

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

**PATOGENICIDADE DE *Paecilomyces fumosoroseus* ISOLADO CG 259 À *Eurhizococcus brasiliensis* HEMPEL (HOMOPTERA: MARGARODIDAE)**Regina M.D.G. Carneiro<sup>1</sup>, Saulo J. Soria<sup>2</sup>, Stela M. Kulczynki<sup>1</sup> e João B. da Silva<sup>3</sup>

## ABSTRACT

Pathogenicity Effect of *Paecilomyces fumosoroseus*, Isolate CG 259 on Cysts of *Eurhizococcus brasiliensis* Hempel (Homoptera: Margarodidae)

The isolate CG 259 of *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith was highly pathogenic to the ground pearl cysts, *Eurhizococcus brasiliensis* Hempel, through bioassays in laboratory. Cysts were inoculated by immersion in conidia concentrations ranging from 10<sup>1</sup> to 10<sup>8</sup>/ml. The percentage of cysts colonization ranged from 17.7 to 99.2% after 28 days of inoculation. The lethal concentrations (LC 50) were 8.1 x 10<sup>2</sup> conidia/ml. *P. fumosoroseus* caused a dehydration and internal colonization of the cysts, with no evolution to adult stage.

KEY WORDS: Insecta, biological control, ground pearl, soil fungi.

A maioria dos insetos que vivem no solo são frequentemente infectados por fungos entomopatogênicos, sobretudo *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok e *Paecilomyces* spp. Existem muitos trabalhos mostrando a eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok em pragas de solo no Brasil (Alves 1992) e no exterior (McCoy *et al.* 1992). Os fungos do gênero *Paecilomyces* tem grande potencial como agentes de controle biológico de insetos. Nesse gênero 14 espécies entomopatogênicas são conhecidas. *P. fumosorosoeus* (Wize) Brown & Smith e *P. farinosus* (Holm ex Gray) Brown & Sm. atacam insetos em todos os estágios de desenvolvimento (Samson 1974). A cochonilha *Eurhizococcus brasiliensis* Hempel ocasiona sérios danos aos vinhedos do Sul do Brasil. Não existe um método eficaz de controle desses insetos devido a sua sobrevivência em forma de cistos abaixo da superfície do solo (Fagundes 1964). Pesquisas realizadas por vários autores mostraram que o ciclo da praga é anual (Soria & Gallotti 1986). Os ovos são colocados por fêmeas partenogênicas dentro de cistos, de dezembro a janeiro e as larvas se instalam nas raízes sugando a seiva. Em seguida, as patas do inseto degeneram

Recebido em 14/01/93.

<sup>1</sup> EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Caixa postal 403, 96001-970, Pelotas, RS.

<sup>2</sup> EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, Caixa postal 130, 95700-000, Bento Gonçalves, RS.

<sup>3</sup> DMEC/UFPEL, Caixa postal 354, 96001-970, Pelotas, RS.

e as larvas permanecem estáticas alimentando-se de forma contínua, de fevereiro a julho, sofrendo três mudas nesse período. As larvas de quarto instar, secretam uma parede semiquitínosa que funciona como exo-esqueleto; os estiletes bucais degeneram dando origem

Tabela 1. Percentagem de cistos de *Eurhizococcus brasiliensis* colonizados pelo isolado CG 259 de *Paecilomyces fumosoroseus* em relação a concentração de conídios aplicados, 28 dias após a inoculação.

Conc. de conídios/ml	Cistos Colonizados (%)	Médias <sup>2</sup>
10 <sup>5</sup>	99,19	84,831616a
10 <sup>7</sup>	98,11	82,102795a
10 <sup>6</sup>	96,06	78,560431a
10 <sup>5</sup>	94,43	76,354828ab
10 <sup>3</sup>	78,38	62,288031b
10 <sup>1</sup>	17,69	24,870309c
Testemunha	0,00	0,000000d

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV = 12,064%.

<sup>2</sup>Médias transformadas em arco seno de raiz quadrada de  $x/100$ .

ao "cisto verdadeiro", que permanece superfície do solo de julho a dezembro. Nesse estudo propõe-se isolar e identificar fungos entomopatogênicos a partir de cistos e solos provenientes de regiões vitivinícolas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina; selecionar isolados através de testes de patogenicidade e determinar a concentração letal mediana (CI 50) para os isolados mais virulentos.

Os cistos verdadeiros e as amostras de solos foram coletados em 18 propriedades nas regiões vitivinícolas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina e trazidos para o Laboratório de Fitopatologia, EMBRAPA/CPACT. Os fungos foram isolados a partir de cistos previamente desinfetados superficialmente, com hipoclorito de sódio 2% (5 minutos) e água estéril, sendo dispostos em câmaras úmidas para emergência e isolamento de estruturas fúngicas. Efetuou-se também o isolamento a partir do solo através do método de plaqueamento (Pochon & Tardieux 1962) em BDA mais estreptomomicina (0,2%). A seguir os fungos foram identificados utilizando-se chaves especializadas (Samson 1974, Arx 1981, Samson et al. 1988) e transferidos para BDA para posterior utilização. Para seleção de isolados mais virulentos procedeu-se um teste de patogenicidade utilizando-se duas suspensões de conídios de 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup>/ml obtidas a partir da lavagem de placas de Petri com água estéril mais "Tween" a 0,1%. Foram tratados 100 cistos por concentração de conídios. Utilizou-se como critério de seleção, dos fungos isolados cuja patogenicidade (colonização e mortalidade dos cistos) fosse superior a 70% na concentração 10<sup>8</sup> conídios/ml. Os cistos foram coletados manualmente selecionados pelo tamanho (4 a 6 mm) e sanidade aparente, e desinfetados como o descrito acima. A seguir, foram tratados por imersão em suspensões de conídios e colocados em placa de Petri revestida com algodão e papel filtro, previamente esterilizadas e umedecidas com água estéril. Estas placas foram armazenadas durante 90 dias a uma temperatura de 25°C. As observações foram feitas semanalmente, sendo avaliados o número de cistos verdadeiros colonizados pelo fungos.

Tabela 2. Percentagens parciais (PP) do número de cistos colonizados por *Paecilomyces fumosoroseus* em relação à concentração de conídios, aos 7, 14, 21 e 18 dias após a inoculação. Percentagens transformadas (PT) em arco seno raiz quadrada de  $x/100$ .

Conc. de coníd./ml	Infecção(%)							
	7 dias		14 dias		21 dias		28 dias	
	PP	PT	PP	PT	PP	PT	PP	PT
10 <sup>1</sup>	15,8	23,4b <sup>1</sup>	16,7	24,1a <sup>1</sup>	17,7	24,8a <sup>1</sup>	17,7	24,8a <sup>1</sup>
10 <sup>3</sup>	30,8	33,7b <sup>2</sup>	71,2	57,5a <sup>2</sup>	78,4	62,3a <sup>2</sup>	78,4	62,3a <sup>2</sup>
10 <sup>5</sup>	53,0	46,7b <sup>3</sup>	86,7	68,6a <sup>3</sup>	89,7	71,3a <sup>3</sup>	94,4	76,4a <sup>3</sup>
10 <sup>6</sup>	64,1	53,2b <sup>4</sup>	90,5	72,0a <sup>4</sup>	95,3	77,5a <sup>4</sup>	96,1	78,6a <sup>4</sup>
10 <sup>7</sup>	69,1	56,2b <sup>5</sup>	86,3	68,3ab <sup>5</sup>	95,0	77,1a <sup>5</sup>	98,1	82,1a <sup>5</sup>
10 <sup>8</sup>	83,8	66,2b <sup>6</sup>	94,6	76,6ab <sup>6</sup>	98,8	83,7a <sup>6</sup>	99,2	84,8a <sup>6</sup>
Test.	0	0a	0	0a	0	0a	0	0a

CV = 13,387%. DMS 1% 13,88169. Médias seguidas de mesmas letras nas colunas e mesmos índices nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1%.

Para determinação da CL 50 para os isolados selecionados na etapa anterior, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos (10<sup>1</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> conídios/ml e testemunha) em cinco repetições (20 insetos/repetição) num total de 100 insetos/tratamento. Na testemunha utilizou-se apenas imersão dos cistos em água esterilizada. As observações foram feitas semanalmente, durante um período de 28 dias, sendo avaliadas as percentagens de cistos parasitados pelo fungo. As análises estatísticas foram realizadas com valores parciais (7, 14, 21 e 28 dias) para acompanhamento evolutivo da infecção e aos 28, dias para a determinação do CL 50 (Finney 1947).

Foram isolados cinco fungos entomopatogênicos a partir dos cistos e solos: dois isolados de *B. bassiana*, dois isolados de *M. anisopliae* e um de *P. fumosoroseus*. Nos biotestes de patogenicidade os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* colonizaram apenas externamente os cistos ocorrendo uma mortalidade inferior a 30%, na concentração 10<sup>8</sup> conídios/ml, ocorrendo desenvolvimento de fêmeas e ovos no interior dos cistos. Apenas um isolado de *P. fumosoroseus*, obtido a partir de cistos e solo proveniente da região de Vila Conceição, Caxias do Sul, mostrou-se altamente patogênico nos testes preliminares, sendo catalogado com a sigla CG 259. Os biotestes com o isolado CG 259 mostraram que as percentagens de colonização foram crescentes, em função das concentrações de conídios (Tabela 1). Após 28 dias não houve diferença significativa, entre as concentrações 10<sup>8</sup> e 10<sup>7</sup> conídios/ml, que causaram mortalidade superior a 98% e as concentrações 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> que causaram uma mortalidade superior a 94%. Houve diferença significativa entre todos os tratamentos e a testemunha, na qual pode-se avaliar que em 76,8% dos cistos ocorreu formação de adultos e muitas vezes postura de ovos. Observou-se, também, a secreção de cera, uma característica importante para assegurar a viabilidade dos cistos. Os cistos colonizados pelo fungo estavam inicialmente apenas recobertos externamente pelo micélio, apresentando-se após 28 dias completamente desidratados e retorcidos. Cortes realizados nos cistos normais mostraram, a presença de grande quantidade de hemolinfa e, nos cistos doentes, o desaparecimento desse líquido. Com relação as

observações parciais (7, 14 e 21 dias) pode-se verificar que nas maiores concentrações do fungo o tempo de colonização foi menor. Não houve acréscimo significativo na percentagem de colonização do 21° ao 28° dia, mostrando que o processo infectivo já havia se estabilizado (Tabela 2).

O valor da concentração letal mediana (CL 50) efetuada após 28 dias de observações foi de  $8,1 \times 10^2$  conídios/ml, com os respectivos limites de confiança ao nível de 5% de probabilidade ( $8,0 \times 10$  e  $9,3 \times 10^3$ ). Esses resultados mostram que a linhagem CG 259 de *P. fumosoroseus* tem potencial para ser utilizada no controle da pérola da terra, desde que outros estudos em casa de vegetação e a campo sejam realizados.

### LITERATURA CITADA

- Alves, S.B. 1992. Perspectivas para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 27: 77-86.
- Arx, J.A.V. 1981. The genera of fungi sporulating in pure culture. 3rd ed. J. Cramer. Vaduz, 424p.
- Fagundes, A.C. 1964. Notas sobre a biologia de pérola da terra *Eurhizococcus brasiliensis* Hempel. *Divulgação Agrônômica* 11: 18-22.
- Ferron, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*, p. 465-481. In H.D. (Burges (ed.), *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. New York, Academic Press.
- Fynney, D.J. 1947. Probit analysis. Cambridge University Press.
- McCoy, C.W., G.K. Storey & M.S. Tigano-Milani. 1992. Environmental factors affecting entomopathogenic fungi in the soil. *Pesq. Agropec. Bras.* 27: 107-111.
- Pochon, J. & P. Tardieux. 1962. *Tecnicas d'analyse en microbiologie du sol*. Paris, Ed. La Torelle, 111p.
- Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied hiphomycetes. *Stud. Mycol.* 6: 119.
- Samson, R.A., H.C. Evans & J.P. Latgé. 1988. *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer-Verlag, 197p.
- Soria, S.J. & B.J. Gallotti. 1986. O margarodes da videira *Eurhizococcus brasiliensis* (Homopera: Margarodidae): biologia, ecologia e controle no Sul do Brasil. *Pelotas, EMBRAPA/CNPV, Circ. Tec.* 13, 22p.