

ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE AFÍDEOS NO CULTIVO DA COUVE (*Brassica oleracea*) COM ÊNFASE A *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE)

por

RICARDO LOPES DE MELO

(Sob Orientação do Professor Edmilson Jacinto Marques)

RESUMO

Lipaphis erysimi (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) é uma praga relevante para couve, não existindo agrotóxicos registrados no Brasil para o seu controle. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o controle biológico com fungos entomopatogênicos e a sua associação com óleo de nim em afídeos da couve, com ênfase para *L. erysimi*. A participação deste, no complexo de pragas da couve em Pernambuco foi avaliada. Dentre os seis municípios monitorados *L. erysimi* mostrou-se mais freqüente em João Alfredo (68,7%), Recife (63,9%) e Vitória de Santo Antão (74,6%). *Cycloneda sanguinea* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae), *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Aphidiidae), Syrphidae e *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams foram constatados. As linhagens de *Beauveria bassiana* URPE 27 e de *Lecanicillium muscarium* URPE 28 foram eleitas como mais virulentas, causando em ninfas taxa de mortalidade de 83% e 77%, sobrevivência 2,1 e 3,3 dias e Concentração Letal (CL₅₀) de 2,4x10⁷con/ml e 7,3x10⁶con/ml, respectivamente. O óleo de nim, quando pulverizado apresentou CL₅₀ de 0,2mL/l e de 3,7mL/l, aplicado em imersão. O óleo em concentração de 1,25mL/l causou mortalidade de 80% das ninfas em 24horas. Efeito fitotóxico foi promovido em concentrações acima de 2,5mL/L. A associação do nim com *B. bassiana* URPE 27 e *L. muscarium* URPE 28 mostrou-se compatível. Em campo, a linhagem URPE 27 causou eficiência relativa de 89,6%, 88,3% e 90,4%, enquanto que URPE 28

promoveu 45,5%, 62% e 64,4% contra *L. erysimi*, *Myzus persicae* (Sulzer) e *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae), respectivamente. A associação com o óleo de nim mostrou-se mais favorável com a linhagem URPE 27. Em monitoramento de campo em Viçosa-MG, avaliou-se a eficácia de *Zoophthora aphids* (Hoffmann in Fresenius) Batko (1964b) sobre *L. erysimi* e *M. persicae*, que apresentou proporção média de infectados de 0,24 e 0,30, respectivamente. O terceiro ínstar foi a fase de *L. erysimi* mais susceptível.

PALAVRAS-CHAVE: Afídios da couve, Entomophthorales, Hypocreales, nim, pulgão da mostarda.

ALTERNATIVE CONTROL OF APHIDS IN THE CULTIVATION OF KALE (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.) WITH EMPHASIS ON *Lipaphis erysimi* (KALT.)

(HEMIPTERA: APHIDIDAE)

by

RICARDO LOPES DE MELO

(Under the Direction of Professor Edmilson Jacinto Marques)

ABSTRACT

Lipaphis erysimi (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) is a pest with Kale, in the absence of pesticides registered in Brazil for its control. The goal of this research was to evaluate the biological control with entomopatogênicos fungi and its association with Neem oil in aphids of Kale, with emphasis to *L. erysimi*. The participation of *L. erysimi* in complex of aphids-pest of kale in Pernambuco was evaluated. Among six municipalities monitored, *L. erysimi* was more frequent in João Alfredo (68,7%), Recife (63,9%) and Vitória de Santo Antão (74,6%). *Cycloneda sanguinea* (L.) (Coleoptera: Coccinelidae), *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Aphidiidae), *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams, and Syrphidae were noted. Strains *Beauveria bassiana* URPE 27 and *L. muscarium* URPE 28 of were elected as more virulent, causing in nymphs mortality rate of 83% and 77%, survival 2,1 and 3,3 days and Lethal Concentration (LC₅₀) of 2,4x10⁷con./ml and 7,3x10⁶con./ml, respectively. The neem oil when sprayed shower LC₅₀ of 0.2mL/l and 3.7mL/l applied in immersion. The combination of neem with *B. bassiana* URPE 27 and *L. muscarium* URPE 28 was compatible. In the field, the strain URPE 27 caused relative efficiency of 89.6%, 88.3% and 90.4%, while URPE 28 promoted 45.5%, 62% and 64.4% against *L. erysimi*, *Myzus persicae* (Sulzer) and *Brevicoryne brassicae*

(L.) (Hemiptera: Aphididae), respectively. The association with the neem oil was more favorable to the strain URPE 27. In field monitoring in Viçosa-MG, to evaluate the effectiveness of *Zoophthora aphids* (Hoffman in Fresenius) Batko (1964b) on *L. erysimi* and *M. persicae*, which showed average proportion of infected of 0.24 and 0.30, respectively. The third instar stage *L. erysimi* more likely.

KEY WORDS: Aphids of kale, Entomophthorales, Hypocreales, neem, Mustard aphid.

ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE AFÍDEOS NO CULTIVO DA COUVE (*Brassica oleracea*) COM ÊNFASE A *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE)

por

RICARDO LOPES DE MELO

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

RECIFE - PE

FEVEREIRO – 2012

ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE AFÍDEOS NO CULTIVO DA COUVE (*Brassica oleracea*) COM ÊNFASE A *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE)

por

RICARDO LOPES DE MELO

Comitê de Orientação:

Edmilson Jacinto Marques – UFRPE

José Vargas de Oliveira – UFRPE

Rachel Gonçalves Ferreira – PERPART

ALTERNATIVAS DE CONTROLE DE AFÍDEOS NO CULTIVO DA COUVE (*Brassica oleracea*) COM ÊNFASE A *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE)

por

RICARDO LOPES DE MELO

Orientador: _____
Edmilson Jacinto Marques – UFRPE

Examinadores: _____
José Vargas de Oliveira – UFRPE

Marco Aurélio Paes de Oliveira – UFRPE

Rachel Gonçalves Ferreira – PERPART

Elza Áurea de Luna Alves Lima – UFPE

DEDICATÓRIA

A minha família e amigos que foram extremamente relevantes nesta caminhada!

Meu filho João Pedro (JP) que trouxe mais alegria pra minha vida!

Dedico e ofereço!

AGRADECIMENTOS

Ao grande Deus que determina tudo em nossas vidas, por permitir que chegasse ao final desta batalha.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola que através da sua estrutura física e dos profissionais aqui lotados permitiu a realização deste sonho.

À FACEPE pela concessão da bolsa de estudos, CAPES e CNPq que contribuíram com auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa pela recepção no PROCAD, contribuindo para melhoria do desenvolvimento do projeto.

Ao Professor Edmilson Jacinto Marques pelo grande incentivo, orientação e amizade prestadas durante este período.

Ao professor Simon Luck Elliot pela atenção, orientação e presteza nos momentos de convívio na UFV e ao professor Robert W. Barreto por gentilmente ceder a área da Clínica de fitopatologia para o desenvolvimento das minhas pesquisas.

Ao Dr. Harry Evans pelo auxílio nas identificações de fungos coletados em campo.

À minha mãe, Maria Neuza Lopes de Melo pelas constantes energias positivas das suas orações, por seus conselhos e apoio, além da paciência de viver distante pensando no meu bem maior.

À memória de meu pai, Roque Fernandes de Melo que com seu jeito particular de ensinar como a vida pode ser difícil para alcançarmos nossas metas me mostrou como devemos valorizar nossas conquistas.

À Zenaide da Silva Oliveira pela companhia, incentivo, amor e tantas outras coisas compartilhadas em nossas vidas e pelo auxílio no inglês do trabalho.

Ao meu grande irmão Marco Aurélio Paes de Oliveira que sempre me auxiliou nos momentos que necessitei, e que tem uma grande participação na minha vida nos momentos alegres, e nos mais difíceis. A minha mãe pernambucana Auristela Correia de Albuquerque “Auri” que me acolheu com grande carinho e que me ofereceu uma amizade verdadeira.

À Lílian Maria da Solidade Ribeiro grande parceira de momentos muito bons, ruins, dos conselhos, dos trabalhos, de muita coisa que pra sempre será lembrada.

Ao grande amigo e parceiro Robson Nascimento por sua presteza e solidariedade em diversos momentos e ocasiões.

Grandes amigos Bárbara, Danila, Dinho, Herbert (Betinho) e turma, Luciano “Luck”, Ledilton, Leda, Letícia, Marco Paulo Marcelo, Marquinho “tubaína”, Onildo, Taliane, Vânia, pelos sempre bons momentos de apoio e incentivo.

Aos amigos do laboratório de Patologia de Insetos (UFRPE) Cinthia, Dávilla, Ellen, Eliana, Jennifer, Rodrigo pelos momentos agradáveis vivenciados juntos.

Jeferson Elias meu fornecedor de couve, Tadeu, grande amigo conquistado, Eduardo “Carneiro”, Felipe pelos momentos de alegria que compartilhamos.

Célio e Daniel que sempre auxiliou nos momentos de trabalho na UFV.

Nicolle, Vanessinha, Martin, Robério, Alberto e demais amigos conquistados nesta grande jornada.

Aos amigos conquistados em Viçosa na república e na UFV pelo incentivo, Aline, Alessandro ‘cabelo’, Camila, Dinho, Henrique Jonas, Lucas, Maola, Silma.

Enfim, a todos que fizeram parte desta jornada com suas contribuições.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	xi
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
A cultura da couve.....	01
Aspectos gerais e importância	01
Pragas da cultura	03
Afídeos da couve.....	03
Aspectos gerais e distribuição geográfica	03
Injúrias	04
Biologia e características gerais das espécies praga da couve manteiga.....	05
<i>Lipaphis erysimi</i>	05
<i>Myzus persicae</i>	05
<i>Brevicoryne brassicae</i>	06
Métodos de controle de afídeos	07
Controle biológico.....	07
Fungos entomopatogênicos Hypocreales	09
Fungos entomopatogênicos Entomophthorales	11
Controle químico.....	12
Inseticidas de origem vegetal.....	13
Óleo de nim.....	13

	Interação de Fungos Entomopatogênicos e óleo de nim	14
2	FREQUÊNCIA DE <i>Lipaphis erysimi</i> (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) E AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO NO COMPLEXO DE AFÍDEOS DA COUVE (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Acephala</i> D.C.) EM PERNAMBUCO	24
	RESUMO.....	25
	ABSTRACT.....	26
	INTRODUÇÃO	27
	MATERIAL E MÉTODOS	28
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
	AGRADECIMENTOS	35
	LITERATURA CITADA	36
3	AÇÃO DE ESPÉCIES DE HYPOCREALES E ÓLEO DE NIM (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.) SOBRE <i>Lipaphis erysimi</i> (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) NO CULTIVO DA COUVE (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Acephala</i> D.C.)	44
	RESUMO.....	45
	ABSTRACT.....	46
	INTRODUÇÃO	47
	MATERIAL E MÉTODOS	49
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
	AGRADECIMENTOS	61
	LITERATURA CITADA	62

4	ATIVIDADE DE ESPÉCIES DE HYPOCREALES ASSOCIADOS COM ÓLEO DE NIM (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.) SOBRE A POPULAÇÃO DE <i>Lipaphis erysimi</i> (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) NO CULTIVO DA COUVE (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Acephala</i> D.C.) EM CAMPO	83
	RESUMO.....	84
	ABSTRACT.....	85
	INTRODUÇÃO	86
	MATERIAL E MÉTODOS	87
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
	AGRADECIMENTOS	96
	LITERATURA CITADA	97
5	<i>Zoophthora aphidis</i> (HOFFMANN IN FRESENIUS) BATKO (1964B) ASSOCIADO AO PULGÃO <i>Lipaphis erysimi</i> (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) NO CULTIVO DA COUVE (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Acephala</i> D.C.)	112
	RESUMO.....	113
	ABSTRACT.....	114
	INTRODUÇÃO	115
	MATERIAL E MÉTODOS	116
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
	AGRADECIMENTOS	123
	LITERATURA CITADA	123

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cultura da couve

Aspectos gerais e importância

Classificada como hortaliça herbácea, folhosa (Bevilacqua 2011a, Martins 2011a) a couve faz parte de um complexo de cerca de 3.200 espécies inseridas em aproximadamente 350 gêneros da família Brassicaceae, superfamília Brassicaceae, que possui uma gama de variedades botânicas derivadas de *Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C. (Milec *et al.* 2007, Filgueira 2008), que são amplamente cultivadas no mundo.

As principais variedades são a couve-folha (*B. oleracea* var. *acephala*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve-brócolos (*B. oleracea* var. *itálica*), couve-tronchuda (*B. oleracea* var. *tronchuda*), couve-de-bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera*) e couve-rabano (*B. oleracea* var. *gongylodes*) (May *et al.* 2007, Filgueira 2008), que têm seu cultivo realizado durante todo o ano (Filgueira 2008, Martins 2011b) em monocultura ou em consórcio com plantas aromáticas, batata, aipo, beterraba, cebola e alface (Bevilacqua 2011b).

De origem em clima temperado (Costa norte mediterrânea na Europa e Ásia menor) a couve-folha apresenta característica (Rashid & Singhm 2000, Filgueira 2008), adaptando-se bem em regiões de clima frio (15 a 19°C) e amenos (20 a 25°C) (Peña & Hughes 2007, Filgueira 2008).

As plantas apresentam caule ereto que produzem diversos rebentos e folhas lisas com variações em tons de verde, sendo no Brasil indistintamente produzido a cultivar ‘Manteiga’

(Filgueira 2008), que tem multiplicado sua participação nos mercados em todo o mundo (Peña & Hughes 2007).

Relativamente rústica, é pouco exigente em solo e adubação, transplantada com 15 cm de altura e cultivada em espaçamento 100x50cm, e reproduzida por brotações (clones) ou sementes nos híbridos atuais. A colheita é realizada 90 dias aproximadamente após o transplante, quebrando as folhas no pecíolo, rente ao caule, deixando folhas menores (4 a 5) em crescimento (Filgueira 2008, Martins 2011a e 2011b).

O consumo da couve ocorre *in natura* ou minimamente processadas, sucos, salgados e doces, estando sempre entre as hortaliças mais consumidas no mercado nacional, apresentando interessantes características organolépticas e nutrientes como vitaminas A, B1, B2, C, K, minerais, como cálcio e ferro, fibras e proteínas, além de composto bioativo como o Glicosinolato e flavonóides (Apak *et al.* 2007, SEBRAE 2008, Bevilacqua 2011a).

A couve faz parte de uma importante cadeia produtiva. Aproximadamente 65% dos mais de 33 mil produtores rurais, concentram a produção em áreas com menos de 10 hectares (SEBRAE 2006), indicando uso intensivo de mão-de-obra familiar, fixação do homem no campo e geração de renda (Embrapa 2012).

Segundo o SEBRAE (2006) no ano de 2006 foram produzidas no Brasil, cerca de 93.551 toneladas de couve, sendo o Nordeste responsável por aproximadamente 19.700 toneladas, ficando atrás apenas da região Sudeste, responsável por mais de 56 mil toneladas. Os estados de maior produção dentro da região Nordeste são Alagoas (11.885t), Bahia (3.948t) e Pernambuco (1.547t). Em termos monetários, isso significa mais de 17 milhões de reais para os produtores desta região.

Pragas da cultura

Os insetos citados em literatura que fazem parte do complexo de pragas da couve são os pulgões *Lipaphis erysimi* (Kalt.), *Brevicoryne brassicae* (L.) e *Myzus persicae* (Sulzer), mosca branca *Bemisia tabaci* Biótipo B (Genn.), curuquerê-da-couve *Ascia monuste orseis* (Latr.), traças-das-crucíferas *Plutella xylostella* L., lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* (Hufnagel), lagarta-mede-palmo *Trichoplusia ni* (Heub.) e a broca-da-couve *Hellula phidilealis* (Walker) (Rashid & Singhm 2000, Gallo *et al.* 2002, Araújo Júnior *et al.* 2007, Filgueira 2008).

A presença destes organismos pode reduzir, significativamente, a produção e produtividade, causando injúrias com diferentes graus de severidade e danos diretos e indiretos. Dependendo da condição nutricional e fase de desenvolvimento da planta, as perdas podem chegar a comprometer completamente a produção.

Afídeos da couve

Aspectos gerais e distribuição geográfica

Insetos pertencentes à Ordem Hemiptera, Sub-ordem Sternorrhyncha, os Aphididae fazem parte de Aphidoidea, juntamente com as famílias Phylloxeridae e Adelgidae. Os pulgões ou afídeos são fitófagos e sugadores de seiva do floema (Sorenson 2003, Blackman & Eastop 2007).

Os afídeos são diminutos, adultos de comprimento variável (1,5 a 2.5mm), coloração diversificada de acordo com a espécie, condições de ambiente e tamanho da colônia, variando de tons de verde, rosa, amarelo e preto (Liu & Sparks Jr. 2011). A consistência é delicada e formato piriforme, podendo ter adultos ápteros ou alados (Blackman & Eastop 2007, Pereira *et al.* 2009).

O ciclo de vida é variável de acordo com as espécies, tendo ciclo reprodutivo sexuado e assexuado e são caracterizados de acordo com o uso da sua planta hospedeira, sendo denominados como ‘heteroécio’ ou ‘monoécio’ quando têm ou não alternância de hospedeiro, respectivamente

(Williams & Dixon 2007, Pereira *et al.* 2009, Liu & Sparks Jr. 2011). As fêmeas que se reproduzem por partenogênese que pode ser cíclica gerando indivíduos ápteros ou alados (Blackman & Eastop 2007), têm alta prolificidade, proporcionam a geração de cerca de 50 a 100 ninfas/fêmea (Pereira *et al.* 2009, Liu & Sparks Jr. 2011).

Nas condições climáticas brasileiras os afídeos são vivíparos com reprodução por partenogênese telítoca, desenvolvendo rapidamente colônias numerosas, que em condições desfavoráveis como, por exemplo, a baixa qualidade do alimento e alta densidade, estimulam o surgimento de indivíduos alados, responsáveis pela migração/dispersão da espécie (Pereira *et al.* 2009).

Quanto a distribuição geográfica, os afídeos são encontrados em diversas regiões e habitats terrestres (Völkl *et al.* 2007), sendo as espécies que atacam as brássicas, de maneira geral, *L. erysimi*, *M. persicae*, *B. brassicae*, *Aphis gossypii* Glover e *Pemphigus populitransversus* Riley (Dewar 2007, Liu & Sparks Jr. 2011), e como citado anteriormente, as três primeiras fazem parte do complexo de pragas que infestam plantas de couve no Brasil.

Injúrias

Afídeos causam danos diretos e indiretos em crucíferas. Os danos diretos provêm da sucção da seiva nos tecidos do floema, causando a perda de compostos secundários e deficiência nutricional das plantas, a injeção de toxinas pode induzir má formação dos tecidos foliares e em casos mais acentuados à formação de galhas. Esses efeitos podem levar a morte de plantas jovens (Gallo *et al.* 2002, Salvadori *et al.* 2005, Liu & Sparks Jr. 2011).

Indiretamente, os danos ocasionados pelos afídeos conferem desde a redução da fotossíntese pela presença da fumagina, recobrindo o honeydew, substância com alta concentração de açúcares excretada pelos pulgões, e nos casos mais graves através da transmissão de mais de 10 vírus e

viroídes, dentre estas, o Vírus do anel negro da couve e Mosaico da couve flor, rabanete e nabo (Pena-Martinez 1992, Gallo *et al.* 2002, Salvadori *et al.* 2005, Liu & Sparks Jr. 2011).

Biologia e características gerais das espécies praga da couve manteiga

Lipaphis erysimi

Espécie holocíclica (Blackman & Eastop 2007), adultos apresenta cor com uma variação de tons verde, tendo manchas esclerotizadas facilmente visíveis na superfície dorsal da porção abdominal e as antenas levemente escurecidas com exceção da porção basal (Liu & Sparks Jr. 2011).

As características mais evidentes que identificam esta espécie ao nível macroscópico são tubérculos frontais não convergentes, a cauda em formato de língua e em alguns casos pode apresentar uma leve cerosidade nas colônias (Liu & Sparks Jr. 2011), característica não observada nas populações encontradas em Pernambuco e Minas Gerais.

A média de longevidade de *L. erysimi* na faixa de temperatura ótima para a maioria dos insetos (20-25°C) situa-se na faixa de 32 a 34 dias e quando exposto a condições extremas (15°C) é de 23 dias e (30°C) de apenas 14 dias, em estudo realizado em condições controladas de laboratório. Em condição de campo os valores não sofrem muita alternância, com longevidade média de 33 dias no inverno e 22 dias no verão e a fecundidade média a 25°C é de 2,5 ninfas/fêmea/dia. Para duplicar a população, *L. erysimi* necessitou de apenas 1,41 e 2,39 dias no verão e inverno, respectivamente (Godoy & Cividanes 2002).

Myzus persicae

Espécie altamente polífaga, cosmopolita e tem alta eficiência na transmissão de viroses sendo capaz de transmitir mais de 100 fitoviroses (Blackman & Eastop 2007).

Conhecidos vulgarmente como pulgão-verde, apresentam cerca de 2mm de comprimento, forma áptera de cor verde-clara e alada com tons de verde mais marcantes, cabeça, tórax e antenas escuros. Reproduz-se por partenogênese telítoca, com quatro ínstares de duração aproximada de dez dias até a fase adulta (Gallo *et al.* 2002, Blackman & Eastop 2007).

Adultos de *M. persicae* usualmente são alados. As antenas e os sinfúnculos são da mesma cor do corpo, mas sutilmente escurecidos na porção final, proeminentes, sinfúnculos dilatados a base (Blackman & Eastop 2007, Liu & Sparks Jr. 2011) e cilíndrico em sua extensão (Gallo *et al.* 2002).

As características que auxiliam macroscopicamente na separação de outras espécies são os tubérculos frontais distintos e voltados para dentro na porção basal e sinfúnculos da mesma cor do corpo e tão longo quanto à cauda (Liu & Sparks Jr. 2011).

Brevicoryne brassicae

Ápteros de *B. brassicae* têm cor variando de amarelo a verde escura com regiões mais escuras na cabeça e tórax. A presença de secreção serosa recobrando as colônias é uma característica marcante da espécie (Gallo *et al.* 2002, Liu & Sparks Jr. 2011), que são formadas sobre as folhas comprometendo o desenvolvimento das plantas (May *et al.* 2007).

Características como sinfúnculos e codícola mais curtos que a cauda, cauda em formato de cone contendo de 7-8 setas recurvadas e secreção serosa recobrando os insetos e as folhas infestadas são os indicativos macroscópicos de que se trata de uma infestação de *B. brassicae*. Assim como em outras espécies de afídeos, a presença de fumagina recobrando as folhas pode ser encontrada devido à presença do honeydew (Gallo *et al.* 2002, Liu & Sparks Jr. 2011).

Métodos de controle

Como em diversos insetos pragas em outras culturas, o uso de agrotóxicos para controle de afídeos na couve é o método que tem intensa participação para redução da infestação e controle da densidade e crescimento populacional. Contudo, outras práticas têm sido recomendadas com esses objetivos, a exemplo do controle biológico, mecânico e cultural, físico e comportamental.

Controle biológico

Diferentes espécies interagem no agroecossistema de maneira complexa nos diferentes níveis tróficos. Esta interação tende a proporcionar o equilíbrio entre os organismos em condições normais de conservação. De acordo com Lenteren (2009), o controle biológico natural é responsável por cerca de 95% de controle de organismos, potencialmente pragas, em cerca de 85,5 milhões de km² de área cultivada no planeta.

Predadores, parasitóides e entomopatógenos são comumente relatados em diversas pesquisas em interação com espécies de afídeos em vários sistemas (Völkl *et al.* 2007). Dentre os predadores podem-se citar as espécies da ordem Coleoptera e da família Coccinellidae, *Coleomegilla maculata* DeGeer, *Hippodamia convergens* Guerin-Meneville, *Cycloneda sanguinea* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae) e Dipteros da família Syrphidae (Völkl *et al.* 2007, Liu & Sparks Jr. 2011). Hymenopteros parasitóides *Diaeretiella rapae* e *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Aphidiidae) (Zhang & Hassan 2003, Starý *et al.* 2007), além dos fungos Hypocreales *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams e Entomophthorales *Pandora neoaphids* e *Zoophthora radicans* ocorrem regulando populações de *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae* (Feng *et al.* 1990, Alves 1998, Isikber & Copland 2002).

Em muitos sistemas agrícolas, os fungos entomopatogênicos são importantes agentes de controle natural de diversas espécies de insetos e ácaros-praga (Sosa-Gomez 2005). Estima-se que os fungos entomopatogênicos são responsáveis por cerca de 80% das enfermidades que ocorrem sobre artrópodos (Batista Filho 1989, Alves 1998) e são muito interessantes devido a ampla seletividade a outros inimigos naturais (Cardoso *et al.* 2007), sendo estes agentes de controle biológico passíveis de manipulação para utilização em programas de controle específicos, ou ainda serem associados a programas de manejo integrado de pragas (Lenteren 2009, Goettel *et al.* 2010).

A mais recente classificação de fungos descreve cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies entomopatogênicos, com maior número de representantes nas Classes Oomycetes, Chytridiomycetes, Ascomycetes e Zygomycetes (Goettel *et al.* 2010). Porém, nos Filos Ascomycota e Zigomycota estão às espécies que são verdadeiramente capazes de controlar infestações de pulgões. Entomophthorales (Zigomycota) apresenta uma maior eficiência relativa, de acordo com Völkl *et al.* (2007).

Fatores inerentes ao próprio patógeno e externos, que mantêm com estes uma íntima e complexa interação, interferem na efetividade de um fungo entomopatogênico em promover a infecção no hospedeiro (Alves 1998, Goettel *et al.* 2010).

Os fatores ambientais são extremamente relevantes para que as infecções fúngicas ocorram. Hyphomycetes normalmente requerem altas umidades para que ocorram os processos de germinação, penetração e esporulação. *Lecanicillium* sp., por exemplo, necessita de umidades muito próximas a 100% durante um período de 16 horas, enquanto que espécies de Entomophthorales dependem de umidades superiores a 95% para germinação e esporulação dos conídios (Goettel *et al.* 2010).

A temperatura é um fator que pode ser limitante para que as espécies de fungos entomopatogênicos iniciem o processo infectivo. Para os Hyphomycetes, geralmente, a faixa

ótima de temperatura situa-se entre 20 e 30 °C, enquanto que para os Entomophthorales esta faixa esta compreendida entre 15 e 25°C, tendo que se considerar, ainda, que os raios ultravioletas são danosos para a persistência e infectividade de muitos fungos (Alves 1998, Xu & Feng 2002, Goettel *et al.* 2010).

Considerando fatores inerentes aos fungos entomopatogênicos, uma característica marcante é a especificidade de hospedeiros, que é amplamente variável entre gêneros, dentro do próprio gênero e entre linhagens. Para a aplicação no controle biológico, a seleção de um bom isolado é considerada mais relevante que a espécie em si, devido às variações de virulência que ocorrem nas linhagens no interior do hospedeiro (Goettel *et al.* 2010).

Em muitos casos, fungos entomopatogênicos podem matar certas espécies de insetos apenas em condições muito especiais (Baverstock *et al.* 2005, Baverstock *et al.* 2008). Exemplo disso ocorre em *M. anisopliae*, que é raramente registrado como patógeno de mosquitos em condições de campo, mas em laboratório, muitas linhagens são altamente patogênicas às larvas de mosquitos, ratificando, também, que outros fatores são relevantes para susceptibilidade e ocorrência da doença no hospedeiro em condições naturais (Goettel *et al.* 2010).

É relevante considerar que para haver uma boa atividade do isolado é necessário uma eficiente produção de propágulos infectivos. A produção de conídios depende do tamanho do hospedeiro (cadáver) e de fatores nutricionais, assim como da espécie e linhagem dos fungos (Xu & Feng 2000, Nielsen *et al.* 2001, Goettel *et al.* 2010).

Fungos entomopatogênicos Hypocreales

Ascomycota (Anamorfo) apresenta como principais características o micélio septado e haplóide, com os esporos sexuais, os ascósporos, formados em um asco ou corpo de frutificação.

Muitas linhagens de Ascomicetos têm baixa habilidade de formar esporos sexuais, a forma teleomorfa, e são classificados como forma-classe Hyphomycetes (Goettel *et al.* 2010).

A ordem Hypocreales apresenta esporos de tamanho diminuto ($<10\mu\text{m}$), e grande quantidade de esporos produzidos por cadáver (10^7 - 10^9). A esporulação é lenta, e normalmente, ocorre em alguns dias, a taxa de germinação e o ciclo de vida lentos, alta Concentração Letal (CL_{50}) (10^2 - 10^9). Raramente apresentam muco revestindo os esporos, assim como a formação de esporos de resistência, com maior aplicabilidade em estratégias de controle biológico clássico, inundativo ou ainda por incremento. Cerca de 40 gêneros de fungos entomopatogênicos são encontrados nesta classe/ordem, com espécies representantes de gêneros *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Lecanicillium* (= *Verticillium*), *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Sorospora* e *Tolypocladium* (Goettel *et al.* 2010, Hesketh *et al.* 2010).

O fungo *Metarhizium* é descrito como um deuteromiceto da família Moniliaceae que se caracteriza por infectar grande número de espécies de insetos, formando nestes uma camada pulverulenta de conídios, que os recobre, com cor variável, com tons que alternam do verde claro a escuro, acinzentados, ou ainda esbranquiçados com manchas verdes. Os conídios são normalmente uninucleados, hialinos e se formam sobre conidióforos simples, podendo também se formar sobre ramificações compostas de um conjunto de micélio. As fiálides clavadas ou cilíndricas são originárias do vértice de hifas e se colocam uma ao lado da outra. A massa estromática é composta de um agrupamento de conídios em cadeias que dão origem a estruturas prismáticas compostas (Alves 1998).

O gênero *Beauveria* ocorre infectando diversas espécies de insetos e ácaros. As fiálides são representadas por células com a região basal mais volumosa que se organizam no conidióforo, densamente agrupadas em espirais ou solitárias. Os conídios podem apresentar diversas formas,

sendo normalmente globosos, ovóides, cilíndricos, verrugosos, curvados ou não, aparecem sobre as hastes das fiálides, que podem ser simples, com algumas ramificações na parte superior ou em ziguezague (Alves 1998).

O fungo *Lecanicillium* (= *Verticillium*) é um patógeno que normalmente ocorre sobre afídeos e cochonilhas em diversas regiões. Caracteriza-se por apresentar fiálides pontiagudas, com aspecto de um furador, saindo do ramo principal do conidióforo. Os conídios geralmente elípticos de 2,5 a 7 µm são envolvidos por uma massa gelatinosa de forma esférica e normalmente emitem dois tubos germinativos (Alves 1998).

Fungos entomopatogênicos Entomophthorales

Dentro do Filo Zygomycota são conhecidos mais de 200 espécies de Entomophthorales patogênicas a insetos, que normalmente causam epizootias significativas. A ordem Entomophthorales apresenta como características esporos de tamanho relativamente maior (>10µm) quando comparados a Hypocreales, produzem poucos esporos por cadáver (10^4), com rápida taxa de esporulação, germinação (algumas horas) e ciclo de vida (dias), frequentemente produzem conídios secundários, Concentração Letal (CL₅₀) baixa (10^4), apresentam atividade de descarga de esporos, que são normalmente revestidos por substância mucilaginosa (Hesketh *et al.* 2010)

Aplica-se bem ao controle biológico por conservação, clássico ou por inoculação (Hesketh *et al.* 2010), com espécies dos gêneros *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Furia*, *Massospora*, *Neozygites*, *Pandora*, *Strongwellsea*, e *Zoophthora* presentes na ordem Entomophthorales (Goettel *et al.* 2010).

De um modo geral, os Entomophthorales após a fase de penetração nos hospedeiros evoluem em um processo patológico, por meio dos corpos hifais ou protoplastos, que apresentam diferentes

formas. Quando em condições desfavoráveis, formam-se, a partir de hifas, os esporos de resistência (azigósporos ou zigósporos), que possuem grandes quantidades de substâncias de reserva, rodeadas por uma parede celular espessa, para suportar as condições inadequadas (Alves 1998, Hesketh *et al.* 2010). Esta estrutura é de extrema relevância para a manutenção e propagação da infecção causada por estes entomopatógenos (Goettel *et al.* 2010). Os rizóides podem ou não estar presentes. Os conídios, que apresentam diversas formas podem ter número variável de núcleos e ser fortemente expelidos e fixados por muco característico na superfície do hospedeiro. Os conídios primários podem dar origem a conídios secundários em períodos de 3 a 10 horas após a sua descarga (Alves 1998).

O gênero *Zoophthora* apresenta conidióforo ramificado e raramente simples. Os conídios são clavados a ovóides, com um núcleo e papila basal cônica, rodeado por uma camada líquida com tendência a produzir capiliconídios secundários. O núcleo tem aparência granulosa, podendo ser colorido com aceto orceína. Os rizóides não apresentam terminação discóide aderente (Alves 1998).

Controle químico

As olerícolas são intensivamente pulverizadas com inseticidas, acaricidas e outros agrotóxicos (Filgueira 2008). O controle químico é uma opção viável e algumas vezes necessária para o controle de afídeos na couve, dispondo-se de vários produtos com diferentes princípios ativos. No entanto, deve-se preferencialmente, utilizar produtos seletivos e sistêmicos com ação translaminar para preservar agentes de controle biológico (Gallo *et al.* 2002, Dewar 2007, Filgueira 2008, Liu & Sparks Jr. 2011).

Atualmente para controle de *M. persicae* encontram-se registrados três produtos comerciais com três princípios ativos diferentes (Acefato, Malationa e Mevinfós), mas que pertencem a uma

mesma classe química de organofosforados. Quando se trata de *B. brassicae*, a espécie detém na sua lista 15 produtos comerciais, com 10 ingredientes ativos (Acefato, Clorpirifós, Deltametrina, Imidacloprido, Malationa, Metomil, Mevinfós, Pirimicarbe, Protiofós e Tiacloprido), e cinco classes químicas diferentes (Dimetilcarbamato, Metilcarbamato de oxima, Neonicotinóides, Organofosforado e Piretróides). Para *L. erysimi* não existem produtos registrados (MAPA 2012, SIA 2012).

Os problemas relacionados ao uso inadequado de inseticidas são bastante conhecidos e relatados por diversos pesquisadores, que vão desde a contaminação ambiental, ressurgência de pragas, surtos de pragas secundárias, resistência e efeitos nos agentes de controle biológico (Zheng *et al.* 1997, Robbs & Bittencourt 1998, Alves *et al.* 2001). Estes problemas, associados à busca por qualidade de vida e de consumo pelos consumidores, vêm criando um ambiente favorável às pesquisas com o controle biológico e manejo integrado, visando minimizar os efeitos colaterais da aplicação de agrotóxicos.

Inseticidas de origem vegetal

Óleo de nim

Pertencente a família Meliaceae, *Azadirachta indica* A. Juss., é uma espécie botânica que apresenta uma série de aplicações, dentre estas, a utilização no controle de pragas em função da presença de metabólitos secundários bioativos, sendo seus principais elementos químicos a mistura de três ou quatro compostos correlatos. A Azadirachtina é um triterpeno (limonóide) que tem sido amplamente estudado por ser um dos principais compostos bioativos de *A. indica* (Dev 1997, Vieira & Fernandes 1999, Mossini & Kimmelmeier 2005).

Assim, como para outros produtos de origem vegetal, que são aplicados de maneira alternativa, existe uma dificuldade para padronização dos bioprodutos à base de *A. indica*, em

função de variações nas concentrações dos princípios ativos nas caldas, quando preparados de maneira artesanal (Vieira & Fernandes 1999), conseqüentemente, alternando a eficiência esperada. Para minimizar este problema existe a alternativa de se utilizar formulações de nim, a partir de folhas e/ou sementes (Dev 1997, Charleston *et al.* 2005).

O óleo de nim é um dos produtos mais utilizados em função do baixo impacto aos inimigos naturais (Leskovar & Boales 1996). A ação de inseticidas a base de nim, inclui efeitos no desenvolvimento, como regulador de crescimento (Mordue & Blackwell 1993), repelência para adultos (Charleston *et al.* 2005), deterrente alimentar e contato direto sobre o tegumento para sugadores e ação translaminar (Schmutterer 1990, Ascher 1993), apresentando ação sistêmica, quando absorvido via sistema radicular das plantas (Pavela *et al.* 2004, Kumar *et al.* 2005).

Diversos trabalhos demonstram a viabilidade do uso do extrato de nim para o controle de pulgões. Santos *et al.* (2004) apresentaram como resultados da aplicação do extrato aquoso das sementes de nim sobre o pulgão do algodoeiro *A. gossypii* mortalidade ninfal de até 100% e redução da fecundidade. Gonçalves & Bleicher (2006) registraram eficiência de 83,81% no uso de extrato de nim, via sistema radicular, sobre o pulgão-preto *Aphis craccivora* Koch em plantas de feijão-de-corda. Azadirachtina é utilizado também em batata para controle de afídeos praga da cultura (Zehnder *et al.* 2007).

Estes resultados ratificam a importância da utilização do óleo de nim para o controle de afídeos na couve, em busca de controle eficiente e de baixo impacto nos inimigos naturais.

Interação de fungos entomopatogênicos e óleo de nim

Fungos entomopatogênicos e extratos vegetais são comumente utilizados para controle de insetos sugadores como afídeos e moscas brancas em cultivos de hortaliças no campo e em casa-

de-vegetação (Zehnder *et al.* 2007), desta forma a aplicação simultânea pode ser uma realidade dentro dos sistemas produtivos.

O desenvolvimento de agentes de controle microbiano que sejam eficazes vai depender, dentre outros fatores, de sua ação compatível com outros agentes de controle utilizados nas lavouras, já que os fungicidas, herbicidas e inseticidas podem afetar a viabilidade e o desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos (Clark *et al.* 1982).

A ação dos agrotóxicos sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e linhagem do patógeno, da natureza química dos produtos e das concentrações utilizadas. Estes produtos podem atuar, inibindo o crescimento vegetativo, a conidiogênese e a esporulação dos microorganismos, e até causar mutações genéticas, fatores que podem levar a diminuição da virulência à determinada praga (Alves *et al.* 1998, Goettel *et al.* 2010).

Assim, como para os produtos sintéticos, efeitos de produtos naturais podem ocorrer sobre fungos entomopatogênicos. Estudos desenvolvidos por Aguda *et al.* (1986) demonstraram efeitos negativos do óleo de nim em concentrações de 5% ou superiores, sobre a produção de conídios de *M. anisopliae*. Em estudos desenvolvidos por Depieri *et al.* (2005), avaliando uma formulação comercial de óleo emulsionável de nim (0,5; 1 e 1,5%), do extrato aquoso de sementes (1; 2 e 4%) e do extrato aquoso de folhas de nim (0,15; 1,5 e 15%) com *B. bassiana*, encontraram que os extratos de sementes e de folhas mostraram-se menos prejudiciais a *B. bassiana* que o óleo emulsionável. Este produto, nas concentrações testadas, não foi compatível com *B. bassiana*, inibindo, significativamente, o crescimento vegetativo e reduzindo a produção e a viabilidade dos conídios com efeitos mais acentuados nas concentrações mais altas.

Marques *et al.* (2004) observaram que o óleo de nim contendo 1.200 ppm de azadiractina utilizado nas concentrações de 0,0097 a 5% reduziu o crescimento e a esporulação de *B. bassiana*,

M. anisopliae e *Paecilomyces farinosus* (Holm. ex S. F. Gray) Brown & Smith (= *Isaria farinosa*), contudo, não se verificou efeito do óleo na viabilidade de conídios em todas as concentrações.

Esta pesquisa teve como objetivos:

- 1- Avaliar o status da praga *L. erysimi* em couve no estado de Pernambuco, assim como, identificar os agentes de controle biológico que participam da sua cadeia trófica;
- 2- Avaliar o controle biológico natural e aplicado com fungos entomopatogênicos sobre *L. erysimi*, e demais afídeos da couve;
- 3- Verificar a interação dos fungos entomopatogênicos com óleo de nim.

A hipótese da pesquisa é que os fungos entomopatogênicos utilizados de maneira isolada, ou em combinação com o óleo nim, são capazes de controlar as populações dos afídeos de maneira eficaz.

Literatura Citada

- Aguda, R.M., M.C. Rombach & B.M. Shepard. 1986.** Effect of nim oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Int. Rice Res. Newsletter 11: 34-35.
- Alves, S.B. 1998.** Fungos entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. 2ª ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B., M.B. Medeiros, M.A. Tamai & R.B. Lopes. 2001.** Trofobiose e microrganismos na proteção de plantas. Biotec. Cien. Desenv. 21: 16-21.
- Apak, R., K. Güçlü, B. Demirata, M. Özyürek, S.E. Çelik, B. Bektaşoğlu, K.I. Berker & D. Özyurt. 2007.** Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules 12: 1496-1547.

- Araujo Júnior, J.M., E.J. Marques, L.M. Pires, C.C.M. Silva & R.B. Rocha. 2007.** Ocorrência de *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams no pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em couve no Estado de Pernambuco. Anais da VII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX), UFRPE, RECIFE-PE.
- Ascher, K.R.S. 1993.** Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the neem tree, *Azadirachta indica*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 22: 433-449.
- Batista Filho, A. 1989.** Controle biológico e o manejo integrado de pragas. Biológico 55: 36-39.
- Baverstock, J., P.G. Anderson & J.K. Pell. 2005.** *Pandora neoaphidis* transmission and aphid foraging behavior. J. Invertebr. Pathol. 90: 73-76.
- Baverstock, J., K.E. Baverstock, S.J. Clark & J.K. Pell. 2008.** Transmission of *Pandora neoaphidis* in the presence of co-occurring arthropods. J. Invertebr. Pathol. 98: 356-359.
- Bevilacqua, H.E.C.R. 2011a.** Classificação das hortaliças, p.1-6. In H.E.C.R. Bevilacqua (ed.), Cultivo de hortaliças. São Paulo, Prefeitura de São Paulo, 85p.
- Bevilacqua, H.E.C.R. 2011b.** Rotação e consorciação de culturas, alelopatia, p.73-76. In H.E.C.R. Bevilacqua (ed.), Cultivo de hortaliças. São Paulo, Prefeitura de São Paulo, 85p.
- Blackman, R.L. & V.F. Eastop. 2007.** Taxonomic issues, p. 1-29. In H. van Emden & R. Harrington (eds.), Aphids as crop pests. Wallingford, CAB International, 745p.
- Cardoso, E.R., S. Freitas, H.T. Nunes & L.G.A. Pessoa. 2007.** Seletividade de *Lecanicillium lecanii* e *Metarhizium anisopliae* para larvas de primeiro ínstar de *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae) em laboratório. Acta Sci. Agron. 29: 563-568.
- Charleston, D.S., R. Kfir, L.E.M. Vet & M. Dicke. 2005.** Behavioural responses of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. Bull. Entomol. Res. 95: 457-465.

- Clark, R.A., R.A. Casagrande & D.B. Wallace. 1982.** Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. Environ. Entomol. 11: 67-70.
- Depieri, R.A., S.S. Martinez & A.O. Menezes Júnior. 2005.** Compatibility of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of nee seeds and leaves and the emulsible oil. Neotrop. Entomol. 34: 601-606.
- Dev, S. 1997.** Insecticides of natural origin. Amsterdan, Harwood Academic Publ., 352p.
- Dewar, A.M. 2007.** Chemical control, p. 391-422. In H. van Emden & R. Harrington (eds.), Aphids as crop pests. Wallingford, CAB International, 745p.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças.** Disponível em: www.cnph.embrapa.br , acesso em janeiro de 2012.
- Feng, M.G., J.B. Johnson & L.P.Kish. 1990.** Virulence of *Verticillium lecanii* and aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for species of cereal infesting aphids (Homoptera; Aphididae). Environ. Entomol. 19: 815-820.
- Filgueira, F.A.R. 2008.** Brassicáceas – couves e plantas relacionadas, p. 279-299. In F.A.R. Filgueira (ed.), Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ed. Viçosa, Editora UFV, 421p.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Godoy, K.B. & F.J. Cividanes. 2002.** Tabelas de esperança de vida e fertilidade para *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em condições de laboratório e campo. Neotrop. Entomol. 31: 41-48.

- Goettel, M.S., J. Eilenberg & T. Glare. 2010.** Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations, p. 387-432. In I.G. Lawrence & S.G. Gill (eds.), Insect control biological and synthetic agents. Orlando, Elsevier, 470p.
- Gonçalves, M.E.C. & E. Bleicher. 2006.** Atividade sistêmica de azadiractina e extratos aquosos de sementes de nim sobre o pulgão-preto em feijão-de-corda. Rev. Ciênc. Agron. 37: 177-181.
- Hesketh, H., H.E. Roy & J. Eilenberg. 2010.** Challenges in modeling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. BioControl 55: 55-73.
- Isikber, A.A. & M.J.W. Copland. 2002.** Effects of various aphid foods on *Cycloneda sanguinea*. Entomol. Exp. Appl. 102: 93-97.
- Kumar, P., H.M. Poehling & C. Borgemeister. 2005.** Effects of different application methods of azadirachtin against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Hom., Aleyrodidae) on tomato plants. J. Appl. Entomol. 129: 489-497.
- Lenteren, J.C. van. 2009.** Critérios de seleção de inimigos naturais, p. 11-32. In V.H.P. Bueno (ed.), Controle biológico de pragas: Produção massal e controle de qualidade. Lavras, UFLA, 430p.
- Leskovar, D.I. & A.K. Boales. 1996.** Azadirachtin. Potential use for controlling lepidopterous insects and increasing marketability of cabbage. HortScience 31: 405-409.
- Liu, T.X. & A.N. Sparks Jr. 2011.** Aphids on Cruciferous Crops Identification and Management, 12p. Disponível em <http://AgriLifebookstore.org>, acesso em 01/12/2011.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012.** Disponível em: www.agricultura.gov.br, acesso em janeiro de 2012.
- Marques, R.P., A.C. Monteiro & G.T.Pereira. 2004.** Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de nim (*Azadirachta indica*). Ciênc. Rural 34: 1675-1680.

- Martins, A.L.C. 2011a.** Planejamento da horta, p. 25-30. In H.E.C.R. Bevilacqua (ed.), Cultivo de hortaliças. São Paulo, Prefeitura de São Paulo, 85p.
- Martins, A.L.C. 2011b.** Colheita das hortaliças, p.77-78. In H.E.C.R. Bevilacqua (ed.), Cultivo de hortaliças. São Paulo, Prefeitura de São Paulo, 85p.
- May, A., S.W. Tivelli, P.F. Vargas, A.G. Samra, L.V. Sacconi & M.Q. Pinheiro. 2007.** A cultura da couve-flor, Campinas, Instituto Agrônômico de Campinas, 36p. (Boletim Técnico 200).
- Milec, A.T., R.M.D. Morais, V.C. Xavier, D.C. Conceição, C.R. Mauch & T.B.G.A. Morselli. 2007.** Produção de mudas de couve brócolis em dois sistemas de irrigação utilizando substratos orgânicos. Rev. Bras. Agroecol. 2: 1483-1486.
- Mordue, A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. J. Ins. Physiol. 39: 903-924.
- Mossini, S.A.G. & C. Kemmelmeier. 2005.** A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. Acta Farm. Bonaerense 24: 139-48.
- Nielsen, C., J. Eilenberg, S. Harding, E. Oddsdottir & G. Halldórsson. 2001.** Geographical distribution and host range of entomophthorales infecting the green spruce aphid *Elatobium abietinum* Walker in Iceland. J. Invertebr. Pathol. 78: 72-80.
- Pavela, R., M. Barnett & F. Kocourek. 2004.** Effect of azadirachtin applied systemically through roots of plants on the mortality, development and fecundity of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*). Phytoparasitica 32: 286-294.
- Peña-Martinez, R. 1992.** Afidos como vectores de virus en México. Montecillo, Centro de Fitopatologia, 135p.
- Peña, R. de La & H. Hughes. 2007.** Improving vegetable productivity in a variable and changing climate. Taiwan, SAT eJournal. 22p. Disponível em <http://www.icrisat.org/journal/SpecialProject/sp1.pdf>, acesso em junho de 2011.

- Pereira, P.R.V.S., J.R. Salvadori & D. Lau. 2009.** Distinção necessária. Pelotas, Rev. Cult.,10p. (Caderno Técnico 4).
- Rashid, M.A. & D.P. Singhm. 2000.** A manual on vegetable seed production in Bangladesh. AVRDC-USAID-Bangladesh project horticulture research centre Bangladesh agricultural research institute joydebpur, Gazipur, 119p.
- Robbs, C.F. & A.M. Bittencourt. 1998.** Controle biológico de insetos: O controle biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de fungos imperfeitos ou hifomicetos. Biotec. Cien. Desenv. 6: 10-12.
- Salvadori, J.R., P.R.V.S. Pereira & M.T.B. Silva. 2005.** Manejo de pulgões. Rev. Cult. 75: 32-34.
- Santos, T.M., N.P. Costa, A.L. Torres & A.L. Boiça Júnior. 2004.** Effect of nim extract on the cotton aphid. Pesqu. Agropecu. Bras. 39: 1071-1076.
- Schmutterer, H. 1990.** Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. Annu. Rev. Entomol. 35: 271-297.
- SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. 2006.** Censo agropecuário. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 777p.
- SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. 2008.** Hortaliças minimamente processadas: estudos de mercado SEBRAE/ESPM. Rio de Janeiro, SEBRAE, 40p.
- SIA – Sistema de Informações sobre Agrotóxicos. 2012.** Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia> acesso em janeiro de 2012.
- Sorenson, J.T. 2003.** Aphids, p. 32-37 In V.H. Resh & R.T. Carde (eds.). Encyclopedia of insects. San Diego, Academic Press, 1266p.

- Sosa-Gomez, D.R. 2005.** Aliados sob apuros. *Rev. Cult.* 78: 22-25.
- Starý, P., M. Sampaio & V.H.P. Bueno. 2007.** Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) and their associations related to biological control in Brasil. *Rev. Bras. Entomol.* 51: 107-118.
- Vieira, C.P. & B.J. Fernandes. 1999.** Plantas inseticidas, p. 739–754. In C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick (Orgs.), *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. Porto Alegre, UFRGS/UFSC, 821p.
- Völkl, W., M. Mackauer, J.K. Pell & J. Brodeur. 2007.** Predators, parasitoids and pathogens, p. 187-233. In H. van Emden & R. Harrington (eds.), *Aphids as crop pests*. Wallingford, CAB International, 745p.
- Williams, I.S. & A.F.G. Dixon. 2007.** Life cycles and polymorphism, p. 69-85. In H. van Emden & R. Harrington (eds.), *Aphids as crop pests*. Wallingford, CAB International, 745p.
- Xu, J.H. & M.G. Feng. 2000.** The time-dose-mortality modeling and virulence indices for two entomophthoralean species, *Pandora delphacis* and *P. neoaphidis*, against the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Biol. Control* 17: 29-34.
- Xu, J.H. & M.G. Feng. 2002.** *Pandora delphacis* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) infection affects the fecundity and population dynamics of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) at varying regimes of temperature and relative humidity in the laboratory. *Biol. Control* 25: 85-91.
- Zehnder, G., G.M. Gurr, S. Kühne, M.R. Wade, S.D. Wratten & E. Wyss. 2007.** Arthropod pest management in organic crops. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 57-80.
- Zhang, W.Q. & S.A. Hassan. 2003.** Use of the parasitoid *Diaeretiella rapae* (McIntoch) to control the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). *J. Appl. Entomol.* 127: 522–526.

Zheng, B.Z., X.W. Gao, G.Y. Zhao & B.Z. Cao. 1997. Insecticide resistance in turnip aphids, *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach), from Beijing and suburbs. Res. Pestic. Manage. 9: 27-28.

CAPÍTULO 2

FREQUÊNCIA DE *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) E AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO NO COMPLEXO DE AFÍDEOS DA COUVE (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.) EM PERNAMBUCO¹

RICARDO L. MELO², EDMILSON J. MARQUES², JOSÉ M. ARAUJO JÚNIOR², RACHEL G. FERREIRA³, JOSÉ V. OLIVEIRA², RODRIGO B. ROCHA⁴ E MARCO A. P. OLIVEIRA⁵

² Departamento de Agronomia – Entomologia, Univ. Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE

³ Universidade de Pernambuco – UPE/PERPART, Avenida Agamenon Magalhães, S/N Bairro de Santo Amaro, CEP 50100-010 Recife, PE

⁴ Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Univ. Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, km 16 Rodovia Ilhéus-Itabuna, CEP 45662-900, Ilhéus, BA

⁵ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE.

¹ Melo, R.L., E.J. Marques, J.M. Araújo Júnior, R.G. Ferreira, J.V. Oliveira, R.B. Rocha & M.A.P. Oliveira. Frequência de *Lipaphis erysimi* (kalt.)(Hemiptera: Aphididae) e agentes de controle biológico no complexo de afídeos da couve (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.) em Pernambuco. A ser submetido à Horticultura Brasileira.

RESUMO – A couve-folha (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.) está entre as mais importantes hortaliças cultivadas no Brasil. A presença de afídeos-praga constitui um relativo impedimento para a sua produção. Dentre as espécies que ocorrem no Brasil pode-se citar *Myzus persicae* (Sulzer) e *Brevicoryne brassicae* (L.). *Lipaphis erysimi* (Kalt.) mais recentemente, vem se tornando mais freqüente atacando brassicas, contudo, pouco se conhece da sua distribuição em Pernambuco. O objetivo deste trabalho foi verificar a participação desta espécie em regiões produtoras de couve no estado. Nos seis municípios monitorados foi detectada a presença de *L. erysimi*, sendo a espécie mais freqüente em João Alfredo, Recife e Vitória de Santo Antão, com 68,8%, 63,9% e 74,3% de participação, respectivamente. Inimigos naturais como larvas e adultos de *Cycloneda sanguinea* (L.), o parasitoíde *Lisyphlebus testaceipes* (Cresson), larvas de Syrphidae e *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams foram registrados em associação com *L. erysimi*.

PALAVRAS-CHAVE: Brassicaceae, pulgão, distribuição geográfica

FREQUENCY OF *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) AND
BIOLOGICAL CONTROL AGENTS IN APHID COMPLEX OF THE KALE (*Brassica oleracea*
L. var. Acephala D.C.) IN PERNAMBUCO STATE

ABSTRACT – The kale (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.) is among the most important vegetables grown in Brazil. The presence of aphids-pests is a problem for their production. Among the species that occur in Brazil are *Myzus persicae* (Sulzer) e *Brevicoryne brassicae* (L.). *Lipaphis erysimi* (Kalt.) more recently is becoming more frequent attacking brassicas, however, little is known of its distribution in Pernambuco. The goal of this work was to verify the participation of the species in kale producing regions in the State. In six municipalities monitored was detected the presence of *L. erysimi*, being the most frequent species in João Alfredo, Recife and Vitória de Santo Antão, with 63,9%, 74,3% and 68,8%, participation, respectively. Natural enemies as larvae and adults of *Cycloneda sanguinea* (L.), the parasitoid *Lisyphlebus testaceipes* (Cresson), Syrphidae larvae and *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams were registered in interaction with *L. erysimi*.

KEY WORDS: Brassicaceae, aphid, geografic distribution

Introdução

Amplamente cultivada no mundo a couve-folha (*B. oleracea* var. *acephala*) é uma das variedades da família Brassicaceae abrangendo cerca de 350 gêneros e aproximadamente 3.200 espécies, que são cultivadas durante todo o ano em sistemas de consórcio ou em monocultivo (Milec *et al.* 2007, Filgueira 2008, Bevilacqua 2011, Martins 2011), tendo no Brasil grande relevância por fazer parte da cadeia produtiva de cerca de 21 mil produtores familiares (SEBRAE 2006).

Nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, a couve figura como a segunda hortaliça mais consumida, com porcentagem de 34% entre os produtos minimamente processados (SEBRAE 2008). Em Pernambuco, terceiro maior estado produtor dentro da região Nordeste, foi produzido 1.547 toneladas de couve no ano de 2006 segundo estimativa do IBGE, divulgadas pelo SEBRAE (2006).

Os afídeos estão entre as pragas que reduzem a produção e produtividade da couve (Carvalho *et al.* 2002), responsáveis por danos diretos e indiretos, sendo estes últimos considerados como mais relevantes pela transmissão de viroses, a exemplo do Vírus do anel negro da couve e Mosaico da couve flor, rabanete e nabo (Peña-Martinez 1992, Gallo *et al.* 2002, Salvadori *et al.* 2005, Liu & Sparks Jr. 2011). Dentre as espécies que atacam a couve folha destacam-se *Lipaphis erysimi* (Kalt.), *Brevicoryne brassicae* (L.) e *Myzus persicae* (Sulzer) (Rashid & Singh 2000, Gallo *et al.* 2002, Filgueira 2008). A ocorrência de *L. erysimi* é cosmopolita (Liu & Sparks Jr. 2011, Dewar 2007), contudo, a infestação de plantas de couve ainda não fora registrada em determinadas regiões de Brasil.

No Brasil não existem agrotóxicos registrados para o controle de *L. erysimi* (MAPA 2012, SIA 2012) dificultando a sua utilização. Assim é relevante identificar o complexo de agentes de

controle biológico que atuam sobre este afídeo em condições naturais, visando mensurar a sua eficácia.

Os agentes de controle biológico que atuam sobre *L. erysimi* podem ser os mesmos que ocorrem sobre outras espécies de pulgões, que são predadores, fungos entomopatogênicos e parasitóides, como por exemplo, *Cycloneda sanguinea* (L.), *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams e *Lisyphlebus testaceipes* (Cresson), respectivamente (Zhang & Hassan 2003, Starý *et al.* 2007, Völkl *et al.* 2007, Liu & Sparks Jr. 2011).

Como as informações relativas à ocorrência e distribuição de *L. erysimi* e seus agentes de controle biológico no estado de Pernambuco inexitem, os objetivos desta pesquisa foram realizar o levantamento da população de *L. erysimi*, visando aferir a importância relativa da incidência desta espécie, no complexo de afídeos praga da couve-manteiga no estado, bem como identificar os principais agentes de controle biológico relacionados à *L. erysimi*. A hipótese levantada é de que *L. erysimi* apresenta ampla distribuição no estado de Pernambuco, e que existe, ao menos um agente de controle natural com potencial para ser utilizado em um programa de controle biológico específico.

Material e Métodos

Os dados para o cálculo da frequência de *L. erysimi* foram obtidos através de coletas de amostras em diferentes municípios produtores de couve no estado de Pernambuco, sendo estas processadas no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Distribuição de *Lipaphis erysimi* em Áreas de Cultivo em Pernambuco. Visando conhecer à distribuição de *L. erysimi* e dos demais afídeos que participam do complexo de pragas que atacam a couve em Pernambuco, realizou-se amostragens em cultivos de agricultores familiares nos

municípios de Camocim de São Félix, Chã Grande, João Alfredo, Pombos, Vitória de Santo Antão e Recife (Fig. 1, Tabela 1), durante o período de 10/2008 a 02/2010, com média de duas coletas por município.

Aleatoriamente, com caminhar tipo zigue-zague, foram selecionadas dez plantas infestadas por pulgões, sendo coletada uma folha/planta que foram individualmente armazenadas em sacolas plásticas, identificadas e transportadas ao Laboratório para avaliação. O material foi observado sob microscópio estereoscópio possibilitando a quantificação dos afídeos das diferentes espécies presentes nas folhas, separando-as através de características morfológicas dos indivíduos com base em informações descritas na chave de identificação prática de campo (Field identification key for common aphids on cruciferous crops). Exemplos foram fixados em álcool (90%) e enviados a Dr^a Rachel Gonçalves Ferreira do PERPART, Recife-PE e ao Dr. Carlos Roberto Souza e Silva da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos-SP para identificação.

Inimigos Naturais Associados à *Lipaphis erysimi*. Durante as avaliações para quantificação das espécies de afídeos presentes nos cultivos de couve em Pernambuco, foram observados os inimigos naturais que estavam associados a *L. erysimi*.

Os predadores, parasitóides e fungos entomopatogênicos foram registrados como presentes ou ausentes em cada amostra, associando-os a espécie de afídeo e local de coleta. Predadores e parasitóides adultos foram acondicionados em álcool (70%) e identificados. Insetos mumificados foram mantidos em câmara climatizada BOD (temperatura 26 ± 1 °C, umidade relativa $80 \pm 10\%$ e fotofase de 12h) para obtenção dos adultos dos parasitóides.

Para confirmação da identificação, os fungos entomopatogênicos foram isolados através de cultivo em lâminas e monospóricas, em Batata Dextrose Agar e antibiótico estreptomicina (BDA+A), sendo os procedimentos realizados no Laboratório de Patologia de Insetos da UFRPE.

Após o crescimento em placas Petri, observou-se esporulação de cor branca, conídios de forma elíptica, sendo o material enviado ao professor Sérgio Batista Alves da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) que o identificou como *Lecanicillium* (= *Verticillium*) *muscarium* (Petch) Zare & Gams (Classe-forma: Hyphomycetes).

O isolamento do fungo foi realizado conforme procedimentos descritos em Alves (1998), coletando as suas estruturas diretamente dos afídeos infectados e isolando em BDA+A, repetindo-se o procedimento após três dias de incubação em câmara BOD (temperatura de 26 ± 1 °C, umidade relativa de $80 \pm 10\%$ e fotofase de 12h).

Análises Estatísticas. Para se conhecer a distribuição de *L. erysimi* nos diferentes municípios onde se realizou a amostragem de plantas de couve, assim como, comparar a sua ocorrência com as demais espécies de afídeos pragas da cultura, foi realizada análise de frequência (Proc freq), através do software estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001), sendo as médias obtidas comparadas através do teste χ^2 .

Para os inimigos naturais foi realizado o estudo de correlação de Pearson, comparando os dados de frequência das diferentes localidades e o número total de inimigos naturais encontrados em cada uma, possibilitando averiguar se a presença de um maior número de agentes de controle biológico está diretamente relacionada com a frequência média das espécies, onde:

$$\rho_{X,Y} = \frac{Cov(X,Y)}{\sigma_X \cdot \sigma_Y}$$

Sendo ρ = Correlação de Pearson, x = frequência média da espécie nos diferentes municípios e y = número de espécies de inimigos naturais encontrados por localidade e σ = desvio padrão de x e y .

Resultados e Discussão

Distribuição de *Lipaphis erysimi* e Demais Afídeos em Áreas de Cultivo em Pernambuco. Os resultados obtidos através das análises de frequência ratificam a importância de espécies de afídeos como pragas-chave da cultura da couve folha. Dos seis municípios onde foram realizadas as coletas apenas em João Alfredo e Vitória de Santo Antão, não foram detectadas as três espécies de importância econômica (Tabela 2).

As espécies registradas foram *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae*. Nos levantamentos realizados em João Alfredo e Recife não foi detectada a presença de *B. brassicae*, e *M. persicae* não foi coletado em Vitória de Santo Antão. *L. erysimi* estava presente em todas as regiões monitoradas, sendo este o primeiro registro da espécie no estado de Pernambuco (Tabela 2).

As maiores médias de frequência de *L. erysimi* foram observadas nos municípios de Recife (31,7%), seguido de Vitória de Santo Antão (15,9%) e Chã Grande (15,8%) (Tabela 2). Observado que *L. erysimi* estava presente em todos os municípios avaliados, realizou-se a comparação das três espécies dentro de cada município, verificando a participação de cada uma nas infestações em cada localidade (Tabela 3). A partir dos resultados, foi possível verificar a importância de *L. erysimi* em plantas de couve, o que torna mais relevante os estudos de métodos alternativos de controle, uma vez que não existem produtos registrados para a praga na cultura (MAPA 2012, SIA 2012).

L. erysimi apresentou, significativamente, as maiores médias de infestação quando comparadas as espécies *M. persicae* e *B. brassicae* nos municípios de João Alfredo, Recife e Vitória de Santo Antão, com valores de 68,7% ($\chi^2 = 7,85$; $P = 0,005$); 63,9% ($\chi^2 = 87,09$; $P < 0,0001$) e 74,6% ($\chi^2 = 83,17$; $P < 0,0001$), respectivamente. Nos municípios de Camocim de São Félix e Chã Grande foram registradas como a segunda maior média (Tabela 3).

As espécies *M. persicae* e *B. brassicae* contribuíram com as maiores médias de infestação em Pombos (43,0%), para a primeira, e Camocim de São Félix e Chã Grande (46,1 e 43,9%, respectivamente) para a segunda (Tabela 3).

A relevância da infestação por *L. erysimi* foi verificada em outros estudos realizados. Carvalho *et al.* (2002) no município de Lavras – MG, que verificaram que *L. erysimi*, *B. brassicae* e *M. persicae* são espécies constante, acessória e acidental, respectivamente, de acordo com classificação estabelecida por Bodenheimer (1955). Os autores verificaram ainda que *L. erysimi* se mantém constante durante todo o ano no cultivo de couve, enquanto que *B. brassicae* concentra-se distribuída entre os meses de julho a outubro e *M. persicae* de maio e junho, o que reforça a importância desta espécie para o cultivo de couve. No estudo com *L. erysimi*, em Pernambuco, pode-se observar esta mesma tendência, apresentando ampla frequência.

No município de Jaboticabal, Cividanes & Santos-Cividanes (2010) verificaram que durante um período de sete anos, a ocorrência de formas aladas de *L. erysimi* (68,8%), *M. persicae* (21,7%) e *B. brassicae* (9,5%) nas proximidades de plantio de couve-folha, com as duas primeiras espécies frequentes em períodos mais prolongados durante o ano e *B. brassicae* concentrando-se no mês de novembro.

Em variedades de canola (*Brassica napus* L. var. *Oleifera* Moench.), Talpur & Khuhro (2004), ao investigarem a ocorrência de *L. erysimi*, registraram picos de infestação de 28,7 pulgões por folha na variedade Oscar e 42,7 na variedade Rainbow, em casa-de-vegetação e relataram que a espécie tem potencial de causar grandes perdas para as variedades nestas densidades, enquanto que Vuong *et al.* (2003) registraram densidade de 35,3 afídeos/planta de *L. pseudobrassicae* na couve chinesa (*Brassica rapa* pekinensis) e de 20 afídeos/planta para *M. persicae* em casa-de-vegetação. Enquanto que no campo, *L. pseudobrassicae* atingiu 208 afídeos/planta e *M. persicae* 28 afídeos/planta, em espinafre (*Spinacia oleracea* L.).

A intensa frequência de *L. erysimi* em plantas da família brassicaceae e hortaliças hospedeiras de outras famílias, com altos níveis populacionais, ratificam a importância da ocorrência da espécie em outras regiões, assim como a busca por medidas efetivas de controle desta praga.

Presença de Inimigos Naturais. As três categorias de agentes de controle biológico, predadores, parasitóides e entomopatógenos, citadas em literatura, foram identificadas em interação às infestações de afídeos do complexo de pragas da couve-manteiga nos diferentes municípios de Pernambuco.

Identificou-se *L. muscarium*, como o fungo de ocorrência natural nas infestações de *L. erysimi* e *M. persicae*, nos municípios de Chã Grande, Pombos, Recife e Vitória de Santo Antão (Tabela 4). Adultos e larvas de joaninha *Cycloneda sanguinea* e larvas de Syrphidae foram registrados em Pombos, associados a *M. persicae* e em Recife, em plantas infestadas por *L. erysimi* (Tabela 4).

O himenóptero parasitóide, *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Aphidiidae) foi isolado em múmias de *L. erysimi* e *B. brassicae*, em Camocim de São Félix, Chã Grande e Recife (Tabela 4). Esta espécie é comumente relatada, atacando afídeos em diversas culturas, tendo alguns estudos visando testar a sua eficiência no controle da praga.

No município de Viçosa-MG, Coccinellidae, Syrphidae, *Aphidoletes* sp., *Chrysoperla externa* e *Aphidius colemani* Viereck foram os inimigos naturais registrados por Morais (2010), em populações de *L. erysimi* em plantas de repolho.

Rodrigues *et. al.* (2005) testando a liberação inoculativa de *L. testaceipes* em populações de *Aphis gossypii* Glover em crisântemo, em casa-de-vegetação, verificaram percentagem de parasitismo de até 55,2% seis semanas após a liberação de 0,15 fêmeas/m² reduzindo a infestação de 4,2 para 2,9 pulgões/planta. Contudo, na sétima e oitavas semanas ocorreu uma redução de

parasitismo, em função da ação de outros agentes de controle biológico, como as joaninhas *C. sanguinea*, *Hyppodamia convergens* Guerin e o sirfídio *Pseudodorus clavatus* (Fabricius), demonstrando evidências de predação intraguida, uma vez que estes predadores se alimentaram tanto de pulgões sadios quanto de parasitados por *L. testaceipes*. Esta informação reforça a necessidade de continuidade dos estudos de interação entre os agentes de controle biológico.

As correlações foram positivas e significativas nos estudos realizados, para a presença dos inimigos naturais e frequência de infestação, com valores de $R = 0,98$; $0,83$ e $0,91$, para *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae*, respectivamente. Estes resultados indicam, que à medida que se tem uma maior frequência da espécie, maior será a diversidade de espécies de inimigos naturais em interação.

Com base nestas informações foi possível verificar que *L. erysimi* em Pernambuco tem uma gama de inimigos naturais associados que podem auxiliar na manutenção da população da praga aos níveis abaixo de dano econômico, desde que sejam manipulados para a obtenção destes índices, uma vez que a simples presença do predador não garante a redução significativa da população do afídeo. Este fato foi relatado por Talpur & Khuhro (2004), que identificaram os predadores *Chrysoperla carnea* (Stephens), *Coccinella septempunctata* L. e *C. undecimpunctata* L. presentes no cultivo da canola, sendo, contudo, em número incapaz de controlar as populações de *L. erysimi*.

Outros fatores como a predação intraguida, também, podem contribuir para uma baixa eficiência de agentes de controle biológico atuando de forma natural. Este problema foi relatado por Simelane *et al.* (2008), descrevendo que a presença de inimigos naturais que ocorrem em *A. gossypii* podem coincidir com o pico de parasitismo por *L. testaceipes* interferindo na atuação do inimigo natural.

Ainda de acordo com Simelane *et al.* (2008) *C. septempunctata* aceita se alimentar de afídeos infectador por *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Batko, contudo o valor nutricional e atratividade das presas podem ser inadequados para o desenvolvimento das larvas dos predadores, causando alta mortalidade. A interação pode não ser interessante pelo fato dos fungos reduzirem a fecundidade e tamanho do corpo de adultos do predador, além de aumentar a duração do período larval do segundo, terceiro e quarto estádios. Contudo, pode ocorrer um efeito sinérgico quando os insetos doentes não forem consumidos na totalidade, favorecendo a dispersão do fungo, uma vez que a porção contaminada não é consumida.

A aplicação de táticas de controle que regulem e conservem esta estrutura trófica é imprescindível para o sucesso de um programa de manejo integrado de pragas da couve, reduzindo os efeitos deletérios da aplicação de agrotóxicos para controle de afídeos na couve.

Nosso estudo representa um avanço nas pesquisas com *L. erysimi* como inseto praga de couve-folha no estado de Pernambuco, podendo a partir destes resultados, criarmos novas perspectivas de atuação e manipulação dos agentes de controle biológico que ocorrem naturalmente nesta região, buscando uma solução alternativa a continuidade do uso de agrotóxicos para o controle da praga.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor, ao Dr. Carlos Roberto Souza e Silva da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) pela identificação dos afídeos e a todos os produtores que colaboraram, cedendo material para as coletas.

Literatura Citada

- Alves, S.B. 1998.** Fungos entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. 2ª ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Bevilacqua, H.E.C.R. 2011.** Classificação das hortaliças, p.1-6. In H.E.C.R. Bevilacqua (ed.), Cultivo de hortaliças. São Paulo, Prefeitura de São Paulo, 85p.
- Bodenheimer, F.S. 1955.** Problems of animal ecology. Oxford, Oxford Univ. Press, 179p.
- Carvalho, L.M., V.H.P. Bueno & R. Pena-Martinez. 2002.** Levantamento de afídeos alados em plantas hortícolas em Lavras-MG. Ciênc. Agrotec. 26: 523-532.
- Cividanes, F.J. & T.M. Santos-Cividanes. 2010.** Ocorrência de formas aladas de pulgões e sua relação com fatores meteorológicos e plantas hospedeiras. Pesqu. Agropecu. Bras. 45: 7-15.
- Dewar, A.M. 2007.** Chemical control, p. 391-422. In H. van Emden & R. Harrington (eds.), Aphids as crop pests. Wallingford, CAB International, 745p.
- Filgueira, F.A.R. 2008.** Brassicáceas – couves e plantas relacionadas, p. 279-299. In F.A.R. Filgueira (ed.), Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ed. Viçosa, Editora UFV, 421p.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Liu, T.X. & A.N. Sparks Jr. 2011.** Aphids on Cruciferous Crops Identification and Management, 12p. Disponível em <http://AgriLifebookstore.org>, acesso em 01/12/2011.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012.** Disponível em: www.agricultura.gov.br, acesso em janeiro de 2012.
- Martins, A.L.C. 2011.** Planejamento da horta, p. 25-30. In H.E.C.R. Bevilacqua (ed.), Cultivo de hortaliças. São Paulo, Prefeitura de São Paulo, 85p.

- Milec, A.T., R.M.D. Morais, V.C. Xavier, D.C. Conceição, C.R. Mauch & T.B.G.A. Morselli. 2007.** Produção de mudas de couve brócolis em dois sistemas de irrigação utilizando substratos orgânicos. Rev. Bras. Agroecol. 2: 1483-1486.
- Morais, E.G.F. 2010.** Fatores determinantes do ataque dos pulgões *Brevicoryne brassicae*, *Lipaphis erysimi* e *Myzus persicae* ao repolho. Tese de Doutorado, Viçosa, UFV, 103p.
- Peña-Martinez, R. 1992.** Afidos como vectores de virus en México. Montecillo, Centro de Fitopatologia, 135p.
- Rashid, M.A. & D.P. Singhm. 2000.** A Manual on vegetable seed production in Bangladesh. AVRDC-USAID-Bangladesh project horticulture research centre Bangladesh agricultural research institute joydebpur, Gazipur, 119p.
- Rodrigues, S.M.M., V.H.P. Bueno & M.V. Sampaio. 2005.** Efeito da liberação inoculativa sazonal de *Lysiphlebus testaceipes* (Hym.: Aphidiidae) na população de *Aphis gossypii* (Hem.: Aphididae) em cultivo de crisântemo em casa-de-vegetação comercial. Bol. San. Veg. Plagas 31: 199-207.
- Salvadori, J.R., P.R.V.S. Pereira & M.T.B. Silva. 2005.** Manejo de pulgões. Rev. Cult. 75: 32-34.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. 2006.** Censo agropecuário. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 777p.
- SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. 2008.** Hortaliças minimamente processadas: estudos de mercado SEBRAE/ESPM. Rio de Janeiro, SEBRAE, 40p.

- SIA – Sistema de Informações sobre Agrotóxicos. 2012.** Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia> acesso em janeiro de 2012.
- Simelane, D.O., D.C. Steinkraus, & T.J. Kring. 2008.** Predation rate and development of *Coccinella septempunctata* L. influenced by *Neozygites fresenii*-infected cotton aphid prey. Biol. Control 44: 128-135.
- Starý, P., M. Sampaio & V.H.P. Bueno. 2007.** Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) and their associations related to biological control in Brasil. Rev. Bras. Entomol. 51: 107-118.
- Talpur, M.A. & R.D. Khuhro. 2004.** Relative occurrence and abundance of Mustard Aphid, *Lipaphis erysimi* (Kalt.) and their predators on rainbow and Oscar canola varieties. J. Asia-Pacific Entomol. 7: 215-219.
- Völkl, W., M. Mackauer, J.K. Pell & J. Brodeur. 2007.** Predators, parasitoids and pathogens, p. 187-233. In H. van Emden & R. Harrington (eds.), Aphids as crop pests. Wallingford, CAB International, 745p.
- Vuong, P.T., J. Kim, & Y. Song. 2003.** Overwintering two aphid species, *Lipaphis pseudobrassicae* and *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae), in southern greenhouse area in Korea. J. Asia-Pacific Entomol. 6: 63-67.
- Zhang, W.Q. & S.A. Hassan. 2003.** Use of the parasitoid *Diaeretiella rapae* (McIntoch) to control the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). J. Appl. Entomol. 127: 522–526.

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos municípios de Pernambuco, amostrados para a presença de afídeos em plantas de couve.

Município	Altitude (metros)	Longitude (W)	Latitude (S)
Camocim de São Félix	723	35°45'43"	08°21'31"
Chã Grande	470	35°27'42"	08°14'18"
João Alfredo	328	35°35'18"	07°51'21"
Pombos	208	35°23'45"	08°08'29"
Recife	22	34°56'42"	08°01'00"
Vitória de Santo Antão	156	35°17'29"	08°06'49"

Tabela 2. Frequência, em porcentagem, das médias de infestação de *Lipaphis erysimi*, *Myzus persicae* e *Brevicoryne brassicae* em plantas de couve entre os municípios de Pernambuco.

Espécies/município	Infestação (%)		
	<i>Lipaphis erysimi</i>	<i>Myzus persicae</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i>
Camocim de São Félix	14,1	13,3	28,9
Chã Grande	15,8	14,8	30,5
João Alfredo	9,6	8,7	--
Pombos	12,9	31,3	19,4
Recife	31,7	22,4	--
Vitória de Santo Antão	15,9	--	10,1
Probabilidade (χ^2); P	$\chi^2 = 240,40$; P<0,0001	$\chi^2 = 177,62$; P<0,0001	$\chi^2 = 244,64$; P<0,0001

Tabela 3. Frequência, em percentagem, das médias de infestação de *Lipaphis erysimi*, *Myzus persicae* e *Brevicoryne brassicae* em plantas de couve nos municípios de Pernambuco.

Espécies/município	Infestação (%)			Probabilidade (χ^2) Valor de P
	<i>Lipaphis erysimi</i>	<i>Myzus persicae</i>	<i>Brevicoryne brassicae</i>	
Camocim de São Félix	31,3	22,6	46,1	$\chi^2=58,89^{P<0,0001}$
Chã Grande	32,9	23,2	43,9	$\chi^2=54,64^{P<0,0001}$
João Alfredo	68,7	31,2	-	$\chi^2=7,85^{P=0,005}$
Pombos	27,9	43,0	30,3	$\chi^2=23,99^{P<0,0001}$
Recife	63,9	36,0	-	$\chi^2=87,09^{P<0,0001}$
Vitória de Santo Antão	74,6	-	36,0	$\chi^2=83,17^{P<0,0001}$

Tabela 4. Inimigos naturais identificados, por município de coleta, em afídeos infestando couve em Pernambuco.

Localidade	Espécie coletada	Inimigo natural
Camocim de São Félix	<i>Lipaphis erysimi</i> e <i>Brevicoryne brassicae</i>	<i>Lysiphlebus testaceipes</i>
Chã Grande	<i>Brevicoryne brassicae</i> <i>Lipaphis erysimi</i>	<i>Lysiphlebus testaceipes</i> <i>Lecanicillium muscarium</i>
Pombos	<i>Myzus persicae</i> <i>Lipaphis erysimi</i>	Syrphidae, <i>Cycloneda sanguinea</i> , <i>Lecanicillium muscarium</i> <i>Lecanicillium muscarium</i>
Recife	<i>Lipaphis erysimi</i>	<i>L. testaceipes</i> , Syrphidae, <i>Cycloneda sanguinea</i> , <i>Lecanicillium muscarium</i>
Vitória de Santo Antão	<i>Lipaphis erysimi</i>	<i>Lecanicillium muscarium</i>
João Alfredo	-	-

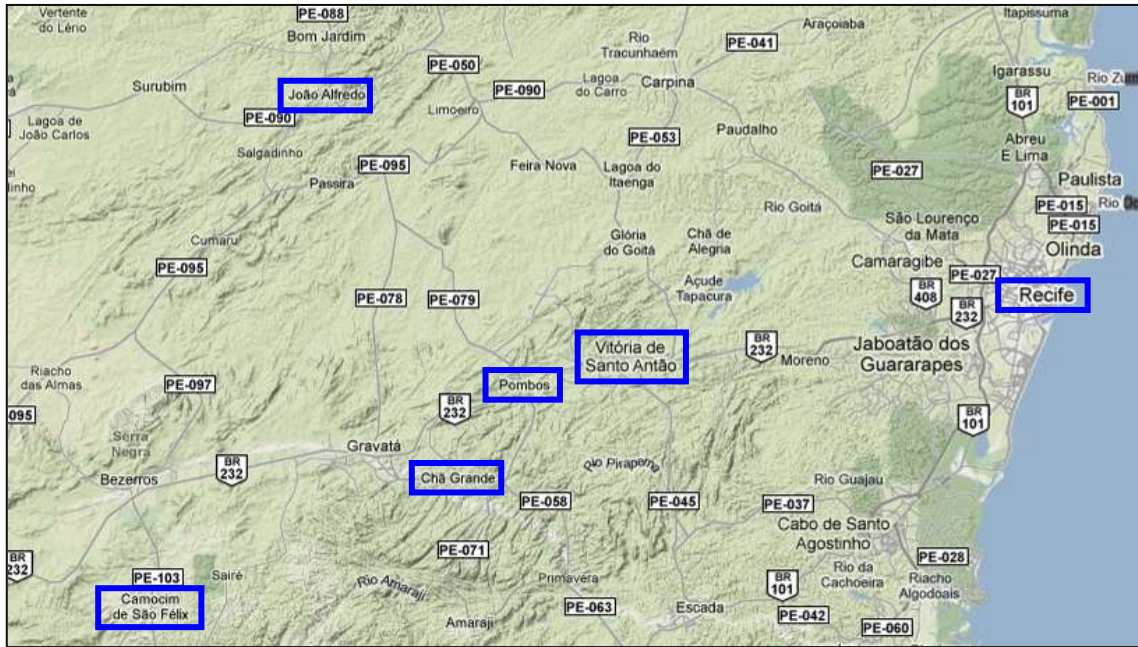


Figura 1. Distribuição espacial dos municípios (em destaque) onde foram amostradas plantas de couve para a avaliação de afídeos (imagem: Google[®]).

CAPÍTULO 3

AÇÃO DE ESPÉCIES DE HYPOCREALES E ÓLEO DE NIM (*Azadirachta indica* A. Juss.)
SOBRE *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) NO CULTIVO DA COUVE
(*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.)¹

RICARDO L. MELO², EDMILSON J. MARQUES², JOSÉ V. OLIVEIRA² E

DÁVILLA A. S. ALVES²

² Departamento de Agronomia – Entomologia, Univ. Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom
Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE

¹ Melo, R.L., E.J. Marques, J.V. Oliveira & D.A.S.Alves. Ação de espécies de Hypocreales e óleo de nim (*Azadirachta indica*) para controle de *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemíptera: Aphididae) no cultivo da couve (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.). A ser submetido ao Biological Control.

RESUMO – Fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales ao longo dos anos vêm sendo utilizados no controle biológico aplicado de diversas espécies de insetos-praga, assim como óleos essenciais, especialmente o óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.). Com a constatação do *status* de praga de *Lipaphis erysimi* (Kalt.) no estado de Pernambuco, junto ao complexo de afídeos que atacam a couve, tornou-se relevante o processo de seleção de linhagens de fungos entomopatogênicos e teste de compatibilidade com o óleo de nim para subsidiar o controle alternativo desta praga. Linhagens de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Lecanicillium* sp. foram testadas. As linhagens de *B. bassiana* URPE 27 e de *L. muscarium* URPE 28 foram as que demonstraram os melhores resultados, com as taxas de mortalidade de ninfas de *L. erysimi* de 83% e 77%, sobrevivência 2,1 e 3,3 dias e Concentração Letal (CL₅₀) de 2,4x10⁷con/ml e 7,3x10⁶con/ml, respectivamente. O óleo de nim, quando pulverizado sobre ninfas apresentou CL₅₀ de 0,2mL/l, e quando aplicado indiretamente de 3,7mL/l. A concentração de 1,25mL/l causou mortalidade de 80% das ninfas em 24horas e concentrações acima de 2,5mL/l causaram efeito fitotóxico nas plantas. A mistura com as linhagens URPE 27 e URPE 28 causou efeitos não significativos nos fungos, sendo compatíveis.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico aplicado, afídeos, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium muscarium*

ACTION OF HYPOCREALES SPECIES AND NEEM OIL (*Azadirachta indica* A. Juss.) ON
Lipaphis erysimi (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) CONTROL IN KALE CULTURE
(*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.)

ABSTRACT – Entomopatogenics fungi of the order Hypocreales over the years have been used in biological control applied to several species of pest insects, as well as essential oils, especially the Neem Oil (*Azadirachta indica* A. Juss.). With the finding of the 'status' of pest of *Lipaphis erysimi* (Kalt.) in the State of Pernambuco, near the complex of aphids which attack the Kale, became with the selection process of entomopatogênicos fungal strains and compatibility testing with the Neem Oil for subsidising the alternate control of this pest. Strains of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Lecanicillium* sp. were tested. The strains *B. bassiana* URPE 27 and *L. muscarium* URPE 28 were those that showed the best results, with *L. erysimi* nymphs mortality of 83% and 77%, survival 2.1 and 3.3 days and Lethal Concentration (LC₅₀) of $2,4 \times 10^7$ con/ml and 7.3×10^6 con/ml, respectively. The neem oil, when sprayed on nymphs presented LC₅₀ of 0.2 ml/l, and when applied indirectly to 3.7 ml/l. The concentration of 1.25 ml/l caused 80% nymphs mortality in 24 hours and concentrations above 2.5 ml/l caused a phytotoxic effect on the plants. The mixture with the strains URPE 27 and URPE 28 caused no significant effects on fungi, being compatible.

KEY WORDS: Applied biological control, aphids, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium muscarium*

Introdução

A couve-folha (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.) é afetada com o ataque de afídeos de diversas espécies (Filgueira 2008, Martins 2011). No Brasil, as espécies *Lipaphis erysimi* (Kalt.), *Brevicoryne brassicae* (L.) e *Myzus persicae* (Sulzer) figuram como as mais importantes na infestação da cultura (Gallo *et al.* 2002, Filgueira 2008).

Além das injúrias e dos danos diretos, a infestação por *L. erysimi* está associada à transmissão de vírus, como o Vírus do anel negro da couve e Mosaico da couve flor, rabanete e nabo (Peña-Martinez 1992, Gallo *et al.* 2002, Salvadori *et al.* 2005, Liu & Sparks Jr. 2011) que reduzem significativamente a produção. O controle desta praga necessita de uma atenção intensificada, devido à ausência de produtos registrados para a espécie na cultura (MAPA 2012, SIA 2012).

Avaliações da ANVISA (2011) demonstraram irregularidades no uso de agrotóxicos na cultura da couve em todo o Brasil. De um total de 31,9% de amostras consideradas insatisfatórias com uso de agrotóxicos, 24,3% corresponderam ao uso de produtos não autorizados, 2,8% com excedentes no Limite Máximo de Resíduos (LMR) e 4,9% da associação das duas irregularidades, ratificando a relevância desta problemática de controle de pragas na cultura.

A busca por um método alternativo de controle nesta situação é extremamente relevante, considerando que a couve é uma das hortaliças mais consumidas no mercado nacional *in natura* e minimamente processada (SEBRAE 2008, Bevilacqua 2011), e que aproximadamente 65% dos mais de 33 mil produtores rurais de couve concentram a produção em áreas com menos de 10 hectares, em sistema de agricultura familiar (SEBRAE 2006).

Espécies de fungos entomopatogênicos como, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare and Gams incidem naturalmente sobre pulgões (Alves 1998, Sosa-Gomez 2005, Araújo Júnior *et al.* 2009) e alguns estudos vêm sendo desenvolvidos

para avaliar a eficiência de linhagens de algumas espécies visando à aplicação em programas de controle biológico (Baverstock *et al.* 2006, Kim & Kim 2008, Roditakisa *et al.* 2008, Araújo Júnior *et al.* 2009). O procedimento de seleção de espécies e isolado patogênicos e mais virulento é uma etapa extremamente relevante para um controle biológico eficiente com o uso de fungos entomopatogênicos, devido, principalmente, às particularidades inerentes ao patógeno no processo infectivo, e da influência de fatores ambientais nesse processo (Alves 1998, Lenteren 2009, Goettel *et al.* 2010).

Alternativamente, para o controle de afídeos, é possível se associar fungos entomopatogênicos com o óleo de nim, cujo principio ativo é um complexo de elementos químicos, com predominância da Azadirachtina (Dev 1997, Vieira & Fernandes 1999, Mossini & Kimmelmeier 2005), que apresenta ação inseticida (Pavela *et al.* 2004, Kumar *et al.* 2005) e que vem sendo avaliado no controle destes insetos (Santos *et al.* 2004, Gonçalves & Bleicher 2006, Zehnder *et al.* 2007, Araújo Júnior *et al.* 2009).

Estudos comparando parâmetros biológicos de fungos entomopatogênicos submetidos à ação de compostos químicos são corriqueiros e resultados normalmente demonstram a interferência destes produtos nos entomopatógenos (Clark *et al.* 1982), com respostas que podem ser positiva ou negativa para o fungo (Alves *et al.* 1998, Marques *et al.* 2004, Goettel *et al.* 2010).

O objetivo deste trabalho foi selecionar linhagens dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin com maior virulência a *L. erysimi*, assim como avaliar a aplicação de óleo de nim na mortalidade do pulgão, e seus efeitos quando associados a estas linhagens.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Insetos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Criação de *Lipaphis erysimi*. Os insetos foram criados em plantas de couve var. manteiga produzidas em vasos plásticos de 300mL, contendo substrato de plantio, húmus de minhoca e solo, na proporção 1:1:2, em casa-de-vegetação, com temperatura média de 30 ± 5 °C e umidade relativa de $70 \pm 10\%$.

Fungos Entomopatogênicos e Obtenção das Suspensões. Vinte e duas linhagens de fungos entomopatogênicos foram utilizadas nos experimentos (Tabela 1) após terem sido revigoradas em lagartas de segundo ínstar de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). O procedimento consistiu, inicialmente, em isolar os fungos em meio de cultura Batata Dextrose Agar com antibiótico (Estreptomicina) (BDA + A) que após 10 dias de incubação em câmara climatizada BOD sob temperatura de 26 ± 1 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h. Preparação das suspensões foi realizada com água destilada e esterilizada contendo espalhante adesivo (Tween80[®] 0,02%) (ADE + EA) e concentração superior a 10^7 conídios.mL⁻¹.

As lagartas foram imersas nas suspensões durante dois segundos e, em seguida, armazenadas, individualmente, em caixas plásticas com divisórias contendo pedaços de cana-de-açúcar para alimentação. Diariamente verificou-se a presença de lagartas mortas e com esporulação dos fungos, que foram reisolados primeiramente em BDA + A durante 10 dias e em seguida, em placa cheia em meio completo (MC) (Alves 1998) para utilização nos bioensaios.

Para a aplicação das linhagens revigorados em *L. erysimi* nos testes de patogenicidade, virulência e determinação da Concentração Letal (CL), o número de conídios na suspensão padrão

foi determinado por quantificação com auxílio do hemacitômetro (Câmara de Neubauer, campo superior).

Posteriormente, a suspensão padrão foi ajustada para a obtenção da concentração 1×10^7 conídios.mL⁻¹, para utilização no teste de patogenicidade/virulência. Para a determinação da CL das linhagens de *B. bassiana* (URPE 27) e *L. muscarium* (URPE 28) utilizou-se as concentrações 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 conídios mL⁻¹.

Viabilidade das Linhagens. Durante cada procedimento de aplicação dos fungos em *L. erysimi* nos bioensaios verificou-se a viabilidade das linhagens, observando-se a germinação dos conídios. O procedimento foi realizado através da aplicação de 0,5mL da suspensão 1×10^7 con.mL⁻¹ em placas de Petri contendo BDA+A. As placas foram mantidas em câmara tipo BOD, nas mesmas condições já referidas. Para aferir a germinação foram contados, em média, 250 conídios/placa, em duas repetições, sob microscópio óptico de luz e 400x de aumento. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam a formação do tubo germinativo após 20 horas (Alves 1998).

Bioensaios. Ninfas de 24 – 48 horas de idade, de primeiro e segundo ínstaes (Godoy & Cividanes 2002), respectivamente, foram utilizadas nos bioensaios. O substrato utilizado foram discos de folha de couve manteiga, provenientes de cultivo orgânico, depositados sobre meio de cultura Agar-água (1%). Foram realizados testes de patogenicidade e virulência para selecionar as melhores linhagens e posteriormente, verificou-se o efeito da concentração de conídios na mortalidade dos afídeos. As linhagens eleitas como mais eficazes foram avaliadas quanto à compatibilidade *in vitro* e efeito sinérgico com óleo de nim (Neemseto Cruangi® neem do Brasil LTDA) que contém Azadirachtina-A, Azadirachtina-B, Nimbina e Salanina = 2,389ppm/litro. Para confirmar o agente causal da mortalidade de *L. erysimi*, os insetos foram submetidos à

câmara úmida durante dez dias em BOD nas condições citadas para verificação da esporulação dos fungos.

Patogenicidade/Virulência das Linhagens. Discos de folha de couve manteiga com 5cm de diâmetro, contendo dez ninfas de *L. erysimi* foram depositados em placas de Petri plástica com 9cm de diâmetro, com tampa perfurada e vedada com tela anti-afídica. As suspensões fúngicas foram aplicadas, em câmara de fluxo laminar, diretamente sobre os discos de folha contendo os insetos, com pulverizador microatomizador “Paasche Airbrush” elétrico, modelo “VL”, acoplado a um compressor regulado para 5 libras de pressão. Foram utilizadas dez repetições por tratamento, aplicando-se 1 ml de suspensão em cada repetição. Diariamente, verificou-se a mortalidade das ninfas, como parâmetro para efeito do cálculo da percentagem de mortalidade confirmada e sobrevivência.

Determinação das Concentrações Letais.

Fungos Entomopatogênicos. Para a determinação da CL das linhagens, foram recortados discos de folhas de couve manteiga com 3 cm de diâmetro, que foram imersos durante 1 minuto nas suspensões fúngicas nas diferentes concentrações testadas e postas para secar no Laboratório de Patologia em ambiente aberto, sob temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa de $70 \pm 10\%$. Após este procedimento, os discos de folha foram depositados em potes de acrílico de mesmo diâmetro e cinco centímetros de altura, contendo meio Ágar-água e com tampa perfurada. Foram transferidas dez ninfas de *L. erysimi*, sendo posteriormente armazenadas em BOD nas condições de bioensaio citadas. Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições, registrando-se a mortalidade confirmada diariamente.

Óleo de Nim. A determinação das concentrações letais do óleo de nim foi realizada em duas etapas utilizando emulsões nas concentrações 1,0; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0mL/l. A primeira etapa consistiu na aplicação direta de 1 ml de emulsão sobre dez ninfas de primeiro e segundo ínstaes

com o pulverizador microatomizador anteriormente citado e, a segunda, através da imersão dos discos de folha durante 1 minuto, que após secos fez-se a transferência dos insetos com as características anteriormente citadas. As características do reservatório, meio de cultura e condições de armazenamento foram as mesmas utilizadas para os fungos entomopatogênicos, com a avaliação da mortalidade realizada após 24 horas. Foram utilizadas nove e cinco repetições com dez insetos cada para os tratamentos por pulverização e por imersão, respectivamente.

Compatibilidade *In Vitro* com Óleo de Nim. Para checar os efeitos do óleo de nim em colônias de *B. bassiana* URPE 27 e *L. muscarium* URPE 28, foram inoculados em BDA + A, contendo três diferentes concentrações do produto comercial Neemseto, mais uma testemunha, que constou do inóculo dos fungos no meio de cultura isento do produto.

As misturas foram realizadas em câmara de fluxo laminar, em meio de cultura, ainda líquido, e com temperatura inferior a 40 °C (Alves 1998) nas concentrações 1,25; 2,5 e 5,0 mL/l, sendo utilizado o volume de 20 ml por placa de Petri em cada repetição por tratamento. Após solidificação do meio de cultura, procedeu-se à inoculação dos linhagens em três pontos equidistantes da placa, em três repetições.

Aos cinco, sete e nove dias após a inoculação foi tomada a medida de diâmetro da colônia para o cálculo da área total, e no nono dia contou-se o número médio de conídios em três colônias, e a viabilidade após 20 horas. Para verificar a compatibilidade foi calculado o Índice Biológico apresentado em Alves (2007), de acordo com a fórmula abaixo:

$IB = [47 (CV) + 43 (ESP) + 10 (GERM)] / 100$, onde:

IB = Índice biológico

CV= Porcentagem de crescimento vegetativo em relação à testemunha

ESP = Porcentagem de esporulação das colônias em relação à testemunha

GER = Porcentagem de germinação dos conídios

Os valores de IB para a classificação dos produtos são:

Tóxico 0-41, Moderadamente tóxico 42-66 e Compatível > 66.

Análises Estatísticas. Os dados de mortalidade média confirmada e os parâmetros de compatibilidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA – Proc. ANOVA) e a análise de sobrevivência foi submetida aos testes Log-Rank, após curvas de sobrevivência serem estimadas pelo método Kaplan-Meier, por comparação de pares de isolados usando o Proc Lifetest do SAS (SAS Institute, 1999-2001). Quando necessários os dados foram submetidos à transformação $\sqrt{x + 0,5}$ e as médias foram comparadas através do teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para verificação das CLs, os dados de mortalidade obtidos foram submetidos à análise de Probit (Proc. PROBIT LOG₁₀), utilizando-se do mesmo programa. Foram estimados os valores de CL₅₀ e CL₉₅ além da inclinação da reta. Os dados de mortalidade de *L. erysimi* nos bioensaios foram corrigidos através da fórmula de Abbott (1925).

Os dados de área média da colônia e a interação dos tratamentos com o tempo foram submetidos a análise de variância (ANOVA – Proc. GLM) sendo as médias comparadas através do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Todas as análises foram realizadas no programa computacional SAS (SAS Institute 1999-2001).

Resultados e discussão

Avaliação da Viabilidade. Das vinte e duas linhagens testadas, a grande maioria apresentou índices de viabilidade superiores a 80%, refletindo na qualidade destas. Em duas linhagens apenas, a viabilidade foi considerada insatisfatória, que foram ESALQ 561 isolado de *Solenopsis* sp. com aproximadamente 60% de conídios viáveis e a linhagem E 6, procedente de lagartas de *D. saccharalis* com apenas 40% de conídios viáveis (Tabela 1). Como estes índices foram muito

abaixo do esperado, estas duas linhagens foram excluídas do restante dos estudos (virulência, Concentração Letal, compatibilidade). A porcentagem de germinação de esporos, o seu tamanho relativo e a sua habilidade de penetrar no hospedeiro são determinantes e estão associados à virulência de isolados (Vu *et al.* 2007).

A utilização de linhagens com altos índices de conídios viáveis proporciona maior segurança na obtenção de bons resultados nos estudos de virulência, sendo uma etapa imprescindível para o início deste tipo de estudo.

Estudo da Virulência das Linhagens de Fungos Entomopatogênicos. Os resultados de mortalidade confirmada estão apresentados na Tabela 2. As melhores porcentagens obtidas foram para *B. bassiana* E483, com média de 76,6% e *B. bassiana* URPE 27 com aproximadamente 83% ($F_{10, 99} = 24,41$; $P < 0,0001$), e este último com o efeito mais acentuado na sobrevivência de ninfas de segundo ínstar de *L. erysimi*, com média de 2,1 dias ($\chi^2 = 181,35$; $P < 0001$) (Tabela 2, Fig. 1).

Valores aproximados foram registrados nos estudos realizados por Araújo Júnior *et al.* (2009), onde a mortalidade de ninfas do segundo ínstar de *L. erysimi* variaram de 22 a 90%, com a maior taxa associado a *B. bassiana* CG 001 na concentração 10^7 con./ml.. Os autores registraram média de sobrevivência das ninfas de 4,4 dias para o isolado.

Aplicação de conídios e blastósporos de *B. bassiana* 829 causaram mortalidades de 63,8% e 77,1% de *A. gossypii*, em Tempo Letais (TL_{50}) de 4,6 e 5,0 dias, respectivamente. Estas variações demonstram que linhagens de *B. bassiana*, são potencialmente capazes de controlar populações de afídeos em diferentes sistemas, e que *B. bassiana* URPE 27 mantém-se em um padrão de virulência coerente com outros estudos.

Quando submetidas à ação dos fungos as médias de mortalidade de ninfas de *L. erysimi* variaram de 43 a 67% ($F_{3, 36} = 16,68$; $P < 0,0001$) e sobrevivência de 2,5 a 4,5 dias ($\chi^2 = 51,32$; $P < 0001$) (Tabela 2, Fig. 2), com *M. anisopliae* E1022 demonstrando os resultados mais

satisfatórios. Os resultados de Araújo Júnior *et al.* (2009) variaram entre 14 e 64% de mortalidade e 3,8 a 6,4 dias de sobrevivência para as ninfas de *L. erysimi* tratadas com suspensão de conídios deste fungo. Os autores consideraram *M. anisopliae* CG30 como mais eficaz no controle da praga, por apresentar maior percentual de mortalidade e menor sobrevivência média das ninfas.

As linhagens de *L. muscarium* com maiores percentagens de mortalidade confirmada foram *B. bassiana* (URPE 28 e URPE-29) com médias de 77% e 66%, respectivamente ($F_{5, 54} = 26,27$; $P < 0,0001$) (Tabela 2), com sobrevivência média de 3,3 dias para ambos ($\chi^2 = 55,85$; $P < 0001$) (Tabela 2, Fig. 3), sendo o melhor resultado verificado na linhagem 1397, com sobrevivência média de ninfas de 24-48 de apenas 2,5 dias.

Vários autores avaliaram isolados de *Lecanicillium* sobre espécies de afídeos, tanto de produtos formulados quanto de obtidos de solos ou de insetos. Hall (1976a) observou que adultos de *Macrosiphoniella sanborni* (Gillette) quando tratados com *L. lecanii* (10^6 con./ml) tiveram mortalidade entre 4,0 a 6,0 dias, mas quando tratados com uma suspensão 10^8 com 15% de conidiósporos e 30% de blastósporos, a mortalidade ocorre já nas primeiras 48 horas, contudo, este isolado não provocou efeitos na fecundidade das fêmeas.

Kim *et al.* (2008) aplicando *L. attenuatum* CS625 em *A. gossypii* com três dias de idade determinaram TL_{50} de 2,7 e 3,3 dias e mortalidade de 100,0% e 97,6% quando aplicados conídios e blastósporos do fungo, respectivamente. Loureiro *et al.* (2004) estimaram TL_{50} para *L. lecanii* no pulgão do Pinus, *Cinara atlantica* (Wilson), em média 3,83 dias, quando aplicaram uma concentração de 10^8 con./ml, com mortalidade de 86% após cinco dias da aplicação.

Lecanicillium muscarium promoveu os melhores resultados de Tempos Letais (TL_{50}), variando de 1,58 a 2,43 dias para *M. persicae* e 1,4 a 1,5 dias para *A. gossypii*, sendo os melhores resultados observados quando se comparou *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Nomurea* e *Metarhizium* (Vu *et al.* 2007).

Os autores Kim *et al.* (2008) avaliando *L. longisporum* presente no produto comercial Vertalec[®] aplicado em plantas de pepino, observaram que o produto causou mortalidade cumulativa de 100% de ninfas de *A. gossypii* após 11 dias da aplicação com TL₅₀ estimado em 6,5 dias. Observou-se, ainda, que o fungo reduziu a sobrevivência média dos afídeos.

Therioaphis maculata (Buckton), *Acyrtosiphon pisum* (Harris), *Metopolophium dirhodum* (Walker), *Rhopalosiphon padi* (L.) e *M. persicae* foram submetidos à ação de *L. lecanii* ($13,4 \times 10^6$ e $20,6 \times 10^6$ con./ml) por Harper & Huang (1986). As reduções de populações foram de 37-75%, 60-97%, 32-85%, 8-32%, 50-100% para as espécies, respectivamente, não sendo significativo apenas para *R. padi*.

Nesta pesquisa, as médias de mortalidade de ninfas de *L. erysimi* foram aproximadas, quando os insetos foram tratados com *B. bassiana* URPE 27 e *L. muscarium* URPE 28 respectivamente. Suportado por estes resultados, determinou-se a continuidade dos estudos utilizando apenas estas duas linhagens. Aliado a isso, *L. muscarium* URPE 28 foi detectado em *L. erysimi* coletados no município de Chã Grande, PE, causando epizootia naturalmente, sendo considerado como um indicativo de que seja potencialmente mais eficaz.

A origem do hospedeiro é um fator importante no estudo de virulência dos isolados. Estudos desenvolvidos por Kim & Kim (2008) ao avaliarem a virulência de isolados de *L. attenuatum* procedentes de afídeos e de mosca branca para controle de *A. gossypii*, demonstraram melhores resultados de controle da praga quando o isolado utilizado procedia de afídeo, no entanto, outros estudos também demonstraram que não existe garantia de que pelo fato do isolado ser originário da mesma espécie ou ordem, seja portador de maior eficácia (Hall 1982).

Os estudos com *M. anisopliae* foram descontinuados em função de que os fungos Hypocreales mais comumente encontrados em epizootias naturais de *L. erysimi* e de outros afídeos são *Lecanicillium* spp., *B. bassiana* e *Isaria* spp. (Alves 1998, Chen *et al.* 2008) e

normalmente, apresentam os melhores resultados em estudos de laboratório e casa-de-vegetação (Hall & Burges 1979, Hall 1980, Vu *et al.* 2007, Kim & Kim 2008, Araújo Júnior *et al.* 2009).

Determinação das Concentrações Letais.

Fungos entomopatogênicos. Os valores de inclinação das curvas de concentração-mortalidade de *B. bassiana* URPE 27 e *L. muscarium* URPE 28 encontram-se na Tabela 3. *L. muscarium* URPE 28 mostrou-se levemente mais virulento a ninfas de *L. erysimi*, baseando-se no valor de inclinação da reta, que é sutilmente mais elevada em comparação com *B. bassiana* URPE 27. Esta observação aplica-se também quando se verifica os valores apresentados das CL₅₀ de $7,3 \times 10^6$ conídios/mL para *L. muscarium* URPE 28 e $2,44 \times 10^7$ conídios/mL para *B. bassiana* URPE 27 (Tabela 3). Maiores inclinações de reta indicam que uma menor variação nas concentrações aplicadas para o controle da praga promoverá um maior efeito de mortalidade, conforme pode ser observado na figura 4.

Estudos com avaliação de CL₅₀ são muito frequentes para testar os efeitos da toxicidade de produtos químicos para pragas e inimigos naturais, sendo aplicados de maneira menos frequente em produtos biológicos. Os resultados obtidos podem ainda, sofrer variações entre os ensaios de campo e casa-de-vegetação (Hall & Burges 1979) em função, principalmente, das variações dos fatores abióticos como temperatura, umidade relativa e incidência de raios ultravioletas (Hall & Burges 1979, Hall 1980, Vu *et al.* 2007, Kim & Kim 2008, Kim *et al.* 2010).

Para o pulgão *Macrosiphoniella sanborni* (Gillette) foi estimada por Hall (1976b) valor médio de CL₅₀ de $2,3 \times 10^5$ con./ml, em teste com *L. lecanii*, Kim & Kim (2008) determinaram CL₅₀ de $5,85 \times 10^5$ con./ml para *L. attenuatum* CS625, após cinco dias de avaliação para *A. gossypii* e Vu *et al.* (2007), estimaram para *L. lecanii* 41185 $6,55 \times 10^5$ con./ml para *M. persicae*, seis dias após a aplicação. Estes valores foram relativamente menores, quando comparados a *L.*

muscarium URPE 28 aplicado em ninfas de *L. erysimi*, podendo esta diferença estar associada a fatores relacionados ao patógeno ou hospedeiro.

Óleo de Nim. O nim, quando pulverizado sobre as ninfas de primeiro/segundo ínstares de *L. erysimi* foi extremamente mais tóxico, em relação à aplicação por imersão dos discos de folha com base nos dados de inclinação das curvas de concentração-mortalidade que foram de 2,01 e 0,69 respectivamente (Tabela 3), corroborados pelos valores de CL_{50} de 0,2mL/l para nim pulverizado e 3,7mL/l para nim em imersão (Fig. 5).

Após 24 horas 1,25mL/L pulverizado sobre as ninfas de *L. erysimi*, causou mortalidade de 80% após 24h. Quando aplicado por imersão, a mortalidade após 24h foi de apenas 14% na concentração de 1,25mL/L, e 42% com 10,0mL/L do óleo de nim (Fig. 5). Os índices de mortalidade obtidos por Araújo Júnior *et al.* (2009), quando submeteram as ninfas de *L. erysimi* as emulsões de Neemseto[®], a 2,0% e 1,0% foram de 90% e 81%, quando pulverizadas, e de 79% e 77% quando as folhas foram imersas nas emulsões, respectivamente.

Aplicação de óleo de nim em afídeos adultos de *M. persicae* e *B. brassicae* no cultivo de couve, causou mortalidade após 24 horas de 10% e 33% respectivamente, em estudos realizados por Carvalho *et al.* (2008). Os autores verificaram que o produto é tóxico para *M. persicae* somente em concentrações iguais ou maiores que 1%, não ultrapassando 60% de mortalidade e que *B. brassicae* é mais susceptível ao produto.

Para o afídeo *A. gossypii*, Breda *et al.* (2011) verificaram que ao aplicar extrato de sementes de nim, a mortalidade de adultos foi de 64% na concentração de 0,25%, atingindo o máximo de mortalidade (100%) na concentração 1,5%. A aplicação de emulsão proporcionou mortalidades inferiores, sendo de 12% e 92%, nas concentrações de 0,25% e 2,5%, respectivamente.

Nas concentrações acima de 2,5mL/L foram observados efeitos fitotóxicos do óleo de nim, independente da forma de aplicação, caracterizados por manchas amarronzadas distribuídas de

forma aleatória nos discos de folha. Efeitos fitotóxicos foram relatados por Nisbet *et al.* (1996) quando aplicou Azadirachtina para o controle de *M. persicae* em plantas *Nicotiana clevelandii* A. Gray., onde concentrações de 500ppm causaram deformações (encurtamento ou alongamento) de folhas e efeitos fitotóxicos, sendo este efeito não observado nas concentrações de 50 a 150ppm.

Este fator é limitante para o uso dessas concentrações superiores às indicadas acima, em plantas de couve em função da comercialização do produto. A indicação do produtor de Neemseto[®] é de aplicação de calda na concentração de 10,0 mL/L para controle dos pulgões, contudo, os danos causados nas folhas impossibilitam a sua aplicação, apesar de causar mortalidade de 100% das ninfas em 24h.

Vale ressaltar que, mesmo não causando mortalidade, concentrações inferiores de óleo de nim podem causar outros efeitos deletérios nos insetos, como deterrência alimentar, deformações, repelência (Schumutterer 1990) e na biologia, que merecem mais estudos.

Nisbet *et al.* (1996) verificaram que tratamentos com Azadirachtina nas concentrações de 100 e 150 ppm resultam na produção em grande número de embriões de *M. persicae* escurecidos e inviáveis, variando nas proporções de 0,82 e 0,6, e que a aplicação de 500ppm de Azadirachtina reduz a aquisição do Potato Leafroll Vírus (PLRV) por *M. persicae* em plantas de *N. clevelandii*, devido a ação anti-alimentar (deterrência alimentar), contudo, não interfere na sua capacidade infectiva.

Em insetos da ordem Lepidoptera, por exemplo, estes efeitos foram verificados. Azadirachtina causa mortalidade de *Heliothis virescens* (Fabricius) promovem ecdises incompletas e atrasam o desenvolvimento, principalmente no terceiro ínstar (Koppenhöfer & Kaya 2000), e em *Spodoptera Litura* (Fabricius) ocorre o aumento do período larval e pupal, redução da longevidade de fêmeas e fecundidade (Nathan & Kalaivani 2006).

Compatibilidade *In vitro* com Óleo de Nim. As misturas de diferentes concentrações de óleo de nim e *B. bassiana* URPE 27 e *L. muscarium* URPE 28 foram compatíveis de acordo com Alves (2007), sendo os Índices Biológicos (IB) superiores a >66 em todas as combinações (Tabela 4). Independente da linhagem e da concentração utilizada de óleo de nim *in vitro* não foi observada redução da viabilidade dos conídios.

Para *B. bassiana* URPE 27 reduziu o crescimento vegetativo em todas as combinações, contudo, não foi significativo em comparação com a testemunha quando se utilizou a maior concentração de óleo de nim (5,0mL/l), podendo esta ter causado um possível efeito de hormoligose, que pôde ser observado com um aumento significativo no número de conídios produzido pelas colônias ($37,75 \times 10^7$ con/mL) ($F_{3,28} = 43,24$; $P < 0,0001$) (Tabela 4).

Alteração no padrão reprodutivo de *B. bassiana* URPE 27 foi notória. Em baixa concentração o óleo de nim não causou nenhum tipo de efeito na produção de conídios, contudo na concentração superior (2,5mL/L) houve uma redução, estatisticamente, significativa, demonstrando que este linhagem é sensível a variações na concentração do óleo de nim em associação, tendo um efeito variável (Tabela 4).

Considerando a interação da área da colônia da linhagem avaliada durante três períodos (cinco, sete e nove dias) houve efeito significativo ($F_{11,60} = 20,16$; $P < 0,0001$) indicando que as colônias aumentaram significativamente de tamanho com o avanço do tempo (Fig. 6).

O formato das colônias sofreu alterações macroscópicas com modificações na aparência, características de crescimento como circunferência e altura da colônia que permaneceram com suave elevação, contudo, sem modificar a coloração (Fig. 8).

Lecanicillium muscarium URPE 28 sofreu redução significativa no crescimento vegetativo que se manteve semelhante em todas as concentrações de óleo de nim. O número médio de conídios produzidos por colônia não sofreu efeito significativo, quando comparados à testemunha

($F_{3, 28} = 2,49$; $P = 0,081$), contudo, apresentou aumento numérico de 28,8%, na concentração 1,25mL/l de óleo de nim. Modificações do formato da colônia foram observadas, sendo, contudo menos acentuados que na linhagem *B. bassiana* URPE 27 (Fig. 9). A interação dos tratamentos e tempo foram significativos ($F_{11, 60} = 77,02$; $P < 0,0001$) (Fig. 7).

Estes efeitos foram relatados por Araújo Júnior *et al.* (2009), quando verificaram que não houve efeito nas viabilidades de *B. bassiana* CG 001 e de *M. anisopliae* CG 30, tendo alguma interferência no crescimento vegetativo das linhagens, sem contudo, serem consideradas incompatíveis quando submetidas as concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5% do óleo de nim *in vitro*.

Ensaio de compatibilidade com fungos entomopatogênicos já foram comumente realizados. Bardin *et al.* (2008), submetendo *L. muscarium* (Mycotal®) na concentração $6,5 \times 10^6$ com/mL verificaram que crescimento e diâmetro da colônia não foram afetados pela presença de extrato de Milsana (*Reynoutria sachalinensis* (giant knotweed)) a 0,3% v/v, com médias de 2,28 mm/dia e 27mm em meio de cultura contendo apenas BDA, e 2,21mm/dia e 27,2mm, em combinação para os parâmetros respectivamente, sendo considerados compatíveis.

Azadirachtina tem se mostrado compatível com os fungos *Trichoderma harzianum* Rifai, *B. bassiana*, *L. lecanii* e *M. anisopliae* (Morais *et al.* 2009) e com outros agentes de controle biológico, como o Vírus da Granulose (VG) e Nucleopoliedrovírus (NPV) (Koppenhöfer & Kaya 2000, Nathan & Kalaivani 2006).

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de bolsa de estudos ao primeiro autor.

Literatura Citada

- Abbott, W.S.A. 1925.** Method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Alves, S.B. 1998.** Fungos entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. 2ª ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B., M.L. Haddad, M. Faion, G.C. Batista & L.S. Rossi-zalaf. 2007.** Novo índice biológico para classificação da toxicidade de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. Anais do X Simpósio de Controle Biológico – Siconbiol, Brasília – DF (CD-Room).
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2011.** Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório de atividades de 2010. Gerência Geral de Toxicologia. Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 26p.
- Araújo Júnior J.M.A, E.J. Marques & J.V. Oliveira. 2009.** Potencial de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e do óleo de nim no controle do pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). Neotrop. Entomol. 38: 520-525.
- Bardin, M, J. Fargues & P.C. Nicot. 2008.** Compatibility between biopesticides used to control grey mould, powdery mildew and whitefly on tomato. Biol. Control 46: 476-483.
- Baverstock, J., H.E. Roy, S.J. Clark, P.G. Alderson & J.K. Pell. 2006.** Effects of fungal infection on the reproductive potential of aphids and their progeny. J. Invertebr. Pathol. 91: 136-139.
- Bevilacqua, H.E.C.R. 2011.** Classificação das hortaliças, p.1-6. In H.E.C.R. Bevilacqua (ed.), Cultivo de hortaliças. São Paulo, Prefeitura de São Paulo, 85p.
- Breda, M.O., J.V. Oliveira, E.J. Marques, R.G. Ferreira & M.F. Santana. 2011.** Inseticidas botânicos aplicados sobre *Aphis gossypii* e seu predador *Cycloneda sanguinea* em algodão colorido. Pesqu. Agropecu. Bras. 46: p.1424-1431.

- Carvalho, G.A., N.M. Santos, E.C. Pedroso & A.F. Torres. 2008.** Eficiência do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) no controle de *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) e *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hemiptera: Aphididae) em couve-manteiga *Brassica oleracea* Linnaeus var. *acephala*. Arq. Inst. Biol. 75: 181-186.
- Chen, B., Z.Y. Li & M.G. Feng. 2008.** Occurrence of entomopathogenic fungi in migratory alate aphids in Yunnan Province of China. BioControl 53: 317–326.
- Clark, R.A., R.A. Casagrande & D.B. Wallace. 1982.** Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. Environ. Entomol. 11: 67-70.
- Dev, S. 1997.** Insecticides of natural origin. Amsterdam, Harwood Academic Publ. 352p.
- Filgueira, F.A.R. 2008.** Brassicáceas – couves e plantas relacionadas, p. 279-299. In F.A.R. Filgueira (ed.), Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ed. Viçosa, Editora UFV, 421p.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Godoy, K.B. & F.J. Cividanes. 2002.** Tabelas de esperança de vida e fertilidade para *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em condições de laboratório e campo. Neotrop. Entomol. 31: 41-48.
- Goettel, M.S., J. Eilenberg & T. Glare. 2010.** Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations, p. 387-432. In I.G. Lawrence & S.G. Gill (eds.), Insect control biological and synthetic agents. Orlando, Elsevier, 470p.
- Gonçalves, M.E.C. & E. Bleicher. 2006.** Atividade sistêmica de azadiractina e extratos aquosos de sementes de nim sobre o pulgão-preto em feijão-de-corda. Rev. Ciên. Agron. 37: 177-181.

- Hall, R.A. 1976a.** *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. J. Invertebr. Pathol. 28: 389-391.
- Hall, R.A. 1976b.** A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* conidiospores on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. J. Invertebr. Pathol. 27: 41-48.
- Hall, R.A. 1980.** Control of aphids by the fungus, *Verticillium lecanii*: Effect of spore concentration. Entomol. Exp. Appl. 27: 1-5.
- Hall, R.A. 1982.** Control of whitefly, *Trialeurodes vaporarum* and cotton aphid, *Aphis gossypii* in glasshouses by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. 101: 1-11.
- Hall, R.A. & H.D. Burges. 1979.** Control of aphids in glasshouses with the fungus, *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. 93: 235-246.
- Harper, A.M. & H.C. Huang. 1986.** Evaluation of the entomophagous fungus *Verticillium lecanii* (Moniliales: Moniliaceae) as a control agent for insects. Environ. Entomol. 15: 281-284.
- Kim, J.J. & K.C. Kim. 2008.** Selection of highly virulence isolates of *Lecanicillium attenuatum* against cotton aphid. J. Asia-Pacific Entomol. 11: 1-4.
- Kim, J.J., M.S. Goettel & D.R. Gillespie. 2008.** Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec[®] for simultaneous suppression of cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, on potted cucumbers. Biol. Control 45: 404-409.
- Kim, J.S., J.Y. Roh, J.Y. Choi, Y. Wang, H.J. Shim & Y.H. Je. 2010.** Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. Fungal Biol. 114: 120-128.
- Koppenhöfer, A.M. & H.K. Kaya. 2000.** Interactions of a nucleopolyhedrovirus with azadirachtin and imidacloprid. J. Invertebr. Pathol. 75: 84-86.

- Kumar, P., H.M. Poehling & C. Borgemeister. 2005.** Effects of different application methods of azadirachtin against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Hom., Aleyrodidae) on tomato plants. J. Appl. Entomol. 129: 489-497.
- Lenteren, J.C. van. 2009.** Critérios de seleção de inimigos naturais, p. 11-32. In V.H.P. Bueno (ed.), Controle biológico de pragas: Produção massal e controle de qualidade. Lavras, UFLA, 430p.
- Liu, T.X. & A.N. Sparks Jr. 2011.** Aphids on Cruciferous Crops Identification and Management, 12p. disponível em <http://AgriLifebookstore.org>, acesso em 01/12/2011.
- Loureiro, E.S., N.C. Oliveira, C.F. Wilcken & A. Batista Filho. 2004.** Patogenicidade de *Verticillium lecanii* ao pulgão-do-pinus. Rev. Árv. 28: 765-770.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012.** Disponível em: www.agricultura.gov.br, acesso em janeiro de 2012.
- Marques, R.P., A.C. Monteiro & G.T.Pereira. 2004.** Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). Ciênc. Rural 34: 1675-1680.
- Martins, A.L.C. 2011.** Colheita das hortaliças, p. 77-78. In H.E.C.R. Bevilacqua (ed.), Cultivo de hortaliças. São Paulo, Prefeitura de São Paulo, 85p.
- Morais, L.A.S., L.P.V. Mattos, G.G. Gonçalves & W. Bettioli. 2009.** Efeito de diferentes concentrações do óleo de nim (*Azadirachta indica*) no crescimento micelial de fungos entomopatogênicos e *Trichoderma harzianum*. Hortic. Bras. 27: 113-117.
- Mossini, S.A.G. & C. Kimmelmeier. 2005.** A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. Acta Farm. Bonaerense 24: 139-48.

- Nathan, S.S. & K. Kalaivani. 2006.** Combined effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus (SplNPV) on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Biol. Control 39: 96-104.
- Nisbet A.J., J.A.T. Woodford & R.H.C. Strang. 1996.** The effects of azadirachtin on the acquisition and inoculation of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. Crop Prot. 15: 9-14.
- Pavela, R., M. Barnet & F. Kocourek. 2004.** Effect of azadirachtin applied systemically through roots of plants on the mortality, development and fecundity of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*). Phytoparasitica 32: 286-294.
- Peña-Martinez, R. 1992.** Afidos como vectores de virus en México. Montecillo, Centro de Fitopatología, 135p.
- Roditakisa, E., I.D. Couzinc, N.R. Frankse & A.K. Charnleya. 2008.** Effects of *Lecanicillium longisporum* infection on the behaviour of the green peach aphid *Myzus persicae*. J. Insect Physiol. 54: 128–136.
- Salvadori J.R., P.R.V.S. Pereira & M.T.B. Silva. 2005.** Manejo de pulgões. Rev. Cult. 75: 32-34.
- Santos, T.M., N.P. Costa, A.L. Torres & A.L. Boiça Júnior. 2004.** Effect of nim extract on the cotton aphid. Pesqu. Agropecu. Bras. 39: 1071-1076.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Schmutterer, H. 1990.** Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. Annu. Rev. Entomol. 35: 271-297.
- SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. 2006.** Censo agropecuário. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 777p.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. 2008. Hortaliças minimamente processadas: estudos de mercado SEBRAE/ESPM. Rio de Janeiro, SEBRAE, 40p.

SIA – Sistema de Informações sobre Agrotóxicos. 2012. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia> acesso em janeiro de 2012.

Sosa-Gomez, D.R. 2005. Aliados sob apuros. Rev. Cult. 78: 22-25.

Vieira, C.P. & B.J. Fernandes. 1999. Plantas inseticidas, p. 739–754. In C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick (Orgs.), Farmacognosia – da planta ao medicamento. Porto Alegre, UFRGS/UFSC, 821p.

Vu, V.H., S.I. Hong & K. Kim. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. J. Biosci. Bioeng. 104: 498-505.

Zehnder, G., G.M. Gurr, S. Kühne, M.R. Wade, S.D. Wratten & E. Wyss. 2007. Arthropod pest management in organic crops Annu. Rev. Entomol. 52: 57-80.

Tabela 1. Linhagens, hospedeiros, origem e viabilidade após revigoração de fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios de patogenicidade a *Lipaphis erysimi*.

Fungo	Linhagem	Hospedeiro	Origem	Viabilidade (%)
<i>Beauveria bassiana</i>	CG 001	<i>Deois flavopicta</i>	Distrito Federal	99,22
	IPA 198	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Pernambuco	100,00
	Esalq 900	<i>Solenopsis seavissima</i>	Piracicaba – SP	100,00
	Esalq 512	<i>Solenopsis</i> sp.	Cuiabá – MT	99,50
	IPA 202	-	Pernambuco	100,00
	ESALQ 483	<i>Solenopsis invicta</i>	Cuiabá – MT	100,00
	CG 495	<i>Diabrotica speciosa</i>	Pará	98,62
	Esalq 561	<i>Solenopsis</i> sp.	Cuiabá – MT	59,57
	Esalq 760	<i>Cornitermes cumulans</i>	Piracicaba – SP	97,57
	CG 217	<i>Cerotoma arcuata</i>	Goiás	100,00
	URPE 26	Solo	Campo do Brito – SE	98,39
	URPE 27	Solo	Teresina – PI	100,00

Continuação da tabela 1.

	E 1022	<i>Phyllophaga</i> sp.	Piracicaba – SP	100,00
<i>Metarhizium anisopliae</i>	E 865	Homoptera	Goiânia – GO	97,58
	E 860	<i>Macrapasis zincta</i>	Piracicaba – SP	93,27
	E 6	<i>Diatraea saccharalis</i>	Recife – PE	40,00
<i>Lecanicillium</i> sp.	URPE 24	<i>Lipaphis erysimi</i>	Pernambuco	93,71
	URPE 28	<i>Lipaphis erysimi</i>	Chã Grande – PE	98,58
	URPE 29	<i>Bemisia tabaci</i>	Camocim de São Félix – PE	90,34
	E 1397	Pulgão	Matão – SP	96,80
	E 1408	<i>Bemisia</i> sp.	Itapetininga – SP	98,17
	E 972	Cochonilha verde	Piracicaba – SP	81,28

Tabela 2. Mortalidade (%) e sobrevivência (dias) (média ± EP) de *Lipaphis erysimi* tratados com linhagens de *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium* sp. e *Metarhizium anisopliae*¹.

Tratamento	Linhagem	Mortalidade confirmada (%)	Sobrevivência (dias)
<i>Beauveria bassiana</i>	CG 495	25,1 ± 6,01 ed	4,6 ± 0,43 de
	E 760	47,0 ± 6,50 bcd	4,1 ± 0,24 c
	IPA 202	37,8 ± 6,34 dc	4,3 ± 0,20 d
	E 483	76,6 ± 6,51 a	3,0 ± 0,14 b
	E 512	2,5 ± 2,5 e	5,8 ± 0,33 e
	E 900	26,5 ± 7,27 de	4,1 ± 0,16 d
	E 198	32,5 ± 6,80 d	3,3 ± 0,22 bc
	URPE 26	68,6 ± 6,79 ab	3,3 ± 0,16 b
	URPE 27	83,2 ± 3,44 a	2,1 ± 0,11 a
	CG 217	62,6 ± 5,20 abc	2,3 ± 0,10 ab
Teste F, χ^2 e valor de P		F _{10,99} = 24,41; P < 0,0001	χ^2 = 181,35; P < 0001
<i>Metarhizium anisopliae</i>	860	43,9 ± 10,47 ab	4,5 ± 0,26 b
	865	37,3 ± 4,18 b	5,0 ± 0,35 b
	E 1022	67,1 ± 6,75 a	2,5 ± 0,11 a
	Teste F, χ^2 e valor de P		F _{3,36} = 16,68; P < 0,0001

Continuação da Tabela 2.

	972	15,7 ± 5,15 dc	4,6 ± 0,43 c
	1408	34,6 ± 6,16 bc	3,7 ± 0,19 bc
<i>Lecanicillium</i> sp.	URPE 28	77,2 ± 6,46 a	3,3 ± 0,13 b
	URPE 29	66,8 ± 8,07 a	3,3 ± 0,13 b
	1397	53,9 ± 4,98 ab	2,5 ± 0,10 a
Teste F, χ^2 e valor de P		$F_{5,54} = 26,27; P < 0,0001$	$\chi^2 = 55,85; P < 0001$

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Dados de inclinação das curvas de concentração-mortalidade, CL_{50} e CL_{95} , χ^2 e probabilidade de fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (URPE 27) e *Lecanicillium muscarium* (URPE 28) e óleo de nim aplicados em ninfas de *Lipaphis erysimi*¹.

Tratamento	GL	n	Inclinação ± EP	CL_{50} (IC 95%)	CL_{95} (IC 95%)	χ^2	P
URPE 27	6	300	0,3301 ± 0,05	$2,44 \times 10^7$ ($8,35 \times 10^6$ - $9,42 \times 10^7$)	$2,35 \times 10^{12}$ ($1,13 \times 10^{11}$ - $4,75 \times 10^{14}$)	6,26	0,1806
URPE 28	6	300	0,3746 ± 0,07	$7,30 \times 10^6$ ($8,70 \times 10^5$ - $9,37 \times 10^7$)	$1,80 \times 10^{11}$ ($3,26 \times 10^9$ - $3,50 \times 10^{16}$)	8,68	0,0696
Nim pulverizado	6	300	2,0100 ± 0,23	0,02 (0,001-0,05)	0,48 (0,31-1,36)	6,48	0,1659
Nim por imersão	5	250	0,6893 ± 0,13	0,37 (0,28-0,47)	4,02 (2,31-10,08)	3,71	0,2945

¹GL: graus de liberdade; n: número de insetos usados no teste; EP: erro-padrão da média; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança; χ^2 : qui-quadrado; P: probabilidade do teste χ^2 .

Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de óleo de nim (Neemseto[®]) sobre os parâmetros crescimento da colônia, número de conídios, viabilidade e índices biológicos de *Beauveria bassiana* URPE 27 e *Lecanicillium muscarium* URPE 28¹. Temp.: 26 ± 1°C, UR: 70 ± 10% e fotofase: 12h.

Tratamentos	Crescimento vegetativo	Redução/aumento (%)	Quantificação (x 10 ⁷)	Redução/aumento (%)	Viabilidade (%)	Índice Biológico
URPE 27	10,8 ± 0,29 a	-	26,2 ± 1,95 b	-	95,9	-
URPE 27 + Nim 1,25mL/l	4,4 ± 0,42 b	-59,1	27,9 ± 1,86 b	6,2	95,1	74,4
URPE 27 + Nim 2,5mL/l	6,1 ± 0,47 b	-43,7	20,6 ± 0,85 c	-21,5	99,4	70,2
URPE 27 + Nim 5,0mL/l	10,8 ± 0,67 a	-0,5	37,8 ± 1,92 a	43,8	99,1	118,5
Teste F e valor de P	F _{3,20} = 45,43; P < 0,0001		F _{3,28} = 43,24; P < 0,0001			
URPE 28	6,4 ± 0,22 a	-	13,0 ± 0,71 a	-	98,3	-
URPE 28 + Nim 1,25mL/l	2,2 ± 0,05 b	-65,3	16,8 ± 0,25 a	28,8	100,0	81,7
URPE 28 + Nim 2,5mL/l	2,2 ± 0,06 b	-65,7	13,8 ± 1,47 a	5,8	100,0	71,6
URPE 28 + Nim 5,0mL/l	2,8 ± 0,29 b	-57,2	16,0 ± 1,55 a	23,1	99,1	82,9
Teste F e valor de P	F _{3,20} = 120,72; P < 0,0001		F _{3,28} = 2,49; P = 0,0810			

¹Médias (± EP) seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

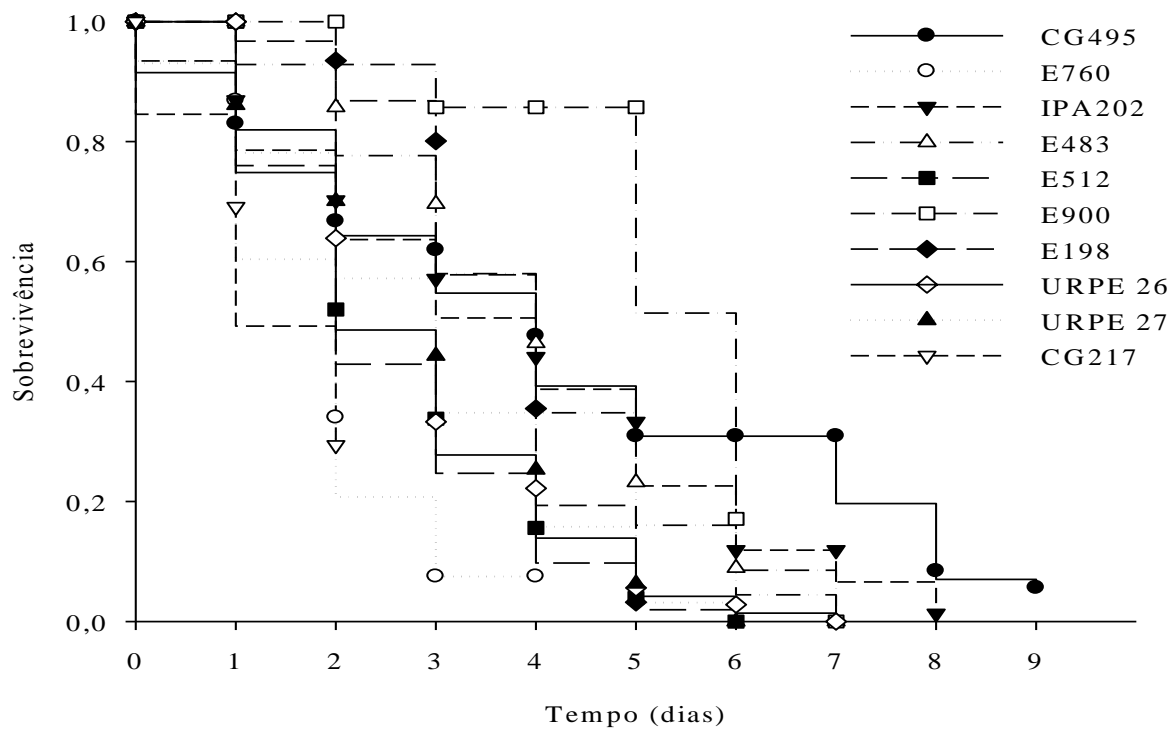


Figura 1. Sobrevivência de *Lipaphis erysimi* submetido a diferentes linhagens de *Beauveria bassiana*.

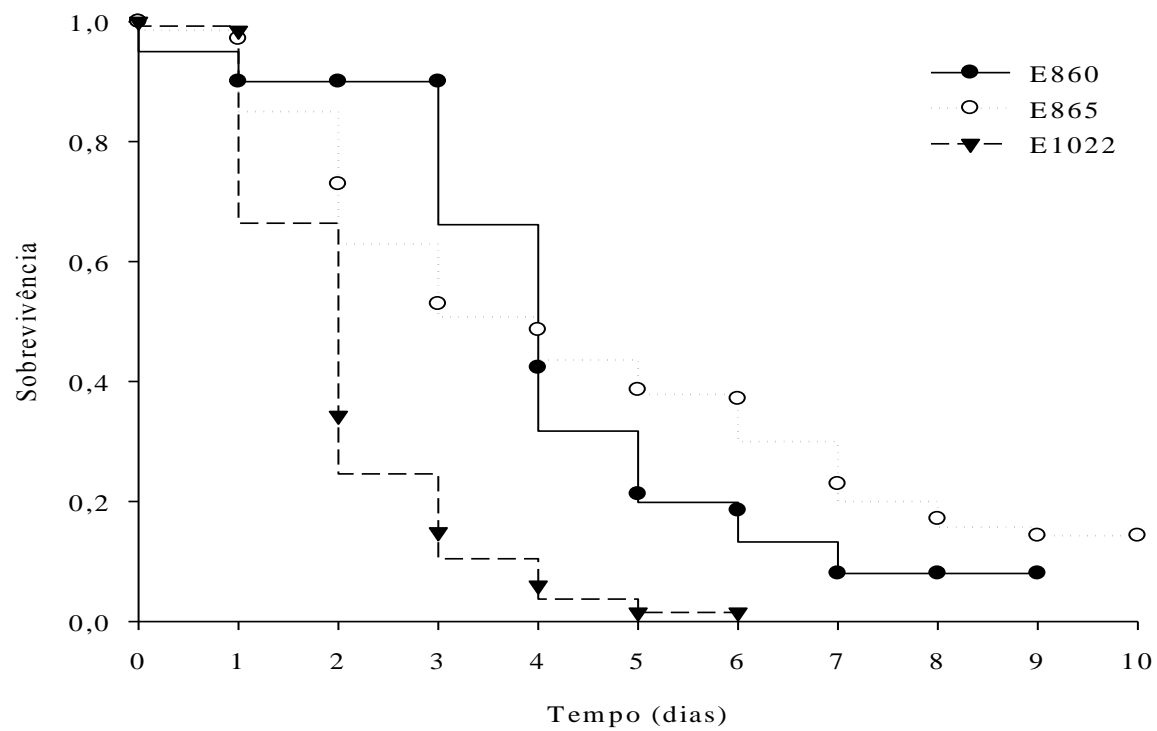


Figura 2. Sobrevivência de *Lipaphis erysimi* submetido a diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

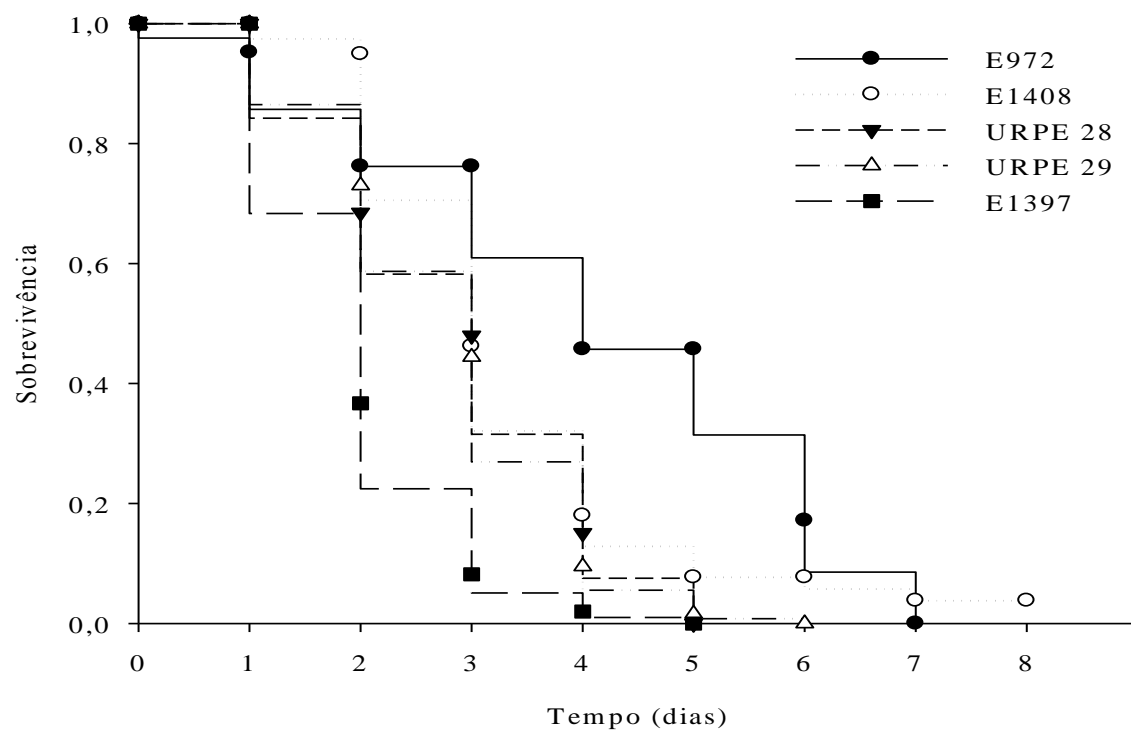


Figura 3. Sobrevivência de *Lipaphis erysimi* submetido a diferentes linhagens de *Lecanicillium* sp.

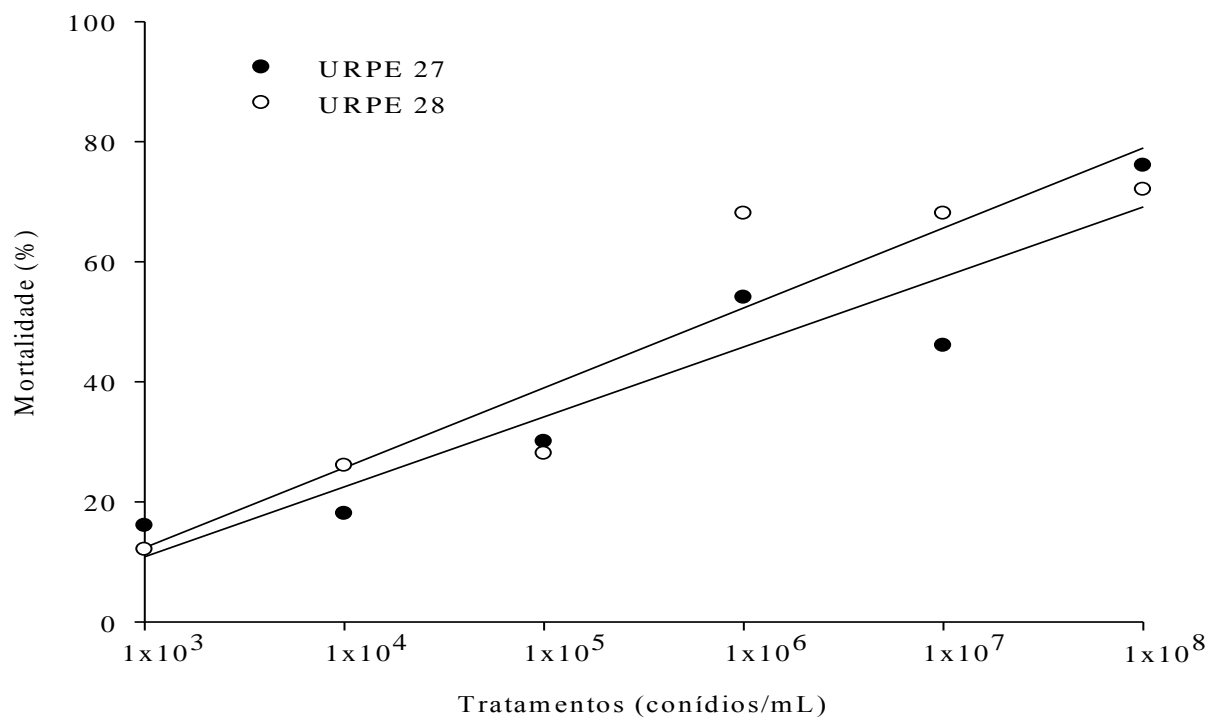


Figura 4. Curvas concentração-mortalidade de *Lipaphis erysimi* submetido a linhagens *Beauveria bassiana* (URPE 27) e *Lecanicillium muscarium* (URPE 28), após cinco dias.

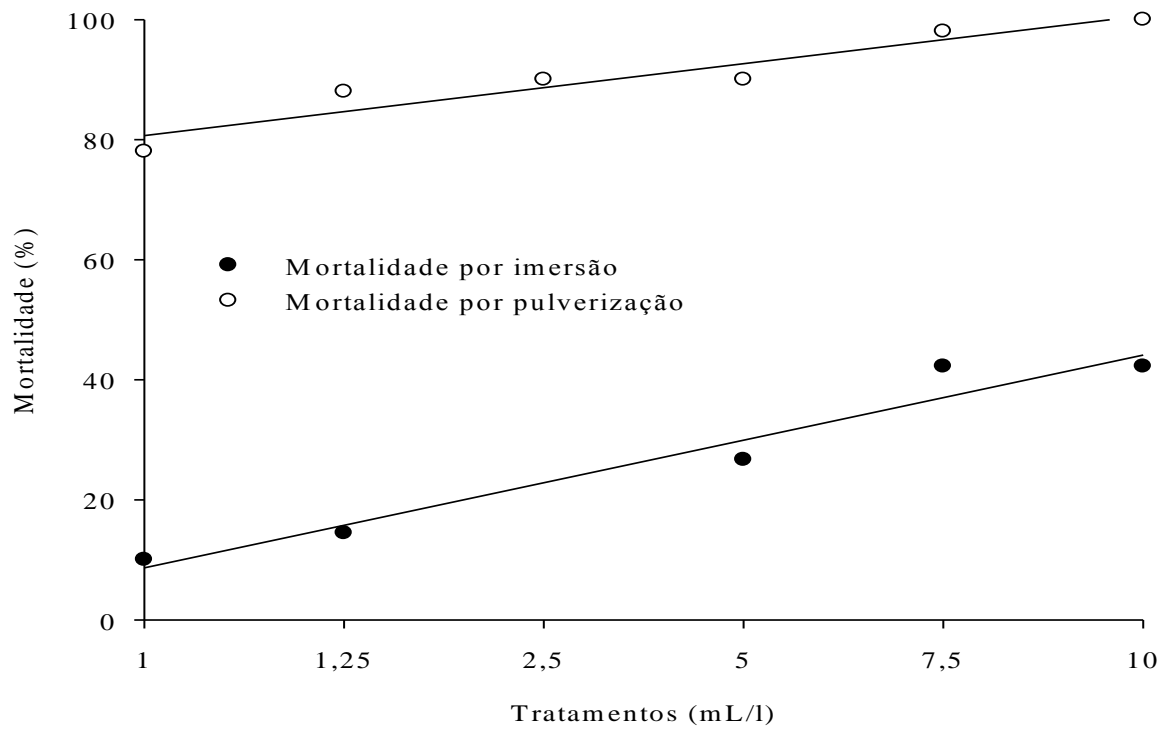


Figura 5. Curvas concentração-mortalidade de *Lipaphis erysimi* submetido ao óleo de nim, após 24 horas.

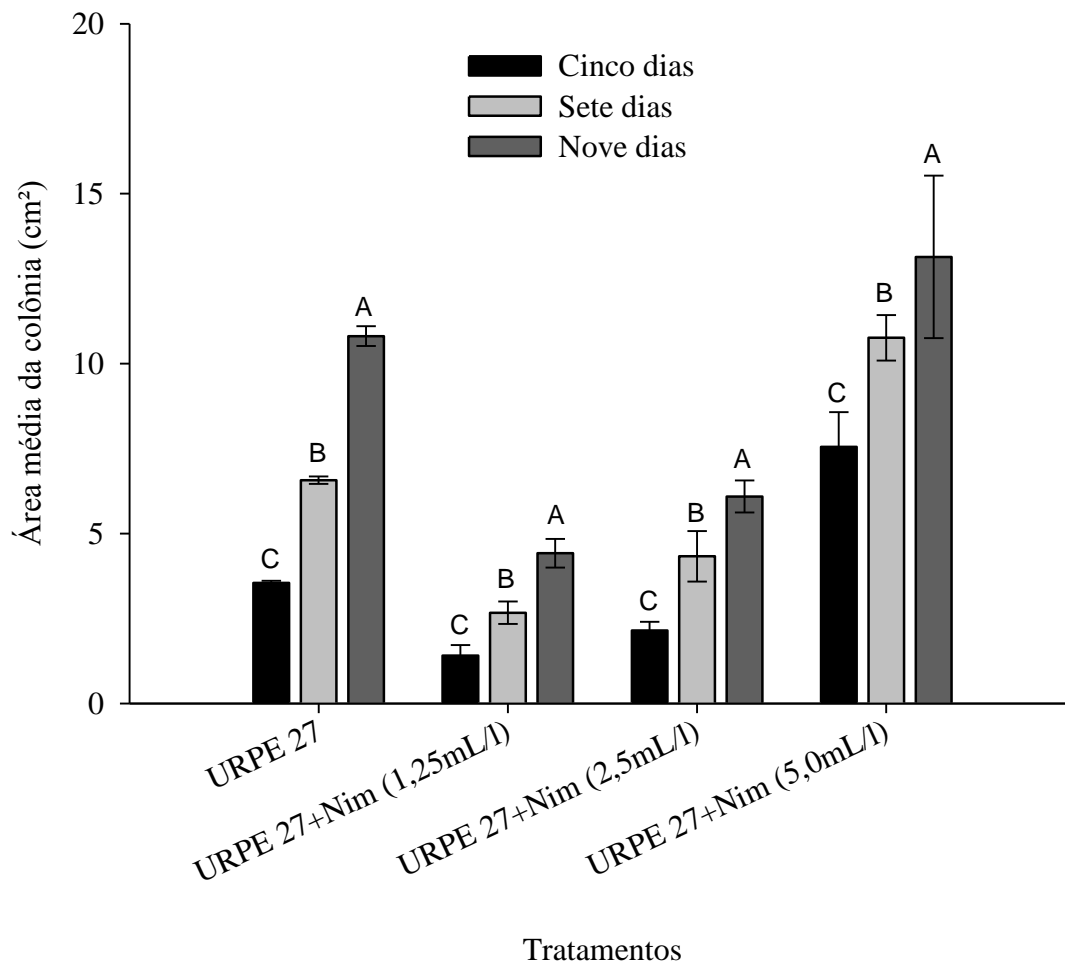


Figura 6. Médias (\pm EP) da área de colônias de *Beauveria bassiana* URPE 27 submetidas ao produto comercial Neemseto[®] em diferentes concentrações *in vitro*, e tempos de exposição. Médias seguidas de letras diferentes nos tratamentos diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

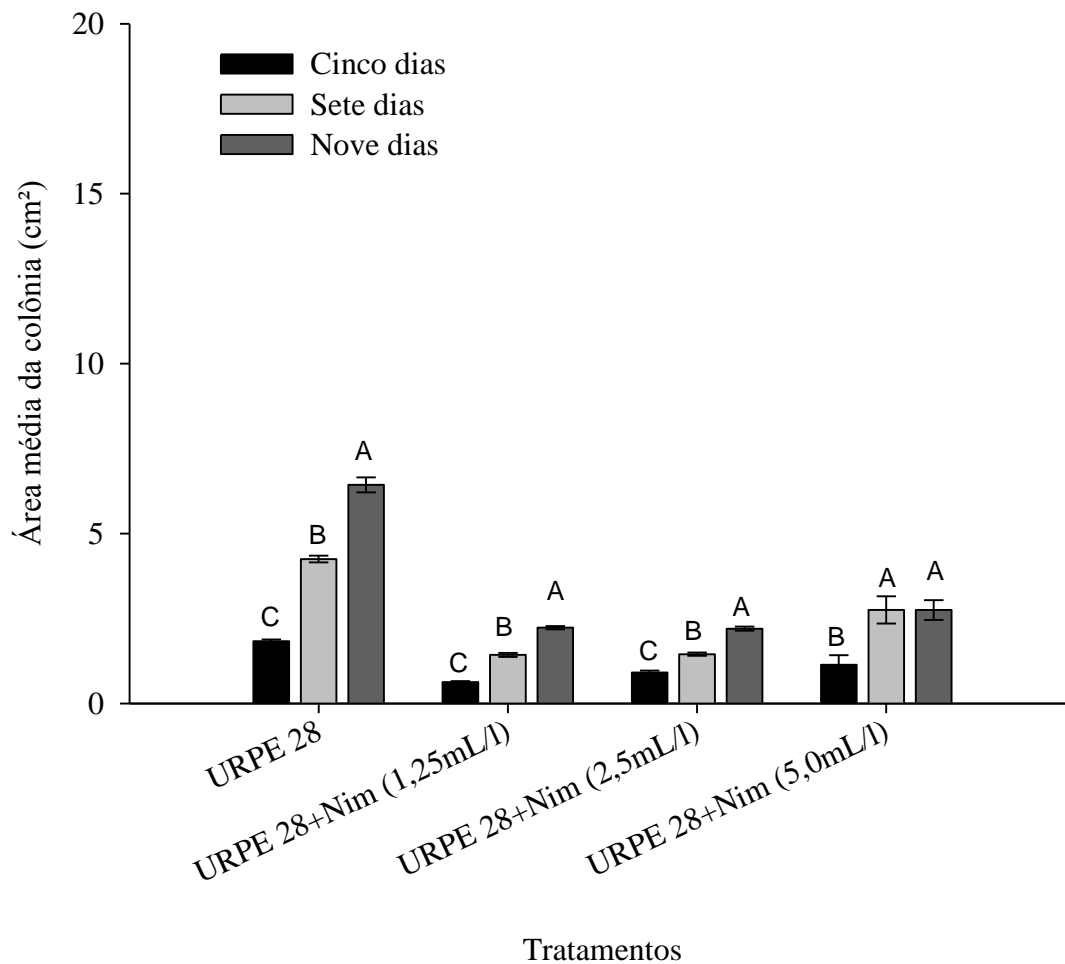


Figura 7. Médias (\pm EP) da área de colônias de *Lecanicillium muscarium* URPE 28 submetidas ao produto comercial Neemseto[®] em diferentes concentrações *in vitro*, e tempos de exposição. Médias seguidas de letras diferentes nos tratamentos diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

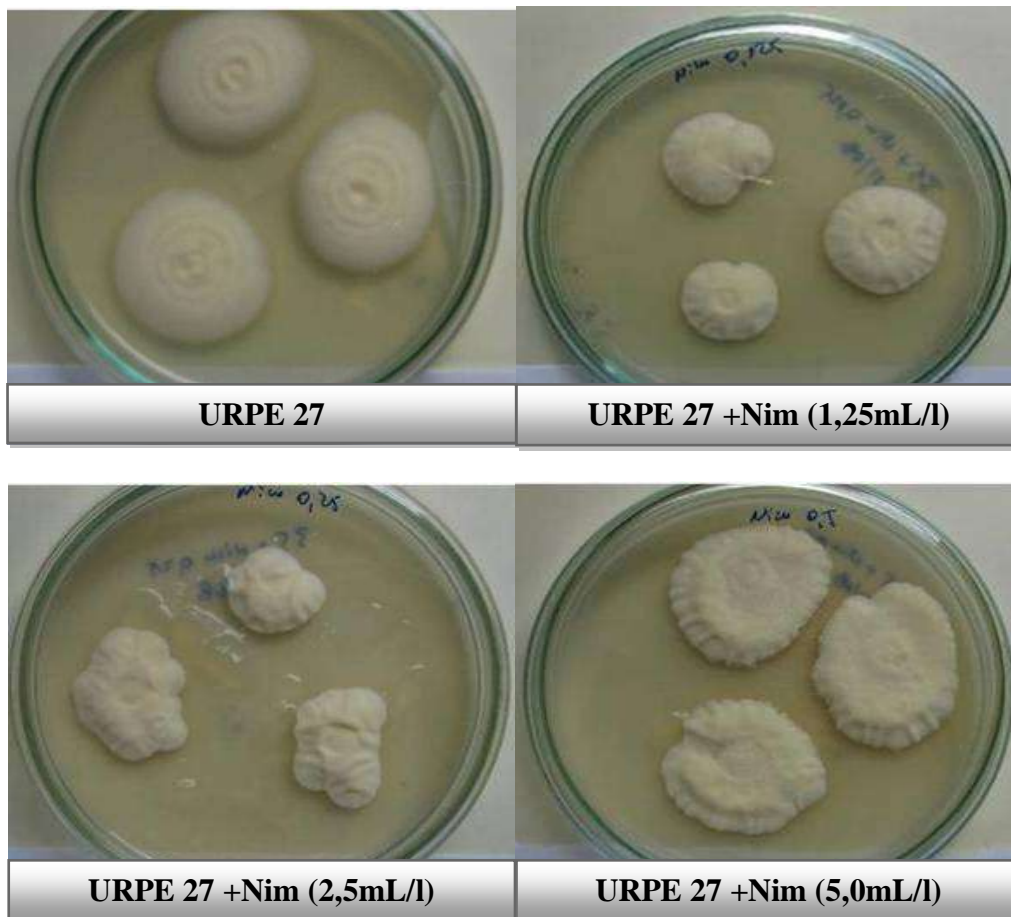


Figura 8. Aspecto geral das colônias de *Beauveria bassiana* URPE 27 submetidas ao produto comercial Neemseto[®], em diferentes concentrações, *in vitro*.

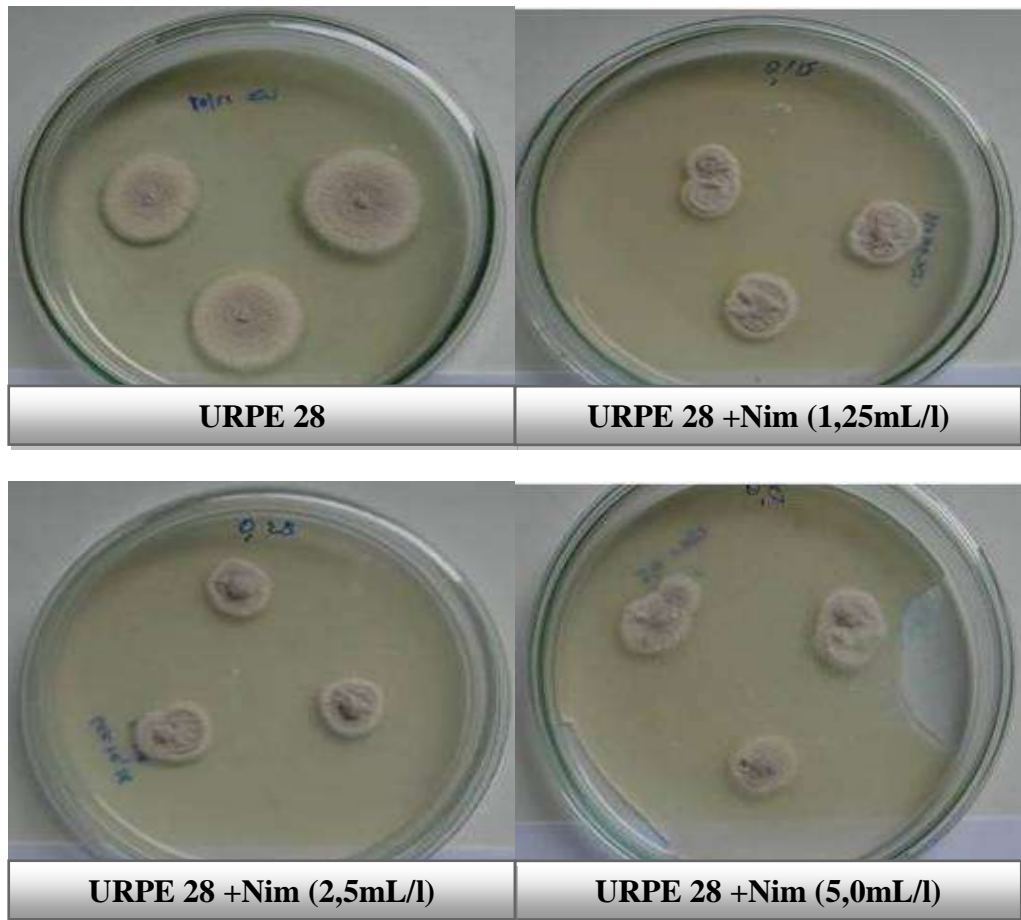


Figura 9. Aspecto geral das colônias de *Lecanicillium muscarium* URPE 28 submetidas ao produto comercial Neemseto[®], em diferentes concentrações *in vitro*.

CAPÍTULO 4

ATIVIDADE DE ESPÉCIES DE HYPOCREALES ASSOCIADOS COM ÓLEO DE NIM (*Azadirachta indica*) SOBRE A POPULAÇÃO DE *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) E DEMAIS AFÍDEOS, NO CULTIVO DA COUVE (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.) EM CAMPO¹

RICARDO L. MELO², EDMILSON J. MARQUES², SIMON L. ELLIOT², DANIEL L. VIOL² E JOSÉ V. OLIVEIRA²

²Departamento de Agronomia – Entomologia, Univ. Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE

³Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde – Entomologia, Univ. Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36570-000, Viçosa - MG

¹ Melo, R.L., E.J. Marques, D.L. Viol, S.L. Elliot & J.V. Oliveira. Atividade de espécies de Hypocreales associados com óleo de nim (*Azadirachta indica*) sobre a população de *Lipaphis erysimi* (KALT.) (Hemíptera: Aphididae) e demais afídeos, no cultivo da couve (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.) em campo. A ser submetido à Crop Protection.

RESUMO – *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) faz parte do complexo de afídeos-praga da couve-folha no estado de Pernambuco-Brasil, não possuindo agrotóxicos registrados para o seu controle. O objetivo deste trabalho foi testar em campo os efeitos de linhagens dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. URPE 27 e de *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams URPE 28 sobre *L. erysimi* e demais afídeos (*Myzus persicae* (Sulzer) e *Brevicoryne brassicae* (L.)) que fazem parte do complexo de pragas da couve, assim como, verificar o comportamento destas linhagens quando associadas ao óleo de nim. A linhagem URPE 27 proporcionou eficiência relativa de 89,6%, 88,3% e 90,4%, enquanto que URPE 28 promoveu 45,5%, 62% e 64,4% contra *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae*, respectivamente. A associação com o óleo de nim mostrou-se mais favorável com a linhagem URPE 27. O óleo de nim foi eficiente no controle dos afídeos em baixa concentração, e causou efeito fitotóxico nas plantas em concentrações superiores a 2,5mL/l. A sobrevivência média dos afídeos foi, significativamente, reduzida com a aplicação dos tratamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Afídeo da mostarda, Meliaceae, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium muscarium*

ACTIVITY OF HYPOCREALES SPECIES ALLIED WITH NEEM OIL (*Azadirachta indica*)
ABOVE THE *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMÍPTERA: APHIDIDAE) POPULATIONS IN
KALE CULTURE (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.) IN FIELD¹

ABSTRACT – *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) is part of the complex of aphids-pest of kale in the State of Pernambuco-Brazil, appearing pesticides registered for your control. The goal of this work was to test in field the effects of strains of entomopatogênicos fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. URPE 27 and *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams URPE 28 of about *L. erysimi* and other aphids (*Myzus persicae* (Sulzer) and *Brevicoryne brassicae* (L.)) forming part of the complex of pests of Kale, as well as verify the behavior of these strains when coupled with the neem oil. The strain URPE 27 caused relative efficiency of 89,6%, 88,3% and 90,4%, while URPE 28 promoted 45,5%, 62,0% and 64,4% against *L. erysimi*, *M. persicae* and *B. brassicae*, respectively. The association with Neem Oil proved more favorable with the isolated URPE 27. The Neem Oil has been shown to be efficient in the control of aphids in low concentration and cause phytotoxic effect in plants in concentrations exceeding 2,5mL/l. The average survival of aphids was significantly reduced with the implementation of treatments.

KEY WORDS: Mustard aphid, Meliaceae, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium muscarium*

Introdução

Lipaphis erysimi (Kalt.) é uma praga de distribuição cosmopolita e de significativa importância para as Brassicaceae (Völkl *et al.* 2007, Filgueira 2008) atacando a couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), o repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) e o nabo (*B. rapa* L.) promovendo danos diretos e indiretos, como a redução da fotossíntese e a transmissão de vírus, respectivamente (Peña-Martinez 1992, Gallo *et al.* 2002, Salvadori *et al.* 2005, Liu & Sparks Jr. 2011).

Lipaphis erysimi é considerada uma praga que apresenta alta prolificidade, e variações de temperatura é um fator importante para a reprodução da espécie. Em laboratório a média de longevidade de *L. erysimi* nas temperaturas de 20 a 25°C foi estabelecida, em média, de 32 a 34 dias. Em campo, foi de, aproximadamente, 33 dias no inverno (15°C) e 22 dias no verão (30°C).

A fecundidade média da espécie a 25°C foi de 2,5 ninfas/fêmea/dia, com o tempo necessário para a população duplicar em número de indivíduos (TD) maior no inverno (2,39 dias) que no verão (1,41 dias). Ainda para condições de campo, e seguindo a mesma tendência, o intervalo de tempo entre cada geração (T), também foi maior no inverno (13,85 dias) que no verão (7,57 dias) (Godoy & Cividanes 2002).

Espécies de fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams, são comumente relatados regulando populações de *L. erysimi*, *Myzus persicae* (Sulzer) e *Brevicoryne brassicae* (L.) (Feng *et al.* 1990, Alves 1998, Isikber & Copland 2002, Zhang & Hassan 2003, Starý *et al.* 2007, Völkl *et al.* 2007, Liu & Sparks Jr. 2011), podendo ser aplicados em programas de controle biológico clássico, inundativo ou ainda por incremento (Hesketh *et al.* 2010), desde que sejam realizados estudos detalhados de virulência de espécies e isolados.

A estimativa do uso de fungos entomopatogênicos em 2001 foi de uma área tratada de aproximadamente 107,9 mil hectares em cigarrinhas das pastagens e da cana-de-açúcar, mamão, café, citrus, hortaliças e seringueira (Faria & Magalhães 2001). Mais recentemente, estas estimativas demonstram que apenas na cultura da cana-de-açúcar e pastagens, carros-chefe do uso de micoinseticidas no Brasil, foram tratados 650 mil hectares respectivamente, refletindo o grande avanço do uso do controle biológico, com resultados satisfatórios (Alves *et al.* 2008).

A Azadirachtina é um triterpeno naturalmente extraído de *Azadirachta indica* A. Juss., planta comumente denominado de nim. Esta substância apresenta ação inseticida, atuando como regulador de crescimento (Mordue & Blackwell 1993), repelente (Charleston *et al.* 2005) e deterrente alimentar (Schmutterer 1990, Ascher 1993), apresentando ainda ação sistêmica quando absorvida via sistema radicular das plantas (Pavela *et al.* 2004, Kumar *et al.* 2005, Gonçalves & Bleicher 2006).

A viabilidade do uso do extrato de nim para o controle de pulgões foi demonstrada por resultados obtidos em diversos estudos que apontam este produto como responsável por mortalidade de ninfas e adultos e redução de fecundidade de pulgões (Santos *et al.* 2004, Gonçalves & Bleicher 2006, Zehnder *et al.* 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação das linhagens *B. bassiana* URPE 27 e *L. muscarium* URPE 28 em populações de *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae* assim como verificar a eficácia do óleo de nim aplicado concomitantemente aos fungos entomopatogênicos em condições de campo.

Material e Métodos

A pesquisa foi conduzida na área experimental da Clínica de Doenças de Plantas e no Laboratório de Interação Inseto-planta da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Estabelecimento do Cultivo. Sementes de couve var. manteiga foram cultivadas em bandejas de isopor, utilizando a mistura de substrato de plantio (50%), húmus de minhoca (30%) e solo (20%), sendo as plântulas transferidas diretamente para o solo, após, aproximadamente 20 dias do plantio.

As plantas foram cultivadas em espaçamento de 1,0 m entre linhas e 0,5 m entre plantas, adubadas com N-P-K, conforme recomendação na fase de plantio e irrigação por aspersão mantida apenas na fase inicial do cultivo até o seu estabelecimento e início das avaliações. Não foram realizadas aplicações de agrotóxicos no cultivo.

Descrição do Experimento.

Insetos, Fungos e Óleo de Nim. Fêmeas adultas de *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae* foram coletadas em campo e multiplicadas até a realização dos bioensaios. Os insetos foram mantidos em potes de acrílico com três centímetros de diâmetro por cinco de altura, com tampa perfurada, onde foi depositado meio de cultura Ágar-água (1%) e sobre este um disco de folha de couve var. manteiga.

A criação estoque foi mantida no Laboratório de Interação Inseto-planta da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob condições controladas de temperatura, umidade relativa e fotofase (25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ e 12h, respectivamente), em câmara climatizada BOD.

Os fungos utilizados no ensaio foram às linhagens *B. bassiana* URPE 27 e *L. muscarium* URPE 28, obtidos do Laboratório de Patologia de Insetos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, mantidos em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar + Antibiótico (Estreptomicina) (BDA + A) conforme Alves (1998), nas mesmas condições citadas, para a criação dos insetos.

As linhagens foram produzidas em placa cheia e após 10 dias de incubação foram utilizados no preparo suspensões com água destilada e esterilizada, contendo espalhante adesivo (Tween80[®] 0,02%) (ADE + EA). As concentrações de conídios foram quantificadas em câmara de Neubauer

(campo superior), obtendo suspensões de $4,9 \times 10^7$ e $1,5 \times 10^7$ conídios.mL⁻¹ para URPE 27 e URPE 28, respectivamente, que correspondem ao dobro da Concentração Letal (CL₅₀) de 3,7mL/l obtida em teste anterior em laboratório.

Durante o procedimento de aplicação dos fungos no experimento foi avaliada a viabilidade das linhagens. O procedimento foi realizado através da aplicação de 0,5mL das suspensões preparadas em placas de Petri contendo meio BDA + A. As placas foram mantidas em câmara BOD, nas mesmas condições já referidas. Para aferir a germinação dos conídios foram contados, em média, 250 conídios/placa, em duas repetições, sob microscópio óptico de luz e 400x de aumento. Foram considerados germinados os conídios que apresentavam a formação do tubo germinativo após 20 horas (Alves 1998).

O óleo de nim utilizado no bioensaio foi proveniente do produto comercial Neemseto[®] (Cruangi neem do Brasil LTDA, Teor das substâncias: Azadirachtina-A, Azadirachtina-B, Nimbina e Salanina = 2,389ppm/litro).

Um pré-teste foi realizado em experimento de campo em plantas de couve com aproximadamente noventa dias de idade nas concentrações 1,0; 2,5; 3,7 e 10,0mL/l para detectar efeito fitotóxico. O volume de calda aplicado foi de 200 l.ha⁻¹, estimando-se 10 ml por planta. As plantas foram pulverizadas com aplicador manual de polipropileno com volume total de 100 ml sendo o volume total distribuído em todas as folhas da planta, na porção abaxial, até o ponto de escorrimento.

Neste pré-teste, cada tratamento foi repetido em três plantas, sendo as avaliações realizadas a cada 24 horas para detectar a presença de manchas nas folhas de couve, o que indica efeito fitotóxico. Foram colhidas três folhas por planta 96 horas após a aplicação para verificação da intensidade dos sintomas.

Área Experimental e Tratamentos. A área foi dividida em três sub-parcelas com características semelhantes contendo cada uma 25, 33 e 21 plantas de couve var. manteiga, com aproximadamente 90 dias de idade e tamanhos de 5x4 metros nas duas primeiras e a última com 6x5 metros.

Os tratamentos utilizados foram: 1 – testemunha absoluta (ADE+EA); 2 – testemunha positiva (Imidacloprid) com o produto comercial Galeão® na dosagem recomendada ($0,7\text{g.L}^{-1}$); 3 – Nim (CL₅₀) produto comercial Neemseto®; 4 – *B. bassiana* URPE 27 (2x CL₅₀); 5 – *L. muscarium* URPE 28 (2x CL₅₀); 6 – *B. bassiana* (2x CL₅₀) + nim (CL₅₀) e 7 – *L. muscarium* (2x CL₅₀) + nim (CL₅₀).

Dez fêmeas de diferentes idades (terceiro e quarto ínstars e adultas) de *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae* foram depositadas em folhas medianas das plantas de couve, onde permaneceram por 24 horas antes da aplicação dos tratamentos.

Assim como no ensaio anterior, o volume de calda aplicado correspondeu a um total de 200 l.ha⁻¹, estimando-se um valor de 10 ml por planta, com o auxílio do mesmo aplicador manual de polipropileno, em toda a folha.

Diariamente realizou-se a contagem direta dos insetos com o auxílio de lupa de bolso de dez aumentos e 6,25 cm² de base (2,5 x 2,5cm). Os parâmetros avaliados foram número total de insetos mortos, vivos e mumificados, além da presença de outros inimigos naturais que ocorreram sequencialmente durante dez dias e mais duas avaliações no 16° e 21° dias após a aplicação, possibilitando acompanhar a flutuação populacional das espécies no período.

Informações Meteorológicas. As informações relativas à temperatura, umidade relativa (máximas, mínimas e médias) e pluviosidade (média e acumulada) foram obtidas diariamente no mesmo local onde estava instalado o plantio, com o auxílio da Estação Meteorológica Squitter (ISIS S1220 PCD Ambiental) distando cerca de 50 m das plantas.

Análises Estatísticas. Os dados dos parâmetros indivíduos mortos, vivos e mortalidade confirmada aos cinco dias, foram submetidos à análise de variância (ANOVA – Proc. ANOVA) e as médias foram comparadas, através do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), a análise de sobrevivência foi submetida aos testes Log-Rank, após curvas de sobrevivência serem estimadas pelo método Kaplan-Meier, por comparação de pares de isolados usando o Proc Lifetest do SAS (SAS Institute, 1999-2001). Calculou-se a eficiência relativa à testemunha, de acordo com Abbott (1925).

Resultados e discussão

Efeito Fitotóxico do Óleo de Nim a Plantas de Couve-Manteiga. Folhas de couve manteiga apresentaram manchas nas superfícies das folhas, quando tratadas com emulsões de óleo de nim em concentrações superiores a 2,5mL/L, ficando mais intensas e com maior amplitude com o aumento gradativo das concentrações (Fig. 1). As manchas amarronzadas e de aspecto disperso nas folhas foram visualizadas com apenas 24 horas da aplicação, ficando mais intensas com 96 horas. Essas manchas são algumas vezes necróticas, e o grau e intensidade chegam, em alguns casos, a tomar completamente a folha.

A simples presença das manchas já inviabiliza o uso do nim nestas concentrações, uma vez que o produto a ser comercializado é a própria folha, o que caracteriza um dano direto, tornando o produto não recomendável. Efeitos fitotóxicos foram relatados por Nisbet *et al.* (1996) onde 500ppm Azadirachtina causou deformações em folhas e outros efeitos fitotóxicos em plantas de *Nicotiana clevelandii* A. Gray., não sendo constatado em concentrações inferiores a 150ppm.

Efeitos dos Tratamentos na Mortalidade, Sobrevivência e Flutuação Populacional de Afídeos da Couve. Os tratamentos sofreram variações temperatura de elevada amplitude. A temperatura mínima no período foi de 9,8 °C e máxima de 26,1 °C com umidade relativa variando

de 54,4 a 93,9% e amplitudes de 16,3 °C e 39,5%, respectivamente (Fig. 2). As condições ambientais e do hospedeiro são cruciais para a reprodução e desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos podendo interferir em todo processo infectivo (Goettel *et al.* 2010).

As variações de temperatura e umidade relativa, principalmente, têm um grande efeito nos resultados referentes à ação de fungos entomopatogênicos, modificando-os inclusive, quando comparados aos obtidos em estudos de laboratório com condições controladas. (Hall & Burges 1979, Hall 1982, Vu *et al.* 2007, Kim & Kim 2008, Kim *et al.* 2010)

Imidacloprido como controle positivo reduziu significativamente as populações de afídeos *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae* causando a mortalidade de todos os indivíduos em apenas 24 horas (Fig. 3). Vale ressaltar que o produto utilizado não é registrado para o controle de *L. erysimi* servindo apenas como fonte de investigação uma vez que existem produtos registrados para as outras duas espécies na couve contendo este princípio ativo (SIA 2012). A eficiência relativa do produto foi máxima (100%) para as três espécies (Tabelas 1, 2 e 3).

Imidacloprido mesmo em concentrações muito baixas foi capaz de causar ampla mortalidade de afídeos. Em *Cinara atlantica* (Wilson) Faria & Souza (2005) verificaram este efeito, registrando média de sobrevivência de pulgões de apenas 1,1 indivíduos após cinco dias de aplicação em plantas de *Pinus taeda* (L.). Gonçalves & Bleicher (2006) registraram eficiência de 99,9% de imidacloprido no pulgão *Aphis craccivora* Koch em plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).

Apesar dos resultados singnificativos registrados em pesquisas, efeitos negativos nos inimigos naturais em nosso estudo foram evidenciados, uma vez que houve mortalidade de larvas de Syrphidae, importante inimigo natural de afídeos em diversas culturas, como a couve (Fig. 8.)

O óleo de nim reduziu, numericamente, a população de *L. erysimi* e interferiu significativamente na sobrevivência dos insetos, que em média permaneceram nas folhas por 2,1

dias (Tabela 1, Fig. 5). Na espécie *M. persicae* o óleo de nim aplicado de maneira isolada teve efeito semelhante ao imidacloprido, mantendo baixa a população de insetos vivos (Tabela 2, Fig. 6), não diferindo o número de insetos mortos, e de sobrevivência. A aplicação de óleo de nim em *B. brassicae* reduziu a sobrevivência média dos insetos para 1,4 dias (Tabela 3, Fig. 7), não havendo, contudo, efeito significativo nos demais parâmetros.

Para as três espécies verificou-se que o óleo de nim apresentou efeito variável, contudo, manteve as populações em baixa densidade de 4,3; 9,3 e 1,0 indivíduos por folha para *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae*, respectivamente, quando aplicado apenas o óleo de nim, este resultado pode estar associado à ação de deterrência alimentar, regulador de crescimento e esterelizante, que interferem na biologia e reprodução de afídeos (Nisbet *et al.* 1996, Schmutterer 1990).

A eficiência de nim foi de 88,0%, 85,1% e 94,4% para *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae*, respectivamente, quando aplicado isoladamente, atingiu índices aproximados aos obtidos pela aplicação de imidacloprido (Tabelas 1, 2 e 3). A mortalidade total dos afídeos, provavelmente, não foi obtida no tratamento, e possivelmente nos demais, em função da concentração utilizada, que é inferior a recomendada, de 1%. Schmutterer (1990) relatou que efeito semelhante nas condições laboratório/campo, é obtido neste último quando se utiliza altas concentrações do produto, em função de efeitos de degradação ou de redução de atividade do nim, provocados pela ação da radiação ultravioleta, chuva e atividades químicas na superfície da planta.

Em plantas de *V. unguiculata* o nim teve eficiência mensurada por Gonçalves & Bleicher (2006), registram variação de 39% a 83%, quando foram aplicados 192 a 1536ppm, respectivamente do produto comercial Neemazal[®] e de 72% e 128g/200 ml de extrato de semente, contra ninfas de *A. craccivora*.

O número médio de *L. erysimi* vivos submetidos à ação da linhagem URPE 27 foi significativamente menor que a testemunha, principalmente quando associada ao óleo de nim, que reduziu drasticamente a sobrevivência média dos insetos para 1,5 dias (Tabela 1, Fig. 3; $\chi^2 = 89,85$; $P < 0,0001$), fato semelhante ao ocorrido com *B. brassicae* (Tabela 3) onde a sobrevivência foi reduzida em comparação a aplicação apenas do fungo (Tabela 3, Fig. 5; $\chi^2 = 153,77$; $P < 0,0001$).

A linhagem URPE 28, assim como o URPE 27, associada com o óleo reduziu o número de insetos vivos (Tabelas 1, 2 e 3), e todos os tratamentos obtiveram efeitos semelhantes a imidacloprido para *L. erysimi* e *M. persicae* (Tabelas 1 e 2).

Para a maioria dos tratamentos aplicados sobre *L. erysimi* com *B. bassiana* URPE 27 e *L. muscarium* URPE 28, combinados ou não ao óleo de nim, foram visualizados insetos mumificados por ação das linhagens (Fig. 8), excetuando-se *B. bassiana* URPE 27 + nim e *B. bassiana* URPE 27 (Tabelas 1, 2 e 3).

A flutuação das populações de *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae*, sofreu influência dos tratamentos aplicados, sendo possível observar, na maioria dos casos, um efeito de redução populacional, tornando-se mais evidente a partir do décimo dia de avaliação (Figs. 3 e 4).

Todos os tratamentos aplicados sobre *L. erysimi* mantiveram uma flutuação populacional baixa ao longo do tempo de avaliação, observando o comportamento das populações na testemunha, fato semelhante ao ocorrido com *B. brassicae* e para *M. persicae*, contudo, esta última espécie com um efeito menos acentuado (Figs. 3 e 4).

Considerando as eficiências relativas foi possível observar que, de maneira geral, a linhagem *B. bassiana* URPE 27 foi mais eficaz que *L. muscarium* URPE 28, tanto quando foi aplicada de maneira isolada ou combinada ao óleo de nim, para o controle das três espécies de afídeos (Tabelas 1, 2 e 3). A única exceção foi para *M. persicae*, onde se obteve eficiência relativa

de 75,9% para URPE 28+nim, comparado a 66,8% para URPE 27+nim (Tabela 2). As maiores eficiências relativas aplicadas a *L. erysimi* foram URPE 27+nim (100%) e URPE 28+nim (65,5%), demonstrando que a combinação dos fungos com óleo de nim foi satisfatória e benéfica para o controle das pragas (Tabela 1).

As duas linhagens podem ser aplicadas para o tratamento de *M. persicae* e *B. brassicae*, contudo, sendo mais recomendado de maneira isolada por demonstrarem maiores índices de eficiência. A linhagem *B. bassiana* URPE 27, de maneira geral, apresentou melhor comportamento em campo que *L. muscarium* URPE 28. As eficiências, considerando apenas a aplicação do fungo foram de 89,6%, 88,3% e 90,4% de URPE 27 contra 45,9%, 62,0% e 64,4% de URPE 28, para *L. erysimi*, *M. persicae* e *B. brassicae*, respectivamente (Tabelas 1, 2 e 3).

Estudos demonstram que as respostas do hospedeiro à infecção não necessariamente será a morte, podendo ter efeitos comportamentais que a antecedem como, por exemplo, a redução da alimentação, atividade e coordenação (Goettel *et al.* 2010) e redução da fecundidade (Baverstock *et al.* 2005).

Em nenhum tratamento proposto, exceto para o imidacloprido foi verificado efeitos negativos nas populações de inimigos naturais, sendo possível observar a presença de predadores e de fungos da ordem Entomophthorales parasitando afídeos nas plantas de couve. Breda *et al.* (2011) verificaram que óleo de nim, mas em laboratório, para controlar *A. gossypii* causou efeitos letais e subletais em larvas de *C. sanguinea* mesmo em baixas concentrações.

Resultados experimentais obtidos em laboratório e campo normalmente podem diferir. Os resultados de bioensaios podem ser utilizados para prever a atividade em campo, uma vez que em laboratório muitas vezes não é possível avaliar o patógeno em seus fatores biológicos e ecológicos e comportamento de ação. Em campo o inseto pode nunca ter contato com suficiente o inoculo

para causar a infecção, e em alguns casos, a virulência pode variar entre os diferentes estádios de desenvolvimento em função da susceptibilidade (Goettel *et al.* 2010).

A aplicação direta de compostos associados à virulência de fungos demonstra que podem ser obtidos excelentes resultados, podendo ser uma alternativa ao uso direto de propágulos infectivos altamente susceptíveis a ação do ambiente. Kim *et al.* (2010), aplicando o sobrenadante obtido de linhagem de *B. bassiana* ($4,7 \times 10^8$), verificaram que a população de *A. gossypii* reagiu com ação idade-dependente, em casa-de-vegetação, com taxa de controle após três dias de aplicação de 67,7%, 56,7%, 52,7%, 42,7% e 41,1% nas diluições de 100, 200, 400, 800 e 1600x, enquanto que as proteínas componentes deste sobrenadante mostraram eficiência de controle de *A. gossypii* de 94,1%.

Este estudo é relevante na continuidade das pesquisas com bioprodutos das linhagens *B. bassiana* URPE 27 e *L. muscarium* URPE 28, uma vez que não existe a garantia de melhores resultados apenas com o aumento da concentração de esporos ou repetição de aplicação, como demonstram outros estudos envolvendo fungos entomopatogênicos (Hall 1980, Kim & Kim 2008).

Os resultados demonstram que as linhagens testadas podem ser introduzidas em programas de manejo integrado de pragas na couve, e que a combinação com o óleo de nim é favorável, podendo ser consideradas como uma alternativa viável ao uso de agrotóxicos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos ao primeiro autor. Ao prof. Robert W. Barreto por ceder as instalações da Clínica de Fitopatologia da UFV para realização dos trabalhos, e ao funcionário Célio pelo constante auxílio em campo.

Literatura Citada

- Abbott, W.S.A. 1925.** Method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Alves, S.B. 1998.** Fungos entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*, 2ª ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B., R.B. Lopes, S.A. Vieira & M.A. Tamai. 2008.** Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. p.69-110. In S.B. Alves & R.B. Lopes. *Controle microbiano de pragas na América Latina*. Piracicaba, FEALQ, 414p.
- Ascher, K.R.S. 1993.** Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 22: 433-449.
- Baverstock, J., P.G. Anderson & J.K. Pell. 2005.** *Pandora neoaphidis* transmission and aphid foraging behavior. *J. Invertebr. Pathol.* 90: 73-76.
- Breda, M.O., J.V. Oliveira, E.J. Marques, R.G. Ferreira & M.F. Santana. 2011.** Inseticidas botânicos aplicados sobre *Aphis gossypii* e seu predador *Cycloneda sanguinea* em algodão colorido. *Pesqu. Agropecu. Bras.* 46: 1424-1431.
- Butt, T.M., L. Ibrahim, B.V. Ball & S.J. Clark. 1994.** Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Pest Manag. Sci.* 4: 207-214.
- Charleston, D.S., R. Kfir, L.E.M. Vet & M. Dicke. 2005.** Behavioural responses of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica*. *Bull. Entomol. Res.* 95: 457-465.
- Faria, A.B.C. & N.J. Sousa. 2005.** Estratégias no manejo de resistência a inseticidas para o pulgão-gigante-do-pinus (*Cinara pinivora* Wilson e *Cinara atlantica* Wilson; Hemiptera: Aphididae). *Floresta* 35: 153-167.

- Faria, M.R. & B.P. Magalhães. 2001.** O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biocientífica Cienc. Desenvolv.* 22: 18-21.
- Faria, M.R. & S.P. Wraight. 2001.** Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Prot.* 20: 767-778.
- Feng, M.G., J.B. Johnson & L.P. Kish. 1990.** Virulence of *Verticillium lecanii* and aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for species of cereal infesting aphids (Homoptera; Aphididae). *Environ. Entomol.* 19: 815-820.
- Filgueira, F.A.R. 2008.** Brassicáceas – couves e plantas relacionadas, p. 279-299. In F.A.R. Filgueira (ed.), *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 3ed. Viçosa, Editora UFV, 421p.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** *Entomologia agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Godoy, K.B. & F.J. Cividanes. 2002.** Tabelas de esperança de vida e fertilidade para *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) em condições de laboratório e campo. *Neotrop. Entomol.* 31: 41-48.
- Goettel, M.S., J. Eilenberg & T. Glare. 2010.** Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations, p. 387-432. In I.G. Lawrence & S.G. Gill (eds.), *Insect control biological and synthetic agents*. Orlando, Elsevier, 470p.
- Gonçalves, M.E.C. & E. Bleicher. 2006.** Atividade sistêmica de azadiractina e extratos aquosos de sementes de nim sobre o pulgão-preto em feijão-de-corda. *Rev. Ciên. Agron.* 37: 177-181.
- Hall, R.A. 1980.** Control of aphids by the fungus, *Verticillium lecanii*: Effect of spore concentration. *Entomol. Exp. Appl.* 27: 1-5.

- Hall, R.A. 1982.** Control of whitefly, *Trialeurodes vaporarum* and cotton aphid, *Aphis gossypii* in glasshouses by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. 101: 1-11.
- Hall, R.A. & H.D. Burges. 1979.** Control of aphids in glasshouses with the fungus, *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. 93: 235-246.
- Hesketh, H., H.E. Roy & J. Eilenberg. 2010.** Challenges in modeling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. BioControl 55: 55-73.
- Isikber, A.A. & M.J.W. Copland. 2002.** Effects of various aphid foods on *Cycloneda sanguinea*. Entomol. Exp. Appl. 102: 93-97.
- Kim, J.J. & K.C. Kim. 2008.** Selection of highly virulence isolates of *Lecanicillium attenuatum* against cotton aphid. J. Asia-Pacific Entomol. 11: 1-4.
- Kim, J.S., J.Y. Roh, J.Y. Choi, Y. Wang, H.J. Shim & Y.H. Je. 2010.** Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. Fungal Biol. 114: 120-128.
- Kumar, P., H.M. Poehling & C. Borgemeister. 2005.** Effects of different application methods of azadirachtin against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* Gennadius (Hom., Aleyrodidae) on tomato plants. J. Appl. Entomol. 129: 489-497.
- Liu, T.X. & A.N. Sparks Jr. 2011.** Aphids on Cruciferous Crops Identification and Management, 12p. disponível em <http://AgriLifebookstore.org>, acesso em 01/12/2011.
- Mordue, A.J. & A. Blackwell. 1993.** Azadirachtin: an update. J. Ins. Physiol. 39: 903-924.
- Nisbet A.J., J.A.T. Woodford & R.H.C. Strang. 1996.** The effects of azadirachtin on the acquisition and inoculation of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. Crop Prot. 15: 9-14.
- Pavela, R., M. Barnet & F. Kocourek. 2004.** Effect of azadirachtin applied systemically through roots of plants on the mortality, development and fecundity of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*). Phytoparasitica 32: 286-294.

- Peña-Martinez, R. 1992.** Afidos como vectores de virus en México. Montecillo, Centro de Fitopatología, 135p.
- Salvadori J.R., P.R.V.S. Pereira & M.T.B. Silva. 2005.** Manejo de pulgões. Rev. Cult. 75: 32-34.
- Santos, T.M., N.P. Costa, A.L. Torres & A.L. Boiça Júnior. 2004.** Effect of nim extract on the cotton aphid. Pesqu. Agropecu. Bras. 39: 1071-1076.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Schmutterer, H. 1990.** Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. Annu. Rev. Entomol. 35: 271-297.
- SIA – Sistema de Informações sobre Agrotóxicos. 2012.** Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia> acesso em janeiro de 2012.
- Starý, P., M. Sampaio & V.H.P. Bueno. 2007.** Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) and their associations related to biological control in Brasil. Rev. Bras. Entomol. 51: 107-118.
- Völkl, W., M. Mackauer, J.K. Pell & J. Brodeur. 2007.** Predators, parasitoids and pathogens, p. 187-233. In H. van Emden & R. Harrington (eds.), Aphids as crop pests. Wallingford, CAB International, 745p.
- Vu, V.H., S.I. Hong & K. Kim. 2007.** Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. J. Biosci. Bioeng. 104: 498-505.
- Zehnder, G., G.M. Gurr, S. Kühne, M.R. Wade, S.D. Wratten & E. Wyss. 2007.** Arthropod pest management in organic crops. Annu. Rev. Entomol. 52: 57-80.
- Zhang, W.Q. & S.A. Hassan. 2003.** Use of the parasitoid *Diaeretiella rapae* (McIntoch) to control the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). J. Appl. Entomol. 127: 522–526.

Tabela 1. Número total (%) (médias \pm EP) de *Lipaphis erysimi* vivos, mortos e mumificados, eficiência relativa e média de sobrevivência (dias), submetidos a diferentes tratamentos em condição de campo, cinco dias após a aplicação¹.

Tratamentos	<i>Lipaphis erysimi</i>				Sobrevivência (dias)
	Vivos	Eficiência (%)	Mortos	Mumificados	
Testemunha	35,7 \pm 12,16 a	-	1,0 \pm 0,00 a	-	11,3 \pm 0,88 a
Imidacloprido	0,0 \pm 0,00 b	100,0	7,0 \pm 0,00 a	-	1,0 \pm 0,00 d
Nim	4,3 \pm 3,84 ab	88,0	8,7 \pm 0,00 a	-	2,1 \pm 0,40 bc
URPE 27	3,7 \pm 2,03 ab	89,6	7,0 \pm 0,00 a	0,0 \pm 0,00 b	6,2 \pm 1,07 b
URPE 27 + Nim	0,0 \pm 0,00 b	100,0	8,0 \pm 0,00 a	0,0 \pm 0,00 b	1,5 \pm 0,22 c
URPE 28	19,3 \pm 11,85 ab	45,9	0,3 \pm 0,33 a	0,3 \pm 0,33 ab	5,8 \pm 0,98 b
URPE 28 + Nim	12,3 \pm 8,35 ab	65,5	7,7 \pm 2,33 a	1,2 \pm 1,20 a	3,2 \pm 0,61 bc
Teste F, χ^2 e valor de P	F _{6,14} = 3,16; P = 0,0355	-	F _{6,14} = 3,24; P = 0,0327	F _{6,14} = 3,40; P = 0,0276	χ^2 = 89,84; P < 0,0001

¹Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey

a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Número total (%) (médias \pm EP) de *Myzus persicae* vivos, mortos e mumificados, eficiência relativa e média de sobrevivência (dias), submetidos a diferentes tratamentos em condição de campo, cinco dias após a aplicação¹.

Tratamentos	<i>Myzus persicae</i>				Sobrevivência (dias)
	Vivos	Eficiência (%)	Mortos	Mumificados	
Testemunha	62,3 \pm 20,93 a	-	1,0 \pm 0,58 a	-	17,2 \pm 0,55 a
Imidacloprido	0,0 \pm 0,00 b	100,0	3,3 \pm 1,20 a	-	1,0 \pm 0,00 b
Nim	9,3 \pm 8,35 b	85,1	4,3 \pm 2,85 a	-	15,2 \pm 1,17 a
URPE 27	7,30 \pm 5,84 b	88,3	0,7 \pm 0,33 a	0,3 \pm 0,33 a	17,8 \pm 1,05 a
URPE 27 + Nim	20,7 \pm 6,23 ab	66,8	0,7 \pm 0,67 a	0,7 \pm 0,67 a	17,3 \pm 0,74 a
URPE 28	23,7 \pm 5,55 ab	62,0	0,3 \pm 0,33 a	0,3 \pm 0,33 a	18,7 \pm 0,77 a
URPE 28 + Nim	15,0 \pm 5,86 b	75,9	2,3 \pm 1,86 a	0,3 \pm 0,33 a	16,1 \pm 1,29 a
Teste F, χ^2 e valor de P	F _{6,14} = 4,52; P = 0,0094	-	F _{6,14} = 1,40; P = 0,2802	F _{6,14} = 0,57; P = 0,7468	χ^2 = 17,53; P = 0,0075

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey

a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Número total (%) (médias \pm EP) de *Brevicoryne brassicae* vivos, mortos e mumificados, eficiência relativa e média de sobrevivência (dias), submetidos a diferentes tratamentos em condição de campo, cinco dias após a aplicação¹.

Tratamentos	<i>Brevicoryne brassicae</i>				Sobrevivência (dias)
	Vivos	Eficiência (%)	Mortos	Mumificados	
Testemunha	17,7 \pm 9,06 a	-	0,7 \pm 0,33 b	-	14,7 \pm 0,96 a
Imidacloprido	0,0 \pm 0,00 a	100,0	11,7 \pm 3,52 a	-	1,0 \pm 0,00 d
Nim	1,00 \pm 0,58 a	94,4	6,0 \pm 3,05 ab	-	1,4 \pm 0,14 c
URPE 27	1,7 \pm 1,67 a	90,4	5,33 \pm 2,72 ab	1,3 \pm 1,33 a	11,9 \pm 1,56 a
URPE 27 + Nim	4,0 \pm 1,73 a	77,4	5,33 \pm 0,67 ab	0,0 \pm 0,00 a	6,0 \pm 0,77 b
URPE 28	6,3 \pm 1,76 a	64,4	2,0 \pm 1,00 ab	1,3 \pm 1,33 a	11,9 \pm 0,98 a
URPE 28 + Nim	7,3 \pm 2,73 a	58,8	4,0 \pm 1,73 ab	0,0 \pm 0,00 a	13,6 \pm 1,14 a
Teste F, χ^2 e valor de P	F _{6,14} = 2,59; P = 0,0666	-	F _{6,14} = 2,57; P = 0,0682	F _{6,14} = 0,83; P = 0,5638	χ^2 = 153,77; P < 0,0001

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey

a 5% de probabilidade.

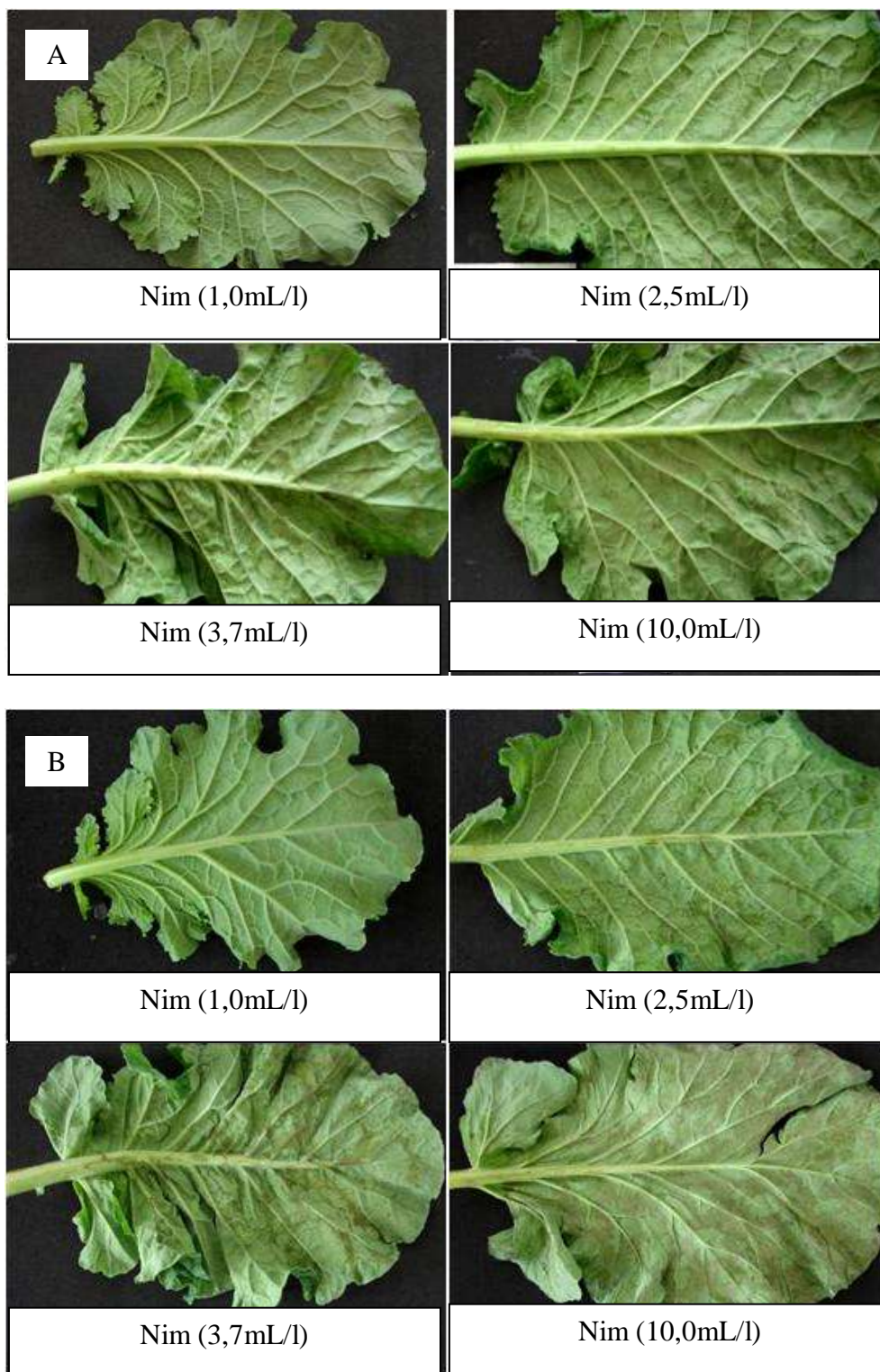


Figura 1. Manchas devido ao efeito fitotóxico do óleo de nim (Neemseto[®]) em plantas de couve manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.) em diferentes concentrações aplicadas em campo, após 24 (A) e 96 (B) horas .

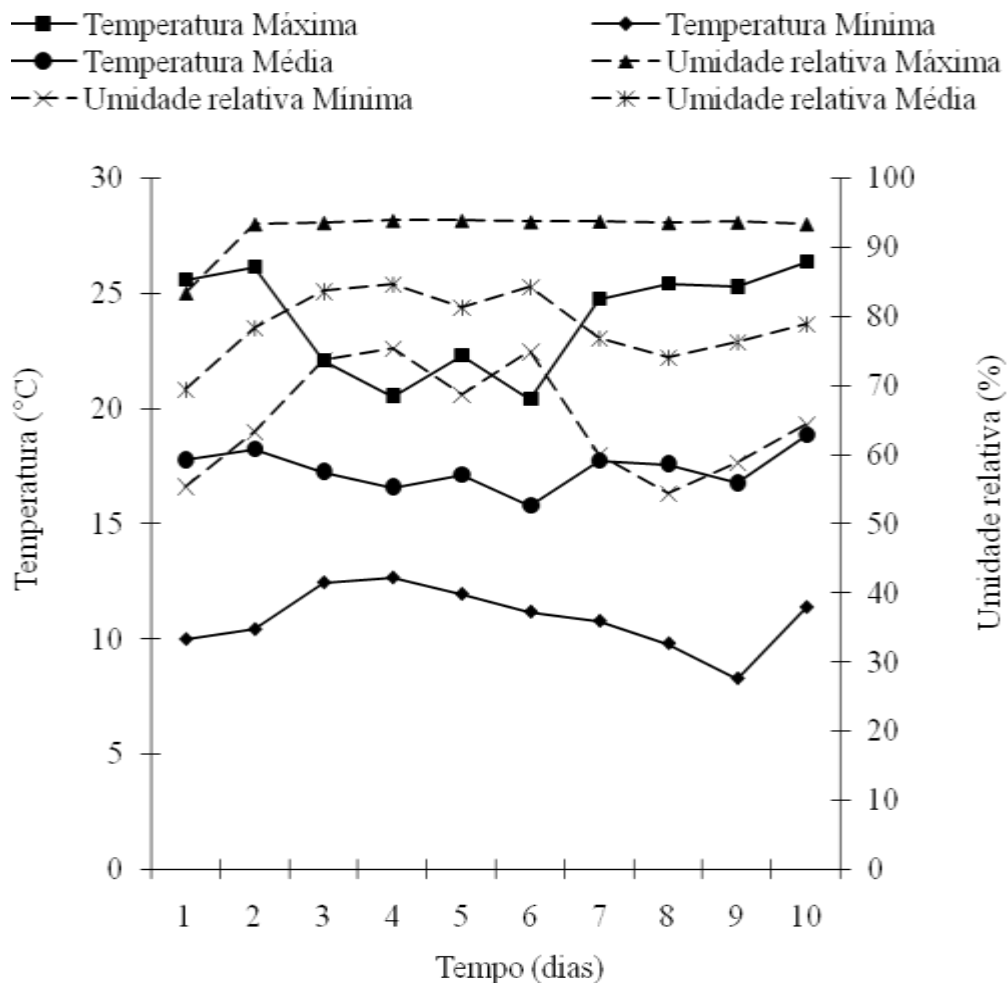


Figura 2. Temperatura e umidade relativa máximas, mínimas e médias aferidas durante o período de avaliação do experimento em campo, onde afídeos da couve foram submetidos à ação de fungos entomopatogênicos, óleo de nim e imidacloprido.

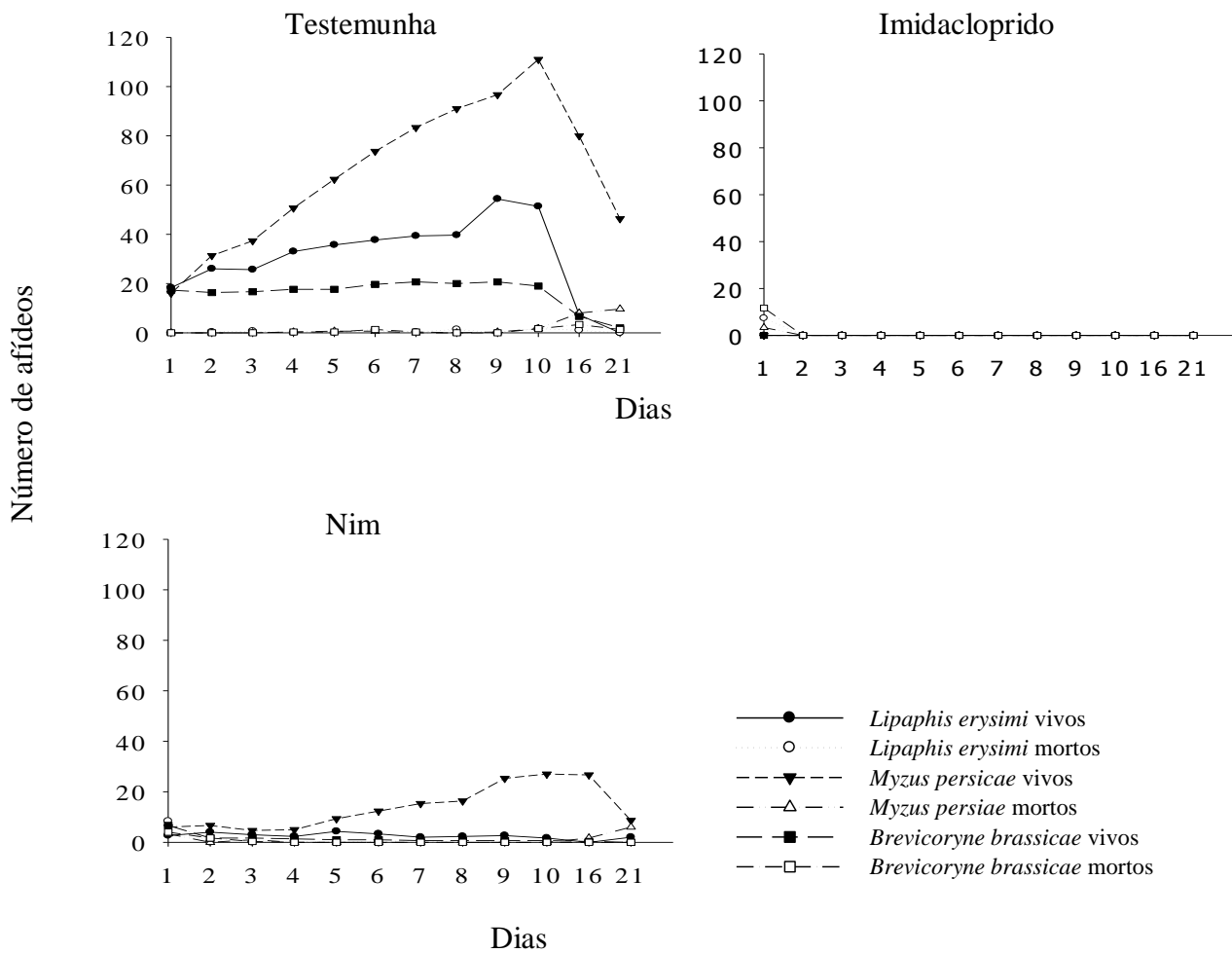


Figura 3. Flutuação populacional de *Lipaphis arysimi*, *Myzus persicae* e *Brevicoryne brassicae* submetidos aos tratamentos testemunha absoluta, testemunha positiva (Imidacloprido) e óleo de nim, em condições de campo em Viçosa, MG.

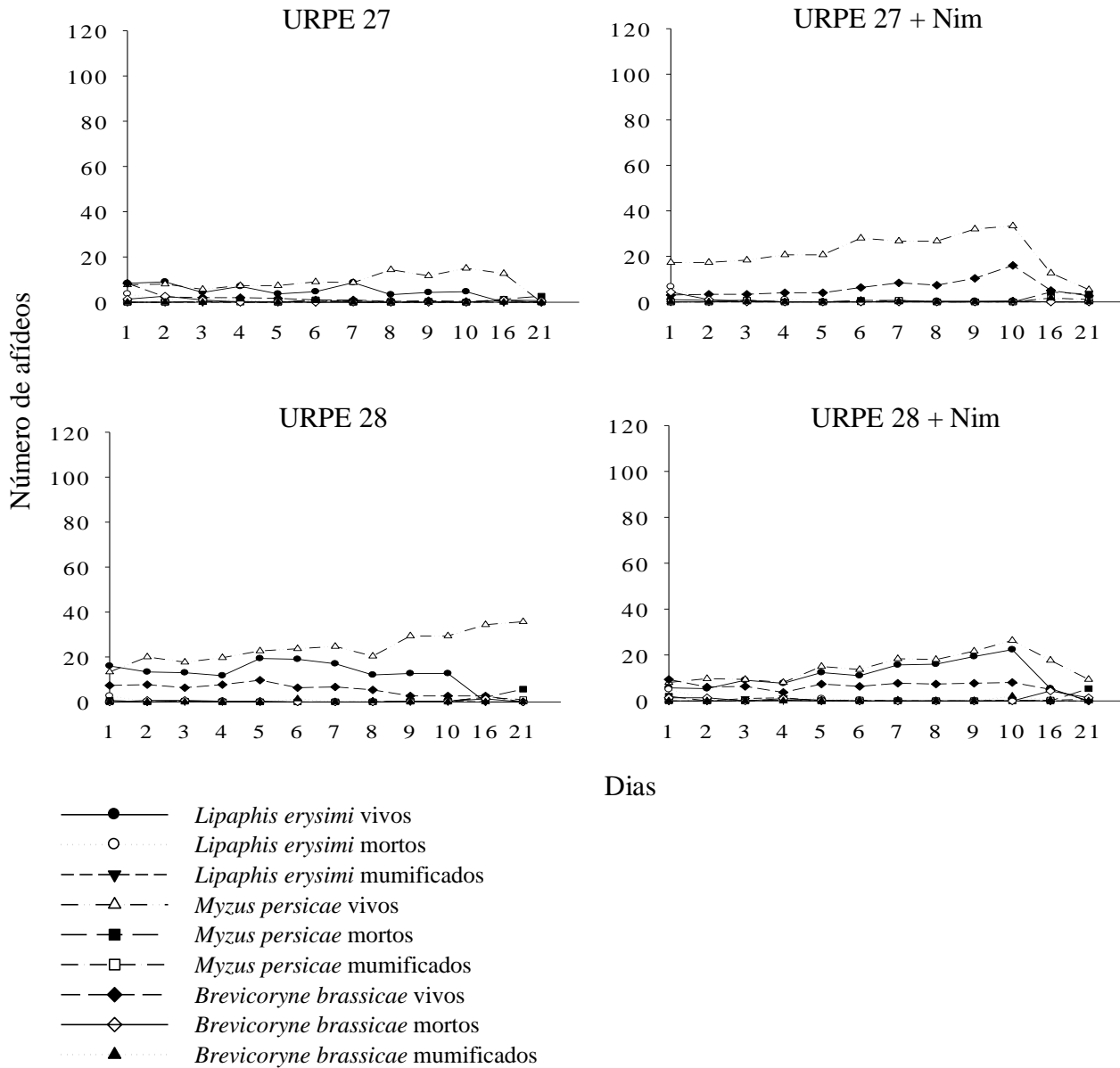


Figura 4. Ação de *Beauveria bassiana* URPE 27 e *Lecanicillium muscarium* URPE 28 e suas associações com óleo de nim sobre a flutuação populacional de *Lipaphis arysimi*, *Myzus persicae* e *Brevicoryne brassicae* em condições de campo em Viçosa, MG.

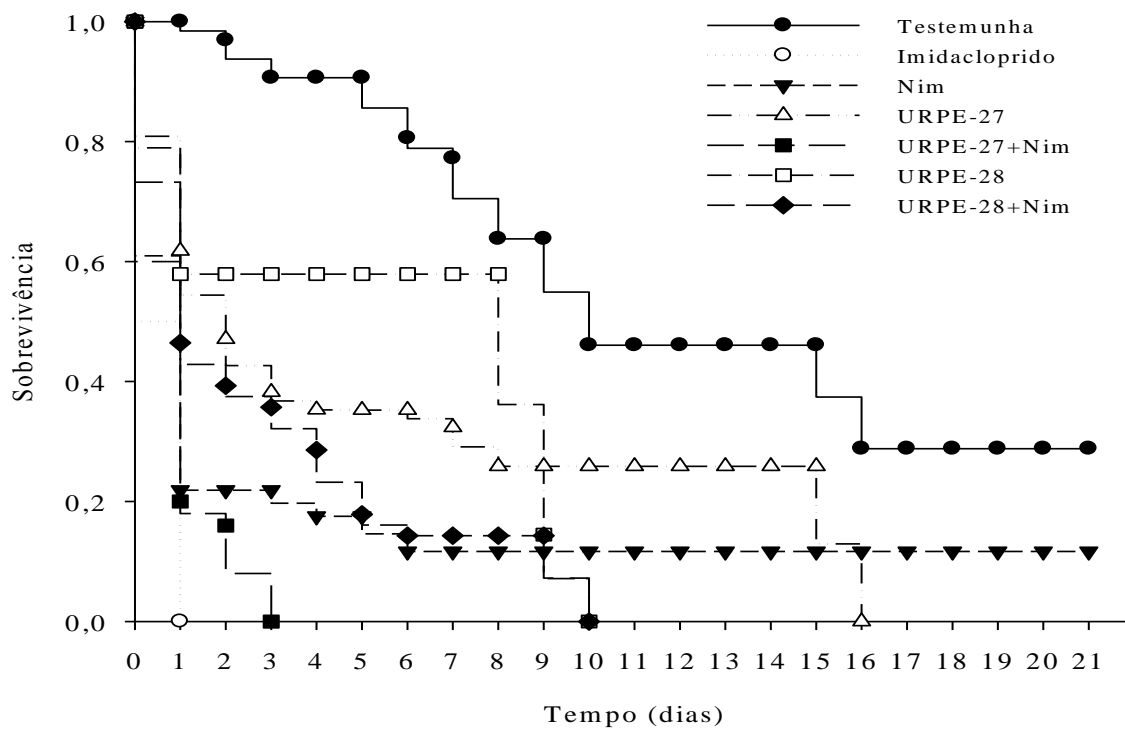


Figura 5. Sobrevivência de *Lipaphis erysimi* submetido à ação de fungos entomopatogênicos, óleo de nim e imidacloprido em campo, Viçosa, MG.

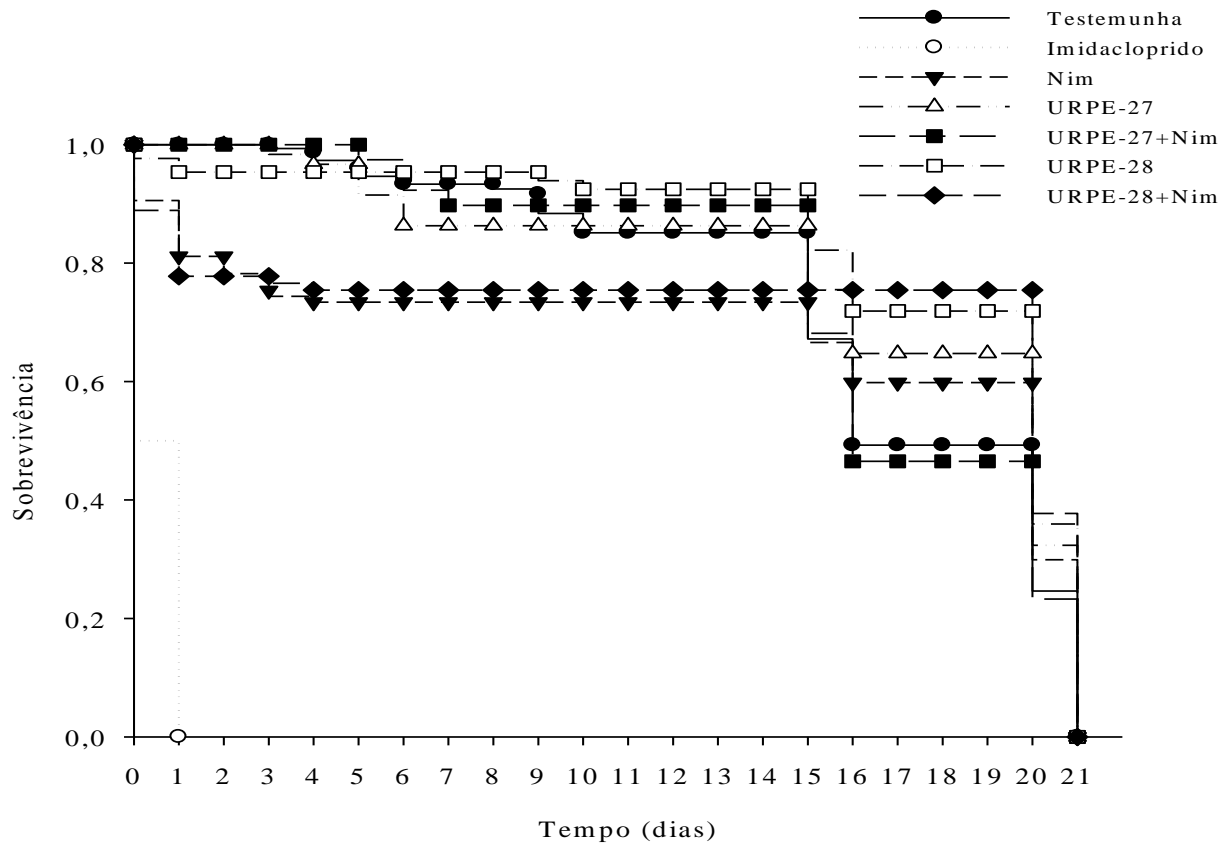


Figura 6. Sobrevivência de *Myzus persicae* submetidos à ação de fungos entomopatogênicos, óleo de nim e inseticida em campo, Viçosa, MG.

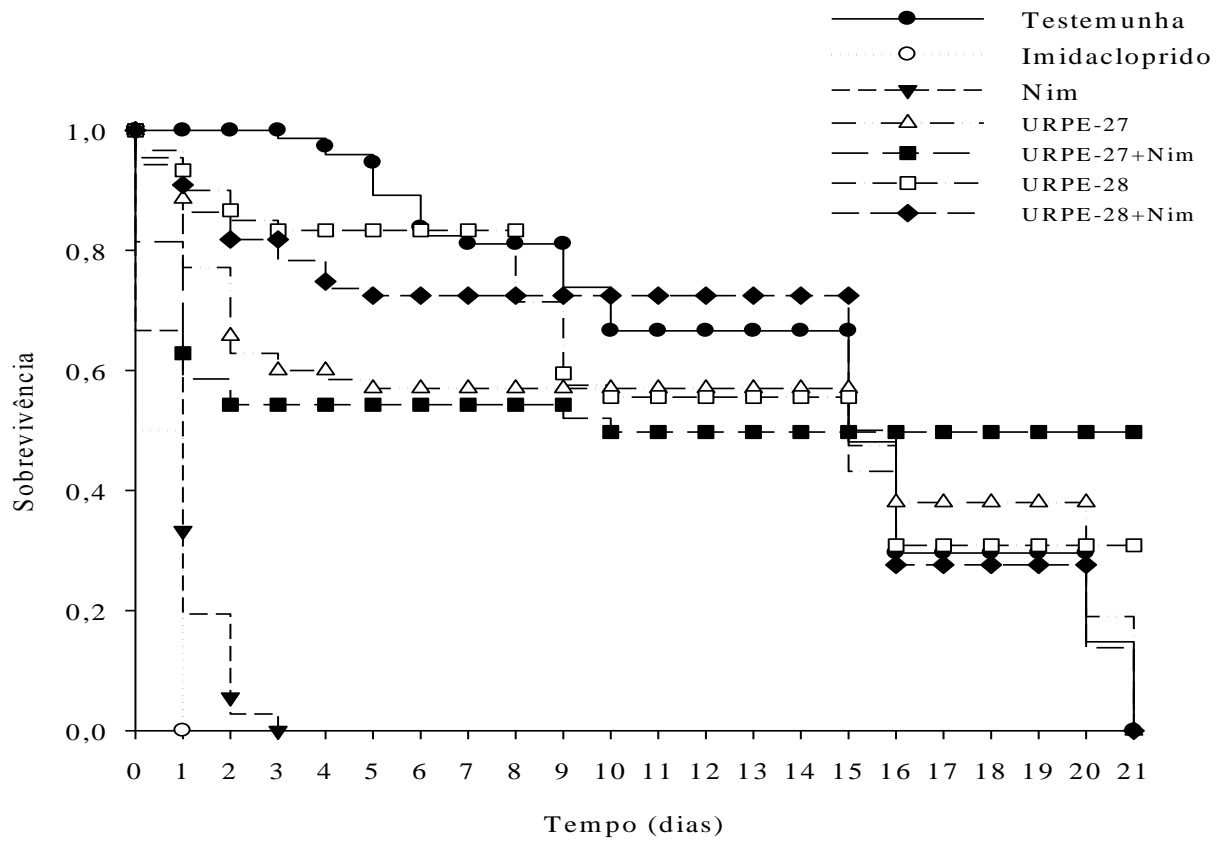


Figura 7. Sobrevivência de *Brevicoryne brassicae* submetido à ação de fungos entomopatogênicos, óleo de nim e inseticida em campo, Viçosa, MG.

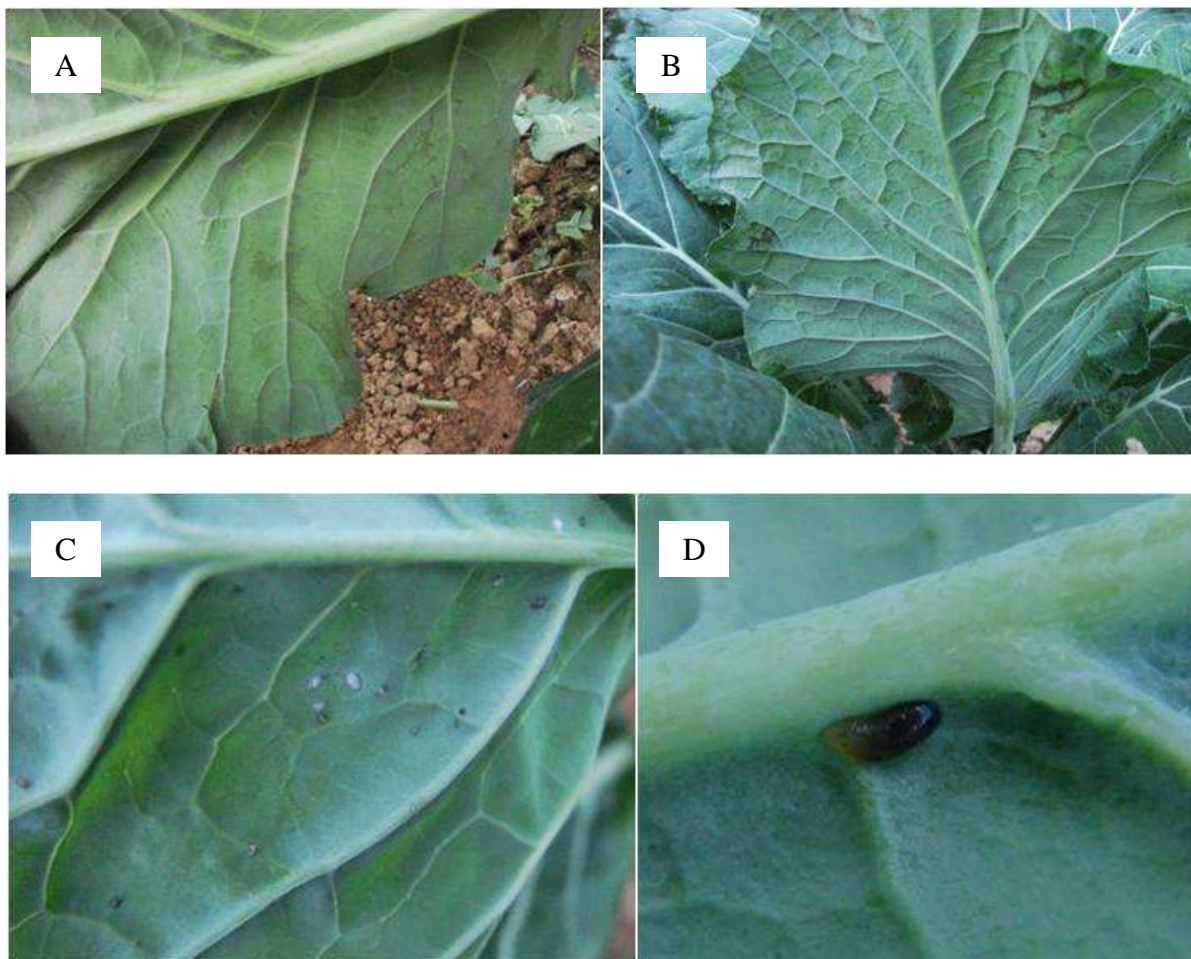


Figura 8. Diferentes aspectos observados nas avaliações de campo onde foram submetidos *Lipaphis erysimi*, *Myzus persicae* e *Brevicoryne brassicae* a ação de *Beauveria bassiana* URPE 27 e *Lecanicillium muscarium* URPE 28, óleo de nim (Neemseto[®]) e imidacloprido. A e B – manchas de efeito fitotóxico do óleo de nim, C – Afídeos infectados por *Beauveria bassiana* URPE 27, D – Larva de Syrphidae morto pela ação do imidacloprido.

CAPÍTULO 5

Zoophthora aphidis (Hoffmann in Fresenius) BATKO (1964B) ASSOCIADO AO PULGÃO
Lipaphis erysimi (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) NO CULTIVO DA COUVE (*Brassica*
oleracea L. var. *Acephala* D.C.)¹

RICARDO L. MELO², SIMON L. ELLIOT³, EDMILSON J. MARQUES², DANIEL L. VIOL² E ROBERT
W. BARRETO⁴

²Departamento de Agronomia – Entomologia, Univ. Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom
Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE

³Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde – Entomologia, Univ. Federal de Viçosa,
Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36570-000 , Viçosa - MG

⁴Departamento de Ciências Agrárias – Fitopatologia, Univ. Federal de Viçosa, Avenida Peter
Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36570-000 , Viçosa - MG

¹ Melo, R.L., S.L. Elliot, E.J. Marques, D.L. Viol & R.W. Barreto. *Zoophthora aphidis* (Hoffmann in Fresenius) Batko (1964b) associado ao pulgão *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) no cultivo da couve (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.). A ser submetido ao BioControl.

RESUMO – Visando conhecer as espécies de fungos Entomophthorales que atuam naturalmente no controle de afídeos-praga da couve em Viçosa-MG, foi realizado o monitoramento de *Lipaphis erysimi* (Kalt.) e *Myzus persicae* (Sulzer) infectados por estes agentes. A espécie identificada causando infecção nos pulgões foi *Zoophthora aphidis* (Hoffmann in Fresenius) Batko (1964b). Em *L. erysimi* e *M. persicae* a proporção média de infectados foi de 0,24 e 0,30, respectivamente. A fase mais susceptível a infecção por *Z. aphidis* foram o terceiro e segundo ínstaes para *L. erysimi* e *M. persicae*, respectivamente. Existe uma correlação positiva entre área da folha e número de infectados. Em média, *L. erysimi* alcançou infestação de 7,3 insetos sadios e de 2,5 insetos infectados, enquanto que *M. persicae* atingiu níveis médios de infestação de 17,9 e 7,8 insetos sadios e infectados, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: *Zoophthora aphidis*, pulgão da mostarda, controle microbiano

Zoophthora aphidis (Hoffmann in Fresenius) Batko (1964b) ASSOCIATED WITH *Lipaphis erysimi* (KALT.) (HEMIPTERA: APHIDIDAE) IN KALE CULTURE (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.)

ABSTRACT – To get acquainted with the species of Entomophthorales fungi that act naturally control aphid pests of kale in Viçosa-MG, was carried out monitoring *Lipaphis erysimi* (Kalt.) and *Myzus persicae* (Sulzer) infected by these agents. The species causing infection in aphids was *Zoophthora aphids* (Hoffman in Fresenius) Batko (1964b). In *L. erysimi* and *M. persicae* the average proportion of infected individuals was 0.24 and 0.30, respectively. Phase more susceptible to infection by *Z. aphidis* were third and second instars for *L. erysimi* and *M. persicae*, respectively. There is a positive correlation between leaf area and number of infecteds. On average, *L. erysimi* infestation reached 7.3 healthy insects and 2.5 infected insects, while *M. persicae* reached average levels of infestation of 17.9 healthy insects and 7.8 infected, respectively.

KEY WORDS: *Zoophthora aphidis*, mustard aphid, microbiological control

Introdução

Fungos da ordem Entomophthorales (Zigomycota) apresentam eficiência significativa no controle natural de populações de insetos (Völkl *et al.* 2007), como por exemplo *Pandora neoaphids* (Remaudière & Hennebert) Humber e *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko que são comumente registradas regulando populações de *Lipaphis erysimi* (Kalt.), *Myzus persicae* (Sulzer) e *Brevicoryne brassicae* (L.) (Feng *et al.* 1990, Alves 1998, Zhang & Hassan 2003, Starý *et al.* 2007, Völkl *et al.* 2007); contudo, é possível que estes agentes não sejam capazes de regular algumas populações em determinadas condições de campo, podendo este fato estar relacionado às íntimas interações que ocorrem entre patógeno e hospedeiro (Alves 1998, Goettel *et al.* 2010).

Estimativa de Lenteren (2009) indicou que, aproximadamente, 95% de populações de insetos que, eventualmente se tornariam pragas em 85,5 milhões de km² de área cultivada no planeta são reguladas pelo controle biológico natural, enquanto que Alves (1998) estima que apenas os fungos entomopatogênicos são responsáveis por cerca de 80% das enfermidades que ocorrem sobre artrópodes.

O pulgão da mostarda como é comumente denominado *L. erysimi* faz parte do complexo de afídeos-pragas na cultura da couve-manteiga (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* D.C.) (Filgueira 2008, Liu & Sparks Jr. 2011), promovendo em associação com *B. brassicae* e *M. persicae* danos e perdas significativos na cultura (Gallo *et al.* 2002, Filgueira 2008).

Estes pulgões, assim como outras espécies de insetos praga, são, eventualmente, infectados por fungos entomopatogênicos, podendo uma mesma população ser infectada por mais de uma espécie e em diferentes estádios de desenvolvimento (Goettel *et al.* 2010).

Dentro do Filo Zygomycota são conhecidos mais de 200 espécies de Entomophthorales patogênicos a insetos, que normalmente causam epizootias significativas. A ordem

Entomophthorales aplica-se bem ao controle biológico por conservação, clássico ou por inoculação (Hesketh *et al.* 2010).

Para que ocorram epizootias causadas por fungos da ordem Entomophthorales as condições climáticas são de relevante importância, que devem ser favoráveis. Estas condições são altas umidades do ar e temperaturas amenas, principalmente da noite (Elliot *et al.* 2002, Baverstock *et al.* 2008).

Das espécies que ocorrem infectando afídeos podem-se destacar as pertencentes ao gênero *Zoophthora* que apresenta como características principais o conidióforo ramificado e raramente simples, os conídios clavados a ovoides, com um núcleo e papila basal cônica, rodeado por uma camada líquida e com tendência a produzir capiliconídios secundários. O núcleo tem aparência granulosa, podendo ser colorido com aceto orceína. Os rizóides não apresentam terminação discóide aderente (Alves 1998).

O objetivo desta pesquisa foi de identificar e avaliar os efeitos de fungos entomophthorales em populações de *L. erysimi* e *M. persicae* no cultivo da couve-manteiga.

Material e Métodos

A pesquisa foi conduzida na área experimental da Clínica de Doenças de Plantas e no Laboratório de Interação Inseto-planta da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Estabelecimento do Cultivo. Sementes de couve var. manteiga foram cultivadas em bandejas de isopor, utilizando a mistura de substrato de plantio (50%), húmus de minhoca (30%) e solo (20%), sendo as plântulas transferidas diretamente para o solo após 20 dias do plantio, aproximadamente.

As plantas foram cultivadas em espaçamento de 1,0 metro entre linhas e 0,5 metro entre plantas, adubadas com N-P-K conforme recomendação na fase de plantio e irrigação por aspersão

mantida apenas na fase inicial do cultivo até o seu estabelecimento e início das avaliações, sem aplicações de agrotóxicos no cultivo.

Acompanhamento da Infecção de Afídeos por Entomophthorales.

Unidade Amostral. Foram selecionadas 20 plantas em quatro fileiras de dois blocos distintos, sendo 15 no primeiro bloco e mais cinco no segundo bloco em fileiras paralelas, distando em oito metros entre eles.

Em cada planta, foi selecionada uma folha jovem, com aproximadamente uma semana de idade, permitindo a manutenção da colônia por um longo período. As folhas foram demarcadas com etiquetas de papel em sacos plásticos de polipropileno, presas no pecíolo da folha com corda de algodão. Na base do pecíolo, ainda foram colocados chumaços de algodão previamente embebidos com óleo de vaselina (Farmax[®]), circundando todo o pecíolo, visando evitar a migração de insetos de outras partes da planta, assim como, dos insetos observados na respectiva folha.

Em cada planta foram tomadas, previamente, as avaliações, as medidas de altura (distância do solo até a base da folha demarcada), comprimento (distância entre a base de sua inserção no caule e a porção final da nervura central) e largura (distância entre as extremidades perpendiculares a nervura central, no maior tamanho). Foram observados espécimes de *L. erysimi* e *M. persicae* que estavam infestando as folhas selecionadas, mantendo-se apenas uma espécie por folha e excluindo insetos migratórios. Para conhecimento prévio da ecologia e sintomatologia das infecções por Entomophthorales, foram realizadas amostragens durante um período de dois meses em plantas de couve infestadas por pulgões, realizando o acompanhamento do quadro infectivo e iniciando o processo de identificação microscópica.

Avaliações e Parâmetros. Diariamente, durante o período de 27 de abril a 26 de maio de 2011 foram registrados o número de insetos encontrados em cada colônia, distinguindo as fases de

desenvolvimento (ninfas I, II, III e IV, adultos alados e ápteros) e categorizando o estágio de infecção por entomophthorales (1 – infectado vivo, com mudança de coloração; 2 – infectado morto; 3 – recoberto por esporos; 4 – completamente recoberto por esporos; 5 – presença de fungos secundários e 6 – morte ocasionada por outras circunstâncias). Foram registrados ainda a presença de outros fatores de mortalidade natural como predadores, parasitóides e outros fungos entomopatogênicos. A observação dos insetos foi realizada com o auxílio de lupa de bolso com dez aumentos e 6,25 cm² de base, visualizando os indivíduos que se localizavam na porção abaxial da folha.

Informações Meteorológicas. As informações relativas à temperatura, umidade relativa (máximas, mínimas e médias) e pluviosidade (média e acumulada) foram obtidas diariamente, às 9h da manhã, no mesmo local onde estava instalado o plantio com o auxílio da estação meteorológica Squitter (ISIS S1220 PCD Ambiental), distando em cerca de 50 metros das plantas.

Identificação de Entomophthorales. A identificação do fungo seguiu a metodologia descrita por Pell *et al.* (2001), onde os insetos coletados em campo exibindo sinais de colonização foram postos em placas de Petri plásticas com 9 cm de diâmetro, mantidas em câmara climatizada à temperatura de 18 °C, umidade relativa próximo a 100%, no escuro, durante o período necessário à conidiogênese.

Os pulgões foram aderidos à fita adesiva de dupla face na parte superior da placa, com a porção dorsal voltada para baixo, enquanto que na porção inferior da placa foram postas lâminas para coletar os conídios e chumaços de algodão umedecidos para manter a alta umidade. A coloração das estruturas do fungo foi realizada através da mistura de Lactofenol e do corante Aceto-Orcéin, a base de ácido acético, que permite a coloração dos núcleos dos conídios.

A visualização das estruturas foi realizada com o auxílio de microscópio óptico de luz (Zeiss, Axioskop 40) e a comparação das mesmas, utilizando as chaves de identificação de Keller

(1987, 1991) e Humber (1989, 1997), com identificação confirmada pelo Phd. Harry C. Evans (CABI Bioscience).

Análises Estatísticas. As médias de tempo para mudança de categoria de infectado foram submetidas à análise de variância (ANOVA – Proc. ANOVA) e as médias foram comparadas, através do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Para se conhecer a distribuição de insetos infectados de *L. erysimi* e *M. persicae* foi realizada análise de frequência (Proc freq), através do software estatístico SAS (SAS Institute 1999-2001), sendo as médias obtidas comparadas através do teste χ^2 .

As médias de altura da planta e área da folha foram submetidas a análise de regressão comparando com o número médio total de insetos infectados por espécie e realizou-se o estudo de correlação de Pearson, comparando os dados de frequência com as referidas médias, onde:

$$\rho_{x,y} = \frac{Cov(X,Y)}{\sigma_x \cdot \sigma_y}$$

Sendo ρ = Correlação de Pearson, x = frequência média da espécie nos diferentes municípios e y = número de espécies de inimigos naturais encontrados por localidade e σ = desvios padrões de x e y .

Resultados e discussão

Durante o período de avaliação foram acompanhados grupos de afídeos de *L. erysimi* e *M. persicae*, duas das três espécies de pulgões que atacam a couve-manteiga no Brasil, identificando-se apenas uma espécie de entomophthorales ocorrendo naturalmente nos insetos, *Zoophthora aphids* (Hoffmann in Fresenius) Batko (1964b) (Fig. 1).

Os conídios primários em *L. erysimi* apresentaram média de 25,5x7,4 μ m de comprimento/largura, com relação de C/L de 3,4 μ m, alongados, uninucleados, com leve constricção na porção apical e revestido por muco. O capiliconídio formado lateralmente. Corpos

hifais alongados, ramificados e cor marrom ferruginoso. Não foram encontrados esporos de resistência. Em *M. persicae* as médias de 28,0x8,8µm comprimento/largura e relação C/L de 3,2µm. Conídios primários semelhantes aos descritos para *L. erysimi*, exceto pela cor esbranquiçada (Fig. 1).

Diferenças na coloração de espécies de afídeos infectados podem ser causadas por diferenças na composição química dos compostos resultantes da interação. Em *M. persicae* mortos pela ação de *Pandora delphacis* (Hori) Humber, a molécula de cistina analisada nos insetos apresentam o triplo da densidade e o dobro do comprimento dos insetos mortos por *P. neoaphidis*, o que proporciona insetos mais marrom-amarelados quando mortos pela ação de *P. delphacis* (Xu & Feng 2000).

As temperaturas máximas e mínimas atingiram os picos de 28,9 e 7,8 °C e umidade relativa de 93 e 43%, respectivamente. As variações de umidade relativa e temperatura são fundamentais para o desenvolvimento de infecções por entomophthorales. Xu & Feng (2002) verificaram que a mortalidade de *M. persicae* causada por *P. delphacis* apresenta um incremento quando a temperatura e umidade relativa estão situadas entre 15-30 °C e 74-100%, respectivamente.

As populações de *M. persicae* foram mais numerosas que as de *L. erysimi* no período avaliado, contudo, os padrões médios de infecção foram semelhantes. Em média, *L. erysimi* alcançou infestação de 7,3 insetos sadios e de 2,5 insetos infectados, enquanto que *M. persicae* atingiu níveis médios de infestação de 17,9 e 7,8 insetos sadios e infectados, respectivamente (Fig. 2), por folha avaliada, com pico para as duas espécies próximo aos quinze dias. Com base nestas médias, as proporções de infectados são de 0,24 e 0,30 para *L. erysimi* e *M. persicae*, respectivamente.

Diferenças nos índices de infecção de uma mesma espécie de fungo em diferentes hospedeiros ocorrem naturalmente. Barta & Cagán (2003) verificaram que *Pandora* (=Erynia

neoaphidis) e *Neozygites fresenii* (Nowakowski) Batko causam diferentes percentagens de mortalidade, em condições naturais de infecção, em seis espécies de afídeos.

De acordo com Baverstock *et al.* (2005) a transmissão de *P. neoaphidis* ocorre quando o pulgão *Acyrtosiphon pisum* (Harris), atingem proporção de 0,24 cadáveres recobertos em plantas de feijão. Um dos fatores que podem interferir na transmissão de fungos é a presença de outros inimigos naturais, como por exemplo, o pulgão *Microlophium carnosum* (Buckton) tem incremento de insetos infectados por *P. neoaphidis* na presença do parasitóide *Aphidius microlophii* (Pennacchio & Tremblay) (Baverstock *et al.* 2008).

Outros agentes foram observados durante o monitoramento. Larvas e adulto de joaninhas (*Cycloneda sanguinea* (L.)), Syrphidae, parasitóide (*Lysiplhebus* sp.) e *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare and Gams estavam sempre presentes durante as avaliações, contudo, não foi mensurado a sua participação como um fator de transmissão de *Z. aphidis* em *L. erysimi* e *M. persicae*. Estes mesmos agentes foram relatados por Morais (2010) em plantas de repolho.

A altura média das plantas no início da avaliação foi de 13,1 centímetros, com largura e comprimento das folhas de 11x15cm, respectivamente. O número médio de insetos infectados apresentou correlação positiva com as médias de altura da planta ($R = 0,0061$) e área da folha ($R = 0,3456$). Por outro lado, as análises de regressão para os dois parâmetros demonstraram que altura da planta e área da folha explica muito pouco as médias de infectados com valores de $R^2 = 0,12$ e $0,13$ respectivamente (Fig. 3).

A área da folha apresentou melhores índices, estando este fato relacionado à dispersão dos conídios de entomophthorales nas mesmas, que pode ocorrer de forma direta através da injeção dos conídios, ou indireta por transporte em outros inimigos naturais. Incremento de infecção de *M. carnosum* por *P. neoaphidis* foi verificado por Baverstock *et al.* (2008) na presença de larvas

de *Inachis io* (L.) que ao reduzirem a área foliar, devido ao consumo, aumentam a taxa de transmissão do fungo.

A fase de desenvolvimento dos afídeos, independente da espécie mais susceptível à ação de *Z. aphidis* foi o terceiro ínstar, conforme pode ser visto na Figura 4 através da análise frequência de infectados, que foi significativa para ambas espécies (*L. erysimi* $\chi^2 = 18,4$; $P = 0,0025$ e *M. persicae* $\chi^2 = 35,5$; $P < 0,0001$), seguido das ninfas de 2º ínstar. Este fato é importante porque a infecção se concentra nas fases iniciais de desenvolvimento, impedindo que o afídeo chegue a fase adulta e continue e se multiplicar (Fig. 4).

Apesar de considerar o primeiro ínstar como a fase crítica de mortalidade, Morais (2010) verificou que fungo Entomophthorales ocorreu de maneira significativa apenas no terceiro ínstar, em *L. erysimi* em plantas de couve. Quando se tratava de *M. persicae* a fase crítica e o início da infecção por Entomophthorales foi o terceiro ínstar.

Os resultados obtidos por Scorsetii *et al.* (2010), demonstraram que fases ninfais e adultos ápteros do afídeo *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) são igualmente infectados naturalmente por *P. neoaphidis*. Contudo, a infecção de adultos alados, é menor que para ninfas e ápteros.

O tempo médio que *Z. aphidis* levou para atingir o máximo de infecção (nível 5) não diferiu entre as fases de desenvolvimento observadas, variando de 72 a 154 horas para *L. erysimi* e de 48 a 125 horas para *M. persicae* (Tabela 1). O Tempo Letal (TL₅₀) de *P. delphacis* e *P. neoaphidis* em concentrações variando de 5-18 conídios/mm² em populações de *M. persicae* é de em média 3 a 4 dias (Xu & Feng 2000).

Em média, as populações de *L. erysimi* que infestavam as plantas de couve foram extintas com 20,5 dias e para *M. persicae* 20,3 dias. Os fatores que levaram à extinção destas populações, além da infecção pelos fungos, foram morte da planta ou queda das folhas.

Diversos são os fatores que interferem na transmissão e dispersão de entomophthorales, como a espécie de afídeo hospedeira, a planta hospedeira e químicos produzidos por esta espécie, fatores ambientais (temperatura, umidade relativa e radiação ultravioleta) e produtos químicos aplicados na cultura (Steinkraus 2006).

Zoophthora aphidis tem potencial de controle das espécies *L. erysimi* e *M. persicae*, uma vez demonstrado que, na maioria dos casos, a infecção de estádios de desenvolvimento subsequentes das espécies foi detectada, causando mortalidade ainda nas fases iniciais.

Os índices de mortalidade são aproximados aos registrados em outras espécies de fungos e hospedeiros. A continuidade dos estudos para melhorar a eficiência do fungo é uma próxima etapa que pode ser realizada, como avaliar os efeitos da interação com outros agentes de controle biológico e métodos de produção e liberação do fungo.

A manipulação do ambiente para favorecer as infecções com *Z. aphidis* é um dos fatores preponderantes para que a sua atuação possa ser eficaz no manejo integrado de pragas da couve, visando os afídeos.

Agradecimentos

A Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro com bolsas de estudo ao primeiro autor. Ao Dr. Harry Evans pelo auxílio na identificação do fungo, a Dr^a Elisângela G.F. Moraes pelas orientações e ao funcionário Célio pelo constante auxílio em campo.

Literatura Citada

Alves, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos, p. 289-381. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos, 2^a ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

- Barta, M. & Cagán, L. 2003.** Entomophthoralean fungi associated with the common nettle aphid (*Microlophium carnosum* Buckton) and the potential role of nettle patches as reservoirs for the pathogens in landscape. *J. Pest Sci.* 76: 6-13.
- Baverstock, J., P.G. Anderson & J.K. Pell. 2005.** *Pandora neoaphidis* transmission and aphid foraging behavior. *J. Invertebr. Pathol.* 90: 73-76.
- Baverstock, J., K.E. Baverstock, S.J. Clark & J.K. Pell. 2008.** Transmission of *Pandora neoaphidis* in the presence of co-occurring arthropods. *J. Invertebr. Pathol.* 98: 356-359.
- Elliot, S. L., G.J de Moraes & J.D. Mumford. 2002.** Importance of ambient saturation deficits in an epizootic of the fungus *Neozygites floridana* in cassava green mites (*Mononychellus tanajoa*). *Exp. Appl. Acarol.* 27: 11-25.
- Feng, M.G., J.B. Johnson & L.P. Kish. 1990.** Virulence of *Verticillium lecanii* and aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi:Hyphomycetes) for species of cereal infesting aphids (Homoptera; Aphididae). *Environ. Entomol.* 19: 815-820.
- Filgueira, F.A.R. 2008.** Brassicáceas – couves e plantas relacionadas, p. 279-299. In F.A.R. Filgueira (ed.), *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 3ed. Viçosa, Editora UFV, 421p.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** *Entomologia agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Goettel, M.S., J. Eilenberg & T. Glare. 2010.** Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations, p. 387-432. In I.G. Lawrence & S.G. Gill (eds.), *Insect control biological and synthetic agents*. Orlando, Elsevier, 470p.
- Hesketh, H., H.E. Roy & J. Eilenberg. 2010.** Challenges in modeling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. *BioControl* 55: 55-73.

- Humber, R.A. 1989.** Synopsis of a revised classification for Entomophthorales (Zygomycotina). Mycotaxon 34: 441–460.
- Humber, R.A. 1997.** Fungi: Identification, p. 153–186. In L. Lacey (ed.), Manual of techniques in insect pathology. San Diego, Academic Press, 852p.
- Keller, S. 1987.** Arthropod–pathogenic Entomophthorales of Switzerland. I. *Conidiobolus*, *Entomophaga* and *Entomophthora*. Sydowia 40: 122–167.
- Keller, S. 1991.** Arthropod-pathogenic Entomophthorales of Switzerland. II. *Erynia*, *Eryniopsis*, *Neozygites*, *Zoophthora*, and *Tarichium*. Sydowia 43: 39–122.
- Lenteren, J.C. van. 2009.** Critérios de seleção de inimigos naturais, p. 11-32. In V.H.P. Bueno (ed.), Controle biológico de pragas: Produção massal e controle de qualidade. Lavras, UFLA, 430p.
- Liu, T.X. & A.N. Sparks Jr. 2011.** Aphids on Cruciferous Crops Identification and Management, 12p. disponível em <http://AgriLifebookstore.org>, acesso em 01/12/2011.
- Morais, E.G.F. 2010.** Fatores determinantes do ataque dos pulgões *Brevicoryne brassicae*, *Lipaphis erysimi* e *Myzus persicae* ao repolho. Tese de Doutorado, Viçosa, UFV, 103p.
- Pell, J.K., J. Eilenberg, A.E. Hajek & D.C. Steinkraus. 2001.** Biology, ecology and pest management potential of *Entomophthorales*, p. 71-154. In T.M. Butt, C. Jackson & N. Magan (eds.), Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential. Wallingford, CABI Publishing, 391p.
- SAS Institute. 1999-2001.** SAS user's guide: Statistics, version 8.2, 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Scorsetti, A.C., A. Maciá, D.C. Steinkraus & C.C López Lastra. 2010.** Prevalence of *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales) infecting *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera: Aphididae) on lettuce crops in Argentina. Biol. Control 52: 46-50.

- Starý, P., M. Sampaio & V.H.P. Bueno. 2007.** Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) and their associations related to biological control in Brasil. *Rev. Bras. Entomol.* 51: 107-118.
- Steinkraus, D.C. 2006.** Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. *J. Invertebr. Pathol.* 92: 125-131.
- Völkl, W., M. Mackauer, J.K. Pell & J. Brodeur. 2007.** Predators, parasitoids and pathogens, p. 187-233. In H. van Emden & R. Harrington (eds.), *Aphids as crop pests*. Wallingford, CAB International, 745p.
- Xu, J.H. & M.G. Feng. 2000.** The time-dose-mortality modeling and virulence indices for two entomophthoralean species, *Pandora delphacis* and *P. neoaphidis*, against the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Biol. Control* 17: 29-34.
- Xu, J.H. & M.G. Feng. 2002.** *Pandora delphacis* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) infection affects the fecundity and population dynamics of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) at varying regimes of temperature and relative humidity in the laboratory. *Biol. Control* 25: 85-91.
- Zhang, W.Q. & S.A. Hassan. 2003.** Use of the parasitoid *Diaeretiella rapae* (McIntoch) to control the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). *J. Appl. Entomol.* 127: 522–526.

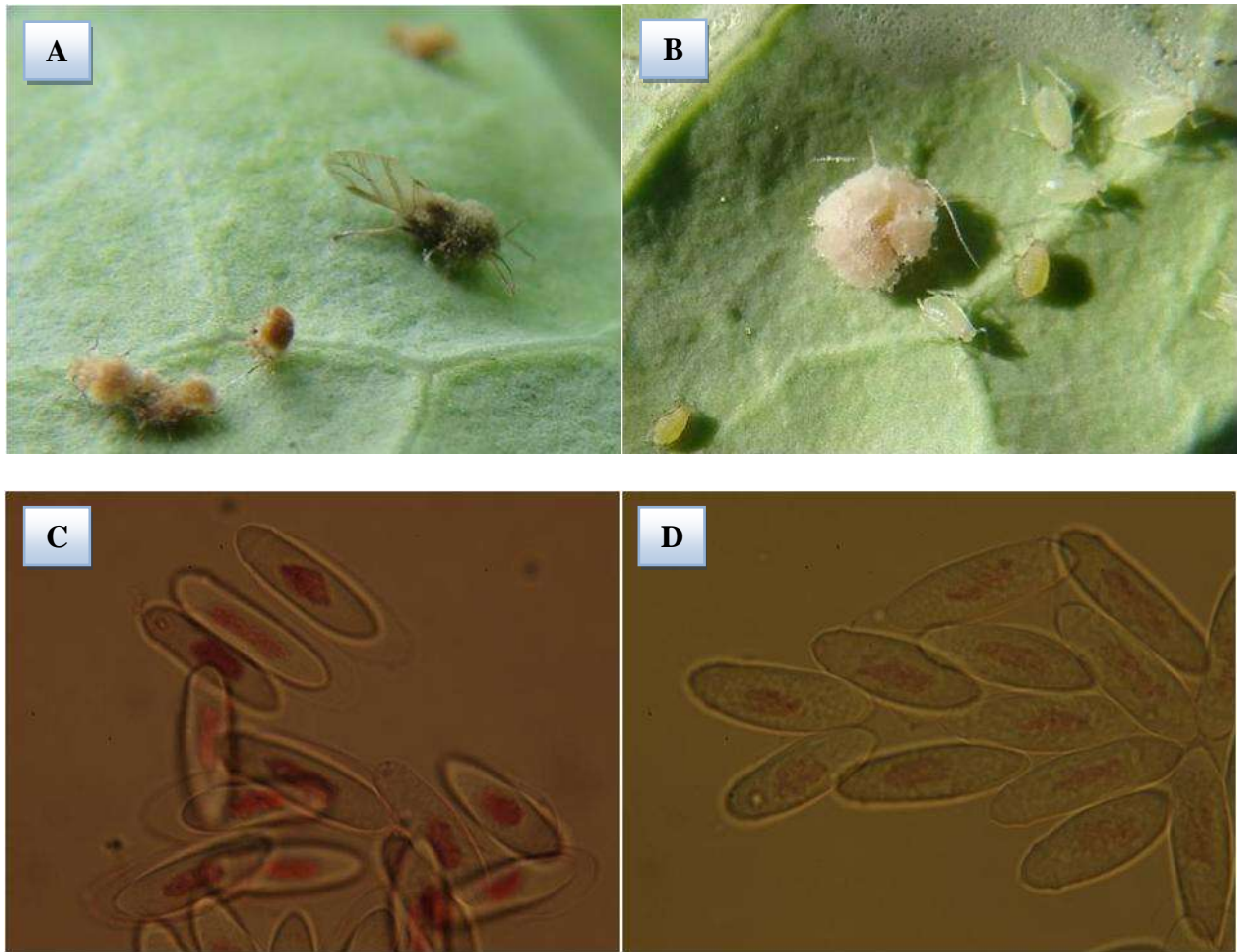


Figura 1. Ninfas e adultos de *Lipaphis erysimi* (A) e adulto de *Myzus persicae* (B) parasitados por *Zoophthora aphidis* em cultivo da couve. C e D microfotografia de conídios de *Zoophthora aphidis* demonstrando constrição característica na extremidade e leve mucilagem recobrando os conídios.

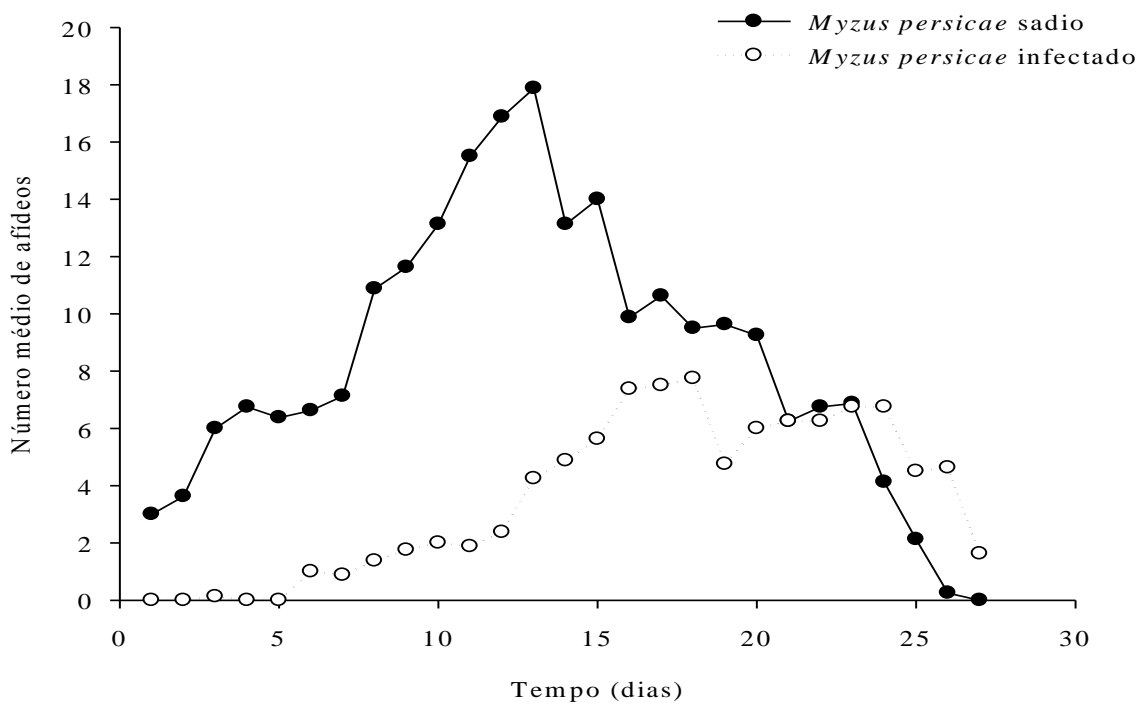
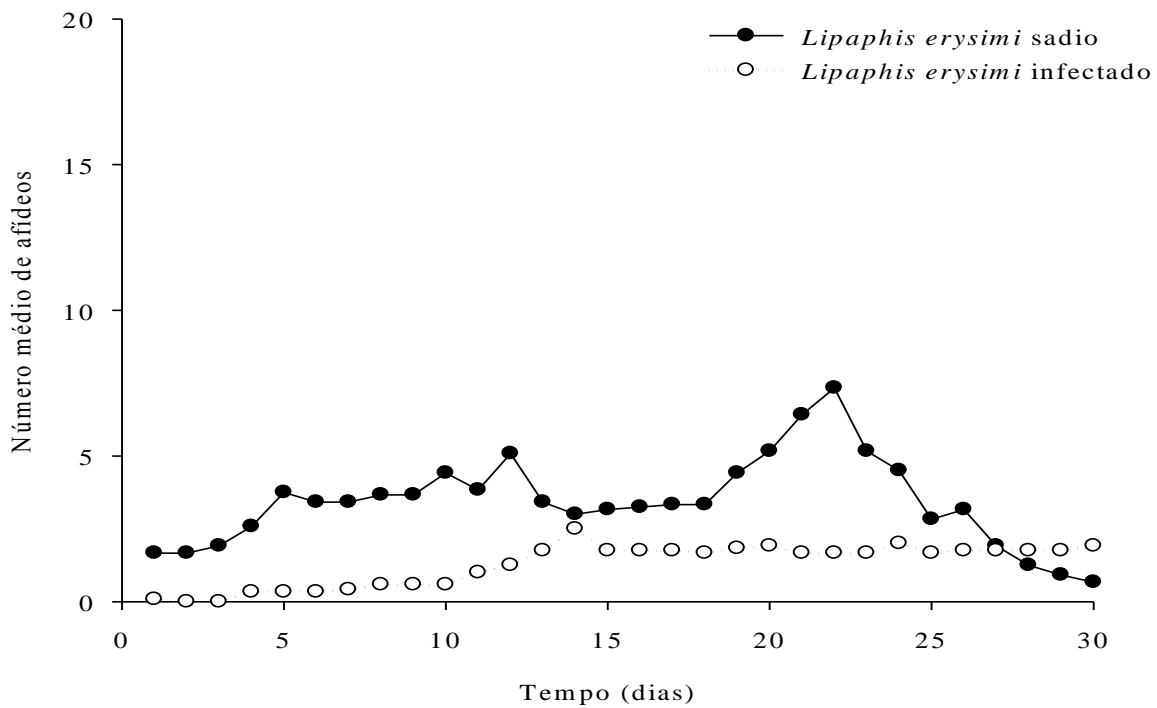


Figura 2. Média de *Lipaphis erysimi* e *Myzus persicae* sadios e infectados por *Zoophthora aphidis* por folha de couve avaliada em um período de 30 dias.

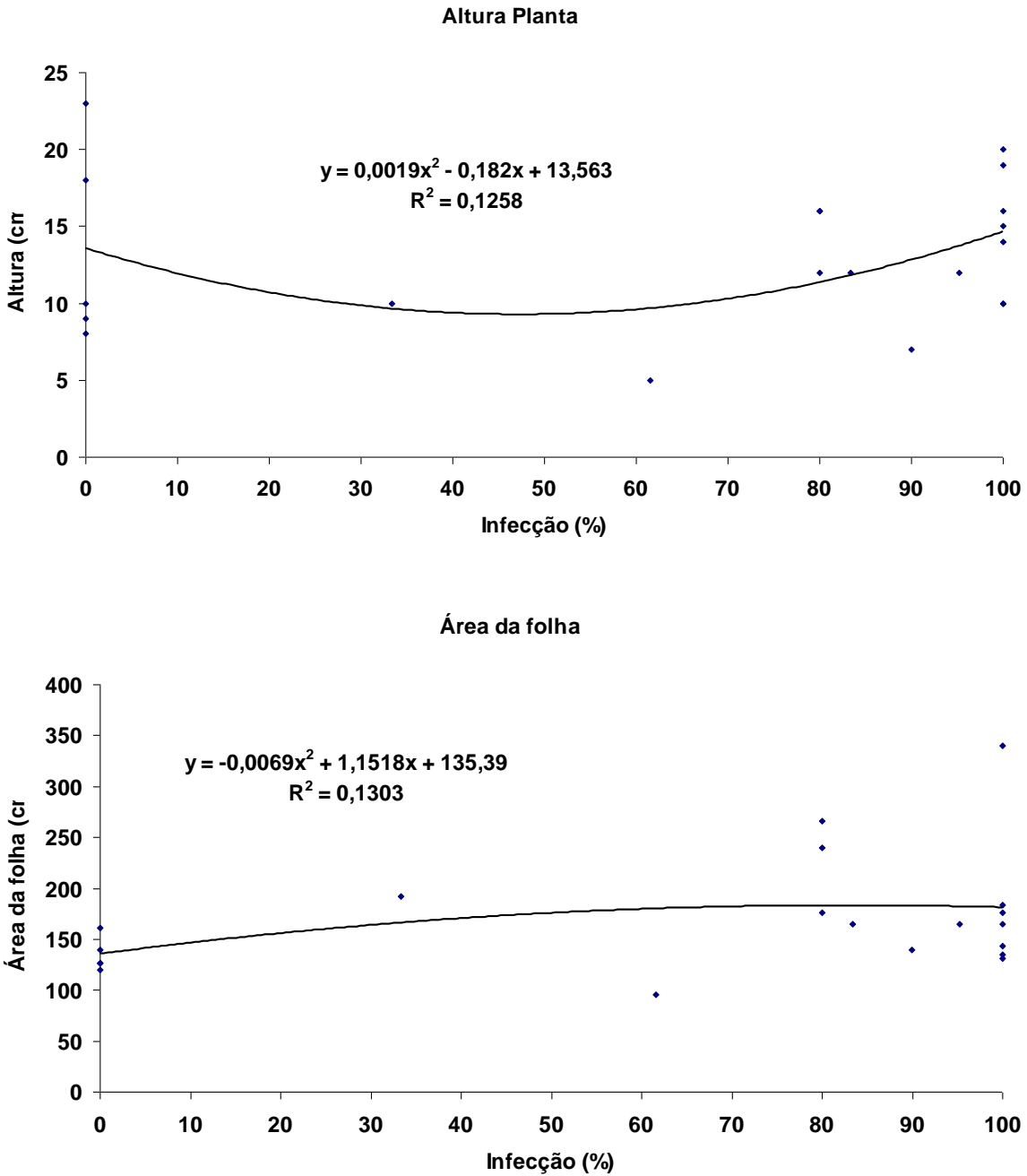


Figura 3. Análise de regressão correlacionando as médias de *Lipaphis erysimi* e *Myzus persicae* infectados por *Zoophthora aphidis* com os dados médios de altura da planta e área da folha de plantas de couve (*B. oleracea*).

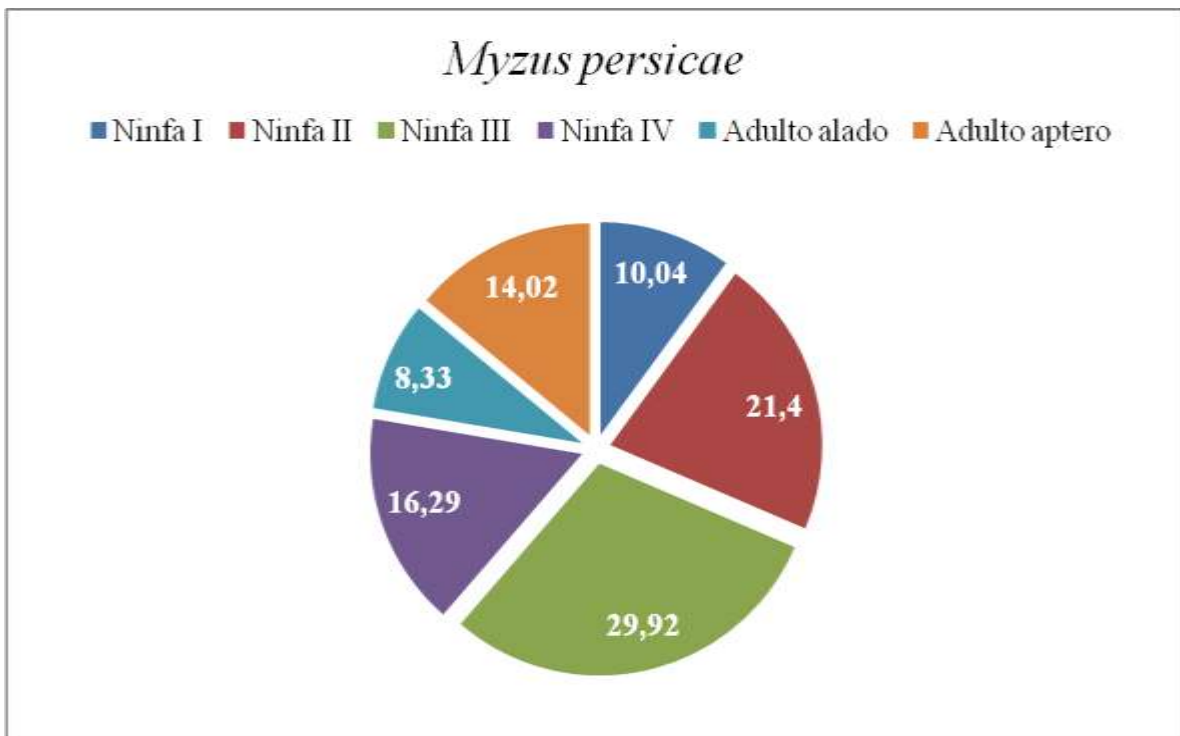
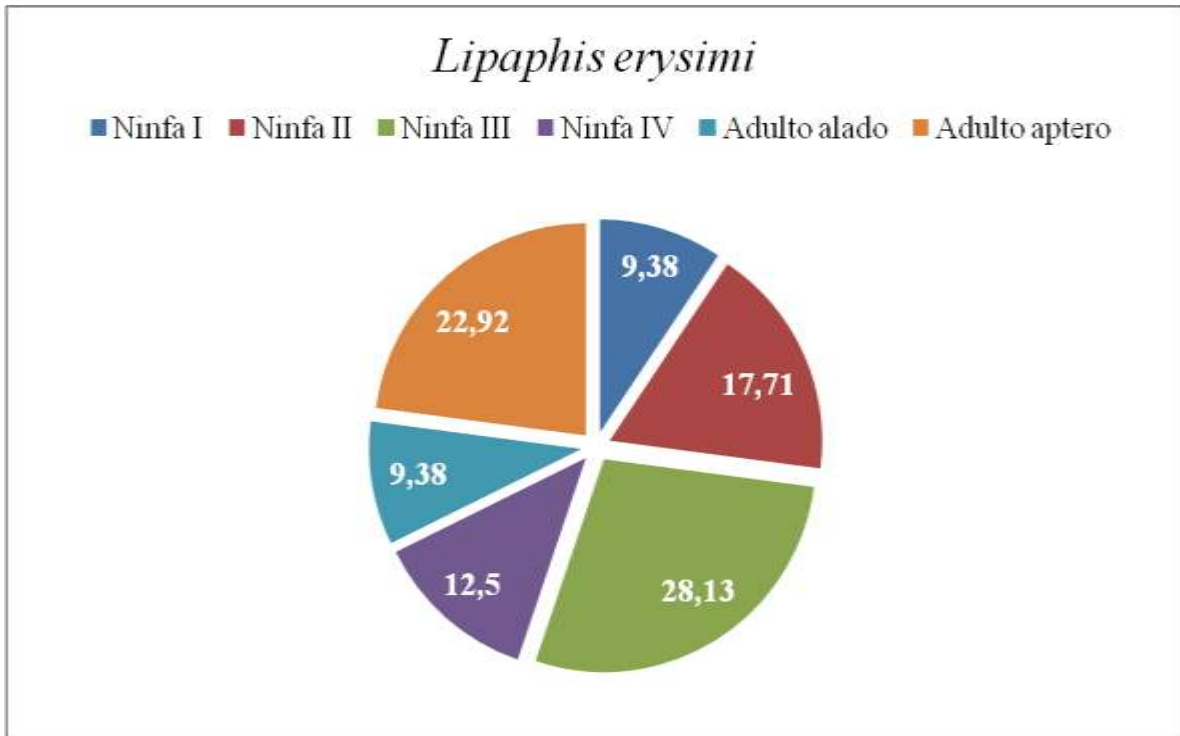


Figura 4. Frequência média de *Lipaphis erysimi* e *Myzus persicae* infectados por *Zoophthora aphidis*, distribuídos por fase de desenvolvimento.

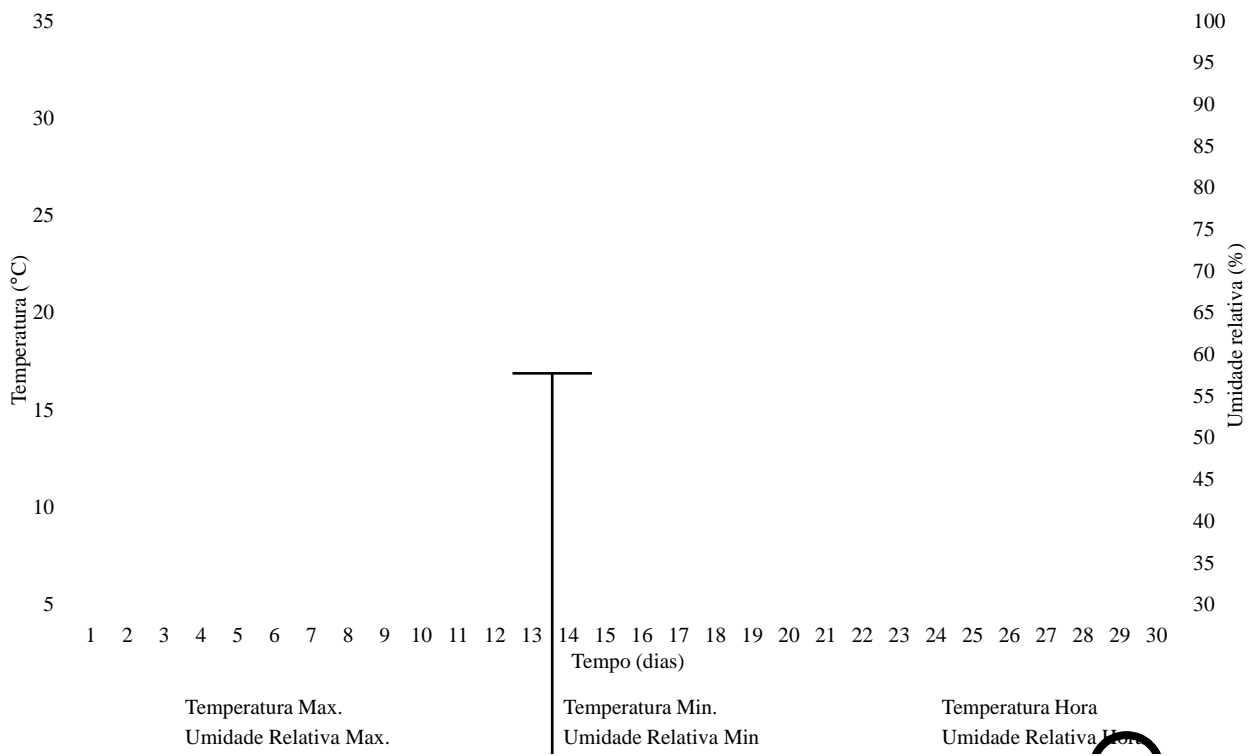


Figura 5. Dados médios de temperatura e umidade relativa (máxima, mínima e na hora da avaliação), mensuradas no período de avaliação.

Tabela 1. Tempo em horas (média \pm EP) necessário para *Lipaphis erysimi* e *Myzus persicae* infectados por *Zoophthora aphids* evoluírem do grau 1 para o grau 5 de infecção, em diferentes fases de desenvolvimento.

Espécie	Fase de desenvolvimento						Teste de F e valor de P
	Ninfa I	Ninfa II	Ninfa III	Ninfa IV	Alado	Áptero	
<i>Lipaphis erysimi</i>	-	105,6 \pm 24,71	108,0 \pm 33,44	84,0 \pm 36,00	72,0 \pm 0	154,3 \pm 39,50	F = 0,63; P = 0,65
<i>Myzus persicae</i>	48,0 \pm 0	73,0 \pm 18,91	123,4 \pm 28,89	97,4 \pm 27,51	-	125,2 \pm 27,00	F = 0,92; P = 0,4692