

## Notas Científicas

### Seleção de isolados de *Verticillium lecanii* para o controle de *Cinara atlantica*

Maria Silvia Pereira Leite<sup>(1)</sup>, Susete do Rocio Chiarello Penteado<sup>(1)</sup>, Scheila Ribeiro Messa Zaleski<sup>(1)</sup>, Joelma Melissa Malherbe Camargo<sup>(2)</sup> e Rodrigo Daniel Ribeiro<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Embrapa Florestas, Caixa Postal 319, CEP 83411-000 Colombo, PR. E-mail: mspleite@cnpf.embrapa.br, susete@cnpf.embrapa.br, srmzaleski@yahoo.com.br <sup>(2)</sup>Faculdades Integradas Espírita, Rua Tobias de Macedo Jr., nº 333, CEP 82010-340 Curitiba, PR.

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de isolados de *Verticillium lecanii*, sobre *Cinara atlantica*, e estimar a CL<sub>50</sub> do melhor isolado. No teste de seleção, utilizaram-se mudas de pinus com ninfas do pulgão, 20 isolados do fungo e um controle, num total de 21 tratamentos e dez repetições. Na CL<sub>50</sub> do isolado CG 904, utilizaram-se seis concentrações, com dez repetições. VL 6, CG 902 e VL 2 apresentaram os mais altos índices de mortalidade, 72,22%, 67,34% e 67,31%, respectivamente. A testemunha apresentou mortalidade de 15,6%. Nos bioensaios de CL<sub>50</sub>, a concentração de 10<sup>8</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, do isolado CG 904, causou mortalidade de 100%, CL<sub>50</sub> de 2x10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup> e TL<sub>50</sub> de 4,4 dias.

Termos para indexação: *Pinus*, fungo entomopatogênico, controle microbiano.

### Screening of *Verticillium lecanii* isolates for controlling of *Cinara atlantica*

Abstract – The aim of this study was to evaluate the pathogenicity of *Verticillium lecanii* isolates against *Cinara atlantica*, and the LC<sub>50</sub> of the best strain. For selection tests, nymphs of *C. atlantica* were placed on individual pine seedling with 20 isolates and one control, in a total of 21 treatments and ten replicates. For the LC<sub>50</sub> estimation it was used the CG 904 strain with six concentrations and ten replicates. VL 6, CG 902 and VL 2 produced the highest mortality, of 72.22%, 67.34% and 67.31%, respectively. The control plot showed mortality of 15.6%. The LC<sub>50</sub> of the CG 904 strain indicated mortality of 100% at the concentration of 10<sup>8</sup> conidia mL<sup>-1</sup>; LC<sub>50</sub>, 2x10<sup>5</sup> conidia mL<sup>-1</sup>; and LT<sub>50</sub>, 4.4 days.

Index terms: *Pinus*, entomopathogenic fungus, microbial control.

O pulgão-gigante-do-pinus, *Cinara atlantica* (Wilson, 1919) (Hemiptera: Aphididae), foi registrado no Brasil em 1998, em plantios de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*, tendo causado prejuízos em viveiros e plantios jovens de pinus (Penteado et al., 2000). O fungo *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas causa epizootias naturais no pulgão-gigante-do-pinus e demonstra um grande potencial de controle. A patogenicidade de *V. lecanii* tem sido testada contra várias pragas, como os hemípteros *Trialeurodes vaporariorum* e *Aphis gossypii* (Hall, 1982); nos pulgões *Myzus persicae*, *Brachycaudus helichrysi* e *Macrosiphoniella sanborni* (Hall & Burges, 1979); sobre alguns afídeos de cereais, *Diuraphis noxia*, *Acyrtosiphon pisum*, *Schizaphis graminum*, *Sitobium avenae*, *Metapolophium dirhodum* e *Rhopalosiphum maidis* (Feng et al., 1990);

sobre *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring, em infestações em plantas de algodão (Gindin et al., 2000) e sobre *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, em plantas de pepino (Askary et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de 20 isolados de *Verticillium lecanii*, para o controle do pulgão-gigante-do-pinus, e estimar a concentração média letal (CL<sub>50</sub>) do melhor isolado.

Os pulgões foram coletados em árvores de pinus e transportados para a criação em laboratório, que foi realizada em gaiolas de PVC, com 10x37 cm e três aberturas laterais cobertas por material de plástico transparente. Após a segunda geração, transferiram-se cinco adultos de *C. atlantica* para gaiolas com uma muda de pinus. Três dias depois, retiraram-se os adultos, deixando-se cinco ninfas por muda. Quan-

do as ninfas atingiram o terceiro ínstar, foram iniciados os bioensaios.

Foram coletados vinte isolados de *V. lecanii*, de diferentes regiões do Sul e Sudeste do Brasil e do Uruguai (Tabela 1). Os isolados foram cultivados em meio de cultura de arroz, tendo-se aplicado 1,5 mL de suspensão fúngica, na concentração de  $1,5 \times 10^7$  conídios mL<sup>-1</sup>, em cada muda de pinus acondicionada em gaiola. Para a testemunha, pulverizou-se água esterilizada e Tween (70%). Foram realizadas observações, durante 15 dias, registrando-se o número de insetos mortos, com observações dos sintomas apresentados pelas ninfas. Os insetos mortos foram imersos em álcool (70%) e água destilada e mantidos em câmara úmida, para a confirmação do agente causal.

Os isolados de *V. lecanii* foram avaliados, quanto à sua patogenicidade, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 21 tratamentos e 10 repetições, com cada unidade experimental constituída de uma muda de pinus, com cinco ninfas de terceiro ínstar de *C. atlantica*. O experimento foi conduzido em salas climatizadas, com fotófase de 12 horas e temperatura e umidade relativa interna das gaiolas de  $20,8 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $89,1 \pm 10\%$ , respectivamente. A eficiência dos isolados foi avaliada mediante a porcentagem de mortalidade e

tempo letal médio (TL<sub>50</sub>). Os dados referentes à mortalidade foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a estimativa da concentração letal média (CL<sub>50</sub>), foi selecionado o isolado CG 904, por ter apresentado um dos menores valores de TL<sub>50</sub> (6,99 dias) e por não diferir, estatisticamente, quanto à mortalidade (64,10%) dos isolados que causaram os maiores índices: VL 6, CG 902 e VL 2 (Tabela 1). Além disso, em testes que vêm sendo conduzidos em laboratório, o CG 904 tem apresentado produtividade superior aos demais isolados. As concentrações das suspensões fúngicas foram de  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  conídios mL<sup>-1</sup>. O experimento foi conduzido em sala climatizada, com temperatura interna das gaiolas de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR de  $88 \pm 10\%$  e fotófase de 12 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e 10 repetições. Na preparação, na aplicação das suspensões e na avaliação, utilizou-se a mesma metodologia empregada no teste anterior. A estimativa da CL<sub>50</sub> foi efetuada mediante a utilização do programa computacional Micro Probit (versão 3.0). Os dados referentes à mortalidade foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 1.** Mortalidade e tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) de ninfas de *Cinara atlantica*, causados por isolados de *Verticillium lecanii*, de diferentes regiões do Sul e Sudeste do Brasil e do Uruguai, utilizados na concentração de  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> (n = 10).

Isolado	Origem	Mortalidade (%) <sup>(1)</sup>	TL <sub>50</sub> (dias) <sup>(2)</sup>
VL 6	Jacupiranga, SP	72,22±6,10a	7,50 (6,11–8,88)
CG 902	São Joaquim, SC	67,34±6,70a	8,52 (6,11–10,93)
VL 2	Colombo, PR	67,31±6,51a	9,91 (7,58–12,23)
VL 5	Lages, SC	65,07±6,01ab	12,62 (10,80–14,43)
VL 4	Quatro Barras, PR	64,81±6,50ab	10,87 (8,99–12,74)
CG 904	Arapoti, PR	64,10±7,68ab	6,99 (4,73–9,21)
CG 903	Salete, SC	59,52±7,57abc	7,49 (5,08–9,89)
VL 3	Ponta Grossa, PR	58,33±7,12abcd	7,23 (5,62–8,84)
CG 899	Santa Cecília, SC	56,52±7,31abcd	7,94 (5,85–10,02)
VL 7	Paysandú, Uruguai	55,36±6,64abcde	9,52 (6,66–12,37)
VL 1	Campina Grande do Sul, PR	53,06±7,13bcdef	9,52 (7,76–11,28)
CG 896	Balsa Nova, PR	51,11±7,45bcdef	10,14 (7,48–12,79)
CG 898	Guaramirim, SC	43,48±7,31cdefg	8,73 (6,38–11,07)
CG 897	Canoinhas, SC	40,90±7,40defgh	9,29 (7,36–11,21)
CG 901	Porto União, SC	37,21±7,37efgh	7,80 (6,00–9,59)
CG 893	Bocaina do Sul, SC	34,88±7,27fghi	8,02 (4,43–11,59)
CG 892	Curitibanos, SC	33,33±7,27ghi	8,17 (6,68–9,65)
CG 894	Senges, PR	26,53±6,31ghi	8,78 (5,68–11,87)
CG 900	Capinzal, SC	26,19±6,78ghi	8,18 (4,66–11,69)
CG 895	Rio do Sul, SC	22,92±6,07hi	6,95 (2,96–10,93)
Testemunha		15,60±4,88i	3,00 (1,61–4,17)

<sup>(1)</sup>Médias (±erro-padrão) seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup>Números entre parênteses representam o intervalo de confiança.

Os sintomas de infecção foram observados pelo escurecimento e pelo intumescimento da massa corporal. A extrusão do fungo ocorreu, inicialmente, pelas inserções do corpo, que produziram conídios de coloração branca. Segundo Alves (1998), a presença dos insetos doentes é determinada pelo aparecimento de um halo branco, associado à estrutura característica do conidióforo e dos conídios do fungo. A Tabela 1 contém os valores referentes às porcentagens de mortalidade de ninfas de *C. atlantica* e TL<sub>50</sub>, causados por diferentes isolados de *V. lecanii*. Os isolados que apresentaram alta infecciosidade foram: VL 6, CG 902, VL 2, VL 5, VL 4, CG 904, CG 903, VL 3, CG 899 e VL 7, que não diferiram estatisticamente entre si, com variação de infecciosidade de 55,4% a 72,2%. Os isolados que apresentaram infecciosidade moderada foram: VL 1, CG 896, CG 898, CG 897 e CG 901, com variação de mortalidade de 37,2% a 53,1%, não tendo diferido estatisticamente entre si. Os isolados CG 893, CG 892, CG 894, CG 900 e CG 895 não diferiram estatisticamente da testemunha e mostraram baixa infecciosidade.

O TL<sub>50</sub> variou entre os diferentes isolados, de 6,95 a 12,62 dias, e os isolados CG 895 e CG 904 apresentaram os menores valores, com 6,95 e 6,99 dias, respectivamente, porém o isolado CG 895 causou baixa mortalidade (22,92%). Na testemunha, não foi verificada a ocorrência de *V. lecanii* em nenhuma das repetições, entretanto a mortalidade foi de 15,6%, em virtude do extenso período de avaliação (15 dias), o que ocasionou, ao final do experimento, sintomas de estresse nas plantas, como clorose e seca dos ponteiros, em consequência da alimentação dos pulgões. Alguns isolados de *V. lecanii*, utilizados na concentração de 10<sup>7</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, causaram mortalidade próxima a 72% em ninfas de *C. atlantica* (Tabela 1).

A suscetibilidade dos afídeos dos cereais ao fungo *V. lecanii* foi avaliada por Feng et al. (1990), que embora não cite a concentração de conídios utilizada, demonstraram que *D. noxia*, *M. dirhodum*, *R. maidis*, *S. graminum*, *S. avenae* e *Rhopalosiphum padi* apresentaram índices de mortalidade de 85%, 80%, 86%, 62%, 100% e 70%, respectivamente. Dos isolados selecionados, o CG 904 foi o que apresentou um dos menores TL<sub>50</sub> (6,9 dias), na concentração de 1,5x10<sup>7</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. Kim et al. (2003), ao avaliar a patogenicidade dos fungos *V. lecanii*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces* spp., demonstraram que

*V. lecanii* foi o mais virulento contra *Aphis gossypii*, tendo apresentado 100% de mortalidade e TL<sub>50</sub> de 2,7 dias. Askary et al. (1998) avaliaram a infecciosidade de dois isolados de *V. lecanii* e o produto comercial Vertalec, no pulgão *M. euphorbiae*; o TL<sub>50</sub> foi de 5 dias para o produto Vertalec e para o isolado 198499, e de 9 dias para o isolado 216596, o que indica que o produto Vertalec e o isolado 198499 foram mais eficientes, com mortalidade de 76% e 94%, respectivamente. Hall & Burgues (1979) obtiveram sucesso no controle de *M. persicae*, em casa de vegetação, com o fungo *V. lecanii*, cujo TL<sub>50</sub> foi de 3,3 dias.

A CL<sub>50</sub> para o isolado CG 904 foi de 2x10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, com variação de 1,3x10<sup>5</sup> a 2,7x10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. A concentração de 10<sup>8</sup> conídios mL<sup>-1</sup> causou 100% de mortalidade e o TL<sub>50</sub> foi de 4,4 dias (Tabela 2), dados semelhantes aos obtidos por Kim et al. (2003), quando utilizaram a concentração 10<sup>8</sup> conídios mL<sup>-1</sup> para o afídeo *A. gossypii* e para a mosca-branca (*T. vaporariorum*). Segundo esse autor, as concentrações de 10<sup>4</sup> a 10<sup>7</sup> conídios mL<sup>-1</sup> resultaram em baixa mortalidade, e para ambas as pragas, a concentração ideal foi de 10<sup>8</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. A CL<sub>50</sub> para *C. atlantica* apresentou valores semelhantes aos obtidos por Feng et al. (1990), que estudaram a suscetibilidade dos afídeos de cereais a *V. lecanii* e determinaram CL<sub>50</sub> de 10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup> para *D. noxia*, *M. dirhodum*, *R. maidis* e *S. graminum*.

**Tabela 2.** Mortalidade de ninfas de *Cinara atlantica*, causada pelo isolado CG 904 de *Verticillium lecanii*, em diferentes concentrações, em laboratório (n = 10)<sup>(1)</sup>.

Concentração (conídios mL <sup>-1</sup> )	Mortalidade (%)	TL <sub>50</sub> (dias) <sup>(2)</sup>	CL <sub>50</sub> (conídios mL <sup>-1</sup> ) <sup>(2)</sup>
0	4,2±2,88c	9,00a (3,28–14,71)	2,0x10 <sup>5</sup> (1,3x10 <sup>5</sup> –2,7x10 <sup>5</sup> )
10 <sup>4</sup>	48,9±7,29bc	4,82b (3,65–5,99)	
10 <sup>5</sup>	58,9±7,88bc	4,90b (4,18–5,61)	
10 <sup>6</sup>	59,2±7,02b	5,97ab (4,58–7,35)	
10 <sup>7</sup>	70,7±7,11ab	5,60b (4,21–6,98)	
10 <sup>8</sup>	100,0±0,00a	4,40b (3,21–5,58)	

<sup>(1)</sup>Médias (±erro-padrão) seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup>Números entre parênteses representam o intervalo de confiança; TL<sub>50</sub>: tempo letal médio; CL<sub>50</sub>: concentração letal média.

## Referências

- ALVES, S.B. Microorganismos associados a insetos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998. p.75-96.
- ASKARY, H.; CARRIÈRE, Y.; BÉLANGER, R.R.; BRODEUR, J. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. **Biocontrol Science and Technology**, v.8, p.23-32, 1998.
- FENG, M.G.; JOHNSON, J.B.; KISH, L.P. Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species of cereal infesting aphids (Homoptera: Aphididae). **Entomological Society of America**, v.19, p.815-820, 1990.
- GINDIN, G.; GESCHTOVT, N.U.; RACCAH, B.; BARASH, I. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Phytoparasitica**, v.28, p.1-11, 2000.
- HALL, R.A. Control of whitefly *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphid *Aphis gossypii* in glasshouses by two isolates of the fungus *Verticillium lecanii*. **Annals of Applied Biology**, v.101, p.1-11, 1982.
- HALL, R.A.; BURGESS, H.D. Control of aphids in glasshouses with the fungus *Verticillium lecanii*. **Annals of Applied Biology**, v.93, p.235-246, 1979.
- KIM, J.J.; LEE, M.H.; YOON, C.; KIM, H.; YOO, J.E.; KIM, K. **Control of cotton aphid and greenhouse whitefly with a fungal pathogen**. Disponível em: <<http://www.fftc.agnet.org/library/abstract/eb502b.html>>. Acesso em: out. 2003.
- PENTEADO, S.R.C.; TRENTINI, R.F.; IEDE, E.T.; REIS FILHO, W. Ocorrência, distribuição, danos e controle de pulgões do gênero *Cinara* em *Pinus* spp. no Brasil. **Revista Floresta**, v.30, p.55-64, 2000.
- WILSON, H.F. Some new Lachnids of the genus *Lachniella* (Homoptera: Hemiptera). **The Canadian Entomologist**, v.51, p.18-47, 1919.

---

Recebido em 25 de agosto de 2004 e aprovado em 6 de maio de 2005