,1219 aA	1,02 ^{ns}
10	7,5979 aA	7,7692 aA	6,5279 aA	7,2344 aA	0,99 ^{ns}
Teste F	48,06 **	59,10 **	11,17 **	47,97 **	
dms (5%) dias d. meios					1,3776
dms (5%) meios d. dias					2,0985

Para a análise de variância foi utilizada a porcentagem da mortalidade acumulada com transformação dos dados em arco seno $\sqrt{\%}$.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, nas linhas (minúsculas) e nas colunas (maiúsculas) pelo teste de Tukey (P<0,05)

^{NS} não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* significativo a 5% de probabilidade

** significativo a 1% de probabilidade

Com exceção do isolado CPAC H3 (Figura 6), não houve diferença na

mortalidade de adultos do primeiro ensaio com a verificada no ensaio atual, contrariando a hipótese que se o inseto permanecer maior tempo com o fungo, e este crescer e esporular sobre o folíolo, haveria maior mortalidade. Assim, observou-se pequena variação de mortalidade entre os dois ensaios, principalmente para o isolado CPAC H1, que no décimo dia controlou aproximadamente 52% no primeiro (Figura 6) e 60% no atual (Figura 8).

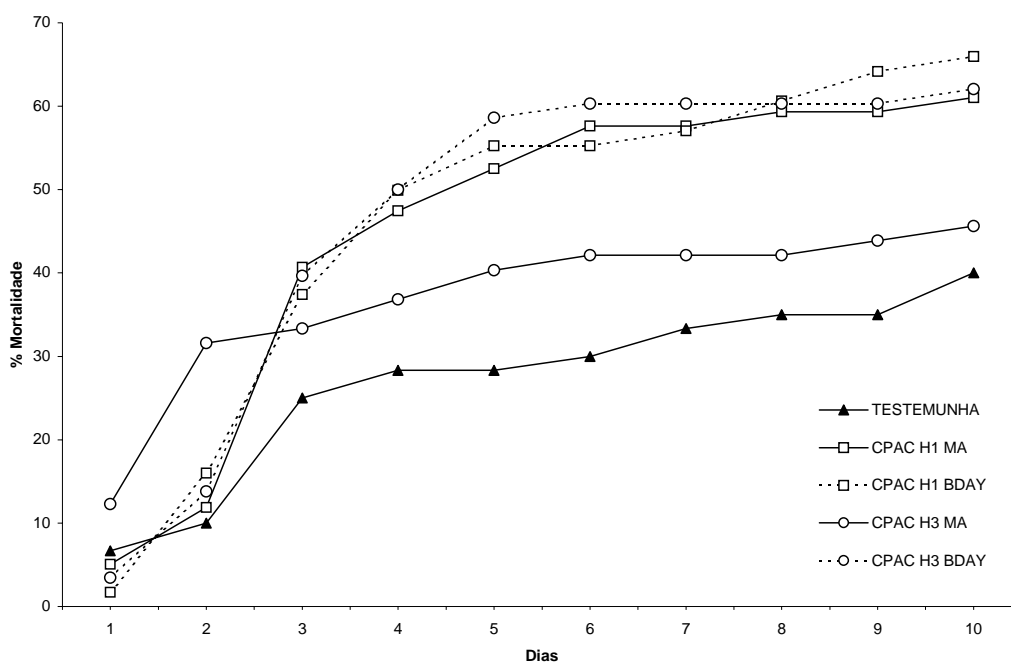


Figura 8. Mortalidade média acumulada de *Leptopharsa heveae* causada pelo fungo *Verticillium lecanii* (isolados CPAC H1 e CPAC H3) cultivados nos meios de aveia (MA) e BDAY, na concentração $0,54 \times 10^9$ conídios/mL em adultos de *L. heveae* ($24 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase 12h). Jaboticabal, SP. 2000.

Houve maior conservação dos folíolos, com o emprego do algodão revestido com canudo no pecíolo. Em praticamente todos folíolos tratados com fungo ocorreu crescimento de hifas. Em todas as amostragens foram observados fiálides e conídios de *V. lecanii* e em algumas observou-se crescimento do fungo *Cladosporium* sp.

Durante as observações das fiálides e conídios, produzidos sobre a face inferior do folíolo, foram notados múltiplos conídios (de 3 a 17) por fiálide (Figura 9). Este fato causou surpresa porque até o momento, tanto em lâminas preparadas com fita adesiva transparente quanto em lâminas tradicionais montadas com lamínulas, havia sido observado apenas um conídio por fiálide (Figura 10). Entretanto, Humber (2000)³, informou que em preparações de lâminas para microscopia nunca seriam vistos mais que um conídio por fiálide, visto que os agregados de conídios são envolvidos por mucilagem que dispersam muito facilmente.

³ Humber, R.A. (USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Plant Protection Research Unit, US Plant, Soil & Nutrition, Ithaca, NY) Comunicação pessoal, 2000.

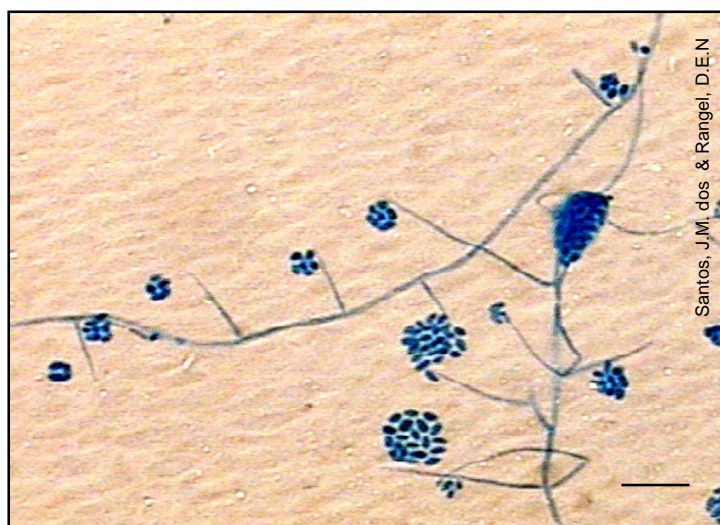


Figura 9. Fotomicrografia de *Verticillium lecanii* corado com azul de metileno e montado em lâmina com fita adesiva transparente. Isolado CPAC H1, coletado na face inferior de folíolo de *Hevea brasiliensis*. Barra = 10 μ m



Figura 10. Fotomicrografia de *Verticillium lecanii* corado com azul de metileno e montado em lâmina com lamínula. Isolado CPAC H1 cultivado em BDAY. Barra = 10 μ m

4.4. Comportamento do fungo *Verticillium lecanii* em meio de cultura.

Comparando-se os valores médios da Tabela 7, nota-se que o meio de aveia favoreceu o maior crescimento do isolado CPAC H1, diferindo significativamente do meio BDAY. Para a produção de conídios, não houve diferença significativa nos valores médios em ambos os meios. Verificou-se uma maior porcentagem de conídios viáveis do fungo produzido no meio BDAY, diferindo significativamente do meio de aveia.

Crescimento radial da colônia. O meio de aveia diferiu significativamente do meio BDAY, favorecendo maior crescimento das colônias durante todo o período avaliado (Tabela 8). Entretanto, Monteiro (1988) avaliando o crescimento dos fungos *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces marquandii* e *Metarhizium anisopliae* em seis meios de culturas, verificou que os dois primeiros cresceram melhor no meio BDA que no meio de aveia (adicionado com 1% de glicose); todavia, não houve diferença significativa do crescimento de *M. anisopliae* em ambos os meios.

O crescimento de *V. lecanii* em meio de aveia foi até o décimo dia ligeiramente superior que no meio BDAY. A partir do 11^o dia, observou-se diminuição da taxa de crescimento em meio BDAY, ao passo que no meio de aveia o crescimento foi constante até o 16^o dia (Tabela 8, Figura 11).

A taxa média de crescimento (diferença do crescimento de um dia para outro) foi de $0,37 \pm 0,05$ cm para o meio de aveia e $0,31 \pm 0,06$ cm para o meio BDAY.

Tabela 7. Valores médios obtidos na análise de variância para crescimento, produção e viabilidade do isolado CPAC H1 de *Verticillium lecanii* em meio de aveia e BDAY

Meio	Crescimento (cm)	Produção (x 10 ⁶ con./mL)	Viabilidade
Aveia	4,1806 A	7,03040 A	72,1326 B
BDAY	3,6948 B	7,09474 A	75,1704 A
Teste F	134,56 **	2,15 ^{ns}	10,85 *
dms (5%)	0,0861	0,0995	2,0731
Dia	¹ Médias		
2	0,4529 R	4,3000 H	68,1534 D
3	0,8307 Q	5,6788 G	71,2483 CD
4	1,3264 P	6,3962 F	81,0975 A
5	1,6539 O		
6	2,1379 N	6,8050 E	
7	2,5225 M		
8	3,0064 L	7,1056 D	67,4449 D
9	3,3168 K		
10	3,7393 J	7,4948 C	
11	4,1421 I		
12	4,5389 H	7,7441 BC	
13	4,9182 G		
14	5,3246 F	7,9448 AB	74,9463 BC
15	5,5707 E		
16	5,9336 D	8,1448 A	76,5953 AB
17	6,1221 C		
18	6,3082 B	8,1086 A	75,6909 BC
19	6,3946 B		
20	6,5764 A	7,9998 AB	74,0354 BC
Teste F	7536,18 **	486,81 **	14,61 **
dms (5%)	0,1166	0,2569	5,2926
F Interação M x D	67,33 **	5,84 **	9,59 **
CV meios	12,26	3,20	4,46
CV dias	3,13	2,45	5,10

Para a análise de variância foi utilizada a porcentagem da viabilidade com transformação dos dados em arco seno $\sqrt{\%}$.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si nas colunas pelo teste de Tukey (P<0,05).

¹ Médias dos meios da interação meios x dias

^{NS} não significativo a 5% de probabilidade

* significativo a 5% de probabilidade

** significativo a 1% de probabilidade

Tabela 8. Desdobramento da interação meios x dias para o diâmetro médio das colônias (cm) do fungo *V. lecanii*, isolado CPAC H1, cultivado em meio de aveia e BDAY ($24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase, 12h). Jaboticabal, SP. 2000

Dia	Meios		Teste F
	Aveia	BDAY	
2	0,5450 aR	0,3607 bR	8,91 **
3	0,9164 aQ	0,7450 bQ	7,71 **
4	1,4307 aP	1,2221 bP	11,41 **
5	1,7664 aO	1,5414 bO	13,28 **
6	2,2286 aN	2,0471 bN	8,64 **
7	2,5929 aM	2,4521 bM	5,19 *
8	3,0864 aL	2,9264 bL	6,72 *
9	3,4150 aK	3,2186 bK	10,12 **
10	3,8529 aJ	3,6257 bJ	13,53 **
11	4,3007 aI	3,9836 bI	26,39 **
12	4,7214 aH	4,3564 bH	34,95 **
13	5,1414 aG	4,6950 bG	52,28 **
14	5,5721 aF	5,0771 bF	64,28 **
15	5,8871 aE	5,2543 bE	105,07 **
16	6,3221 aD	5,5450 bD	158,44 **
17	6,6079 aC	5,6364 bCD	247,56 **
18	6,8650 aB	5,7514 bBC	325,31 **
19	6,9671 aB	5,8221 bAB	343,93 **
20	7,2114 aA	5,9414 bA	423,12 **
Teste F	4407,36 **	3,196,16 **	
dms (5%) dias d. meios			0,1648
dms (5%) meios d. dias			0,1223

Os valores obtidos são médias de duas medidas do diâmetro de cada colônia em 15 repetições (placas), avaliadas durante 20 dias.

Para a análise de variância foi utilizada a média do crescimento cumulativo (em cm/dia), sem transformação dos dados.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, nas linhas (minúsculas) e nas colunas (maiúsculas) pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

* - significativo a 5% de probabilidade

** - significativo a 1% de probabilidade

O diâmetro da colônia (20^o dia) em meio BDAY foi de 59,41 e 72,11mm em meio de aveia (Figura 11). Os resultados obtidos foram superiores ao de

Barbosa (2000) que no mesmo período o crescimento de dois isolados de *V. lecanii* proveniente de *Coccus viridis* foi de 34,20 e 31,50mm em meio BDA, sem a suplementação de extrato de levedura (27°C; 24h escuro). Segundo o autor, o meio que propiciou o maior crescimento para ambos isolados foi o Sabouraud com 37,00 e 38,69. No meio mínimo, ao contrário, ocorreu o menor crescimento 14,50 e 28,25 mm.

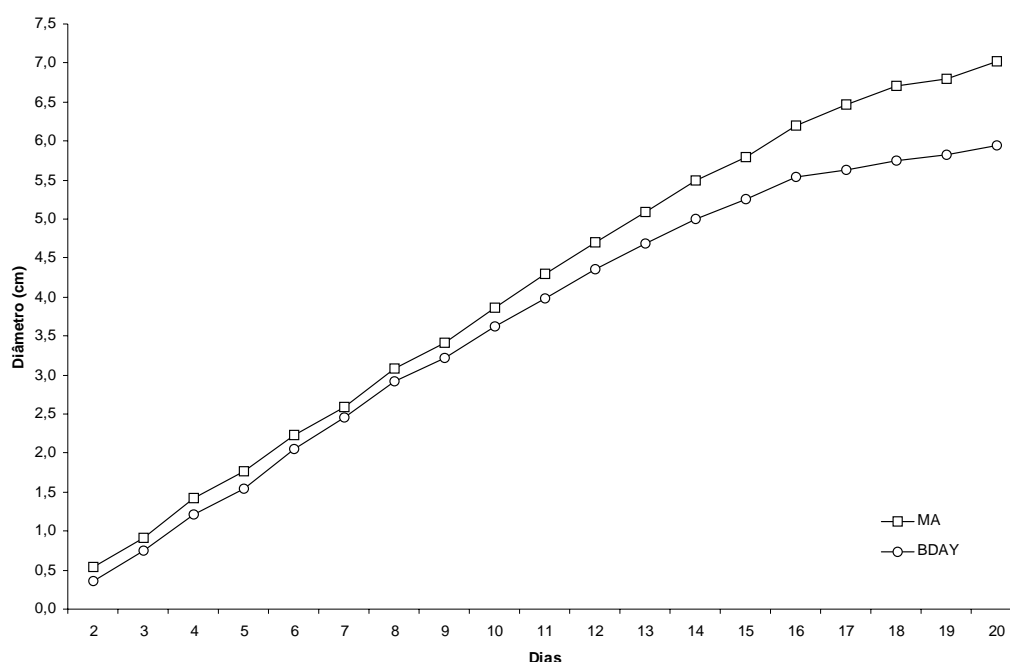


Figura 11. Crescimento médio (em diâmetro) de colônias do fungo *Verticillium lecanii* (isolado CPAC H1), cultivado em meio de aveia (MA) e BDAY ($24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase 12h). Jaboticabal, SP, 2000.

Na Figura 11, observa-se três etapas de crescimento em meio de aveia, sendo do segundo ao 16º dia a primeira, do 16º ao 18º e deste ao 20º dia, respectivamente a segunda e terceira etapa. Em BDAY, foi observado quatro

etapas, sendo a primeira do 2º ao 8º dia, a segunda do 8º ao 13º dia, a terceira do 13º ao 16º dia e a quarta do 16º ao 18º dia. Nestas etapas há uma diminuição da taxa média de crescimento devido a uma possível redução dos nutrientes e aumento de metabólitos produzidos pelo fungo no meio de cultura. A redução da taxa de crescimento pode ser observada na Figura 12

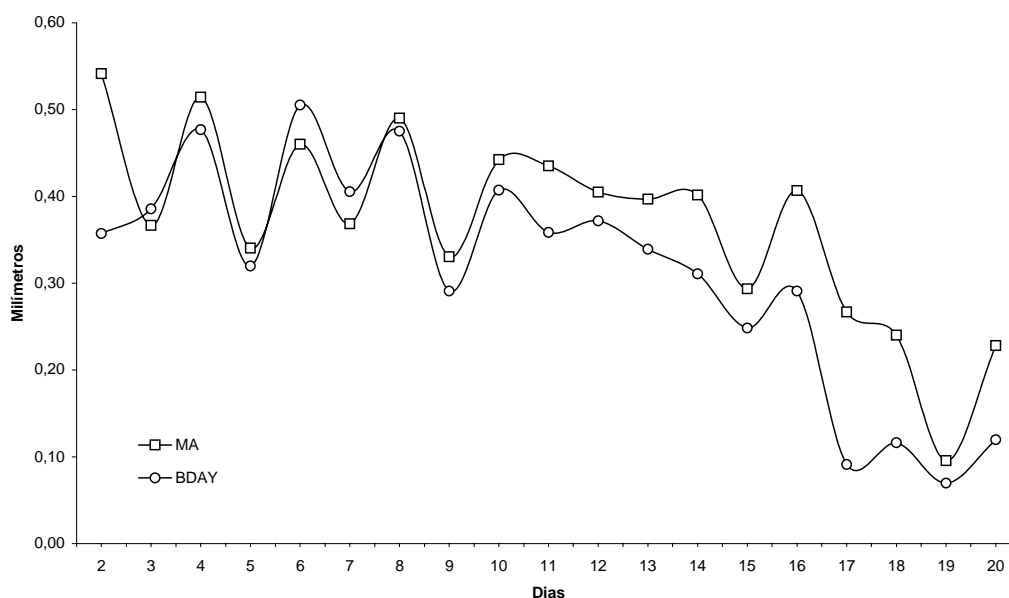


Figura 12. Taxa média diária do crescimento de *Verticillium lecanii* (isolado CPAC H1), cultivado em meio de aveia (MA) e BDAY ($24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase 12h). Jaboticabal, SP, 2000.

Com relação ao crescimento das colônias, verificou-se que o isolado CPAC H1 apresentou colônias com micélio plano, ralo e cotonoso-aveludado em meio de aveia (Figura 13); em meio BDAY colônias com micélio plano, denso e com bordos ondulados (Figura 14).

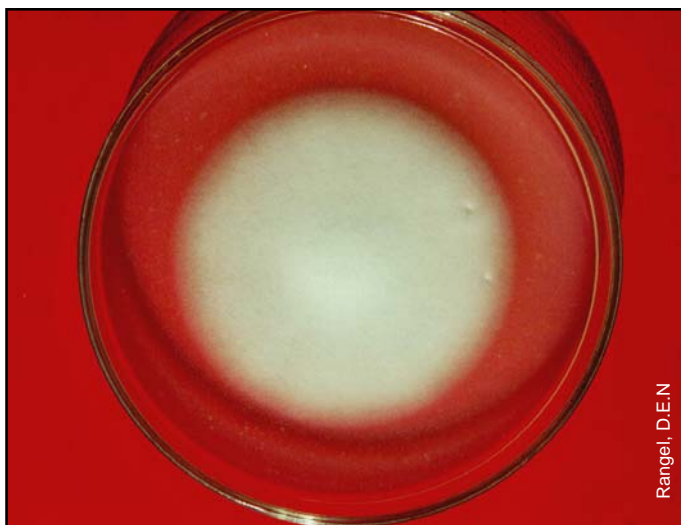


Figura 13. Colônia de *Verticillium lecanii* cultivada em meio de aveia por 20 dias a $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas.



Figura 14. Colônia de *Verticillium lecanii*, cultivada em meio BDAY por 20 dias a $24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12 horas.

Produção de Conídios. Nota-se na Tabela 9 e Figura 15 que houve períodos em que o meio de BDAY favoreceu maior produção de conídios e outros

em que a esporulação foi melhor em meio de aveia, entretanto, nos dias 3, 14 e 16 não houve diferença significativa nos dois meios.

Tabela 9. Desdobramento da interação meios x dias da produção de conídios ($\times 10^6$ conídios/mL) do fungo *V. lecanii*, isolado CPAC H1, cultivado em meio de aveia e BDAY ($24 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase, 12h). Jaboticabal, SP. 2000

Dias	Meios		Teste F
	Aveia	BDAY	
2	0,02 aH	0,01 bF	8,02 **
3	0,50 aG	0,45 aE	0,15 ^{ns}
4	1,52 bF	4,07 aD	14,23 **
6	4,81 bE	8,46 aCD	4,69 *
8	9,25 bE	17,50 aC	6,07 *
10	22,80 bD	42,70 aB	5,80 *
12	40,20 bCD	76,50 aAB	6,10 *
14	77,90 aBC	99,60 aA	0,89 ^{ns}
16	138,00 aAB	141,00 aA	0,01 ^{ns}
18	184,00 aA	89,70 bAB	7,60 **
20	133,00 aAB	75,30 bAB	4,72 *
Teste F	238,57 **	254,07 **	
dms (5%) dias d. meios			0,3632
dms (5%) meios d. dias			0,2250

Os valores obtidos são médias de cinco repetições (cinco culturas) e duas contagens em câmara de Neubauer, utilizando-se os dois campos da câmara.

Para a análise de variância foi utilizada a média da produção de conídios, com transformação dos dados em $7 + \log_{10}$.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, nas linhas (minúsculas) e nas colunas (maiúsculas) pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

^{NS} não significativo a 5% de probabilidade

* significativo a 5% de probabilidade

** significativo a 1% de probabilidade

É importante notar que no segundo dia após a inoculação do meio, o fungo já havia produzido conídios, sendo 2×10^4 e 1×10^4 conídios/mL,

respectivamente para o meio de aveia e BDAY (Tabela 9). A maior produção de conídios foi obtida no 16º dia para o meio BDAY ($1,4 \times 10^8$ conídios/mL) e no 18º dia para o meio de aveia ($1,8 \times 10^8$ conídios/mL) (Figura 15). Após estes dias, houve uma diminuição da produção de conídios para ambos os meios. Samšičáková et al., (1981) observaram semelhante diminuição da esporulação do fungo *Beauveria bassiana* após o 12º dia.

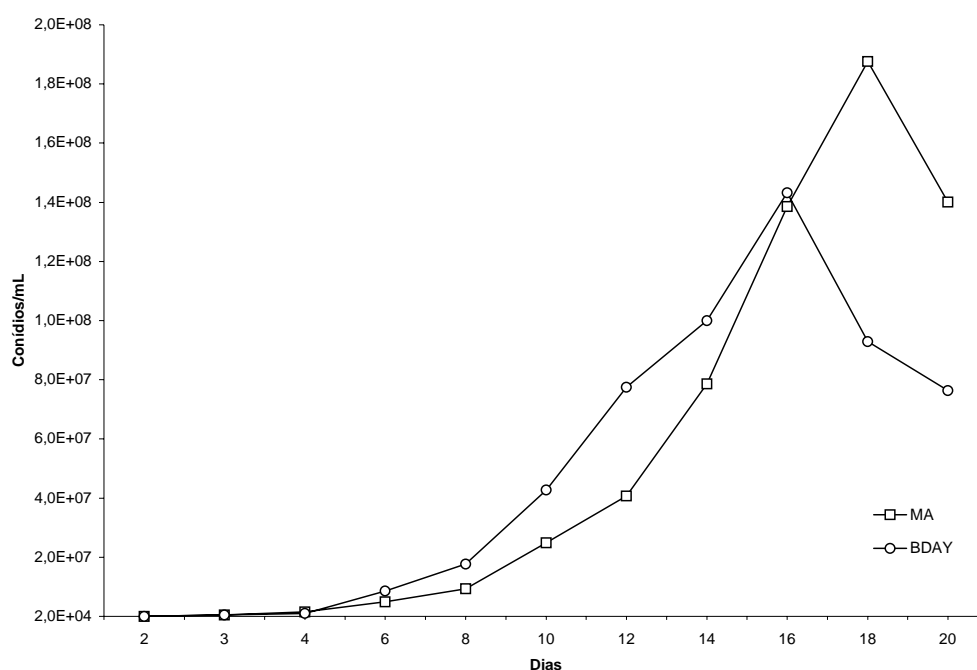


Figura 15. Produção de conídios pelo fungo *V. lecanii* (isolado CPAC H1), cultivado nos meios de aveia (MA) e BDAY ($24 \pm 0,5^\circ\text{C}$; fotofase 12h). Jaboticabal, SP. 2000.

Em relação à produção de conídios dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *P. marquandii* após 10 dias de incubação à 28°C em seis meios de cultura, Monteiro (1988) verificou, que o meio BDA favoreceu maior produção de conídios

que o de aveia.

Viabilidade dos conídios. Foi observada variação da porcentagem de viabilidade do fungo para ambos os meios (Tabela 10 e Figura 16). Monteiro (1988) verificou que os meios completo, mínimo e BDA proporcionaram as melhores porcentagens de germinação para *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *P. marquandii*. A menor viabilidade foi obtida pelos fungos crescidos nos meios de aveia, arroz e meio completo amido.

Tabela 10. Desdobramento da interação meios x dias da viabilidade de conídios do fungo *Verticillium lecanii* (isolado CPAC H1) produzidos nos meios de aveia e BDAY ($24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase, 12h). Jaboticabal, SP. 2000.

Dias	Meios		Teste F
	Aveia	BDAY	
2	61,8565 bC	74,4502 aBCD	27,55 **
3	65,7456 bBC	76,7510 aAB	21,04 **
4	78,4803 bA	83,7147 aA	4,76 *
8	67,2832 aBC	67,6066 aD	0,02 ^{ns}
14	72,2346 bAB	77,6579 aAB	5,11 *
16	76,9597 aA	76,2309 aAB	0,09 ^{ns}
18	75,4700 aA	75,9117 aBC	0,03 ^{ns}
20	79,3332 aA	68,7375 bCD	19,50 **
Teste F	14,98 **	9,22 **	
dms (5%) dias d. meios			7,4849
dms (5%) meios d. dias			4,7964

Para a análise de variância foi utilizada a porcentagem de viabilidade dos conídios com transformação dos dados em arco seno $\sqrt{\%}$

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si, nas linhas (minúsculas) e nas colunas (maiúsculas) pelo teste de Tukey (P<0,05)

^{NS} não significativo a 5% de probabilidade

* significativo a 5% de probabilidade

** significativo a 1% de probabilidade

Observou-se que os conídios cultivados no meio BDAY germinam e o tubo germinativo cresce mais rapidamente no substrato ágar-água do que os conídios cultivados em meio de aveia. O tempo médio para o tubo germinativo ficar com aproximadamente 4 vezes o tamanho do conídio foi de 14:22h e 19:32h ($24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase, 12h) para os conídios respectivamente provenientes do meio BDAY e aveia. Esta diferença pode ser devida ao carregamento de nutrientes do meio BDAY juntamente com a suspensão de conídios, e que segundo Smith & Grula (1981) pode ser utilizado na germinação e crescimento dos tubos germinativos. Isto é evidente pois observou-se que a suspensão de conídios produzidos em meio BDAY ficava com a mesma coloração do meio. Assim, pode-se deduzir que como o meio BDAY é provavelmente mais nutritivo que o meio de aveia, os nutrientes carregados deste meio para a suspensão de conídios favoreceram a germinação em menor tempo. Isto foi provado por Smith & Grula (1981), que observaram que não ocorria a germinação de conídios de *B. bassiana* em água destilada quando eram lavados após a colheita do meio de cultura Sabouraud dextrose ágar pela adição de Triton X100[®] (0,03%) e lavados por duas centrifugações (3.500 rpm por 15”) em água estéril.

Al-Aidroos & Roberts (1978), citado por Samuels et al., (1989) verificaram que mutantes de *M. anisopliae* que germinam mais rapidamente, foram mais virulentos para *Culex pipiens* quando comparados com isolados selvagens. Entretanto, nos dois bioensaios anteriores (Itens 4.2 e 4.3), não foi comprovado alteração de virulência dos isolados de *V. lecanii* quando cultivados em meio de

aveia e BDAY.

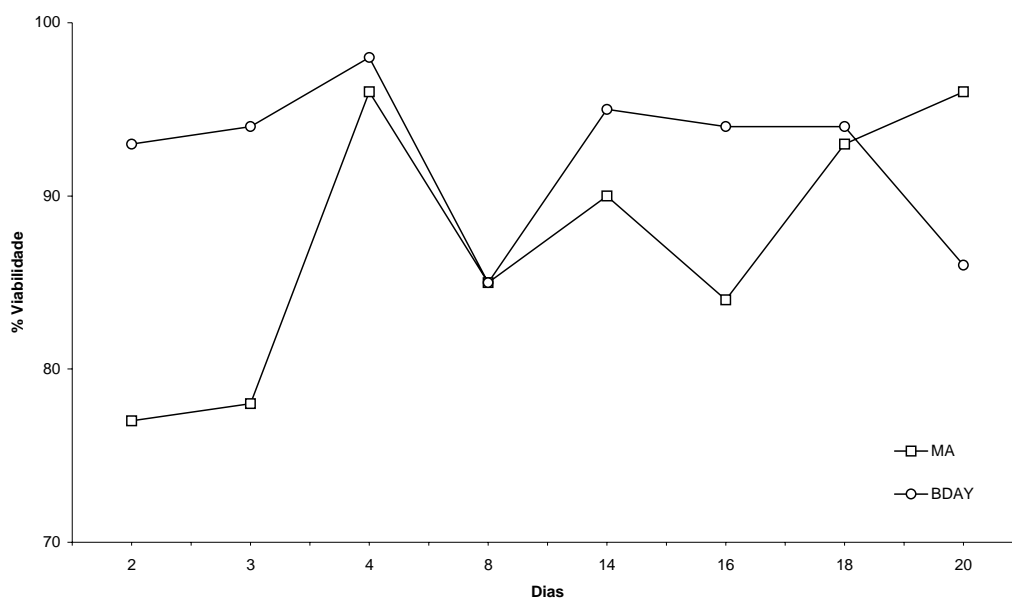


Figura 16. Porcentagem média de conídios viáveis de *Verticillium lecanii*, isolado CPAC H1 cultivados em meio de aveia (MA) e BDAY ($24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; fotofase 12h). Jaboticabal, SP, 2000.

O tempo de germinação obtido acima foi diferente do conseguido por Hall (1980, 1981), na temperatura de 20 a 25°C, a germinação de conídios de *V. lecanii* foi mais rápida, em torno de 10 horas em Sabouraud dextrose ágar, obtendo aproximadamente 98% de germinação. Além de usar um meio mais rico em nutrientes, o autor considerou o conídio germinado quando o tubo germinativo alcançou $\frac{1}{2}$ do tamanho do conídio; entretanto, neste trabalho foi esperado que o tubo germinativo tivesse aproximadamente 4 vezes o tamanho do conídio e

mesmo assim observou-se que alguns conídios estavam no começo da germinação. Desta forma, se a metodologia do autor fosse considerada neste trabalho, haveria uma taxa de germinação muito baixa. Além disso, segundo Gams (1971) e Jun et al., (1991), citado por Steenberg & Humber (1999), *V. lecanii* é considerado um complexo que inclui isolados com características morfológicas e bioquímicas muito variáveis e assim, espera-se que isolados provenientes de continentes de clima temperado sejam diferentes dos de países de clima tropical como é o caso do CPAC H1 proveniente da Guiana Francesa.

Também foi constatado que após 15 horas de incubação na lâmina contendo ágar-água, 100% dos conídios cultivados, colhidos do meio BDAY, apresentavam-se com dois tubos germinativos, e isto ocorreu em apenas 35% dos conídios provenientes do meio de aveia.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este trabalho pode-se tirar as seguintes conclusões:

Dentre os fungos *Aphanocladium album* e *Verticillium lecanii*, o isolado com maior potencial, para ninfas de terceiro e quinto instar, levando-se em conta o TL₅₀, é o isolado CPAC H1, enquanto para adultos é o isolado CPAC H3, ambos de *V. lecanii*.

A concentração de $2,4 \times 10^6$ conídios/mL de *V. lecanii* e *A. album* não é efetiva para o controle do percevejo-de-renda.

É necessário aprimorar novos métodos para manutenção do inseto em laboratório, principalmente para as ninfas, devido a alta mortalidade nos tratamentos testemunhas.

Não há variação da virulência do fungo *V. lecanii*, isolados CPAC H1 e H3, quando cultivados nos meios de aveia e BDAY.

O método de imersão dos insetos em suspensão de conídios é ineficiente para ser utilizado em bioensaios com o percevejo-de-renda, enquanto que o método de aspersão da suspensão de conídios nos insetos e folíolos demonstrou maior eficiência.

O meio de aveia favorece maior crescimento da colônia de *V. lecanii*. Não há diferença entre a produção de conídios quando cultivado em meio de aveia e BDAY.

O melhor tempo para incubação do fungo é de 16 dias para o cultivo em BDAY e 18 dias para meio de aveia. Nestes dias ocorre a maior produção de conídios nas condições do ensaio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.M. Aspectos bioecológicos e controle das principais pragas da seringueira no Brasil. Ilhéus: *CEPLAC Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária*, 1996. p.3-21.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.
- ALVES, S.B. Técnicas de laboratório. In: _____. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 637-711.
- ARZONE, A., MARLETTO, O.I.O. Patogenicità di tre deuteromiceti nei confronti di *Corythucha ciliata* (Heteroptera: Tingidae). *Redia*, v.67, p.195-203, 1984.
- BLISS, C.I. The method of Probits. *Science*. v.79 p.38-9, 1934.

- BOUCIAS, D.G., BRADFORD, D.L. BARFIELD, C.S. Susceptibility of the velvetbean caterpillar and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to *Nomuraea rileyi*: Effects of pathotype, dosage, temperature, and host age. *J. Econ. Entomol.* v.77, p.247-253, 1984.
- CARLILE, M.J., WATKINSON, S.C. Spores, dormancy and dispersal. In: _____. *The fungi*. London: Academic Press, 1994. 482p
- CELESTINO FILHO, P., MAGALHÃES, F.E.L. Ocorrência do fungo *Sporothrix insectorum* HOOG & EVANS, parasitando a mosca de renda (*Leptopharsa heveae* DRAKE & POOR) em seringal de cultivo. EMBRAPA/CNSPD. (Manaus), *Pesquisa em andamento*, nº 42. p.1-2, 1986.
- CHARLES, V.K. A fungus on lace bug. *Micology*, v.29, p.216-221, 1937.
- BARBOSA, C.C. *Caracterização fisiológica de isolados de **Verticillium lecanii** (Zimm.) Viégas obtidos de **Coccus viridis** Green (Hemiptera: Coccidae) em pomares cítricos*, 2000. 48p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- DAOUST, R.A., ROBERTS, D.W. Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae.
- DEAN, W. A luta pela borracha no Brasil: um estudo de história ecológica. São Paulo: Nobel, 1989. 286p. *J. Invertebr. Pathol.* v.40, p.107-117, 1982.
- DHINGRA, O.D., SINCLAIR, J.B. Culture of pathogens. In: _____. *Basic plant pathology methods*. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 1985. 335p.
- DRAKE, C.J., POOR, M.E. A undescribed rubber tingitid from Brazil (Hemiptera).

- J. Wash. Acad. Sci.*, v.25, p.283-284, 1935.
- FINNEY, M.A. *Probit analysis*. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 318p.
- HÄNEL, H. A bioassay for measuring the virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (fungi imperfecti) against the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill) (Isoptera, Termitidae). *Z. Angew. Entomol.* v.92, p.9-18, 1981.
- HALL, R.A. *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *J. Invertebr. Pathol.* v.28, p.389-391, 1976.
- HALL, R.A., BURGESS, H.D. Control of aphids in glasshouses with the fungus, *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.* v.93, p.235-246, 1979.
- HALL, R.A. Comparison of laboratory infection of aphids by *Metarhizium anisopliae* and *Verticillium lecanii*. *Ann. Appl. Biol.* v.95, p.159-162, 1980.
- HALL, R.A. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. *J. Invertebr. Pathol.* v.36, p.216-222, 1980.
- HALL, R.A. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980* (H.D. Burgess, Ed.) Academic Press p. 483-498, 1981.
- JUNQUEIRA, N.T.V.; LIMA, M.I.P.R.; MARTINS, M.A.M.; MAGALHÃES, F.E.L. Isolamento e cultivo do fungo *Sporothrix insectorum* (Hoog & Evans), a ser utilizado para o controle da mosca de renda da seringueira. EMBRAPA/CNSPD. (Manaus), *Comunicado Técnico*, nº 56. p.1-4, 1987.

- JUNQUEIRA, N.T.V.; GARCIA, M.V.B.; CELESTINO FILHO, P.; MORAES, L.A.C.. Controle biológico do percevejo-de-renda (*Leptopharsa heveae*) em seringais de cultivo no Estado do Amazonas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS E VETORES, 1, 1988, Rio de Janeiro. *Resumos...* Rio de Janeiro, 1988. p. 31.
- KOÇ, N.K., DÉFAGO, G. Studies on the host range of the hyperparasite *Aphanocladium album*. *Phytopath. Z.* v.107, p.214-218, 1983.
- LARA, F.M., TANZINI, M.R. Nonpreference of the lace bug *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Heteroptera: Tingidae) for rubber tree clones. *An. Soc. Entomol. Brasil* v.26, p.429-434, 1997.
- LOPEZ LASTRA, C.C. Primer registro de *Aphanocladium album* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) como patogeno de insectos en la Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* v.26, p.259-261, 1990.
- LOPEZ LASTRA, C.C. GARCIA, J.J., REBOREDO, G.R. Efecto comparativo de la virulencia de los hongos *Aphanocladium album* (Preuss) Gams y *Tolypocladium cylindrosporum* Gams (Deuteromycotina: Hyphomycetes), contral larvas de mosquito (Diptera: Culicidae). *Bol. Micol.* v.7, p.13-16, 1992.
- MONTEIRO, A.C. *Aspectos fisioecológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica (Manaus)*. São Carlos, 1988. 233p. Tese (Doutor em Ciências) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos.
- OLIVEIRA, R.O., GAMEIRO, A.H. Desafios da heveicultura nacional. *Preços Agrícolas* (Piracicaba), v. 153, p. 12-6, 1999.

- ORDONEZ GIRALDO, A.I.D.H. *Sporothrix insectorum*: méthode biologique de contrôle de la punaise *Leptopharsa gibbicarina* dans les cultures du palmier à huile em Amérique Latine (Hemiptera: Tingidae). *Bul. Soc. Entomol. France*. v.98, p. 77-85, 1993.
- ORREGO FUENTE, A.L., MENEZES, M., OLIVEIRA, S.M.A., COELHO, R.S.B. Análise comparativa de caracteres patogênicos e fisio-morfológicos para identificação de espécies de *Cylindrocladium*. *Summa Phytopathol.* v.22, p.127-133, 1996.
- OSBORNE, L.S., LANDA, Z. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Fla. Entomol.* v.75, p.456-471, 1992.
- PELAGATTI, O., DEL FRATE, G., CARETTA, G. Funghi isolati da insetti e acari. *Redia*, v.71, p.255-266, 1988.
- REPORTAGEM LOCAL. Produtores de borracha lançam ofensiva. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 5 mar. 1997. Agrofolla, p.3.
- REPORTAGEM LOCAL. Governo atrasa subsídio. Produtores suspendem a colheita. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 19 jan, 1999. Agrofolla. p.5.
- SAMŠIŇÁKOVÁ, A. KÁLALOVÁ, S. VLCEK, V. KYBAL, J. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. *J. Invertebr. Pathol.*, v.38, p.169-174, 1981.
- SAMUELS, K.D.Z., HEALE, J.B., LLEWELLYN, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invertebr. Pathol.*, v.53, p.25-31, 1989
- SHIMAZU, M.; ALVES, R.T.; KISHINO, K-I. Investigation on entomogenous fungi

- in the cerrado region and their utilization for microbial control or pests. *Relat. Tec. do Projeto Nipo Brasileiro de Cooperação em Pesquisa Agrícola 1987-1992* (Planaltina), p.202-214, 1994.
- SILVA, E. *Rio Preto lidera a produção de látex*, da Agência Folha em São José do Rio Preto, 14 março 2000. *Agrofolha*, p.1
- SMITH, R.J.; GRULA, E.A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, v.37, p.222-230, 1981.
- STEENBERG, T., HUMBER, R.A. Entomopathogenic potential of *Verticillium* and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Invertebr. Pathol.*, v.73, p.309-314, 1999.
- TANZINI, M.R. *Resistência de clones de seringueira (Hevea brasiliensis Müell Arg.) a Leptopharsa heveae Drake e Poor, 1935 (Hemiptera: Tingidae) e sua biologia*. Jaboticabal, 1996, 138p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- TAVELLA, L., ARZONE, A. Indagini sui limitatori naturali di *Corythucha ciliata* (Say) (Rhinchota: Heteroptera). *Redia*, v.70, p.443-457, 1987.
- VAL, A J. do. Névoa Protetora: Os fungos pulverizados nos seringais controlam a mosca da renda, uma praga nos cultivos do Mato Grosso. *Revista Globo Rural (Rio de Janeiro)*, março, p.43-6, 1994.
- VEY, A., FARGUES, J. Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. *J.*

Invertebr. Patho., v.30, p.207-215, 1977.

VIÉGAS, A.P. Um amigo do fazendeiro, *Verticillium lecanii* (Zimm.) n. comb., o causador do halo branco do *Coccus viridis* (Green). *Revista do Instituto do Café*. v.14, p.754-772, 1939.

7. ABSTRACT

The lace bug, *Leptopharsa heveae* is an insect that causes serious damages in rubber tree cultures. In laboratory conditions, two concentrations ($2,4 \times 10^5$ and $2,4 \times 10^7$ conidia/mL) of the fungi *Verticillium lecanii* (isolates CPAC H1, CPAC H3 and CPAC H6) and *Aphanocladium album* (FTRI A1) they were tested in nymphs and adults of *L. heveae* to evaluate the virulence of these pathogens. In the largest concentration, it was verified that CPAC H1 went more virulent for nymphs of third instar and its LT_{50} were of 1,9 days; for the fifth instar, the isolates CPAC H1, FTRI A1 and CPAC H6 presented the same virulence and the LT_{50} were respectively 2,6, 2,6 and 3,2 days; for adults, CPAC H3 was more virulent and the TL_{50} were 2,0 days. In the smallest concentration, nor everybody isolated they caused mortality above 50%. The accumulated mortality in the check treatment

was of 74% for third instar, for fifth instar and adults were respectively of 57 and 29% after one week. It was also verified the effect of culture medium for the virulence of *Verticillium lecanii* isolates CPAC H1 and H3. To evaluate this, two types of application of the fungi were used in the insect. In the first, the immersion method of insects was used in the conidia suspension and in the second, the aspersion of the conidia suspension was made on the insects and inferior face of the leaflets. In both essays, it was verified that there was not significant difference of the medium with relationship the virulence. However, it was verified that in the first method the accumulated mortality caused by the fungus didn't pass of 15% until the sixth day, while in the second, in the sixth day it had already happened above 50% of mortality, except one treatment. With relationship to the behavior of *V. lecanii*, isolate CPAC H1, in the oat and BDAY mediums, larger growth was verified in the oat medium. With relationship to the conidia production, there was not significant difference among the medium, however, the largest conidia production was obtained in the 16^o day for BDAY ($1,4 \times 10^8$ conídios/mL) and in the 18^o day for the oat medium ($1,8 \times 10^8$ conídios/mL). After these days, there was a decrease of the conidia production for both mediums. The viability of the conidia in BDAY was significantly higher than in the oat medium.