ESTUDO DE ALGUNS FATORES QUE AFETAM A
EPIZOOTIA DE *Zoophthora radicans* e UTILIZAÇÃO DO
FUNGO PARA O CONTROLE DE *Empoasca* sp.

LUIS GARRIGÓS LEITE

Orientador: PROF. DR. SÉRGIO BATISTA ALVES

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas.
Área de Concentração em
Entomologia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

L533e Leite, Luis Garrigós
Estudo de alguns fatores que afetam a epizootia de
Zoophthora radicans e utilização do fungo para o controle
de Empoasca sp. Piracicaba, 1991.
117p. illus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Cigarrinha verde do feijão - Controle biológico 2.
Fungo entomopatogênico - Epizootia 3. Fungo para controle
biológico I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei-
roz, Piracicaba

CDD 632.752

ESTUDO DE ALGUNS FATORES QUE AFETAM A
EPIZOOTIA DE *Zoophthora radicans* E UTILIZAÇÃO DO
FUNGO PARA O CONTROLE DE *Empoasca* sp.

LUIS GARRIGÓS LEITE

Aprovada em: 26.03.91

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

ESALQ/USP

Prof. Dr. José Djair Vendramim

ESALQ/USP

Dr. Flávio Moscardi

EMBRAPA/CNPSo

Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES
Orientador

Aos meus pais,

Eurico e Josefa

Dedico

Aos meus irmãos,

Luciano, Lucia e Lucy

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao convênio EMBRAPA/CNPAP - Boyce Thompson Institute, na pessoa do Dr. Donald W. Roberts, pelo financiamento durante o curso de Pós-Graduação.

Ao Dr. Sérgio Batista Alves e ao Dr. Stephen P. Wraight pela orientação e coorientação respectivamente, assim como pelos conhecimentos transmitidos, estímulo e amizade.

À pesquisadora do convênio Dra. Sandra Galaini-Wraight, pelas valiosas sugestões, colaboração, apoio e amizade.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada.

Aos pesquisadores do CNPAP/EMBRAPA, Dr. José Emilson Cardoso, Dr. Bonifácio P. Magalhães e Dra. Eliane Dias Quintela, pela oportunidade concedida na realização de grande parte deste trabalho, pelo apoio e companheirismo.

Aos pesquisadores do Instituto Biológico/SCBP, Dr. Benedito Pedro Bastos Cruz e Dr. Antonio Batista Filho, pela oportunidade na realização de parte deste trabalho, pela amizade e consideração sincera.

Aos funcionários dos laboratórios de Entomologia e Patologia de insetos do CNPAP, Sebastião Martins, Edmar, Eloisa, Expedito e Jamil, pela constante colaboração.

Ao Laerte Antonio Machado e demais funcionários do Instituto Biológico, pelo constante apoio.

Ao estagiário da SCBP do Instituto Biológico Walter Luiz Andreotti Prada, pelos auxílios prestados.

Aos amigos Celso Omoto, Thora L. Aagesen e Carlos E. M. Chacón, pelo convívio e incentivo no transcorrer do curso.

A Sueli Aparecida Laranja Pucci, pela revisão do "Summary".

A Sandra Giovanoni, pelos serviços de digitação.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Ocorrência e Especificidade	4
2.2. Ciclo Bilógico	5
2.3. Fatores que Afetam a Epizootia	8
2.3.1. Temperatura	8
2.3.2. Umidade	10
2.3.3. Fotoperíodo	11
2.3.4. Variabilidade de isolados	11
2.3.5. Potencial de inóculo	13
2.3.6. População do hospedeiro	13
2.4. Disseminação	14
2.5. Persistência	15
2.6. Utilização em Campo	16
2.7. Seletividade e Segurança	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Criação de <i>Empoasca kraemeri</i> em Laboratório	19
3.2. Processos de Germinação e Habilidade de In- fecção de Isolados do Fungo <i>Zoophthora radi-</i> cans Sobre <i>Empoasca kraemeri</i>	22

	Página
3.3. Comportamento de Isolados do Fungo <i>Zoophthora radicans</i> sobre <i>Empoasca kraemeri</i>	26
3.4. Conidiogênese de <i>Zoophthora radicans</i> Sobre <i>Empoasca kraemeri</i> , em Diferentes Instares do Inseto e Diferentes Temperaturas	31
3.5. Utilização de <i>Zoophthora radicans</i> , Isolado ARS-2282, para o Controle de <i>Empoasca</i> sp. na Cultura do Feijão	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Processos de Germinação e Habilidade de Infecção de Isolados de <i>Zoophthora radicans</i> sobre <i>Empoasca kraemeri</i>	39
4.2. Comportamento de Isolados do Fungo <i>Zoophthora radicans</i> sobre <i>Empoasca kraemeri</i>	57
4.3. Conidiogênese do Isolado ARS-1590 de <i>Zoophthora radicans</i> Sobre <i>Empoasca kraemeri</i> em Diferentes Instares do Inseto e Temperaturas	71
4.4. Utilização de <i>Zoophthora radicans</i> , Isolado ARS-2282, Para o Controle de <i>Empoasca</i> sp. na Cultura do Feijão	78
5. CONCLUSÕES	101
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo biológico de <i>Zoophthora radicans</i> sobre <i>Empoasca</i> sp. em feijão (Adaptado de McGUIRE, 1985.)	07
2	Gaiolas utilizadas para a criação de <i>Empoasca kraemeri</i> . EMBRAPA/CNPAP. 1987.	20
3	Gaiola utilizada para a inoculação do fungo <i>Zoophthora radicans</i> sobre <i>Empoasca kraemeri</i> . EMBRAPA/CNPAP. 1987.	24
4	Gaiolas utilizadas para a incubação de <i>Empoasca kraemeri</i> inoculada com o fungo <i>Zoophthora radicans</i> . EMBRAPA/CNPAP. 1987. .	28
5	Área utilizada para o experimento na cultura do feijão, mostrando as parcelas tratadas (F) e não tratadas (ND) com o fungo. Capão Bonito, SP., 1989.	33
6	Plantas de feijão (cultivar Jalo) na fase de crescimento vegetativo, infestada com <i>Empoasca</i> sp. Capão Bonito, SP., 1989.	34
7	Coletor de esporos utilizado para analisar a conidiogênese das partículas miceliais aplicadas na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1989.	37

Figura

Página

- 8 Tempo médio de incubação, em horas, de três isolados de *Zoophthora radicans* para matar *Empoasca kraemeri*, em função da dose de inoculação, a 20°C. 61
- 9 Porcentagem de mortalidade acumulada de *Empoasca kraemeri* em função do tempo (horas) de incubação, a 20°C, após a inoculação do fungo *Zoophthora radicans*, isolado ARS-1281, nas faixas de dose de 0,1 a 1,0 (○); 1,1 a 2,0 (△); 2,1 a 3,0 (●); 3,1 a 4,0 (▲); 4,1 a 10,0 (□); e 10,1 a 20,0 (■) conídios/mm². 64
- 10 Porcentagem de mortalidade acumulada de *Empoasca kraemeri* em função do tempo (horas) de incubação, a 20°C, após a inoculação do fungo *Zoophthora radicans*, isolado ARS-1590, nas faixas de dose de 0,1 a 1,0 (○); 1,1 a 2,0 (△); 2,1 a 3,0 (●); 3,1 a 4,0 (▲); 4,1 a 10,0 (□); e 10,1 a 20,0 (■) conídios/mm². 65
- 11 Porcentagem de mortalidade acumulada de *Empoasca kraemeri* em função do tempo (horas) de incubação, a 20°C, após a inoculação do fungo *Zoophthora radicans*, isolado ARS-1229, nas faixas de dose de 0,1 a 1,0 (○); 1,1 a 2,0 (△); 2,1 a 3,0 (●); 3,1 a 4,0 (▲); 4,1 a 10,0 (□); e 10,1 a 20,0 (■) conídios/mm². 66

Figura		Página
12	Temperaturas máximas, médias e mínimas, registradas durante o experimento na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1990.	80
13	Média geral das porcentagens de infecção de <i>Empoasca</i> sp. por <i>Zoophthora radicans</i> e das densidades de cadáver do inseto com o fungo, obtidas das parcelas tratadas com o patógeno (---), daquelas situadas entre as tratadas (—), e daquelas situadas na metade superior do campo (...), ao longo do experimento na cultura do feijão, em correlação com dados climáticos diário do campo. Capão Bonito, SP., 1990.	86
14	Média geral das populações de <i>Empoasca</i> sp., obtidas das parcelas tratadas com <i>Zoophthora radicans</i> (---), daquelas situadas entre as tratadas (—), e daquelas situadas na metade superior do campo (...), ao longo do experimento na cultura do feijão. Capão Bonito, SP. 1990.	87
15	Partícula micelial de <i>Zoophthora radicans</i> em estado de conidiogênese, fixada na folha, na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1989.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Porcentagem de conídios primários de três isolados de <i>Zoophthora radicans</i> que germinaram na Cabeça, Tórax, Abdome e corpo de ninfa do quinto instar de <i>Empoasca kraemeri</i> , após diferentes períodos da inoculação, a 20°C.	40
2	Porcentagem de conídios primários germinados de três isolados de <i>Zoophthora radicans</i> que produziram tubo germinativo (TG), tubo capilar (TC) e conídio secundário (CS) na Cabeça (C), Tórax (T) e Abdome (A) de ninfa do quinto instar de <i>Empoasca kraemeri</i> , após diferentes períodos da inoculação, a 20°C.	42
3	Porcentagem de inóculo de três isolados de <i>Zoophthora radicans</i> que resultaram na formação de apressório (Apres) e no processo de penetração (Penet) na Cabeça (C), Tórax (T) e Abdome (A) de ninfas do quinto instar de <i>Empoasca kraemeri</i> após diferentes períodos da inoculação, a 20°C.	45
4	Porcentagem de conídios primários (CP) e capiloconídios (Cap) com tubo germinativo, de três isolados de <i>Zoophthora radicans</i> , que resultaram no processo de penetração na Cabeça (C), Tórax (T) e Abdome (A) de ninfa do quinto instar de <i>Empoasca kraemeri</i> , após diferentes períodos da inoculação, a 20°C.	47

Tabela		Página
5	Locais de penetração de três isolados de <i>Zoophthora radicans</i> sobre ninfas do quinto instar de <i>Empoasca kraemeri</i> acondicionadas a 20°C, 12 horas após a inoculação.	49
6	Formas de apressórios produzidos por três isolados de <i>Zoophthora radicans</i> sobre ninfas de quinto instar de <i>Empoasca kraemeri</i> , e porcentagem de cada forma, 12 horas após a inoculação, a 20°C.	51
7	Porcentagem de inseto do quinto instar de <i>Empoasca kraemeri</i> com apressório (Apres) e penetração (Penet) de três isolados <i>Zoophthora radicans</i> inoculados em diferentes doses (conídios/inseto), após diferentes períodos da inoculação, a 20°C.	53
8	Número médio de apressório (Apres.) formado e penetração (Penet) causada, por diferentes doses (conídios/inseto) de três isolados de <i>Zoophthora radicans</i> em <i>Empoasca kraemeri</i> do quinto instar, após distintos períodos da inoculação, a 20°C.	56
9	Concentração letal (CL) 50 e 90 de três isolados do fungo <i>Zoophthora radicans</i> sobre a cigarrinha <i>Empoasca kraemeri</i> expressos em conídios/mm ² , e inclinação das retas (β). .	58

Tabela		Página
10	Tempo médio (horas $\pm$ SD) de incubação de três isolados de <i>Zoophthora radicans</i> para matar <i>Empoasca kraemeri</i> , inoculada com diferentes doses do patógeno e acondicionada a 20°C.	62
11	Porcentagens de cadáveres de <i>Empoasca kraemeri</i> com esporos de resistência, para três isolados do fungo <i>Zoophthora radicans</i> , a 20°C.	68
12	Produção total de conídios e tempo (horas) para ocorrer diferentes níveis de conidio-gênese de três isolados de <i>Zoophthora radicans</i> sobre ninfas do 5º instar de <i>Empoasca kraemeri</i> , após a morte do hospedeiro, a 20°C.	69
13	Produção total de conídios e tempo (horas) para ocorrer diferentes níveis de conidio-gênese de <i>Zoophthora radicans</i> (isolado ARS-1590), sobre diferentes instares de <i>Empoasca kraemeri</i> , após a morte do hospedeiro, a 20°C.	72
14	Produção total de conídios e tempo (horas) para ocorrer diferentes níveis da conidio-gênese de <i>Zoophthora radicans</i> sobre ninfa do 5º instar de <i>Empoasca kraemeri</i> após a morte do hospedeiro, em diferentes temperaturas.	75

Tabela

Página

15	Número de conídios produzidos por fragmento micelial (cerca de 4 mm ²) de <i>Zoophthora radicans</i> de parcelas tratadas na cultura do feijão, nos três dias iniciais após a aplicação do patógeno. Capão Bonito, SP., 1990.	82
16	Porcentagem média de infecção de <i>Empoasca</i> sp. por <i>Zoophthora radicans</i> , obtida das parcelas tratadas com diferentes doses do fungo (F), daquelas situadas entre as tratadas (Nf) e daquelas situadas na metade superior do campo (Nc), ao longo do experimento na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1990.	83
17	Densidade média de cadáver de <i>Empoasca</i> sp. com <i>Zoophthora radicans</i> por trifólio, obtida das parcelas tratadas com diferentes doses do fungo (F), daquelas situadas entre as tratadas (Nf) e daquelas situadas na metade superior do campo (Nc), ao longo do experimento na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1990.	84
18	Densidade média de <i>Empoasca</i> sp. por trifólio, obtida das parcelas tratadas com diferentes doses de <i>Zoophthora radicans</i> (F), daquelas situadas entre as tratadas (Nf), e daquelas situadas na metade superior do campo (Nc), ao longo do experimento na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1990. ..	85

ESTUDO DE ALGUNS FATORES QUE AFETAM A
EPIZOOTIA DE *Zoophthora radicans* E UTILIZAÇÃO DO
FUNGO PARA O CONTROLE DE *Empoasca* sp.

Autor: LUÍS GARRIGÓS LEITE

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

RESUMO

Foram analisados e comparados os processos de germinação e habilidade de infecção dos isolados ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229 de *Zoophthora radicans* sobre ninfas do 5º instar de *Empoasca kraemer*i a 20°C e 100% de umidade relativa (UR). A germinação dos conídios primários dos isolados sobre o inseto iniciou-se dentro do período de 2 horas após a inoculação. A produção total de tubos germinativos tendeu a se igualar à de capiloconídios sobre o corpo do hospedeiro, 12 horas após a inoculação. A proporção de conídios secundários, dentro das formas geradas pelos conídios primários germinados sobre o inseto, não ultrapassou 25% em qualquer das regiões do corpo. A formação de apressório e penetração dos isolados iniciaram dentro do período de 6 horas após a inoculação. As penetrações dos isolados ocorreram em maior proporção no abdome, seguido do tórax e cabeça do inseto, tendo sido mais freqüente nas membranas do corpo do que nos escleritos. Foram analisados e comparados

os comportamentos dos três isolados sobre ninfas do 5º instar de *E. kraemeri* a 20°C e 100% de UR. Os isolados ARS-1590 e ARS-1261 foram os mais indicados para o controle de *Empoasca* sp.. O isolado ARS-1590 apresentou menor DL₅₀ (0,7 conídios por mm²) e menor tempo para iniciar a conidiogênese (9,1 horas) após a morte do inseto. O isolado ARS-1261 apresentou menores tempos médios de incubação para matar o inseto, variáveis de 65,0 a 75,0 horas, e maior produção de conídios ($4,3 \times 10^4$ por inseto). Os tempos médios de incubação dos isolados para matar o inseto foram indiretamente proporcionais às doses de inoculação. Foi analisada a conidiogênese do isolado ARS-1590 sobre diferentes instares do inseto a 20°C e 100% de UR, e sobre ninfas do 5º instar a diferentes temperaturas e 100% de UR. A produção de conídios foi diretamente proporcional à idade do hospedeiro. A faixa ótima de temperatura para o patógeno foi de 20 a 25°C, enquanto que a faixa de 15 a 20°C foi favorável. Avaliou-se a estratégia da introdução inoculativa, pela aplicação de diferentes doses de micélio seco do fungo (isolado ARS-2282) em campo de feijão infestado com *Empoasca* sp.. A dose de 1 g/m² do fungo foi a mais viável para a formação de focos primários da doença e indução da epizootia. O desenvolvimento epizootico do fungo sobre a população do inseto foi dependente do período de orvalho e da densidade de cadáveres do inseto atacados pelo patógeno, sendo que, em condições subótimas de umidade o inóculo, foi dependente também da densidade populacional do hospedeiro. O fungo, aplicado na

fase de crescimento vegetativo da cultura, reduziu a alta infestação da praga e possibilitou a recuperação das plantas.

STUDY OF SOME FACTORS THAT AFFECT THE
EPIZOOTIC OF *Zoophthora radicans* AND UTILIZATION OF
THE FUNGUS TO CONTROL *Empoasca* sp.

Author: LUÍS GARRIGÓS LEITE

Adviser: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

SUMMARY

The germination and penetration hability of ARS-1590, ARS-1261 and ARS-1229 isolates of *Zoophthora radicans* on fifth-instar *Empoasca kraemeri* nymphs, at 20°C and 100% relative humidity (RH), were investigated and compared. The primary conidia on the insect germinated within the 2 hr. after the inoculation, for all isolates. The secondary conidia proportion, among the forms produced by the primary conidia on the insect, did not exceed 25% in all body regions. The apressorium formation and isolate penetration began within the 6 hr. after inoculation. The penetration occurred in greater proportion on the abdomen, followed by the thorax and head, more often through membranes than sclerites. The behaviour of the three isolates on fifth-instar *E. kraemeri* nymphs, at 20°C and 100% RH, were investigated and compared. The ARS-1590 and ARS-1229 isolates were the most indicated to *Empoasca* sp. control. The ARS-1590 showed the lower LD₅₀ (0,7 conidias per mm²),

and lower time to start the esporulation (9,1 hr.) after insect death. The ARS-1261 race showed the smaller mean incubation times, variable from 65,0 to 75,0 hr., and larger conidial production ($4,3 \times 10^4$ per insect). The mean incubation times were indirectly related with the inoculation doses, for all isolates. Sporulation of the ARS-1590 isolate on leafhoppers of different ages, at 20°C and 100% RH, and on fifth-instar *E. kraemeri*, at different temperatures and 100% RH, were investigated. The conidial production was directly related with the leafhopper age. The optimal temperature to *Z. radicans* ranged from 20 to 25°C, although adequate sporulation also occurred from 15 to 20°C. The inoculative introduction strategy by application of different doses of dry micelia was investigated for the isolate ARS-2282 in a bean field infested with *Empoasca* sp. The most viable dose of the fungus was 1 g/m² to attain a primary focus formation of the disease and epizootic induction. The epizootic on leafhopper populations was dependent upon the dew period and density of fungus-infected cadavers. At suboptimal conditions of humidity and inocule, the fungus was dependent on the host population density. Application of the fungus so as to coincide with the vegetative growing phase of the bean plants resulted in lower pest decreased infestation, allowing plant recovery.

1. INTRODUÇÃO

O feijão, *Phaseolus vulgaris* L., e o caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., são plantas cultivadas no Brasil e consideradas de grande importância por fornecerem alimentos básicos de elevado teor protéico à população brasileira. Dentre os principais Estados produtores de feijão, destacam-se Paraná, São Paulo e Minas Gerais, cuja produção alcançou, em 1983, cerca de 60% do total produzido no país (TEIXEIRA & ROCHA, 1988). O caupi é predominantemente produzido nas regiões Norte e Nordeste, tendo o Estado do Ceará a posição de maior produtor brasileiro, respondendo por 20% da produção total do país (TEIXEIRA et alii, 1988).

O cultivo destas leguminosas vem sendo feito por um contingente expressivo de pequenos agricultores, mediante a utilização de técnicas rudimentares. Assim, o rendimento destas culturas tem sido baixa, em torno de 587 kg/ha para feijão (TEIXEIRA & ROCHA, 1988) e de aproximadamente 260 kg/ha para o caupi (MAY, 1986), devido ao ataque de pragas, doenças e outros fatores.

Dentre as pragas do feijão e caupi, destaca-se a cigarrinha-verde, *Empoasca* sp., a qual suga a seiva da planta e injeta uma toxina, podendo provocar um amarelecimento

mento, seguido de um secamento nas margens das folhas, quando em altas populações. Nestes casos, o inseto pode acarretar perdas acima de 60% em feijão e caupi (SANTOS *et alii*, 1977; RAMALHO, 1978).

O nível de 2 a 3 ninfas por folha, em feijão, foi o limite populacional determinado por VALDERRAMA *et alii* (1977), a partir do qual devem ser aplicadas medidas de controle para se evitar dano econômico às plantas. Porém, dentre as técnicas de cultivo utilizadas pelos pequenos produtores de feijão e caupi, geralmente não é incluída nenhuma medida para o combate desta praga, ficando seu controle na dependência, em parte, dos inimigos naturais.

Dentre os inimigos naturais da cigarrinha-verde, já são conhecidos, no Brasil, os parasitos de ovos *Anagrus flaviolus* e *Aphelinoidea plutella* (PIZAMIGLIO, 1979); o predador *Eriopsis connexa* (MAGALHÃES & CARVALHO, 1988); bem como os fungos entomopatogênicos *Hirsutella guyana* e *Zoophthora radicans* Brefeld (Humber) (DAOUST *et alii*, 1983). O fungo *Z. radicans* pertence à ordem Entomophthorales e tem um grande potencial para o controle da cigarrinha-verde, segundo DAOUST *et alii* (1985). Em condições de alta umidade, o fungo se dissemina muito rapidamente na população do inseto, podendo atingir níveis acima de 50% de infecção (McGUIRE *et alii*, 1987a; GALAINI-WRAIGHT *et alii*, no prelo).

Devido à possibilidade de utilização do fungo *Z. radicans* na forma de micélio seco para o controle de *Empoasca* sp. em feijão ou caupi, torna-se importante conhe-

cer o comportamento de isolados do patógeno, visando a busca daqueles mais agressivos e de maior potencial epizootico. Também torna-se importante o estudo da interação patógeno/hospedeiro/ambiente, com vistas ao desenvolvimento de modelos matemáticos que forneçam dados para a utilização do fungo e quanto a capacidade do patógeno colonizar a população da praga em condições de campo, quando aplicado para a formação de focos primários da doença. Assim, esta pesquisa teve os seguintes objetivos:

- a) Analisar e comparar os processos de germinação e habilidade de infecção de três isolados de *Z. radicans* sobre *E. kraemeri*;
- b) Analisar e comparar o comportamento (LC_{50} , tempo médio de incubação, tempo para iniciar a conidiogênese, produção de conídios primários e produção de esporos de resistência) dos três isolados do fungo sobre o inseto;
- c) Analisar a conidiogênese do isolado ARS - 1590 em diferentes instares do inseto e diferentes temperaturas;
- d) Avaliar a estratégia da introdução inoculativa, mediante aplicação de diferentes doses de micélio seco do fungo, em campo de feijão infestado com *Empoasca* sp., visando induzir uma epizootia na população do inseto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ocorrência e Especificidade

O fungo *Zoophthora radicans* (= *Erynia radicans* = *Entomophthora sphaerosperma*) é bem conhecido no mundo por ser um patógeno polífago (BEN ZE'EV *et alii*, 1984), sendo uma espécie de Entomophthorales amplamente estudada (GALAINI-WRAIGHT *et alii*, no prelo). O fungo já foi citado sobre diversas espécies de insetos, agrupadas em um mínimo de quatro ordens (GLARE *et alii*, 1987), tendo também sido relatado como patógeno capaz de provocar altos níveis de doença na população do hospedeiro (SAWYER, 1929; JAKES & PATTERSON, 1962; VANDENBERG & SOPER, 1978; MILNER & LUTTON, 1983). Diferentes isolados do fungo apresentam uma certa especificidade ao hospedeiro original, podendo, muitas vezes, serem adaptados a insetos taxonomicamente próximos (PAPIEROK *et alii*, 1984; McGUIRE, 1985). Com base no trabalho de BROBYN & WILDING (1977), pode-se afirmar que a especificidade do fungo está relacionada à cutícula do hospedeiro. De acordo com estes autores, conídios de *Neozygites fresenii*, espécie comumente encontrada em *Aphis fabae* e não em *Acyrtosiphon pisum*, germinou na cutícula de cada uma das espécies de

afídeo e formou um apressório fixando o tubo germinativo na cutícula dos hospedeiros. Posteriormente, o fungo penetrou na cutícula somente de *A. fabae*, sugerindo que o mecanismo de barreira ocorreu na cutícula do hospedeiro. No Brasil, *Z. radicans* foi primeiramente citado em populações de *Anticarsia gemmatilis* em campo de soja (HOFFMANN *et alii*, 1979) e posteriormente em *Empoasca kraemer* na cultura do caupi (DAOUST *et alii*, 1983). A ocorrência do fungo em *E. fabae* já foi citada, há cerca de 70 anos, na Flórida, por BEYER (1922), em Iowa, por FENTON & HARTZELL (1923), e em Wisconsin, por DUDLEY (1926), nos Estados Unidos. Mais recentemente foi relatado atacando *E. flavescens* na China (ZANG & LUO, 1976) e *Empoasca* sp. em Israel (BEN-ZE'EV & KENNETH, 1981).

2.2. Ciclo Biológico

McGUIRE (1985) relatou que o ciclo de vida de *Z. radicans* (Figura 1) começa com a germinação dos conídios, a partir dos esporos de resistência. O tubo germinativo penetra no tegumento do inseto e se multiplica em suas cavidades, provocando a sua morte fisiológica. Nesta fase, o fungo forma rizóides e prende o cadáver ao substrato. O patógeno então inicia a sua extrusão através do tegumento do inseto, formando os conidióforos, os quais dão origem aos conídios, que são violentamente descarregados no ambiente. Se o conídio cai sobre um inseto suscetível, há a formação do tubo germinativo, que penetra no hospedeiro dando início a novo

ciclo de infecção. Entretanto, quando cai sobre um substrato não adequado, ocorre a formação de um conídio secundário, que se liga ao primário por um conidióforo curto ou longo (capilósforo). Este conídio secundário é então capaz de infectar o inseto ou formar conídio terciário. Em certas condições, pode haver formação de esporos de resistência no cadáver, tendo o fungo produzido ou não conídios primários. Estes esporos são resistentes às condições ambientais desfavoráveis e, provavelmente, ajudam na sobrevivência de *Z. radicans* quando o hospedeiro não está presente.

Segundo REMAUDIERE *et alii* (1976), os conídios secundários formados por curto conidióforo são descarregados ativamente e apresentam semelhança morfológica ao conídio primário, enquanto que aqueles formados por capilósforo (capiloconídios) são descarregados passivamente e apresentam diferença morfológica em relação ao conídio primário.

Ciclo Biológico de *Zoophthora radicans*
sobre *Empoasca* sp em Feijão

Figura 1. Ciclo biológico de *Zoophthora radicans* sobre *Empoasca* sp. em feijão (Adaptado de McGUIRE, 1985).

2.3. Fatores que Afetam a Epizootia

As epizootias de fungos entomopatogênicos, em geral, são influenciadas pelos fatores físicos do ambiente, especialmente a temperatura e umidade, bem como pelos relacionados ao hospedeiro e ao próprio fungo.

2.3.1. Temperatura

A temperatura deve ser considerada importante para a ocorrência de epizootias de fungos, especialmente de Entomophthorales, em virtude de poder afetar, segundo CARRUTHERS & SOPER (1987), três estágios de desenvolvimento dos patógenos: primeiro, a formação e descarga de conídios; segundo, a germinação do conídio e penetração do tubo germinativo no inseto e, finalmente, o crescimento vegetativo dentro do hospedeiro.

MILNER & LUTTON (1983) verificaram maior produção do fungo *Z. radicans* sobre *Therioaphis trifolii maculata*, quando incubado a 25°C, tendo a conidiogênese iniciado 4 horas após o patógeno ser exposto à condição favorável de umidade, e a produção de conídios atingido o pico 4 a 8 horas após o início da conidiogênese. SOPER (1985) constatou um mesmo período para o fungo iniciar a conidiogênese sobre *Choristoneura fumiferana*, após a exposição do patógeno em condição favorável de umidade e a 20°C. Em temperaturas de 15, 10 e 5°C, o tempo para iniciar a conidiogênese aumentou

progressivamente para 6, 10 e 16 horas respectivamente, e a produção de esporos descreceu, caindo bruscamente para temperaturas abaixo de 15°C. Assim, a ocorrência das epizootias de *Z. radicans* tem sido relacionada a temperaturas superiores a 15°C (MILNER & BOURNE, 1983; WRAIGHT & ROBERTS, 1987).

McGUIRE *et alii* (1987b) constataram que os conídios primários de *Z. radicans*, inoculados sobre *E. fabae*, resultaram em uma maior porcentagem de infecção quando incubados a 20°C. Os conídios resultaram em infecção do inseto mesmo quando incubados a 10°C, sendo inibidos a 32°C. Na temperatura de 20°C, a infecção do fungo sobre este inseto tem ocorrido após 3 a 4 horas de sua inoculação (WRAIGHT *et alii*, 1990), podendo levar até 16 horas para infectar a espécie *Acyrtosiphon kondoi*, quando incubados à 10°C (MILNER & BOURNE, 1983).

A temperatura ótima para o crescimento vegetativo de uma raça de *Z. radicans*, estudada "in vitro" por BEN-ZE'EV (1980), foi de 27°C, sendo a máxima de 33°C. McGUIRE *et alii* (1987b) verificaram que o fungo pode colonizar o inseto mesmo quando submetido à temperatura de 32°C durante um período de até 24 horas. O tempo para o fungo se desenvolver dentro do inseto e causar a sua morte, na temperatura de 20°C, tem sido citado, em torno de 2 a 5 dias conforme o hospedeiro (MILNER & LUTTON, 1983; SOPER, 1985; GALAINI-WRAIGHT *et alii*, no prelo), podendo levar de 12 a 15 dias para matar a espécie *A. kondoi*, à 8°C (MILNER & BOURNE, 1983).

2.3.2. Umidade

A maioria das espécies de Entomophthorales requerem uma atmosfera saturada ou próxima da saturação para a descarga dos conídios (WILDING, 1969). MILLSTEIN *et alii* (1983) verificaram que as umidades relativas de 89,9; 91,2; 94,8; 97,5 e 99,1 provocaram inibição na produção de conídios de uma espécie não identificada de *Zoophthora*, de quase 100%, de 98, 90, 70 e 20% respectivamente, em relação a condição ótima de 100% de umidade. NORDIN *et alii* (1983) relataram que a umidade acumulada (horas de umidade) foi um importante fator para a progressão epizootica deste fungo sobre a população de um curculionídeo praga de alfafa. No ponto de vista de CARRUTHERS & SOPER (1987), a umidade interfere como um interruptor que liga e desliga o desenvolvimento epizootico de Entomophthorales.

MILNER *et alii* (1982) constataram que *Z. radicans* requer uma umidade acima de 90%, durante um período mínimo de 9 horas, para causar epizootia na população do pulgão *T. trifolii maculata*. GALAINI-WRAIGHT *et alii* (no prelo) verificaram ser necessário um período equivalente de umidade acumulada por dia para o desenvolvimento epizootico do fungo sobre populações de *E. kraemeri*, na cultura do feijão, e relacionaram a exigência ao fato de que o patógeno necessita de 4 a 6 horas de orvalho para provocar a sua extrusão e conidiogênese sobre o inseto infectado, e mais 4 horas para que os conídios, ejetados sobre um novo hospedei-

ro, provoquem a infecção. A alta mobilidade e elevada rapidez do fungo *Z. radicans* para provocar a infecção sobre *Empoasca* são mecanismos capazes de permitir a ocorrência de elevados níveis de incidência do fungo na população do hospedeiro, em períodos de estiagem.

2.3.3. Fotoperíodo

Os fungos também são influenciados pelo fotoperíodo. MILNER *et alii* (1984) verificaram que afídeos da espécie *A. pisum*, infectados com *E. planchoniana*, *Pandora neophidis*, *P. kondoiensis*, *Z. phalloides*, *Z. radicans* e *Conidiobolus obscurus* apresentaram mortalidade em determinados períodos do dia, quando foram submetidos à fotofase de 16 horas e temperatura de 15°C. Os autores concluem que a luz induz o fungo a matar o hospedeiro, para permitir que o patógeno amadureça nas 8 horas posteriores e inicie a conidiogênese nas condições mais favoráveis, encontradas no período da noite. YAMAMOTO & AOKI (1983) constataram que o fotoperíodo de 12:12 h provocou um ritmo circadiano na descarga dos conídios de *Z. radicans*, com picos no período do escuro.

2.3.4. Variabilidade de isolados

O comportamento de isolados de *Z. radicans* tem apresentado variação sobre o inseto, porém a patogenicidade do fungo pode ser considerado alta, o que contribui para que

proporcione altos níveis epizooticos e predomine sobre outras espécies de Entomophthorales comumente encontradas no mesmo hospedeiro. VANDENBERG & SOPER (1979) constataram uma concentração letal média (CL_{50}) de 18,13 esporos/mm² quando estudaram a patogenicidade de um isolado de *Z. radicans* sobre *C. fumiferana*. Diferentes isolados deste fungo, testados por MILNER & SOPER (1981) sobre o pulgão *T. trifolii maculata*, apresentaram CL_{50} variáveis de 1,3 a 37,6 conídios/mm², com média de 11,3 conídios/mm², sendo mais patogênico em relação à *E. epitalis*, *C. obscurus* e *C. virulenta*. PAPIEROK *et alii* (1984) estudaram o comportamento de 8 isolados de *Z. radicans* sobre o pulgão *A. pisum*, constatando CL_{50} variáveis entre 5,1 a 12,1 conídios/mm², além de diferenças na habilidade de formar rizóides, produção de conídios primários e produção de esporos de resistência. DUMAS & PAPIEROK (1989) verificaram que a CL_{50} de 350 conídios/mm² foi a menor entre 2 isolados deste fungo sobre larvas de *Aedes aegypti*. A dose letal média (DL_{50}) de *Z. radicans* sobre *E. kraemeri* foi determinada por WRAIGHT *et alii* (1990) como sendo de apenas 4,1 conídios/insetos.

A virulência de *Z. radicans* pode ser considerada alta em relação à de outras espécies de fungos Entomophthorales. Este fungo provocou a mortalidade do afídeo *T. trifolii maculata* à partir do 3^o dia após a inoculação, enquanto que *P. neoaphidis*, *C. obscurus*, *E. planchoniana* e *Z. phalloides* provocaram a mortalidade de outras espécies de afídeos hospedeiros, relacionados à cada fungo, a partir do

4^o dia para os 2 primeiros patógenos e a partir do 5^o, 6^o e 7^o dia para os três últimos, respectivamente (MILNER *et alii*, 1984).

2.3.5. Potencial de inóculo

Segundo WILDING (1981), a fonte natural de inóculo de Entomophthorales mais importante para iniciar uma epizootia sobre uma população de afídeos é o solo contaminado com esporos de resistência ou outras estruturas do fungo, seguido dos adultos alados do hospedeiro infectados com o patógeno e do vento, que transporta conídios originados de epizootias em outras áreas.

O potencial de inóculo tem sido fortemente correlacionado com o desenvolvimento epizoótico de fungos Entomophthorales (SOPER & McLEOD, 1981; CARRUTHERS *et alii*, 1985), sendo necessário um potencial de inóculo mínimo para que as epizootias se iniciem (ALVES, 1986a). GALAINI-WRAIGHT *et alii* (no prelo) constataram um desenvolvimento epizoótico de *Z. radicans*, em população de *E. kraemeri*, a partir de um potencial de inóculo mínimo de 0,4 a 0,5 cadáveres do inseto com fungo por planta, em condições climáticas favoráveis.

2.3.6. População do hospedeiro

As epizootias de fungos entomopatogênicos têm sido relatadas como dependentes ou independentes da densida-

de populacional, bem como independentes mas favorecidas por este fator (BENZ, 1987). A velocidade de desenvolvimento epizootico de *Entomophthora sphaerosperma* foi diretamente relacionada com densidade populacional do hospedeiro *Psylla mali* em pomares de maçã (JAQUES & PATTERSON, 1962). Segundo MISSIONIER *et alii* (1970), a dispersão de Entomophthorales sobre a população de um inseto pode ser dependente da densidade populacional do hospedeiro, quando o potencial de inóculo do fungo encontra-se abaixo do mínimo necessário para o desenvolvimento epizootico. GLARE *et alii* (1985) relataram que a infecção do hospedeiro via capiloconídio constitui-se em um eficiente mecanismo de transmissão do fungo sobre espécies de insetos, quando estes ocorrem em baixa densidade populacional, enquanto que as infecções provocadas por conídios ejetados apresentam maior eficiência em altas densidades populacionais dos hospedeiros.

2.4. Disseminação

Segundo GALAINI-WRAIGHT *et alii* (no prelo), adultos do hospedeiro apresentam um importante papel na dispersão do patógeno. O vento também pode apresentar alguma importância na dispersão do patógeno, uma vez que WILDING (1978) constatou uma correlação entre o desenvolvimento epizootico de 3 espécies de *Entomophthora* sobre a população do afídeo *A. pisum* com a densidade de conídios dos patógenos no ar. A lenta dispersão do fungo *Z. radicans* sobre a população

do afídeo *T. trifolii maculata* levou MILNER *et alii* (1982) a concluir que a movimentação dos insetos apresenta um papel mais importante na disseminação do patógeno do que o vento.

2.5. Persistência

A persistência das espécies de Entomophthorales durante anos consecutivos deve ser atribuída, principalmente, à capacidade das mesmas em formarem esporos de resistência. SHIMAZU (1979) verificou que a redução na temperatura foi o principal fator responsável pela indução da formação de esporos de resistência dentro do hospedeiro *Nilaparvata lugens*.

A persistência de conídios de *P. neoaphidis* foi avaliada por BROBYN *et alii* (1985) em um mínimo de 14 dias em cultura de feijão. Segundo UZIEL & KENNETH (1986), a persistência de *Z. radicans*, a baixas porcentagens de umidade relativa e altas temperaturas, foi maior na forma de capiloconídios do que conídios primários. A 50% de UR e 20°C de temperatura a sobrevivência dos capiloconídeos foi de 83, 77, 74, 48 e 19% da primeira à 5ª semana de exposição, respectivamente. Na temperatura de 25°C, a sobrevivência dos capiloconídios, após um dia, caiu de 81% para 17% e, a 30°C, de 39% para 6%.

O fungo produz um maior número de capiloconídios, quanto menos adequado o substrato atingido pelo conídio primário, para a formação e penetração do tubo germina-

tivo (VAN ROERMUND *et alii*, 1984). WRIGHT *et alii* (1990) inocularam o fungo sobre *E. fabae* de 5^o instar e verificaram a formação de 10, 13 e 22% de tubos germinativos na cabeça, tórax e abdome respectivamente, e 88, 84 e 71% de capilocônídios nas respectivas partes do inseto.

2.6. Utilização em Campo

O principal obstáculo ao uso de fungos da ordem Entomophthorales para o controle de insetos tem sido a curta vida dos esporos, sendo numerosos os problemas associados também à produção e aplicação dos patógenos (WILDING, 1981). A utilização do fungo em experimentos de campo tem sido realizada através da aplicação do patógeno em estado de dormência, juntamente com insetos infectados vivos ou mortos, e em conidiogênese, juntamente com o meio de cultura (WILDING, 1981; WILDING, 1982; MILNER *et alii*, 1982; WILDING *et alii*, 1986ab; McGUIRE *et alii*, 1987b). A primeira técnica tem apresentado melhores resultados que a segunda para o controle de afídeos; porém, nestas condições, o fungo tem disseminado bastante lentamente para evitar que a praga provoque dano econômico.

Observações feitas, em condições de campo, com um fungo Entomophthorales sobre cadáver de gafanhoto, possibilitaram constatar que o patógeno permanece em conidiogênese durante várias noites consecutivas, e em dormência durante o período diurno. Estas observações levaram McCABE &

SOPER (1985) à idealização de um processo de produção de micélio seco armazenável para o fungo *Z. radicans*, isolado de *Choristoneura fumiferana*. O micélio é produzido em meio líquido oxigenado, sendo, posteriormente, colhido por filtração e seco com um açúcar (maltose) dessecante e protetor. O produto final é quebrado em pequenas partículas e aplicado ao entardecer sobre as folhagens das plantas no campo. Em contato com o orvalho da noite, o fungo, é estimulado à conidiogênese, ejetando os conídios sobre os insetos próximos.

WRAIGHT & ROBERTS (1987) relataram sucesso no controle de *E. fabae* em alfafa, após a aplicação de 60 g de micélio seco de *Z. radicans* no canto de uma área de 0,12 ha e de outra de 0,24 ha. O micélio esporulou pouco, resultando em 0% de infecção dos insetos, nas duas áreas, 4 dias após a aplicação. Entretanto, avaliações realizadas 3 semanas após a aplicação acusaram mais de 70% de infecção na população de ninfas, nas proximidades dos focos iniciais das duas áreas, e baixa porcentagem nos pontos mais distantes. Nos 4 dias seguintes, o fungo disseminou-se rapidamente nas duas áreas, atingindo 51 e 73% de infecção na população total de ninfas da área maior e menor respectivamente, reduzindo drasticamente a população do inseto. A rápida disseminação do patógeno foi relacionada, provavelmente, à movimentação dos insetos adultos infectados. Estes autores relataram, ainda, ser importante a realização de estudos com a aplicação de micélio seco, com vista a uma rápida supressão da população da praga. A aplicação de 33, 10 e 3,3 kg/ha resultou em 47,

27 e 7% de infecção respectivamente, o que sugere ser necessário utilizar uma maior quantidade do fungo.

2.7. Seletividade e Segurança

A importância que o fungo apresenta nos estudos realizados quanto ao controle de *Empoasca* sp. deve-se, além dos altos níveis epizooticos que proporciona, à seletividade aos inimigos naturais e inocuidade ao homem. *Z. radicans* não afetou o desenvolvimento do parasitóide *Trioxys complanatus* quando os inimigos naturais iniciaram a atuação simultaneamente sobre o hospedeiro *T. trifolii maculata* (MILNER *et alii*, 1984). A espécie *P. neoaphidis* não afetou o desenvolvimento de *Metopolophium dirhodum* sobre o afídeo *Macrosiphum (Sitobion) avenae* somente quando a aplicação do patógeno sobre o hospedeiro foi feita 4 dias após a exposição do parasitóide (POWELL *et alii*, 1986). MAGALHÃES *et alii* (1988) verificaram não haver efeito de altas dosagens de *Z. radicans* sobre *Coleomegilla* sp. e *Eriopsis* sp., os quais são predadores de insetos associados à cultura do feijão. TORIELLO *et alii* (1986) demonstraram que *P. neoaphidis* é, provavelmente, inócuo ao homem e animais quando injetaram o fungo via subcutânea e peritoneal em animais cobaias, não verificando efeitos colaterais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos epizootiológicos de *Zoophthora radicans* sobre *Empoasca kraemerí* foram divididos em 4 etapas, sendo as 3 primeiras conduzidas no laboratório do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão da EMBRAPA, em Goiânia - GO, e a terceira, em condições de campo, na região de Capão Bonito, no Sul do Estado de São Paulo, com a colaboração do Instituto Biológico de São Paulo e do Instituto Agrônomo de Campinas.

Nas três primeiras etapas o fungo foi estudado utilizando-se *E. kraemerí* como hospedeiro, obtida de criação em laboratório, descrita conforme a seguir.

3.1. Criação de *Empoasca kraemerí* em Laboratório

Foram utilizadas seis gaiolas de 120 x 90 x 30 cm cada uma, dispostas duas a duas dentro de estantes de madeira (Figura 2), e mantidas em uma sala de 5 x 4 m. No fundo, as gaiolas apresentavam 2 aberturas em círculos (6 cm de diâmetro cada), tapadas com tela de filó para ventilação. As portas foram feitas com tela de filó, fixadas com fita adesiva nos contornos da gaiola, visando facilitar o manu-

seio, bem como a visualização e a ventilação das plantas e insetos. O fotoperíodo dentro de cada gaiola foi proporcionado por 4 lâmpadas fluorescentes de 20 W cada, fixadas paralelamente no topo. As lâmpadas eram envolvidas, com folga, por um tecido de filó, fixado com fita adesiva no teto. O tempo de luminosidade foi proporcionado por reguladores automáticos, ajustados para 14 horas de fotofase.

Figura 2. Gaiolas utilizadas para a criação de *Empoasca kraemeri*. EMBRAPA/CNPAP. 1987.

Dentro de cada gaiola, foram colocadas plantas de caupi com aproximadamente 20 cm de altura e um mínimo de 3 folhas desenvolvidas cada uma, plantadas em grupo de 4 dentro de vasos de 5 litros.

Semanalmente, 2 gaiolas eram infestadas, cada uma com 150 insetos de *Empoasca* sp., provenientes inicialmente do campo (coletados na forma adulta). Os insetos criados foram coletados no 5^o instar, na 3^a semana após a liberação dos adultos, sendo colocados em sacos plásticos juntamente com as folhas das plantas. Esses insetos foram, então, retirados para serem utilizados no experimento. A triagem consistiu em colocar os insetos dentro de uma placa de Petri de plástico de 20 cm de diâmetro, onde eram anestesiados com CO₂ para, em seguida, serem selecionados quanto aos instares desejados. Os insetos de 5^o instar ou adultos, restantes da triagem, foram mantidos dentro dos sacos plásticos e acondicionados em incubadora regulada a 20°C ± 0,5°C para, então, infestarem novamente a gaiola com novas plantas hospedeiras. Quando insetos de instares mais novos eram coletados para o experimento, uma parte permaneceu na gaiola para serem posteriormente utilizados na geração de novas colônias.

A utilização de 6 gaiolas, intercaladas em duas por semana, possibilitou a obtenção semanal de insetos para serem utilizados no experimento. Para a manutenção das criações, 20 vasos foram semanalmente plantados com caupi e acondicionados em estufa.

3.2. Processos de Germinação e Habilidade de Infecção de Isolados do Fungo *Zoophthora radicans* Sobre *Empoasca kraemeri*

Foram feitos estudos com 3 isolados de *Z. radicans* no tocante à viabilidade dos conídios, seus processos de germinação e habilidade de infecção sobre ninfas do 5^o instar de *E. kraemeri*. Os estudos foram feitos no dorso do inseto, separadamente, nas regiões da cabeça, tórax e abdome. Os conídios não germinados foram considerados inviáveis, enquanto que os germinados foram considerados viáveis e submetidos a avaliações referentes a formação de conídios secundários, capiloconídios e tubo germinativo. O estudo da habilidade de infecção dos diferentes isolados do fungo sobre as diferentes regiões do corpo do inseto consistiu em se avaliar a formação de apressórios com grampo de penetração ou crescimento da hifa no hemocele dentro do corpo do hospedeiro.

Os isolados escolhidos do fungo foram o ARS-1590 e o ARS-1229, originados de *Empoasca* sp., respectivamente dos Estados de Goiás e Santa Catarina, no Brasil, bem como o ARS-1261, originado de *E. fabae* do Estado de Wisconsin, nos Estados Unidos, os quais foram fornecidos pelo laboratório de Patologia de Insetos do Instituto Boyce Thompson em Ithaca, EUA. Os isolados foram produzidos na superfície de meio de cultura líquido à base de dextrose (1%) e extrato de levedura (1%) e utilizados na forma de micélio

fresco. Para a instalação do experimento, o fungo foi previamente filtrado, pulverizado com maltose a 10% e transferidos para uma câmara úmida formada dentro de uma placa de Petri, contendo papel de filtro umedecido com a solução. Em seguida, a placa de Petri contendo o micélio fresco do patógeno foi acondicionada dentro de geladeira e mantida por aproximadamente 15 horas, visando estimular a conidiogênese.

Após a produção dos isolados, foram efetuadas as inoculações do fungo sobre os insetos, mediante a utilização de pequenas gaiolas (Figura 3). Cada gaiola era constituída de uma placa de plástico de 4,0 cm de diâmetro e de fundo aberto, contendo apenas um segmento de 0,5 cm de largura, ligado entre as duas extremidades laterais opostas. A placa foi colocada sobre a face inferior de uma folha de caupi, que por sua vez foi estendida com a face superior sobre uma chapa de acrílico (15,5 x 10 cm). O conjunto foi fixado com um parafuso ligando o segmento do fundo da placa com a chapa de acrílico. Na parte de dentro da tampa da gaiola foi colocada uma camada de agar-água com antibiótico. Para a inoculação dos insetos, pequenos círculos de micélio fresco, submetidos ao processo para estimular a conidiogênese, foram distribuídos sobre a camada de agar-água da tampa, e acondicionados dentro de uma câmara úmida (saco plástico contendo papel de filtro umedecido), no interior de uma incubadora regulada a $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, visando aumentar a conidiogênese do fungo.

Figura 3. Gaiola utilizada para a inoculação do fungo *Zoophthora radicans* sobre *Empoasca kraemer*i. EM-BRAPA/CNPAF. 1987.

Após quatro horas, as gaiolas e as superfícies expostas das folhas foram umedecidas com uma fina névoa de água destilada, para simular o orvalho natural. Os insetos foram anestesiados com CO_2 e colocados na superfície úmida da folha em cada gaiola. As tampas das gaiolas, contendo o fungo em conidiogênese, foram colocadas sobre os insetos e mantidas por aproximadamente 5 minutos (período de duração da anestesia), expondo-os à chuva de conídios. Durante cada período de exposição, as tampas contendo o fungo eram constantemente giradas para assegurar uma distribuição uniforme dos conídios.

Após cada inoculação, a tampa com o fungo era removida e substituída por outra limpa. As gaiolas contendo os insetos inoculados foram, então, colocadas dentro de sacos plásticos contendo umidade saturada (produzida através de papel toalha umidecido), e mantidas no escuro a $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Os estudos foram feitos sobre os insetos, após 2, 6 e 12 horas da inoculação. No primeiro horário, foram utilizados 10, 12 e 8 insetos para os isolados 1590, 1261 e 1229 respectivamente, enquanto que, no segundo, foram utilizados 13, 16 e 10 insetos respectivamente, e, no terceiro, 20, 22 e 20 insetos respectivamente. Os insetos foram coletados de dentro das gaiolas de inoculação, sendo um deles utilizado para as observações mais imediatas e os demais acondicionados em geladeira, para que o fungo inoculado fosse inativado e pudesse em seguida ser observado.

As observações foram feitas com uma objetiva de 400 x em um microscópio óptico com contraste de fase e fluorescência, tendo sido utilizado um excitador Schott BG-12 (350-490 nm), um refletor Dichroic (500 nm) e uma barreira Schott 06 515 (525 nm). Os insetos foram colocados sobre uma gota de Calcofluor White (Sigma) à 0,5% (W/V) depositada sobre uma lâmina e cobertos, sem serem pressionados, por uma lamínula de vidro.

3.3. Comportamento de Isolados do Fungo *Zoophthora radicans* sobre *Empoasca kraemeri*

Nesta etapa, foram realizados estudos com os mesmos três isolados do fungo já citados, sobre insetos do 5^o instar, tendo como parâmetro a CL_{50} , tempo médio de incubação para matar o inseto, tempo para iniciar a conidiogênese após a morte do inseto, produção de conídios primários ao longo do tempo e presença de esporos de resistência.

A produção dos isolados e inoculação do fungo sobre os insetos durante a condução dos bioensaios, necessários para os estudos do comportamento do patógeno, foram realizados mediante os processos já descritos. Foram utilizadas vinte e cinco ninfas de *E. kraemeri* no início do 5^o instar por gaiola de inoculação. As doses do fungo não foram precisamente controladas, devido à exposição dos insetos à descarga natural de conídios. A variação do tempo de exposição, de alguns segundos a seis minutos (período máximo de duração da anestesia sobre os insetos), permitiu produzir diferentes doses, variáveis de 1 a 30 conídios/mm². A quantificação das doses foram feitas com uma lamícula de vidro pequena e retangular, colocada no fundo de cada gaiola para coletar amostras de conídios durante o tempo de exposição ao fungo. Os esporos amostrados foram coloridos com lactofenol e contados com o auxílio do microscópio óptico.

As gaiolas, contendo os insetos inoculados foram, então, colocadas dentro de sacos plásticos contendo

umidade saturada (produzida através de papel toalha umedecido), e mantidas à $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por doze horas no escuro, para simular as condições naturais da noite. Após este período, os insetos foram transferidos para outras gaiolas maiores (Figura 4), acondicionadas em incubadoras, também reguladas a $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e doze horas de fotofase, onde foram feitas as avaliações de mortalidade. Estas gaiolas eram constituídas de tubos de acrílico, sustentados por uma plataforma com $13 \times 15 \times 18$ cm, também de acrílico, contendo um recipiente (200 ml) com água na parte inferior. Um folíolo de caupi foi mantido dentro do tubo, tendo o seu pecíolo atravessado pela plataforma e mergulhado dentro do recipiente com água. Na parte lateral do tubo haviam duas fileiras de dois furos cada (1,5 cm de diâmetro por furo), sendo uma oposta a outra, visando facilitar a coleta dos insetos mortos. Estas aberturas permaneceram fechadas com rolha quando não utilizadas. Na tampa do tubo havia apenas um orifício maior (4,0 cm de diâmetro), tampado com "filó".

Figura 4. Gaiolas utilizadas para a incubação de *Empoasca kraemer* inoculada com o fungo *Zoophthora radicans*. EMBRAPA/CNPAF. 1987.

A mortalidade dos insetos foi avaliada 48 horas após serem transferidos para as gaiolas maiores, e a cada seis horas (06:00, 12:00, 18:00 e 24:00 horas) após este período. Todos os insetos mortos eram removidos das gaiolas, colocados em agar-água e observados após 24 horas, para se confirmar a infecção pelo fungo, através da sua extrusão e a presença de esporos de resistência. A avaliação da presença de esporos de resistência foi feita após a confirmação do patógeno sobre o inseto, mediante o esmagamento do cadáver juntamente com uma gota de água, entre uma lâmina e lamínu-

la, seguido da sua observação em microscópio óptico.

Foram utilizadas 12 gaiolas para cada bioensaio, correspondentes a 10 doses do fungo e duas testemunhas. Para cada isolado do fungo, foram realizados 5 bioensaios em diferentes dias, sendo cada um equivalente a uma repetição. Os insetos utilizados foram obtidos de gerações ou colônias diferentes durante as 5 repetições.

Para o cálculo da concentração letal média (CL_{50}) de cada bioensaio foi realizada uma análise de regressão (análise de probit), entre os logaritmos das diferentes dosagens e as probabilidades de mortalidade, (probits) obtidas até 116 horas após a inoculação do patógeno.

Os tempos médios de incubação e CL_{50} do patógeno foram calculados para as doses de 0,0 a 1,0, 1,1 a 2,0, 2,1 a 3,0, 3,1 a 4,0, 4,1 a 10,0 e 10,1 a 20,0 conídios/mm². No cálculo do primeiro parâmetro foi empregada uma média ponderada, para cada uma das 10 doses de cada bioensaio, com base na fórmula: $\frac{\sum(n \times k)}{\sum n}$ onde n representa o número de insetos mortos no período k de horas.

A produção de esporos de resistência dos diferentes isolados foi analisada estatisticamente através do teste de Kruskal-Wallis.

Nos estudos relacionados ao tempo para início da conidiogênese após a morte do inseto e a quantidade de conídios produzidos, foram utilizados 21, 14 e 18 insetos de 5^o instar, infectados pelo patógeno, para os isolados ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229. Logo após a morte do inseto,

cada cadáver foi colocado individualmente sobre uma camada de agar - água (1,5%) depositada no fundo de uma pequena placa de Petri, que por sua vez foi invertida sobre a tampa. Uma camada contendo 1,5 ml de gelatina (10%) com 1% de triton x-100 foi depositada sobre a parte interna da tampa, abaixo do cadáver do inseto com fungo. Os conídios descarregados do fungo caíam sobre a superfície gelatinosa e morriam aderidos. A gelatina sobre as tampas foram observadas em intervalos de duas horas antes do início da conidiogênese, sendo coletadas e substituídas a cada 6 horas, até o final de produção de conídios. Durante o experimento, as placas contendo o cadáver do inseto permaneceram no escuro, dentro de sacos plásticos contendo papel de filtro umedecido, sob temperatura de $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

As camadas gelatinosas contendo o fungo foram secas e estocadas até que os conídios pudessem ser contados. Para a contagem, cada camada foi colocada dentro de um tubo de ensaio contendo 1,5 ml de água destilada mais TWEEN (0,1%), o qual foi mantido em banho-maria. Após o derretimento da gelatina, o conteúdo foi agitado em um agitador de tubos de ensaio e entornado dentro de uma pequena placa de Petri, demarcada na face inferior com duas faixas perpendiculares de 1 mm de largura cada uma. A contagem dos esporos foi feita com o auxílio de um microscópio óptico, percorrendo as faixas demarcadas nas placas e, em seguida, extrapolando para a área total da placa.

3.4. Conidiogênese de *Zoophthora radicans* Sobre *Empoasca kraemeri*, em Diferentes Instares do Inseto e Diferentes Temperaturas

Nesta etapa estudou-se a conidiogênese do isolado ARS-1590 sobre insetos do 5^o instar, nas temperaturas de 5, 10, 15, 20 e 25°C, e sobre insetos no 1^o ao 5^o instar e adultos, na temperatura de 20°C. Foram utilizados 10, 13, 15, 21 e 17 cadáveres para as temperaturas de 5 a 25°C respectivamente, e 4, 14, 13, 14, 21 e 9 para as fases do 1^o instar a adulto respectivamente. Avaliaram-se o tempo para início da conidiogênese e a produção de conídios ao longo do tempo, mediante os processos já descritos para o estudo da conidiogênese dos 3 isolados. Os experimentos foram conduzidos na ausência de luz, dentro de incubadoras reguladas com as diferentes temperaturas e à 100% de Umidade Relativa.

Nos cálculos dos tempos para ocorrer diferentes níveis da conidiogênese de *Z. radicans* sobre o inseto, após a morte do hospedeiro, foram utilizadas as médias de tempos estimados pelo logaritmo das curvas ajustadas aos dados da conidiogênese de cada cadáver.

A produção total de conídios e o tempo para ocorrer diferentes níveis da conidiogênese de *Z. radicans* sobre o inseto, após a morte do hospedeiro, foram analisados estatisticamente através do teste de Kruskal-Wallis.

3.5. Utilização de *Zoophthora radicans*, Isolado ARS-2282, para o Controle de *Empoasca* sp. na Cultura do Feijão

O trabalho foi desenvolvido nos meses de março a abril, correspondente à safra da seca, em um campo de feijão localizado na região de Capão Bonito, no Sul do Estado de São Paulo, considerada como o principal polo produtor desta leguminosa no Estado. O plantio do feijão (cultivar jalo) foi realizado no dia 15 de março, em espaçamento de 0,5 m entre linhas.

O campo plantado apresentou uma forma retangular inclinada longitudinalmente, com área de aproximadamente 5.000 m², margeada com mata nativa em tórno de uma lateral e da extremidade mais alta, com extensa área de feijão mais avançado em idade na outra lateral, e com capim e milho na extremidade mais baixa (Figura 5).

Figura 5. Área utilizada para o experimento na cultura do feijão, mostrando as parcelas tratadas (F) e não tratadas (N) com o fungo. Capão Bonito, SP., 1989.

O ensaio foi instalado durante a fase vegetativa da cultura, no dia 15 de abril, quando as plantas se apresentavam com uma alta infestação de ninfas e adultos de *E. kraemerí*, e com sintomas de encarquilhamento nas folhas (Figura 6). A alta infestação dos insetos foi, provavelmente, provocada pela imigração dos insetos do campo de feijão ao lado, para a área experimental, onde as plantas se apresentavam mais novas e atrativas a praga.

Figura 6. Plantas de feijão (cultivar Jalo) na fase de crescimento vegetativo, infestadas com *Empoasca* sp. Capão Bonito, SP., 1989.

O isolado de *Z. radicans* utilizado foi o número ARS-2282, procedente da Iugoslávia e fornecido pelo Ins-

tituto Boyce Thompson após ter sido produzido no laboratório da instituição, na forma de micélio seco, mediante o processo desenvolvido por McCABE & SOPER (1985). A escolha deste isolado, para ser utilizado no experimento de campo, deveu-se ao fato do mesmo ter sido encontrado provocando elevado nível epizootico sobre população de *Empoasca vitis* em cultura de beterraba, em uma época de estiagem. Este isolado não foi incluído nas primeiras etapas da pesquisa pelo fato de ter sido isolado após o desenvolvimento dos primeiros estudos.

O fungo foi aplicado nas doses de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 g/m², em parcelas distribuídas na metade mais baixa do campo (Figura 4). As áreas tratadas com as diferentes doses foram dispostas em fileira ao longo do campo e distanciadas em 18 m entre si. Iniciou-se com a menor dose, na extremidade mais baixa do campo, seguindo-se gradualmente com as doses maiores para a região mediana. Foram utilizadas 3 repetições para cada dose do fungo, dispostas lateralmente e separadas por distâncias variáveis de 10 a 20 m entre si.

Também foram feitas avaliações em parcelas não tratadas, distribuídas entre as repetições das diferentes doses do patógeno, de forma que repetiram 2 vezes para cada dose. As parcelas da metade mais baixa do campo (tratadas e não tratadas) foram representadas por áreas de 2 x 2 m, contendo 4 linhas de feijão, sendo cada uma um ponto de amostragem.

Na metade mais alta do campo foram feitas avaliações em áreas não tratadas a 18 m da maior dose (2g/m^2) e a 36 m, ou seja, no topo. Para cada distância foram utilizadas 3 repetições, distribuídas nas linhas das diferentes doses do fungo, em distâncias de 10 a 20 m entre si. Estas parcelas também foram representadas por áreas de 2×2 m, contendo quatro linhas de feijão, sendo que, de cada duas, foi escolhida uma como ponto de amostragem.

A aplicação do fungo, nos diferentes tratamentos, foi feita após as 19 horas, quando iniciou a queda do orvalho, e consistiu da distribuição manual dos fragmentos miceliais na face inferior das folhas, onde eram fixados pelo orvalho. Em 11 parcelas com fungo avaliou-se a conidiogênese de 1 fragmento micelial por parcela, durante 3 dias consecutivos.

A coleta dos esporos ejetados foi feita com o auxílio de um pequeno coletor de plástico contendo gelatina a 10%, colocado embaixo do fragmento micelial e fixado na face inferior da folha por um alfinete atravessado e fincado em um pedaço de isopor na face superior (Figura 7). O coletor com gelatina era substituído diariamente durante o período de avaliação e levado, posteriormente, para o laboratório da Seção de Controle Biológico de Pragas (SCBP) do Instituto Biológico, em Campinas, onde procedeu-se a contagem dos esporos, conforme descrito.

Figura 7. Coletor de esporos utilizado para avaliar a conidiogênese das partículas miceliais aplicadas na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1989.

O efeito do fungo sobre a população do inseto foi avaliado a cada 3, 4 ou no máximo 5 dias no campo, tendo iniciado um dia após a aplicação do patógeno. As avaliações consistiram em coletar quatro trifólios por parcela, obtidos intercaladamente da metade superior da planta, em um ponto de amostragem, e da metade inferior, no ponto seguinte. Os trifólios foram coletados individualmente, mediante o seu ensacamento rápido em sacos plásticos de 35 x 50 cm. Estes foram fechados logo após a coleta e transportados para o

laboratório da SCBP, onde procedeu-se a avaliação do número de insetos, em diferentes instares, encontrados por folha, efetuando-se as seguintes observações: insetos sadios, vivos com o fungo incubado e mortos com o fungo em conidiogênese. O ínstar de *E. kraemeri* foi determinado em microscópio óptico, após a paralização do inseto em um filme de água, entre uma lâmina de vidro e um laminula de plástico. Seguindo esta observação, os insetos foram esmagados e avaliados quanto a presença de infecção do patógeno, através da existência de micélio no conteúdo extravasado do corpo. Foram considerados, para a análise dos níveis de infecção, insetos vivos ou recém mortos, do 2º ínstar à fase adulta.

Durante a condução do experimento, um aparelho "Omnidata", colocado previamente no centro do campo, registrou a duração de orvalho e a temperatura na face inferior da folha. Os dados de precipitação pluviométrica utilizados no experimento foram obtidos de medidas feitas a 8 km de distância, na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas, em Capão Bonito.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Processos de Germinação e Habilidade de Infecção de Isolados de *Zoophthora radicans* sobre *Empoasca kraemer*

O conhecimento da viabilidade, processos de germinação e habilidade de infecção de isolados de um fungo Entomophthorales pode contribuir para a seleção daqueles mais agressivos à praga que se deseja controlar e com maior potencial epizootico.

A Tabela 1 refere-se à viabilidade de conídios primários de três isolados de *Zoophthora radicans*, nas diferentes regiões do corpo do inseto, em diferentes tempos após a inoculação.

Doze horas após a inoculação, verifica-se que o isolado ARS-1261 apresentou 88,4% de conídios primários germinados no corpo do inseto, mostrando uma viabilidade pouco maior que à do ARS-1590, com 81,1%, e bastante superior em relação à do ARS-1229, com 59,0% de germinação. A baixa viabilidade do ARS-1229 sobre os insetos pode limitar a eficiência deste isolado para o controle da praga.

Tabela 1. Porcentagem de conídios primários de três isolados de *Zoophthora radicans* que germinaram na cabeça, tórax, abdome e corpo de ninfa do quinto instar de *Empoasca kraemeri*, após diferentes períodos da inoculação, a 20°C.

HORAS APÓS A INOCULAÇÃO	REGIÃO DO CORPO	I S O L A D O		
		ARS-1590	ARS-1261	ARS-1229
2	Cabeça	80,0	81,2	0,0
	Tórax	74,3	88,9	13,5
	Abdome	68,8	97,4	18,6
	Corpo	73,1	91,0	14,8
6	Cabeça	46,6	74,3	25,0
	Tórax	66,0	88,4	30,0
	Abdome	59,9	79,3	32,4
	Corpo	61,0	83,0	30,7
12	Cabeça	85,7	72,7	33,3
	Tórax	82,7	91,1	36,1
	Abdome	78,4	90,1	47,8
	Corpo	81,1	88,4	59,0

SMITH & GRULA (1981) constataram que uma fonte de carbono é necessária para a germinação de conídios de *Beauveria bassiana*. Segundo FERRON (1983), conídios de fungos entomopatogênicos têm reserva de nitrogênio endógeno suficiente para a síntese de proteína e o processo de germinação. No entanto, necessitam de uma fonte de carbono para que este fenômeno ocorra. As principais fontes de carbono citadas pelo autor são ácidos nucleicos e alguns ácidos gordurosos. Considerando-se que a germinação de *Z. radicans* tem sido constatada em substrato inerte (WRAIGHT, informação

peçoal), é possível que fontes do carbono tenham pouca influência na germinação do fungo. A redução na porcentagem de germinação dos conídios inoculados do abdome para a cabeça, verificada em todos os tempos para o isolado ARS-1229, pode ser devida, provavelmente, à existência de algum composto químico inibidor da germinação deste isolado, presente na cutícula do hospedeiro em maior concentração nas camadas de maior espessura e esclerotizadas.

A Tabela 2 refere-se à porcentagem dos conídios germinados dos isolados que produziram tubos germinativos, tubos capilares e conídios secundários, nas diferentes regiões do corpo do inseto em diferentes tempos após a inoculação.

Tabela 2. Porcentagem de conídios primários germinados de três isolados de *Zoophtora radicans* que produziram tubo germinativo (TG), tubo capilar (TC) e conídio secundário (CS) na Cabeça (C), Tórax (T) e Abdome (A) de ninfa do quinto instar de *Empoasca kraemeri*, após diferentes períodos da inoculação, a 20°C.

HORAS APÓS A INOCULAÇÃO	REGIÃO DO CORPO	I S O L A D O								
		1590			1261			1229		
		TG	TC	CS	TG	TC	CS	TG	TC	CS
2	C	92,8	7,2	0,0	46,2	53,8	0,0	0,0	0,0	0,0
	T	81,3	18,7	0,0	65,0	35,0	0,0	100,0	0,0	0,0
	A	77,0	21,5	1,5	68,5	31,5	0,0	100,0	0,0	0,0
6	C	40,0	56,6	3,4	42,3	57,7	0,0	40,0	60,0	0,0
	T	52,9	45,8	1,3	50,0	50,0	0,0	73,3	26,7	0,0
	A	42,7	55,6	1,7	62,5	37,5	0,0	37,0	63,0	0,0
12	C	42,6	55,5	1,9	37,4	62,6	0,0	20,1	55,0	24,9
	T	47,0	50,8	2,2	48,2	51,8	0,0	43,5	56,5	0,0
	A	46,8	51,3	1,9	68,4	31,6	0,0	68,4	27,0	4,6
Média	C	58,5A	39,8A	1,8A	42,0A	58,0A	0,0	20,0A	38,3A	8,3A
	T	60,4A	38,4A	1,2A	54,4AB	45,6A	0,0	72,3A	27,7A	0,0A
	A	55,5A	42,8A	1,7A	66,5B	33,5A	0,0	68,5A	30,0A	1,5A

As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Friedman

Nota-se que o isolado ARS-1261 aumentou a produção de tubos germinativos da cabeça para o tórax e abdome em todos os períodos após a inoculação, de modo que, na média dos tempos, apresentou porcentagens de conídios primários germinados com tubo germinativo de 42,0; 54,4 e 66,5%, nas respectivas regiões do corpo do inseto, com diferença

significativa entre as porcentagens na cabeça e abdome.

Este comportamento, embora não tenha sido verificado para o isolado ARS-1590 e verificado somente 12 horas após a inoculação para o ARS-1229, pode ser uma característica do fungo, pois foi constatado também por WRAIGHT *et alii* (1990). Segundo estes autores, a produção de tubos germinativos tende a aumentar da cabeça para o abdome devido ao fato de estas formas, produzindo apressório, são favorecidas nas regiões do hospedeiro com cutícula, mais fina, como o abdome, para provocar a infecção. Como conclusão, os autores relataram que um estimulante químico, presente em maior concentração no abdome, induz a produção de tubos germinativos. VAN ROERMUND *et alii* (1984) mencionaram que a produção de tubos germinativos é governada também por estimulantes nutricionais, pois verificaram maior produção de tubos germinativos em substrato rico em nutriente do que em substrato composto de agar-água.

O isolado ARS-1261 apresentou uma redução na produção de tubos capilares da cabeça do inseto para o tórax e abdome, visto que, na média dos tempos, esta forma foi gerada por 58,0; 45,6 e 33,5% dos conídios primários germinados nas respectivas regiões. Já o isolado ARS-1590, apresentou um sensível aumento na produção de tubos capilares da cabeça para o tórax. SAMPEDRO *et alii* (1984) mencionaram que o modo de germinação do fungo *Conidiobolus obscurus* é dependente do isolado, bem como das condições físicas e nutricionais do substrato. A redução na produção de tubos capilares

da cabeça para o abdome, verificada para o isolado ARS-1261, deveu-se ao aumento da produção de tubos germinativos, provocado pelo aumento de estímulos para a geração desta forma. Para qualquer um dos isolados, pode-se afirmar que, as 12 horas após a inoculação, os inóculos germinados sobre o inseto a 20°C apresentaram uma produção total de tubos germinativos equilibrada com a de tubos capilares.

No que se refere aos conídios secundários, estes representam baixas porcentagens dentro das formas geradas pelo fungo, tendo sido produzidos, 12 horas após a inoculação, por 1,9, 2,2 e 1,9% dos conídios primários germinados do isolado ARS-1590, nas regiões da cabeça, tórax e abdome respectivamente, e por 24,9 e 4,6% dos conídios primários germinados do isolado ARS-1229 na cabeça e abdome, respectivamente.

A germinação dos inóculos dos isolados ARS-1590 e ARS-1261 iniciou-se e praticamente estabilizou-se duas horas após a inoculação do fungo. Assim, pode-se afirmar que o isolado ARS-1229 foi o mais lento quanto a germinação dos conídios, visto que as porcentagens de conídios germinados nas diferentes regiões do corpo do inseto foram baixas duas horas após a inoculação, aumentando nos períodos posteriores. Além disso, a produção de tubos capilares não ocorreu antes das duas horas. De modo geral, pode-se afirmar que a germinação dos conídios de *Z. radicans* ocorre num período extremamente curto após a inoculação, tendo por comparação os Hifomicetos *B. bassiana* e *Nomuraea rileyi*, cuja

germinação de conídios ocorre em cerca de 12 e 18 horas, respectivamente (ALVES, 1986a), bem como *Metarhizium anisopliae*, que leva, comumente, cerca de 18 a 24 horas (SAMUELS *et alii*, 1989). Segundo STEINHAUS (1949), a germinação dos conídios de fungos Entomophthorales ocorre logo após a descarga dos mesmos.

A Tabela 3 refere-se à porcentagem de inóculo dos isolados que resultaram na formação de apressório e na penetração nas diferentes regiões do corpo do inseto, nos variados períodos após a inoculação.

Tabela 3. Porcentagem de inóculo de três isolados de *Zoophthora radicans* que resultaram na formação de apressório (Apres) e no processo de penetração (Penet) na Cabeça (C), Tórax (T) e Abdome (A) de ninfas do quinto instar de *Empoasca kraemerii*, após diferentes períodos da inoculação, a 20°C.

HORAS APÓS A INOCULAÇÃO	REGIÃO DO CORPO	I S O L A D O					
		ARS-1590		ARS-1261		ARS-1229	
		APRES	PENET	APRES	PENET	APRES	PENET
2	C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	A	1,2	0,0	5,1	0,0	0,0	0,0
6	C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T	4,2	2,4	4,3	2,2	0,0	0,0
	A	10,9	7,3	16,5	8,3	1,9	1,9
12	C	3,2	1,6	4,5	0,0	1,7	0,0
	T	9,9	7,4	10,8	7,6	2,4	1,8
	A	18,1	16,6	28,5	20,5	9,7	7,0

Verificou-se que, duas horas após a inoculação, o fungo já havia formado apressórios no abdome, sendo gerados por 1,2 e 5,1% do inóculo dos isolados ARS-1590 e ARS-1261, respectivamente.

Seis horas após a inoculação, os isolados ARS-1590 e ARS-1261 começaram a apresentar penetrações no abdome, resultantes de 7,3 e 8,3% dos respectivos inóculos, sendo observados valores de 2,4 e 2,2% no tóxar. Apenas 1,9% do inóculo do isolado ARS-1229 resultou na formação de apressório e no processo de penetração no abdome do inseto. Estudos desenvolvidos por WRAIGHT *et alii* (1990) mostraram que o fungo inicia a infecção de *E. fabae* em 3 a 4 horas após a inoculação.

Decorridos 12 horas da inoculação, as penetrações foram resultantes de até 16,6, 20,5 e 7,0% dos inóculos no abdome, respectivamente dos isolados ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229. As porcentagens de inóculo resultantes em penetração, para os isolados ARS-1590 e ARS-1261, podem ser consideradas altas em relação à porcentagem observada por BREY *et alii* (1986), para o fungo *C. obscurus* sobre *Acyrtosiphon pisum*. Segundo este autor, menos de 10% dos conídios germinados deste fungo resultaram em penetração.

A Tabela 4 refere-se à porcentagem de conídios primários e capiloconídios com tubo germinativo, para os isolados estudados, que resultaram no processo de penetração nas distintas regiões do corpo do inseto, após diferentes tempos da inoculação.

Tabela 4. Porcentagem de conídios primários (CP) e capiloconídios (Cap) com tubo germinativo, de três isolados de *Zoophthora radicans*, que resultaram no processo de penetração na Cabeça (C), Tórax (T) e Abdome (A) de ninfas do quinto instar de *Empoasca kraemer*i, após diferentes períodos da inoculação, a 20°C.

HORAS APÓS A INOCULAÇÃO	REGIÃO DO CORPO	I S O L A D O					
		1590		1261		1229	
		CP	Cap	CP	Cap	CP	Cap
2	C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T	6,8	0,0	4,9	0,0	0,0	0,0
	A	28,6	0,0	16,7	0,0	15,4	0,0
12	C	4,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	T	17,5	25,0	17,4	0,0	1,2	0,0
	A	43,8	25,0	32,3	8,3	21,3	0,0

As penetrações ocorreram em maior proporção as 12 horas da inoculação, para o isolado ARS-1590, através das formas infectivas com tubo germinativo, resultantes de até 43,8, 17,5 e 4,3% dos conídios primários com tubo germinativo, no abdome, tórax e cabeça respectivamente, e de 25% dos capiloconídios tanto no abdome como no tórax. Observa-se, ainda, que o isolado ARS-1590 foi o único que penetrou na cabeça, região bastante esclerotizada do corpo do inseto. Segundo TOMIYAMA & AOKI (1982), a cápsula cefálica de larvas

de insetos é bastante resistente à penetração de fungos entomopatogênicos, mesmo aqueles com conídios de elevado potencial metabólico. Estes fatos demonstram haver uma tendência dos conídios germinados com tubos germinativos do ARS-1590 apresentarem maior poder de penetração no inseto, seguido daqueles do ARS-1261 e do ARS-1229.

Os conídios germinados com tubos germinativos do ARS-1261 não apresentaram o mesmo poder de penetração daqueles do ARS-1590, mas representaram uma proporção pouco maior do número médio de conídios germinados das diferentes regiões do corpo do inseto, 6 e 12 horas após a inoculação (Tabela 2). Este fato contribuiu para um equilíbrio na porcentagem do inóculo resultante em penetração dos dois isolados.

O isolado ARS-1229, além de apresentar a menor viabilidade dentre os isolados, foi o mais lento na germinação e no desenvolvimento da infecção, tendo ainda demonstrado o menor poder de penetração através dos conídios germinados com tubos germinativos.

A Tabela 5 refere-se à distribuição dos pontos de penetração dos isolados, nas diferentes regiões do corpo do inseto, 12 horas após a inoculação.

O abdome do inseto foi a região mais preferida na penetração do fungo com 71,7, 72,1 e 81,3% das penetrações, provocadas respectivamente pelos isolados ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229 no corpo do hospedeiro, seguido do tórax, com 26,1, 27,9 e 18,8% respectivamente, e da cabeça,

com apenas 2,2% das penetrações provocadas pelo isolado ARS-1590. WRAIGHT *et alii* (1990) obtiveram resultados semelhantes, utilizando *E. fabae* como hospedeiro. Estudos tem mostrado que *Entomophthora muscae* e *C. obscurus* também penetram com maior frequência através do abdome do hospedeiro (CBROBYN & WILDING, 1983; BREY *et alii*, 1986; WRAIGHT *et alii*, 1990). No entanto, *E. planchoniana* não apresentou preferência de região para penetrar em afídeo (CBROBYN & WILDING, 1977).

Tabela 5. Locais de penetração de três isolados de *Zoophthora radicans* sobre ninfa do quinto instar de *Empoasca kraemeri* acondicionadas a 20°C, 12 horas após a inoculação.

LOCAL DA PENETRAÇÃO	I S O L A D O		
	1590	1261	1229
Cabeça	2,2	0,0	0,0
Tórax	26,1	27,9	18,8
Escleritos torácicos	6,5	16,3	0,0
Membranas torácicas	19,6	11,6	18,8
Abdome	71,7	72,1	81,3
Escleritos abdominais	21,7	27,9	18,8
Membranas abdominais	50,0	44,2	62,5
Escleritos do corpo	28,3	44,2	18,8
Membranas do corpo	69,6	55,8	81,3

As membranas do inseto foram os locais mais preferidos na penetração do patógeno, com 69,6, 55,8 e 81,3% dos totais de penetrações no corpo, provocadas pelos isolados ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229 respectivamente, seguido dos escleritos, com 28,3, 44,2 e 18,8% dos totais de penetrações provocadas pelos respectivos isolados.

O fato do isolado ARS-1261, dentre os três isolados, ter apresentado as maiores porcentagens de penetração no esclerito do inseto demonstra haver uma tendência do mesmo apresentar a menor mobilidade para a localização de membranas. MAGALHAES *et alii* (1990) induziram a produção de apressório deste fungo "*in vitro*", quando inocularam conídios primários em agar-água, cobrindo-os com caldo nutritivo seguido de uma lâmina de vidro. Este fato indica que estímulos físicos e químicos são importantes fatores para a produção de apressório.

A Tabela 6 refere-se aos tipos de apressórios produzidos pelos três isolados de *Z. radicans* e a proporção de cada tipo.

Tabela 6. Formas de apressórios produzidos por três isolados de *Zoophthora radicans* sobre ninfas de quinto ínstar de *Empoasca kraemeri*, e porcentagem de cada forma, 12 horas após a inoculação, a 20°C.

FORMA DE APRESSÓRIO	DESCRIÇÃO	I S O L A D O S		
		ARS-1590	ARS-1261	ARS-1229
Alongado	Alongado; geralmente clavado; frequentemente com pronunciado bulbo terminal; geralmente produzido no final de longa hifa; separado da hifa por septo.	82,7	71,0	87,0
Globular	Globular ou oblongo, produzido na adjacência do conídio parente, sem distinguir o tubo germinativo, ou no final de um curto tubo germinativo; sem septo.	15,4	25,8	13,0
Bulbo	Quase circular; separado da hifa por septo; provavelmente uma forma aberrante de apressório alongado	1,9	3,2	0,0

Os conídios são, na maioria, do tipo alongado, tendo esta forma representado 82,7, 71,0 e 87,0% dos apressórios produzidos pelos isolados ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229, respectivamente. O tipo de apressório globular foi a segunda forma mais produzida, representando 15,4, 25,8 e 13,0% dos apressórios produzidos pelo ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229, respectivamente, enquanto que o tipo bulbo

representou baixa porcentagem dos apressórios, ou seja, 1,9 e 3,2% daqueles produzidos pelos dois primeiros isolados, respectivamente. Segundo WRAIGHT *et alii* (1990), a produção de apressório no final de longas hifas representa um mecanismo apropriado quanto a seleção de pontos específicos para a penetração na cutícula do hospedeiro.

Poucas espécies de fungos Entomophthorales são conhecidas como geradoras de apressórios. As espécies conhecidas inclui *Neozygites fresenii* (BROBYN & WILDING, 1977) e *Entomophaga aulicae* (MURRIN & NOLAN, 1987). HYWEL-JONES & WEBSTER (1986) também constatarem a formação de apressórios por *E. conica*. No entanto, BROBYN & WILDING (1977) não constatarem a formação de apressório para a espécie *Pandora neocaphidis*, nem TOMIYAMA & AOKI (1982) para *P. blunckii*.

A Tabela 7 refere-se à porcentagem de insetos com apressório e penetração dos três isolados do fungo, quando inoculados diferentes doses e em distintos períodos após a inoculação.

Tabela 7. Porcentagem de insetos do quinto instar de *Empoasca kraemeri* com apressório (Apres) e penetração (Penet) de três isolados *Zoophthora radicans*, inoculados em diferentes doses (conídios/inseto), após diferentes períodos da inoculação, a 20°C.

HORAS APÓS A INOCULAÇÃO	I S O L A D O								
	ARS-1590			ARS-1261			ARS-1229		
	DOSE	APRES	PENET	DOSE	APRES	PENET	DOSE	APRES	PENET
2	22,0	10,0	0,0	8,3	16,7	0,0	11,0	0,0	0,0
6	38,2	76,9	69,2	20,0	62,5	50,0	23,0	10,0	10,0
12	23,8	85,0	85,0	18,7	72,7	68,2	21,7	55,0	50,0

Duas horas após a inoculação, verificou-se a presença de apressórios em 10% dos insetos inoculados com o ARS-1590, na dose de 22 conídios por inseto, e em 16,7% daqueles inoculados com o ARS-1261, na dose de 8,3 conídios por inseto.

Seis horas após a inoculação, os apressórios foram encontrados em 76,9% dos insetos inoculados com o ARS-1590, na dose 38,2 conídios por inseto; em 62,5% daqueles inoculados com o ARS-1261, na dose de 20 conídios por inseto, e em 10% daqueles inoculados com o ARS-1229, na dose de 23 conídios por inseto. Quanto às penetrações provocadas pelo fungo, embora possam ser resultantes de baixa porcentagem dos inóculos neste tempo, atingiram 69,2, 50 e apenas 10% dos insetos inoculados com os isolados ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229, respectivamente. YENDOL & PASCHKE, 1965

citam que *Entomophthora* spp. penetrou no térmita *Reticulitermes flavipes* dentro do período de 24 horas após a inoculação. Já *C. obscurus* penetrou na lagarta *Porthetria* (= *Lymantria*) dispar somente 22 horas da inoculação (HARTMANN & WASTI, 1974). Por outro lado, a penetração de *Erynia blunckii* na lagarta *Plutella xylostella* ocorreu dentro do período de 18 horas após a inoculação (TOMIYAMA & AOKI, 1982). Segundo ALVES (1986a), *B. bassiana* e *N. rileyi* levam cerca de 24 horas após a inoculação para penetrar na cutícula do hospedeiro.

Assim, a ação de *Z. radicans* para provocar a penetração no hospedeiro pode ser considerada bastante rápida, em relação à de outras espécies de Entomophthorales e Hifomicetos, o que contribui para que o patógeno seja bastante agressivo e provoque elevados níveis de infecção, mesmo em períodos quando as condições favoráveis de umidade limitam-se apenas aos períodos de orvalho durante as noites.

Doze horas após a inoculação, os apressórios foram encontrados em 85% dos insetos inoculados com o ARS-1590, na dosagem de 23,8 conídios por inseto; 72,7% daqueles inoculados com o ARS-1261, na dose de 18,7 conídios; e 55% daqueles inoculados com o ARS-1229, na dose de 21,7 conídios. As penetrações provocadas por estas inoculações abrangeram 85, 69,2 e 50% dos insetos inoculados com o ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229 respectivamente. Considerando-se que as doses utilizadas no último tempo foram semelhantes, pode-se afirmar que o isolado ARS-1590 pareceu ser o

mais patogênico, seguido do ARS-1261 e do ARS-1229. De acordo com a Tabela 4, a maior patogenicidade do ARS-1590 em relação ao ARS-1261 deveu-se à maior taxa de penetração resultante dos conídios primários e capiloconídios com tubo germinativo. A baixa patogenicidade do isolado ARS-1229 deveu-se, principalmente, à baixa viabilidade do inóculo e ao baixo poder de penetração, através dos conídios primários e capiloconídios com tubo germinativo. LATGÉ *et alii* (1982) verificaram que a patogenicidade de isolados de *C. obscurus* sobre *A. pisum* correlacionou-se diretamente com a viabilidade dos mesmos sobre o hospedeiro e produção de tubos germinativos pelos conídios primários germinados.

A Tabela 8 refere-se ao número médio de apressórios formados e de penetração causada por isolados de *Z. radicans* nos insetos que apresentaram o fungo nestas fases, após diferentes períodos da inoculação.

Tabela 8 Número médio de apressórios (Apres) formados e penetração (Penet) causada, por diferentes doses (conídios/insetos) de três isolados de *Zoophthora radicans* em *Empoasca kraemeri* do quinto instar, após distintos períodos da inoculação, a 20°C.

HORAS APÓS A INOCULAÇÃO	I S O L A D O								
	ARS-1590			ARS-1261			ARS-1229		
	DOSE	APRES	PENET	DOSE	APRES	PENET	DOSE	APRES	PENET
2	22,0	1,0	0,0	8,3	1,0	0,0	11,0	0,0	0,0
6	38,2	3,0	1,9	20,0	2,6	1,8	23,0	2,0	2,0
12	23,8	3,2	2,8	18,7	3,9	2,9	21,7	2,1	1,6

Nos insetos com apressórios foi encontrado um número médio de 1,0 apressório por exemplar, duas horas após a inoculação com os isolados ARS-1590 e ARS-1261. Seis horas após a inoculação, foram encontrados 3,0, 2,6 e 2,0 apressórios por inseto, para os isolados ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229 respectivamente, enquanto que, 12 horas após, foram encontrados 3,12, 3,0 e 2,1 apressórios, para os respectivos isolados.

Até duas horas após a inoculação não ocorreu penetração com qualquer dos isolados. Após seis horas, foi encontrado um número médio de 1,9, 1,8 e 2,0 penetrações por exemplar, com os isolados ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229, respectivamente, e 2,8, 2,9 e 1,6 penetrações, 12 horas após a inoculação com os respectivos isolados. WRAIGHT *et alii*

(1990) verificaram que as porcentagens de conídios com tubo germinativo deste fungo, que resultaram em penetração no inseto *E. fabae*, foram de 2,5, 5,0 e 20,0% nos tempos de 6, 12 e 48 horas após a inoculação.

4.2. Comportamento de Isolados do Fungo *Zoophthora radicans* sobre *Empoasca kraemer*i

O potencial epizootico de um fungo entomopatogênico pode ser incrementado em um programa de controle biológico de praga, pela seleção de isolados patogênicos, virulentos e produtivos, utilizando-se da variabilidade natural existente entre os isolados coletados a campo sobre o inseto praga.

Os dados referentes a CL_{50} , CL_{90} e inclinação da reta (coeficiente angular - β), dos três isolados do fungo *Z. radicans* sobre a cigarrinha *E. kraemer*i, expressos em conídios/mm², encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Concentração letal (CL) 50 e 90 de três isolados do fungo *Zoophthora radicans* sobre a cigarrinha *Empoasca kraemeri*, expressos em conídios/mm², e inclinação das retas (β).

	I S O L A D O S ¹		
	ARS-1590	ARS-1261	ARS-1229
CL ₅₀	0,67 a	1,37 b	26,17 c
CL ₉₀	8,52 a	12,27 a	1.873,27 c
β	1,2 $\pm$ 0,082	1,41 $\pm$ 0,102	0,89 $\pm$ 0,102

¹ Os valores seguidos por letras distintas, na linha, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Pode-se verificar que o isolado ARS-1590 apresentou a menor CL₅₀, de 0,7, e menor CL₉₀ de 8,5 conídios/mm² apresentando maior patogenicidade em relação ao ARS-1261 (CL₅₀ de 1,4 e CL₉₀ de 12,3), mas não significativamente diferente ao nível de 5% de probabilidade, no que se refere à CL₉₀. O ARS-1229 foi bem menos patogênico que os demais, tendo diferenciado significamente com CL₅₀ de 26,2 e CL₉₀ de 1873,3 conídios/mm². A inclinação da reta deste isolado, de 0,89 $\pm$ 0,102, foi menor que as proporcionadas pelos demais isolados, estando abaixo daquelas frequentemente proporcionadas por fungos Entomophthorales, constatadas por PAPIEROK (1982) entre 1,0 e 2,5. Os resultados, no que se refere a CL₅₀, confirmam a maior patogenicidade do ARS-1590, seguido do ARS-1261 e ARS-1229, estando de acordo com as observações

quanto a habilidade de infecção dos isolados. Também mostram CL_{50} bastante baixas, equivalentes à DL_{50} de 4,1 conídios por inseto, determinada por WRAIGHT *et alii* (1991) para *E. fabae*. MILNER & SOPER (1981) constatarem variações de 1,3 a 37,6 conídios/mm² na CL_{50} de isolados deste fungo sobre o pulgão *Therioaphis trifolii maculata*. PAPIEROK & WILDING (1979), testando *C. obscurus* contra duas populações de *Acyrtosiphon pisum*, verificaram que uma foi suscetível ao patógeno, com CL_{50} variável de 1,4 a 5,0 conídios/mm², dependendo do isolado, e a outra resistente. SOPER (1979) encontrou uma CL_{50} média de 53 conídios/mm² para *E. virulenta* em *Myzus persicae*.

A patogenicidade deste fungo e de outras espécies de Entomophthorales, tem sido constatada apresentando-se mais elevada que a de alguns Hifomicetos. MANIANIA & FARGUES (1984) testaram diferentes isolados de *Paecilomyces fumoso-roseus*, *N. rileyi*, *M. anisopliae* e *B. bassiana* contra larvas de *Mamestra brassicae*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua* e *Scotia ipsilon* e verificaram que o primeiro noctuideo foi mais suscetível, tendo os isolados mais virulentos apresentado CL_{50} variáveis de 10^3 a 10^4 conídios/mm². O fungo *B. bassiana* provocou uma mortalidade de 38% em *Antonomus grandis*, quando inoculado na dosagem de 9×10^3 conídios por inseto (ALVES, 1986b) e de 72% de *Ceratomyia arcuata*, na dosagem de $8,3 \times 10^3$ conídios por inseto (FERNANDES *et alii*, 1989b). LEITE *et alii* (1987) verificaram ser necessário 5×10^3 conídios de *B. bassiana* e

Paecilomyces sp. por inseto de *Nezara viridula* do 5º instar, para provocar 66,7 e 22,7% de infecção respectivamente. A elevada patogenicidade que muitos Entomophthorales apresentam, constituiu-se, provavelmente, em uma das características mais favoráveis desta ordem, que resulta na capacidade de provocar elevados níveis epizooticos e dizimar as populações dos insetos.

O tempo médio de incubação (TMI) do fungo *Z. radicans* para provocar a morte do inseto *E. kraemeri*, em função da dose de inoculação de 3 isolados do patógeno, está representado na Figura 8. As inclinações das retas demonstram haver uma tendência de redução no TMI do patógeno com o aumento das doses dos 3 isolados, enquanto que a redução na altura das retas indicam uma redução no tempo para matar os insetos a partir do isolado ARS-1229 para o ARS-1590 e ARS-1261. A dependência do TMI do fungo para com a sua dose sobre o hospedeiro, ratifica as observações relatadas por VANDENBERG & SOPER (1979), MILNER & SOPER (1981) e MILNER & BOURNE (1983), que indicam que o aumento da dose do fungo sobre a população do inseto, resultante do aumento do potencial de inóculo, pode provocar não somente um maior nível de infecção, mas uma mortalidade do hospedeiro em um espaço de tempo mais curto.

Figura 8. Tempo médio de incubação, em horas, de três isolados de *Zoophthora radicans* para matar *Empoasca kraemeri*, em função da dose de inoculação, a 20°C.

A Tabela 10 expressa os tempos médios de incubação (TMI) de *Z. radicans* para matar *E. kraemeri*, em função da dose de inoculação de 3 isolados do patógeno.

Tabela 10. Tempo médio (horas $\pm$ SD) de incubação de três isolados de *Zoophthora radicans* para matar *Empoasca kraemeri*, inoculada com diferentes doses do patógeno e acondicionada a 20°C.

FAIXAS DE DOSE CON. /mm ²	I S O L A D O S		
	ARS-1261	ARS-1590	ARS-1229
0,1 - 1,0	73,4 $\pm$ 4,60	82,0 $\pm$ 6,36	95,3 $\pm$ 1,44
1,1 - 2,0	71,7 $\pm$ 5,03	79,8 $\pm$ 4,92	92,6 $\pm$ 0,50
2,1 - 3,0	70,7 $\pm$ 5,56	74,9 $\pm$ 5,78	91,0 $\pm$ 0,79
3,1 - 4,0	68,9 $\pm$ 5,69	71,8 $\pm$ 6,64	85,9 $\pm$ 0,72
4,1 - 10,0	67,0 $\pm$ 10,85	73,5 $\pm$ 15,74	81,7 $\pm$ 4,53
10,1 - 20,0	65,9 $\pm$ 7,52	71,5 $\pm$ 10,98	79,5 $\pm$ 4,50
$\bar{M}$ ¹	69,6 a	75,5 ab	87,7 b

¹ As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os TMI do isolado ARS-1261 foram menores que aqueles do ARS-1590, no entanto as respectivas médias de 69,6 e 75,5 horas não diferiram significativamente ao nível de 5% de probabilidade. Da mesma forma, os TMI do isolado ARS-1590 foram menores que aqueles do ARS-1229, no entanto as respectivas médias de 75,5 e 87,7 horas não diferiram significativamente ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados da Tabela 10 também mostram haver um efeito da dose de *Z. radicans* no TMI do patógeno, assim como tem sido constatado para o fungo Hifomiceto *B. bassina*. O aumento da concentração deste fungo sobre larvas

de *Ostrinia nubilalis* (CARRUTHERS *et alii*, 1985) e adultos de *C. arcuata* (FERNANDES, *et alii*, 1989a) provocou uma redução do tempo médio de incubação do patógeno no primeiro hospedeiro e do TL_{50} no segundo.

As porcentagens de mortalidade acumulada de *E. kraemerii*, provocadas pelos 3 isolados de *Z. radicans*, em função do tempo de incubação e das faixas de doses de inoculação do fungo, estão representadas nas Figuras 9, 10 e 11.

O isolado ARS-1261 (Figura 9) começou a matar os insetos após 52 horas da inoculação e provocou a mortalidade dentro de um espaço de tempo de aproximadamente 16 horas, independentemente da dosagem, visto que as curvas tendem a se estabilizar após 68 horas. O isolado ARS-1590 (Figura 10), embora seja pouco mais patogênico que o ARS-1261, começou a matar os insetos após 60 horas da inoculação e provocou a mortalidade dentro de um período mais longo, de 32 horas, independentemente da dosagem, visto que as curvas tendem a se estabilizar após aproximadamente 92 horas. O isolado ARS-1229 (Figura 11), embora tenha sido menos patogênico que o ARS-1590, provocou a mortalidade dos insetos em um período de tempo semelhante. MILNER *et alii* (1984) constataram que um isolado deste fungo, inoculado sobre o afídeo *T. trifolii maculata* e submetido a uma fotofase de 16 horas, provocou a mortalidade do hospedeiro ao longo de um período de 24 horas, a partir do 3^o dia após a inoculação, com o acme ocorrendo na fase de luz, 12 horas após o seu início. Segundo GALAINI-WRAIGHT *et alii* (no prelo), o fungo apresen-

ta um sincronismo que possibilita matar o inseto nos períodos da tarde. Este sincronismo é, provavelmente, uma característica de fungos Entomophthorales, pois já foi constatado em diversas outras espécies (NEWMAN & CARNER, 1976; MILNER, 1981; MILNER & BOURNE, 1983; MILNER *et alii*, 1984).

Figura 9. Porcentagem de mortalidade acumulada de *Empoasca kraemerii* em função do tempo (horas) de incubação, a 20°C, após a inoculação do fungo *Zoophthora radicans*, isolado ARS-1261, nas faixas de dose de 0,1 a 1,0 (O); 1,1 a 2,0 (Δ); 2,1 a 3,0 (●); 3,1 a 4,0 (▲); 4,1 a 10,0 (□); e 10,1 a 20,0 (■) conídios/mm².

Figura 10. Porcentagem de mortalidade acumulada de *Empoasca kraemeri* em função do tempo (horas) de incubação, a 20°C, após a inoculação do fungo *Zoophthora radicans*, isolado ARS-1590, nas faixas de dose de 0,1 a 1,0 (○); 1,1 a 2,0 (△); 2,1 a 3,0 (●); 3,1 a 4,0 (▲); 4,1 a 10,0 (◻); e 10,1 a 20,0 (■) conídios/mm².

Figura 11. Porcentagem de mortalidade acumulada de *Empoasca kraemeri* em função do tempo (horas) de incubação, a 20°C, após a inoculação do fungo *Zoophthora radicans*, isolado ARS-1229, nas faixas de dose de 0,1 a 1,0 (○); 1,1 a 2,0 (△); 2,1 a 3,0 (●); 3,1 a 4,0 (▲); 4,1 a 10,0 (□); e 10,1 a 20,0 (■) conídios/mm².

O isolado ARS-1590 foi mais patogênico ao inseto (no que se refere a Cl_{50}), devido à maior taxa de penetração, resultante dos conídios primários e capiloconídios com tubo germinativo. A habilidade do ARS-1261 de matar mais rapidamente os insetos deve-se, provavelmente, ao fato deste isolado crescer com maior rapidez dentro do hospedeiro, comportamento também verificado em meios de cultura. A baixa patogenicidade do isolado ARS-1229 sobre *E. kraemeri* pode estar relacionada, principalmente, a baixa viabilidade do inóculo e baixo poder de penetração através dos conídios primários e capiloconídios com tubo germinativo, conforme constatado nesta pesquisa.

A Tabela 11 refere-se à porcentagem de cadáveres de *E. kraemeri* com esporos de resistências, para os três isolados de *Z. radicans*. Verificou-se que houve diferença significativa na produção de esporos de resistência dos três isolados. O ARS-1261 apresentou maior produção desta forma do fungo, com 10% dos 694 insetos infectados, em relação ao ARS-1590, com 2% dos 742 insetos infectados, e ao ARS-1229, que não formou esporos de resistência nos 334 insetos infectados. PAPIEROK *et alii* (1984) também constataram diferenças na produção de esporos de resistência de diferentes isolados deste fungo. Os resultados da presente pesquisa sugerem que o isolado ARS-1229 é fisiologicamente diferente do ARS-1590 e do ARS-1261, já que não produziu esporos de resistência nas condições do experimento.

Tabela 11. Porcentagem de cadáveres de *Empoasca kraemeri* com esporos de resistência, para três isolados do fungo *Zoophthora radicans*, a 20°C.

REPET.	I S O L A D O S		
	ARS-1261	ARS-1590	ARS-1229
1	2,67 (9/135)	0,67 (1/49)	0,00 (0/90)
2	20,65 (35/155)	1,37 (2/146)	0,00 (0/113)
3	7,86 (11/140)	3,98 (7/176)	0,00 (0/50)
4	10,42 (15/144)	0,00 (0/130)	0,00 (0/59)
5	6,67 (8/120)	3,55 (5/141)	0,00 (0/22)
$\bar{M}$ ¹	10,81 (75/694) a	2,02 (15/742) b	0,00(0/334) c

¹ As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

A Tabela 12 representa a conidiogênese dos três isolados de *Z. radicans* sobre cadáveres do 5º instar de *E. kraemeri*, a 20°C.

Tabela 12. Produção total de conídios e tempo (horas) para ocorrer diferentes níveis de conidiogênese de três isolados de *Zoophthora radicans* sobre ninfas do 5º instar de *Empoasca kraemeri*, após a morte do hospedeiro, a 20°C.

ISOLADO	NÚMERO DE CONÍDIOS ($\times 10^4$)	NÍVEIS DA CONIDIOGÊNESE ^a			
		2,5%	PICO	50%	97,5%
ARS-1590	2,6A	9,1A	16,6A	19,4A	42,6A
ARS-1261	4,3A	10,3A	19,1A	22,4A	49,0A
ARS-1229	3,3A	11,6A	19,3A	21,3A	39,4A

^a Média dos tempos estimados pelo logaritmo das curvas ajustadas aos dados da conidiogênese de cada cadáver.
As médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

O número total de conídios produzidos por inseto não diferiu significativamente entre os isolados, apresentando-se maior para o ARS-1261, com $4,3 \times 10^4$ conídios, seguido do ARS-1229, com $3,3 \times 10^4$, e do ARS-1590, com $2,6 \times 10^4$. MILNER & LUTTON (1983) verificaram para *Z. radicans* uma produção de $3,7 \times 10^5$ conídios primários por adulto do pulgão *T. trifolii maculata*, a 25°C. Estudando a conidiogênese de *E. obscurus*, *E. planchoniana* e *E. exitialis* sobre o afídeo *A. kondoi*, MILNER (1981) verificou uma produção de 6 a 10×10^3 conídios por cadáver, para a primeira espécie do patógeno, de cerca de 5×10^4 conídios para a segunda espécie, e de 3 a 4×10^5 conídios para a terceira espécie, quando os fungos foram submetidos às respectivas temperaturas favoráveis. Segundo PAPIEROK (1985), a espécie *C. coro-*

natus produziu cerca de 6×10^4 conídios por cadáver de *A. pisum*.

A produção de conídios de *Z. radicans* e de muitas outras espécies de Entomophthorales tem sido constatada apresentando-se abaixo da proporcionada por grande parte dos Hifomicetos. A produção de *M. anisopliae* sobre ninfas do 5º instar de *Mahanarva posticata* atingiu $1,0 \times 10^8$ conídios por inseto (ALVES, 1986a), enquanto que a produção de *B. bassiana* sobre adultos de *C. arcuata* atingiu $7,1 \times 10^7$ conídios por inseto (FERNANDES et alii, 1989b). A produção de esporos destes fungos, embora tendo sido calculada em hospedeiros maiores do que aquele utilizado para a produção de *Z. radicans*, é, provavelmente, maior. O fungo *N. rileyi*, quando multiplicado sobre *Pseudoplusia includens* produziu até $2,7 \times 10^7$ conídios por área de 2 mm^2 (KISH & ALLEN, 1976), semelhante à do corpo de *E. kraemeri*, apresentando, dessa forma, uma produção maior que a produção de *Z. radicans* sobre a cigarrinha-verde. Assim, a elevada produção de conídios de grande parte dos Hifomicetos compensa a menor patogenicidade em relação a grande parte dos Entomophthorales, podendo causar epizootias, como as freqüentemente provocadas por *M. anisopliae* em cigarrinha da cana-de-açúcar no Nordeste e por *N. rileyi* em populações de *A. gemmatilis* na cultura da soja (ALVES, 1986a).

O tempo para iniciar a conidiogênese do fungo, após a morte do inseto, não diferiu significativamente entre os isolados, apresentando-se menor para o isolado ARS-1590,

com 9,1 horas, seguido do ARS-1261, com 10,3, e do ARS-1229, com 11,6 horas (Tabela 12). Assim, o isolado ARS-1590, pode apresentar importância semelhante para o desenvolvimento de epizootias sobre populações de *E. kraemeri*, em relação ao ARS-1261, já que não houve diferença significativa entre os isolados quanto ao tempo para iniciar a conidiogênese após a morte do inseto, produção de conídios, virulência (tempo para iniciar a conidiogênese) e patogenicidade (no que se refere a CL_{50}).

Os tempos para atingir maior nível de conidiogênese, após a morte dos insetos, foram de 16,6, 19,1 e 19,3 horas, respectivamente para os isolados ARS-1590, ARS-1261 e ARS-1229, enquanto que para atingir 50% foi de 19,4, 22,4 e 21,3 horas, para os respectivos isolados. O tempo para atingir 97,5% da conidiogênese foi maior para o isolado ARS-1261, com 49,0 horas, seguido do ARS-1590, com 42,6 e do ARS-1229, com 39,4 horas.

4.3. Conidiogênese do Isolado ARS-1590 de *Zoophthora radicans* Sobre *Empoasca kraemeri*, em Diferentes Instares do Inseto e Temperaturas

Os estudos dos fatores que podem afetar o desenvolvimento epizootico de entomopatógenos são importantes para a busca do sucesso em programas de controle biológico de pragas, principalmente quando envolve um fungo capaz de se estabelecer na população do inseto, bastando ser aplicado

para a formação de focos primários do patógeno. A conidiogênese deste fungo, durante a fase de colonização, pode ser afetada por diferentes fatores, dentre os quais a temperatura e idade do hospedeiro.

A Tabela 13 refere-se à conidiogênese do fungo *Z. radicans* sobre cadáveres de diferentes instares de *E. kraemeri*, à 20°C.

Tabela 13. Produção total de conídios e tempo (horas) para ocorrer diferentes níveis de conidiogênese de *Zoophthora radicans* (isolado ARS-1590) sobre diferentes instares de *Empoasca kraemeri*, após a morte do hospedeiro, a 20°C.

INSTAR	NÚMERO DE CONÍDIOS ($\times 10^4$)	NÍVEIS DA CONIDIOGÊNESE ^a			
		2,5%	PICO	50%	97,5%
1 ^o	2,2	6,0	11,8	15,1	41,1
2 ^o	3,8	6,1	11,9	15,1	40,0
3 ^o	7,8	6,2	12,3	16,2	47,9
4 ^o	12,7	7,0	14,0	17,8	46,8
5 ^o	26,4	9,1	16,6	19,4	42,6
Adulto	20,7	13,5	22,1	24,3	44,3

^a Média dos tempos estimados pelo logaritmo das curvas ajustadas aos dados da conidiogênese de cada cadáver.

O número total de conídios do fungo, produzidos em função da idade do inseto, aumentou progressivamente do 1^o instar ao 5^o instar variando de $2,2 \times 10^4$ a $26,4 \times 10^4$ conídios/inseto. O aumento verificado está relacionado, à expansão do volume do corpo do inseto do 1^o para o 5^o

instar. A produção de conídios na fase adulta do inseto, de $20,7 \times 10^3$, foi levemente inferior à do 5º instar.

O tempo para o início da produção de conídios do fungo, após a morte do inseto, foi de 6 horas para ninfas do 1º instar, aumentando gradativamente para 6,1, 6,2, 7,0, 9,1 e 13,5 horas para ninfas de 2º, 3º, 4º e 5º instar e adultos, respectivamente. MILNER *et alii* (1984) mencionaram que o fungo *E. planchoniana*, incubado no afídeo *A. kondoi* e submetido à temperatura ótima, necessita de 8 horas, após a morte do hospedeiro, para amadurecer e iniciar a produção de conídios. Segundo os autores, o fungo apresenta-se, principalmente na forma de protoplastos pouco tempo antes da morte do hospedeiro, sendo necessário este período de tempo após a morte para ocorrer a formação da parede celular do patógeno dentro do hospedeiro e iniciar a conidiogênese. Assim, o sincronismo na mortalidade dos insetos no período da tarde, conforme mencionado pelos mesmos autores, pode permitir que o patógeno amadureça ou inicie o amadurecimento dentro do hospedeiro, antes da queda do orvalho. Este fato provavelmente explica a habilidade que *Z. radicans* tem de iniciar a conidiogênese dentro do período de 4 a 8 horas após ser submetido às condições favoráveis de umidade (GALAINI-WRIGHT *et alii*, no prelo).

O período de tempo para o fungo iniciar a conidiogênese sobre insetos adultos de *Empoasca* sp., em condições de campo, tem sido observado em torno de 6 horas após a queda do orvalho (WRIGHT, informação pessoal). O

aumento desproporcional no período de tempo para *Z. radicans* iniciar a conidiogênese sobre insetos de instares finais, conforme verificado nesta pesquisa, pode ser considerado uma anomalia, provocada provavelmente pela falta de umidade nas condições do experimento e, conseqüentemente, pelo maior retardamento na absorção de umidade pelo fungo quanto maior o volume do corpo do inseto.

Os tempos para atingir o acme da conidiogênese aumentaram progressivamente do 1º ao 5º instar e adulto, variando de 11,8 a 22,1 horas. Da mesma forma, para atingir 50% da conidiogênese, variou de 15,1 a 24,3 horas. Quanto aos tempos para ocorrer 97,5% da produção de esporos, mantiveram dentro da faixa de 40,0 a 48,0 horas, independente do instar do inseto. Estes resultados mostram que a idade do inseto não interfere na duração da conidiogênese do fungo sobre o hospedeiro.

De um modo geral, pode-se afirmar que a ocorrência da epizootia pode ser influenciada pela idade da população do hospedeiro, devendo os estágios mais avançados do inseto possibilitar um maior fornecimento de inóculo e contribuir para uma maior progressão epizootica do patógeno. A fase adulta do inseto pode apresentar maior importância na epizootia do que insetos do quinto instar, uma vez que, sendo alada, contribui para uma maior dispersão do fungo para locais mais distantes, no campo infestado (GALAINI-WRAIGHT *et alii*, no prelo). A importância dos adultos nas epizootias já foi relatada para a cigarrinha da cana-de-açúcar por

ALVES (1986a), o qual considerou que adultos do inseto são os responsáveis pela formação dos focos primários da doença provocada por *M. anisopliae*.

A Tabela 14 refere-se ao efeito da temperatura na conidiogênese do fungo *Z. radicans* sobre cadáveres do 5º instar de *E. kraemeri*. O aumento da temperatura de 5°C para 10, 15 e 20°C proporcionou um aumento gradativo na produção do fungo, que variou de $1,3 \times 10^4$ a $2,6 \times 10^4$ conídios por inseto. Na temperatura de 25°C a produção de conídios foi um pouco inferior à produção obtida a 20°C.

Tabela 14. Produção total de conídios e tempo (horas) para ocorrer diferentes níveis da conidiogênese de *Zoophthora radicans* sobre ninfa do 5º instar de *Empoasca kraemeri* após a morte do hospedeiro, em diferentes temperaturas.

TEMPERATURA (°C)	NÚMERO DE CONÍDIOS ($\times 10^4$)	NÍVEIS DA CONIDIOGÊNESE ^a			
		2,5%	PICO	50%	97,5%
5	1,3	39,1	70,6	81,6	171,8
10	1,4	26,7	43,7	55,0	116,4
15	2,5	17,9	29,0	32,4	62,4
20	2,6	9,1	16,6	19,4	42,6
25	2,5	9,5	16,1	18,0	34,4

^a Média dos tempos estimados pelo logaritmo das curvas ajustadas aos dados da conidiogênese de cada cadáver.

Com relação ao tempo para iniciar a conidiogênese (2,5%), este aumentou de 9,1 horas a 20°C para 9,5 a 25°C e para 17,9, 26,7 e 39,1 horas, conforme se diminuiu a temperatura para 15, 10 e 5°C, respectivamente.

As temperaturas entre 20 e 25°C podem ser consideradas ótimas ao fungo, visto que a temperatura maior proporcionou uma redução de apenas 3,8% na produção de conídios e um tempo para iniciar a conidiogênese semelhante, em relação à temperatura de 20°C. As temperaturas abaixo de 20°C podem ser consideradas favoráveis até 15°C, na qual verificou-se uma redução de 3,8% na produção de conídios e um aumento de duas vezes no tempo para iniciar a conidiogênese, em relação à temperatura de 20°C. As temperaturas de 5 e 10°C proporcionaram reduções na produção de conídios de 53,8 e 50,0%, respectivamente, e aumentaram os tempos para iniciar a conidiogênese em aproximadamente 4 e 3 vezes, respectivamente, em relação à temperatura de 20°C. Estes resultados confirmam as observações feitas por SOPER (1985) de que temperaturas abaixo de 15°C são desfavoráveis ao desenvolvimento epizootico do fungo. MILNER & LUTTON (1983) verificaram que *Z. radicans* apresentou maior produção de conídios na temperatura de 25°C, enquanto que GLARE *et alii* (1986) constatarem maior produção a 20°C para *Z. phalloides*, com alta inibição da conidiogênese na temperatura maior. Estudando o efeito de temperaturas na conidiogênese de *E. obscurus*, *E. planchoniana* e *E. exitialis* sobre o afídeo *A. kondoi*, MILNER (1981) verificou que as faixas de temperatu-

ras favoráveis para o desenvolvimento epizootico pode ser de 5 a 25°C para a primeira espécie, de 10 a 20°C para a segunda espécie e de 15 a 25°C para a terceira espécie.

Os resultados, em geral, indicam que *Z. radicans* e, provavelmente, muitas outras espécies de Entomophthorales, preferem temperaturas mais amenas, em relação à grande parte dos fungos Hifomicetos. Os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *N. rileyi* apresentam faixas de temperatura favoráveis para o desenvolvimento, de 24 a 30°C, 22 a 26°C e 20 a 30°C respectivamente, sendo que os dois últimos patógenos podem suportar temperaturas de até 45 e 35°C respectivamente (ALVES, 1986a). O fungo *Verticillium lecanii* apresenta uma faixa de temperatura favorável de 20 à 25°C, podendo suportar uma temperatura de até 36°C (HALL, 1981). HALL & PAPIEROK (1982) relataram que os fungos Entomophthorales são organismos predominante de clima temperado e apresentam temperaturas ótimas para o desenvolvimento em torno de 20°C ou abaixo.

Os períodos com temperatura em torno de 20°C podem contribuir para uma maior eficiência de *Z. radicans* no controle da cigarrinha-verde, tanto por favorecer o patógeno, como por atrasar o ciclo da praga. Segundo KOUSKOLEKAS & DECKER (1966), a taxa de desenvolvimento de *E. fabae* atingiu o cume na temperatura de 30°C. Considerando-se que o ciclo de *E. kraemerii* a 27°C é de cerca de 19 dias (LEITE FILHO & RAMALHO, 1979), estima-se que a 20°C podem ocorrer mais de quatro ciclos do patógeno para uma geração de praga.

Os tempos para ocorrer o pico da produção de conídios, após a morte do inseto, foram de 16,1, 16,6, 29,0, 43,7 e 70,6 horas, nas temperaturas de 25, 20, 15, 10 e 5°C respectivamente, enquanto que os tempos para atingir 50% da produção de conídios foram de 18,0, 19,4, 32,4, 55,0 e 81,6 horas nas respectivas temperaturas. Os tempos para ocorrer o pico da produção de conídios de *E. planchoniana* sobre o afídeo *A. kondoi*, após o patógeno ser exposto à condição favorável de umidade, foram de 4 a 8 horas a 20°C, 12 a 16 horas a 15°C e 12 a 20 horas a 10°C. Nota-se ainda na Tabela 14 um aumento do tempo de duração da conidiogênese de 34,4 para 42,6, 62,4, 116,4 e 171,8, provocado pelo decréscimo da temperatura de 25°C para 20, 15, 10 e 5°C, respectivamente. GLARE *et alii* (1986) constataram efeito semelhante das quatro maiores temperaturas e 4°C, na conidiogênese do fungo *Z. radicans* sobre o afídeo *M. persicae*, tendo provocado um aumento na duração em torno de 32, 60, 72, 112 e 288 horas, respectivamente.

4.4. Utilização de *Zoophthora radicans*, Isolado ARS-2282,

Para o Controle de *Empoasca* sp. na Cultura do Feijão

Nos levantamentos iniciais, a população encontrava-se acima do nível de dano que é de 2 a 3 insetos/trifólio (VALDERRAMA *et alii*, 1977) na quase totalidade das parcelas do campo experimental. Cabe ressaltar que as plantas, neste período, apresentam-se em crescimento vegetativo,

com uma média de 24,4 cm de altura e 4,3 folhas/planta, estando sujeitas a danos econômicos em virtude da alta infestação (Figura 5).

No levantamento inicial não se constatou a ocorrência de infecção dos insetos por *Z. radicans*, nas parcelas destinadas à aplicação do fungo e nas intermediárias. No entanto, constatou-se, através de observações, a presença de cadáveres atacados pelo fungo nativo no topo do campo (parte mais alta). Deve-se mencionar também que o fungo nativo encontrava-se em desenvolvimento epizootico na população do inseto em outros campos da região.

Durante a condução do experimento, as temperaturas diárias (Figura 12) não ultrapassaram 32,5°C durante o dia e não se situaram abaixo de 11,5°C durante a noite. As temperaturas mínima e máxima atingidas durante o experimento podem ser consideradas suportáveis para *Z. radicans*, dado ao fato de que o patógeno provocou a infecção no inseto, mesmo quando submetido à temperatura de 10°C, e colonizou o hospedeiro quando submetido a 32°C durante até 24 horas (McGUIRE *et alii*, 1987b). Além disso, foi constatado nesta pesquisa que o fungo produziu conídios quando submetido a 10°C, com 53,8% de redução quando comparada à produção a 20°C. A temperatura média variou de 15,8 a 24,9°C, apresentando-se dentro da faixa favorável de 15 a 25°C, conforme verificado nesta pesquisa. Assim, a temperatura não afetou o desenvolvimento epizootico da doença sobre a população dos insetos, durante a condução do experimento.

Figura 12. Temperaturas máximas, médias e mínimas, registradas durante o experimento na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1990.

No entanto, os níveis de infecção dos insetos avaliados apresentaram correlação com outros fatores, os quais atuaram na conidiogênese do patógeno e infecção dos insetos nos 5 dias precedentes a cada avaliação. A correlação com os fatores do período precedente está baseada nos dados obtidos nesta pesquisa, referentes ao tempo médio de incubação do patógeno, de 3 a 4 dias, para provocar a morte do hospedeiro após o início da infecção, quando submetidos à temperatura de 20°C. O fato das temperaturas durante o

experimento terem sido reduzidas nos períodos noturnos, com mínimas de $14,7^{\circ}\text{C}$, em média, provavelmente alongou o tempo médio de incubação do patógeno, permitindo a correlação com os fatores ocorridos até os 5 dias precedentes.

A Tabela 15 refere-se à conidiogênese dos fragmentos miceliais do fungo, após a sua aplicação nas diferentes doses. Os demais dados do experimento, referentes à porcentagem média de infecção dos insetos, densidade média de cadáveres do inseto com fungo e densidade populacional média da praga, estão expressas nas Tabelas 16, 17 e 18 respectivamente, sendo que as médias gerais das duas primeiras tabelas estão representadas graficamente na Figura 13 e, da última tabela, na Figura 14. Os dados referentes à duração de orvalho por noite e precipitação pluviométrica diária durante o experimento também estão representados graficamente na Figura 13, em correlação com os demais parâmetros.

Tabela 15. Número de conídios produzidos por fragmento micelial (cerca de 4 mm²) de *Zoophthora radicans* nas parcelas tratadas na cultura do feijão, nos três dias iniciais após a aplicação do patógeno. Capão Bonito, SP., 1990.

FRAGMENTO	D A T A		
	16/4	17/4	18/4
1	12928,6	30085,7	17642,9
2	6371,4	18371,4	7471,4
3	5771,4	40628,6	15071,4
4	9642,9	48000,0	8385,7
5	85,7	242,9	3214,3
6	2600,0	21800,0	15257,1
7	557,1	10400,0	33171,4
8	25371,4	82857,1	24228,6
9	14514,3	44857,1	8957,1
10	14457,1	19714,3	7271,4
11	34071,4	49457,1	24857,1
$\bar{M}$	11488,3	33310,4	15048,0

Tabela 16. Porcentagem média de infecção de *Empoasca* sp. por *Zoophthora radicans*, obtida das parcelas tratadas com diferentes doses do fungo (F), daquelas situadas entre as tratadas (Nf) e daquelas situadas na metade superior do campo (Nc), ao longo do experimento na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1990.

TRATAMENTOS	DATAS		DA	AVALIAÇÃO			
	16/4	20/4		26/4	30/4	4/5	7/5
Número médio de insetos coletados por parcela	7,2±3,5	15,7±7,1	11,31±6,5	11,5±4,5	7,8±4,5	4,5±13,0	2,0±1,8
SD							
F -2,0g/m ²	0,0	29,3	53,0	18,0	67,6	4,8	0,0
F -1,0g/m ²	0,0	37,6	28,0	16,5	42,1	80,0	80,0
F -0,5g/m ²	0,0	18,0	23,3	12,5	55,0	54,2	9,5
F -0,25g/m ²	0,0	14,4	31,7	14,9	73,7	94,4	77,8
F -Média Geral	0,0	24,8	34,0	15,5	59,6	58,4	41,8
Nf -2,0g/m ²	0,0	6,3	4,5	41,9	69,4	25,0	33,3
Nf -1,0g/m ²	0,0	6,7	39,4	41,1	78,6	61,3	37,5
Nf -0,5g/m ²	0,0	6,3	10,5	36,8	69,5	37,5	41,7
Nf -0,25g/m ²	0,0	7,7	13,4	23,1	59,5	58,3	58,3
Nf -Média Geral	0,0	6,8	17,0	35,7	69,3	45,5	42,7
Nc -18m	-	0,0	13,3	8,5	40,4	35,6	75,0
Nc -36m (Topo)	-	6,7	28,3	10,3	66,7	40,5	45,0
Nc -Média Geral	-	3,4	20,8	9,4	53,6	38,1	60,0

Nf - Parcelas não tratadas localizadas a 5 a 10 m das tratadas.

Nc - Parcelas não tratadas localizadas a 18 e 36 m (topo do terreno) das tratadas com a maior dose.

Tabela 17. Densidade média de cadáver de *Empoasca* sp. com *Zoophthora radicans* por trifólio, obtida das parcelas tratadas com diferentes doses do fungo (F), daquelas situadas entre as tratadas (Nf) e daquelas situadas na metade superior do campo (Nc), ao longo do experimento na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1990.

TRATAMENTOS	DATAS DA AVALIAÇÃO						
	16/4	20/4	23/4	26/4	30/4	4/5	7/5
F -2,0g/m ²	0,00	0,66	0,16	0,00	0,53	0,76	0,20
F -1,0g/m ²	0,00	0,75	0,08	0,22	0,34	0,68	0,05
F -0,5g/m ²	0,00	0,58	0,25	0,07	0,46	0,62	0,47
F -0,25g/m ²	0,00	0,83	0,08	0,14	0,66	0,46	0,13
F -Média Ger.	0,00	0,70	0,14	0,10	0,49	0,63	0,21
Nf-2,0g/m ²	0,00	0,00	0,13	0,00	0,59	0,66	0,37
Nf-1,0g/m ²	0,00	0,25	0,00	0,50	0,33	0,32	0,20
Nf-0,5g/m ²	0,00	0,00	0,00	0,00	0,85	0,30	0,24
Nf-0,25g/m ²	0,00	0,13	0,00	0,38	0,71	0,42	0,00
Nf-Média Ger.	0,00	0,09	0,03	0,22	0,62	0,42	0,20
Nc-18m	-	0,00	0,00	0,16	0,88	0,99	0,11
Nc-36m (Topo)	-	0,50	0,16	0,00	0,50	0,22	0,19
Nc-Média Ger.	-	0,25	0,08	0,08	0,69	0,60	0,15

Nf - Parcelas não tratadas localizadas a 5 a 10 m das tratadas.

Nc - Parcelas não tratadas localizadas a 18 e 36 m (topo do terreno) das tratadas com a maior dose.

Tabela 18. Densidade média de *Empoasca* sp. por trifólio, obtida das parcelas tratadas com diferentes doses de *Zoophthora radicans* (F), daquelas situadas entre as tratadas (Nf), e daquelas situadas na metade superior do campo (Nc), ao longo do experimento na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1990.

TRATAMENTOS	DATAS DA AVALIAÇÃO						
	16/4	20/4	23/4	26/4	30/4	4/5	7/5
F -2,0g/m ²	6,2	4,3	3,4	3,1	1,6	1,2	0,1
F -1,0g/m ²	5,0	4,5	2,5	3,3	2,4	0,8	0,7
F -0,5g/m ²	5,5	5,3	3,3	2,5	3,0	1,3	0,7
F -0,25g/m ²	7,5	5,4	3,9	3,2	2,0	0,7	0,5
F -Média Ger.	6,0	4,9	3,3	3,0	2,2	1,0	0,5
Nf-2,0g/m ²	2,8	4,4	4,0	3,6	2,4	1,0	0,3
Nf-1,0g/m ²	3,8	4,4	3,6	3,4	2,6	1,8	0,7
Nf-0,5g/m ²	4,5	7,1	5,1	3,7	3,2	1,6	0,9
Nf-0,25g/m ²	3,0	7,3	3,9	3,4	1,8	1,4	1,1
Nf-Média Ger.	3,5	5,8	4,2	3,5	2,5	1,4	0,8
Nc-18m	-	9,5	2,3	4,8	2,1	1,9	0,9
Nc-36m (Topo)	-	3,5	2,8	2,8	1,5	0,9	0,8
Nc-Média Ger.	-	6,5	2,6	3,8	1,8	1,4	0,8

Nf - Parcelas não tratadas localizadas a 5 a 10 m das tratadas.

Nc - Parcelas não tratadas localizadas a 18 e 36 m (topo do terreno) das tratadas com a maior dose.

Figura 13. Média geral das porcentagens de infecção de *Empoasca* sp. por *Zoophthora radicans* e as densidades de cadáver do inseto com fungo, obtidas das parcelas tratadas com o patógeno (---), daquelas situadas entre as tratadas (—), e daquelas situadas na metade superior do campo (...), ao longo do experimento na cultura do feijão, em correlação com dados climáticos diário do campo. Capão Bonito, SP., 1990.

Figura 14. Média geral das populações de *Empoasca* sp., obtidas das parcelas tratadas com *Zoophthora radicans* (---), daquelas situadas entre as tratadas (—), e daquelas situadas na metade superior do campo (...), ao longo do experimento na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1990.

Para melhor entendimento do desempenho do patógeno, serão discutidos a seguir os fatores que afetaram o desenvolvimento da epizootia em condições de campo, em cada período após a introdução inoculativa do patógeno, assim como o efeito do fungo na população dos insetos.

Primeiro período: 1 a 5 dias após a introdução do patógeno

Verificou-se que ocorreu a conidiogênese dos fragmentos miceliais do fungo nas três noites consecutivas após a sua aplicação. Nesta fase, o fungo apresentou coloração branca e aspecto pulverulento (Figura 15). A produção média de conídios por fragmento do fungo foi de 11.488 na primeira noite, atingindo o acme na segunda noite com 33.310 conídios, após o que foi reduzida para 15.048 conídios na terceira noite. O fungo foi favorecido por períodos de orvalho, com média de 12,8 horas, bastante elevados durante as 5 primeiras noites. Os períodos de orvalho foram suficientes para o fungo iniciar o desenvolvimento epizootico, já que o exigido está em torno de 9 horas, ou seja, 4 a 6 horas para o patógeno iniciar a conidiogênese, mais 4 horas para que os conídios ejetados iniciem a infecção (MILNER *et alii*, 1982; GALAINI-WRAIGHT *et alii*, no prelo).

Figura 15. Partícula micelial de *Zoophthora radicans*, em estado de conidiogênese, fixada na folha na cultura do feijão. Capão Bonito, SP., 1989.

Os conídios produzidos nas parcelas tratadas, proporcionaram níveis médios de infecção, após 5 dias da aplicação, de 14,4, 18,0, 37,6 e 29,3% para as dosagens de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 g/m² respectivamente, tendo resultado em uma média geral de 24,8%. Considerando-se que a produção total média de conídios por fragmento seja de 59846, ao longo dos 3 dias avaliados, e que 1g do fungo formulado contenha cerca de 1.000 fragmentos, as dosagens utilizadas de 1,0 a 8,0 g/4m² produziriam respectivamente, neste período, cerca de 6x10⁷ a 5x10⁸ conídios por parcela, equivalente à dosagem de 1,5x10¹¹ a 1,3x10¹² conídios por hectare, res-

pectivamente. No entanto, as dosagens de conídios foram bastante inferiores a estas em virtude da perda dos fragmentos que não atingiram as folhas ou que se desgrudaram das mesmas, após a aplicação do patógeno. O fungo *E. aphidis*, produzido por ANON (1976), em meio de cultura à base de farelo e água, e pulverizado como suspensão contendo 8×10^6 conídios/ml sobre população de afídeos, efetuou um controle entre 75 e 100% dos insetos. Os níveis de infecção de *Empoasca sp.*, obtidos no experimento, podem ser considerados superiores aos relatados por WRIGHT & ROBERTS (1987), que foram de 47,27 e 7% em população de *E. fabae*, após a aplicação das doses de 3,3, 1,0 e 0,33 g/m² de micélio seco do mesmo patógeno.

Os Hifomicetos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *N. riley* e outros têm sido estudados para o controle de pragas em condições de campo, mediante a aplicação dos patógenos em doses acima de 10^{12} conídios/ha, sendo que muitas situam-se entre 10^{13} e 10^{14} conídios/ha (GETZIN, 1981; FERRON, 1981; ALVES, 1986b; GALAINI, 1984). As dosagens de *Z. radicans* utilizadas no experimento, em termos de conídios por hectare, podem ser consideradas bastante inferiores às utilizadas para muitos dos Hifomicetos. Mesmo assim, foram suficientes para provocar o desenvolvimento da doença na população de *Empoasca sp.* nas parcelas, devido, provavelmente, à elevada patogenicidade do fungo.

Os níveis de infecção médios proporcionados pelas 2 maiores doses do fungo foram semelhantes entre si,

sendo maiores que aqueles proporcionados pelas 2 menores doses. Este fato permite afirmar que a dose de 1 g/m^2 é, provavelmente, a mais indicada para ser utilizada no controle da praga através da formação de focos da doença e indução da epizootia. WILDING (1982) estudou a aplicação de cadáveres do inseto com *E. neoaphidis*, para o controle de *Aphis fabae* em feijão, verificando que 5 mg de cadáveres por planta proporcionou 20% de infecção dos insetos 3 dias após a aplicação, apresentando-se como a melhor dose para ser utilizada.

Nas parcelas não tratadas, relacionadas à cada dose do fungo, ocorreram níveis de infecção médios variáveis de 6,3 a 7,7%, com média geral de 6,8%. Em algumas parcelas foram encontrados cadáveres de adultos de *Empoasca* sp. com o patógeno indicando que o fungo foi, provavelmente, disseminado pela movimentação dos adultos infectados nas parcelas tratadas. Também foram encontrados cadáveres de ninfas indicando que os insetos foram infectados na mesma área, em virtude da disseminação eólica do fungo aplicado ou do fungo nativo no local.

Segundo WILDING (1981), a fonte natural de inóculo de Entomophthorales mais importante para iniciar uma epizootia sobre populações de insetos é o solo, seguido dos adultos alados do hospedeiro e do vento. Utilizando armadilha de conídios, WILDING (1970) verificou que Entomophthorales podem disseminar-se pelo vento, após o aparecimento do foco primário da doença. WILDING (1975) estudou o desenvolvimento epizootico de 3 espécies de Entomophthorales sobre a

população do afídeo *A. pisum*, correlacionando-o com a densidade de conídios dos patógenos no ar. Segundo o autor, os esporos detectados estavam relacionados principalmente aos fungos que induziam os insetos a migrarem para partes mais altas das plantas, antes de morrerem pela infecção. O vento também pode prejudicar o desenvolvimento epizootico de Entomophthorales, quando atinge uma velocidade e frequência capaz de reduzir a umidade no microambiente do patógeno. MILLSTEIN *et alii* (1983) verificaram que o vento de 4 litros por minuto, com 30% de UR, semelhante ao que ocorre durante à noite, provocou a inibição de aproximadamente 35% da conidiogênese do fungo *Erynia sp.*, quando submetido por 1 hora a esta condição, em intervalos de mesmo período. Esta inibição foi equivalente à provocada pelo ar com 74,6% de UR, durante o mesmo período e frequência.

A lenta dispersão do fungo *Z. radicans* sobre a população do afídeo *T. trifolii maculata* levou MILNER *et alii* (1982) a concluir que a movimentação dos insetos apresenta um papel mais importante na disseminação do patógeno do que o vento. WRAIGHT & ROBERTS (1987) mencionaram que a movimentação de adultos de *E. fabae*, infectados com *Z. radicans* à partir de um foco primário da doença, provocou uma rápida disseminação do patógeno.

Nas condições do experimento, a aplicação de fragmentos miceliais de *Z. radicans* foi adequada para a introdução inoculativa do patógeno e formação de focos primários da doença. Segundo KENNETH *et alii* (1979), esta técnica

apresenta maior vantagem para a utilização do fungo *Hirsutella thompsonii*, em relação à pulverização de conídios em suspensão, por permitir a disseminação da forma infectiva através do vento.

Com relação às parcelas não tratadas da metade superior do campo, não se verificou infecção nos insetos para aquelas localizadas a 18 m da maior dose do fungo, enquanto que as localizadas a 36 m, apresentaram uma média de 6,7% de infecção. Pode-se sugerir que o nível de infecção encontrado na testemunha do topo foi provocado pelo fungo nativo, devido ao fato que, no dia seguinte à instalação do experimento, foram encontrados nesta localidade alguns cadáveres do inseto com o patógeno.

Notou-se também, cinco dias após a aplicação, a formação de focos primários, ou seja, de cadáveres do inseto com o patógeno, em maior frequência nas parcelas tratadas com as diferentes doses (média geral de 0,7 cadáveres por trifólio), e em menor, naquelas não tratadas, relacionadas às mesmas (média geral de 0,1 cadáveres por trifólio). A densidade média geral de cadáver nas parcelas tratadas com fungo pode ser considerada bastante acima da densidade mínima, de 0,4 a 0,5 cadáveres/planta, exigida para provocar o desenvolvimento epizootico em condições climáticas favoráveis (GALAINI-WRAIGHT *et alii*, no prelo).

Segundo período: 6 a 8 dias após a introdução inoculativa

Os níveis de infecção continuaram à crescer em quase todo o campo experimental no período após 20 a 23 de abril, atingindo médias gerais variáveis de 17,0 a 34,0%, conforme as localidades no campo.

O aumento do nível de doença neste período pode estar relacionado à combinação de fatores que ocorreram dentro do período dos 5 dias precedentes a data de 23 de abril. No intervalo de tempo de 18 a 20 de abril, a duração do orvalho esteve em torno do exigido de 9 horas, com média de 10,5 horas, sendo o potencial de inóculo elevado.

Os potenciais de inóculo do campo entraram em declínio no período após 20 a 23 de abril, sendo reduzidos para médias gerais variáveis de 0,03 a 0,14 cadáveres por trifólio, conforme as localidades no campo. O declínio foi provocado, provavelmente, pela chuva do dia 20 e por formigas, que atuaram durante as noites removendo os cadáveres fixados nas folhas pelos rizóides. As formigas do gênero *Solenopsis* foram citadas por GRAVENA & LARA (1982) como predadores de insetos pragas. Assim, os insetos debilitados ou mortos constituem-se em presas fáceis ao predador.

Terceiro período: 9 a 11 dias após a introdução do patógeno

As porcentagens de infecção dos insetos nas parcelas tratadas com as diferentes doses e naquelas não

tratadas, situadas na metade superior do campo, declinaram no período após 20 a 23 de abril, sendo reduzidas para médias gerais de 15,5 e 9,4% de infecção, respectivamente.

Nas parcelas não tratadas, relacionadas às doses de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 g/m², os níveis de infecção continuaram a crescer, atingindo médias de 23,1, 36,7, 41,4 e 41,9%, respectivamente. A análise desses dados permite confirmar que as infecções nas parcelas não tratadas, relacionadas às doses, foram provocadas principalmente pelo fungo aplicado, já que os níveis de infecção foram proporcionais às doses utilizadas. Além disso, reforçam a afirmação de que a dose de 1,0 g/m² pode ser indicada para o controle deste inseto, visto que o nível médio de infecção das parcelas não tratadas, relacionadas à esta dose, foi semelhante à aquele relacionado à maior dose e maior que aqueles relacionados às doses inferiores.

Considerando-se que as condições climáticas do campo foram sempre uniformes, e que os potenciais de inóculo foram reduzidos para níveis semelhantes após o dia 20 de abril, pode-se sugerir que as diferenças nos comportamentos epizooticos no período de 23 a 26 de abril podem ser devidas às diferenças dos níveis populacionais do inseto nas áreas.

Assim, a redução dos níveis médios de infecção das parcelas tratadas e daquelas não tratadas, situadas na metade superior do campo, deveu-se a três fatores ocorridos dentro do período dos 5 dias precedentes ao dia 26, os quais foram: redução da duração de orvalho (média de 2,3 horas no

período de 20 a 23 de abril), redução do potencial de inóculo e redução da população do inseto. A continuidade do aumento dos níveis médios de infecção de *Empoasca sp.* das parcelas não tratadas, relacionadas às doses, deveu-se, provavelmente, ao fato de que a população do inseto, nos 5 dias precedentes a 26 de abril, apresentava-se mais alta nestas áreas. Este fator biótico, associado com o hábito que os insetos possuem de agregação e estratificação na planta possibilitou que os conídios nestas áreas, embora em números reduzidos, atingissem números de hospedeiros suficientes para permitir o aumento dos níveis de infecção. Segundo MISSIONIER *et alii* (1970), a dispersão de Entomophthorales sobre a população de um inseto pode ser dependente da densidade populacional do hospedeiro, quando o potencial de inóculo do fungo encontra-se abaixo do mínimo necessário para o desenvolvimento epizoótico.

Quarto período: 12 a 15 dias após a introdução do patógeno

As porcentagens de infecção aumentaram em todo o campo no período após 26 a 30 de abril, atingindo níveis elevados 15 dias após a introdução inoculativa, com médias gerais variáveis de 53,8 a 69,3%, conforme as localidades no campo. WILDING *et alii* (1986a), estudando o controle de *A. fabae* na cultura do feijão, através de duas aplicações de cadáveres do inseto com *E. neoaphidis*, com intervalo de oito dias, na dosagem equivalente a 2,5 kg/ha, conseguiram resul-

tados semelhantes, ou seja, 39% de infecção dos insetos, 15 dias após a primeira aplicação, e 66%, 21 dias após.

A doença foi favorecida por fatores ocorridos dentro dos 5 dias precedentes a 30 de abril. Neste período a duração de orvalho esteve elevada, com média de 13,9 horas por noite, e o potencial de inóculo aumentou, atingindo médias gerais variáveis de 0,5 a 0,6 cadáveres por trifólio, conforme as localidades no campo.

Quinto período: após 15 dias da introdução do patógeno

A partir do dia 30 de abril, ou seja, 15 dias após a introdução inoculativa, até o final do experimento, os tratamentos com fungo e as testemunhas apresentaram altas variações nos níveis de infecção dos insetos. Este fato pode ter sido provocado pelas baixas populações de insetos neste período, que podem ter levado a um aumento no erro experimental.

Apesar das variações, os níveis de infecção dos tratamentos com fungo e das testemunhas foram altos neste período. A doença foi favorecida pelo elevado potencial de inóculo e por períodos de orvalho acima do exigido, com média de 11,9 horas.

Efeito do fungo na densidade populacional do inseto ao longo do experimento

Após a instalação do experimento ocorreu um declínio nas populações do inseto nas parcelas tratadas com as diferentes doses, sendo reduzidas, no dia 20 de abril, para níveis com média geral de 4,9 insetos por trifólio. As populações de insetos nas parcelas não tratadas, relacionadas às doses, apresentaram-se em crescimento após a instalação do experimento, até atingir, no dia 20 de abril, níveis superiores aos das parcelas tratadas com média geral de 5,8 insetos por trifólio. O declínio populacional nas parcelas tratadas com fungo foi provocado pelos elevados níveis de infecção dos insetos, enquanto que o crescimento nas não tratadas foi possibilitado, provavelmente, pelos baixos níveis de infecção nestas áreas.

No período após 5 a 8 dias da introdução do patógeno ocorreu um declínio populacional generalizado no campo experimental, provocado, provavelmente, pela chuva no dia 20 de abril e pelo aumento nos níveis de infecção. As populações de insetos nas parcelas tratadas com as diferentes doses foram mais afetadas pelo fungo, visto que apresentaram densidade média geral 15 a 20% mais baixa que a das não tratadas, relacionadas às mesmas.

Considerando-se que as populações do inseto nas parcelas não tratadas, relacionadas às doses, tenham contribuído para o aumento dos níveis de infecção, pode-se

afirmar que níveis acima de 4 a 5 insetos por trifólio (estimado como a população média geral destas áreas, nas datas de 21 e 23 de abril), provavelmente, permite o desenvolvimento epizootico da doença, mesmo em condições subótimas de umidade e inóculo, semelhantes às ocorridas no experimento.

As populações dos insetos, na maioria das parcelas tratadas com as diferentes doses e das não tratadas, continuaram a declinar no período após 8 a 11 dias da introdução do patógeno, sendo reduzidas para médias gerais variáveis de 3,0 a 3,8 insetos por trifólio, conforme as localidades no campo.

No período após 11 a 15 dias da introdução do patógeno, as populações dos insetos voltaram a declinar na quase totalidade das parcelas, sendo reduzidas para níveis em torno de 2 insetos por trifólio. A redução da população neste período não interferiu no aumento dos níveis de infecção, como ocorreu no período anterior, pelo fato de que o patógeno dispõe de mecanismos que permitem provocar o desenvolvimento epizootico mesmo em baixas densidades populacionais do hospedeiro, quando o potencial de inóculo atinge o limiar e as condições climáticas são favoráveis. Segundo GLARE *et alii* (1985), a infecção do hospedeiro via capilocónidio constitui-se em um eficiente mecanismo de transmissão do fungo sobre espécies de insetos normalmente encontradas em baixa densidade populacional. Este esporo, sendo mais resistente a baixas umidades do que os conídios primários (UZIEL & KENNETH, 1986), apresentam maior capacidade de so-

brevivência sobre a cutícula do hospedeiro ou sobre a folha, durante o dia. Assim, os capiloconídios podem ser os primeiros esporos que germinam e penetram no hospedeiro após a queda do orvalho (WRAIGHT *et alii*, 1990).

A população do inseto continuou a declinar em todo o campo após 15 dias da introdução do patógeno, sendo reduzida para níveis abaixo do nível de dano econômico, com médias em torno de 1 inseto por trifólio em 4 de maio e abaixo desse nível no dia 7.

O fungo *Z. radicans* nativo tem sido encontrado, geralmente, à partir do mês de março, provocando doença na população de *Empoasca* sp. em campos de feijão. No entanto, o desenvolvimento epizootico do patógeno, geralmente, é insuficiente para evitar que a população do inseto cresça e se mantenha elevada até provocar danos econômicos na cultura. SCHOONHOVEN *et alii* (1982) encontraram que o período mais crítico para o feijoeiro em relação à praga foi durante o florescimento. Entretanto, quando a infestação ocorreu à partir do início do desenvolvimento da cultura, o período de 27 a 44 dias após o plantio foi o mais crítico. Observaram ainda que até 27 dias e após 62 dias do plantio a ocorrência da cigarrinha-verde não implicou em perda da produção final.

Os resultados desta pesquisa mostram que o fungo *Z. radicans* pode evitar danos econômicos na cultura do feijão infestada com *Empoasca* sp., quando aplicado em condições favoráveis, antes que a população da praga atinja o nível de dano econômico.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente trabalho pode-se concluir o seguinte:

- A germinação dos conídios primários de *Zoophthora radicans* sobre *Empoasca kraemer*i, a 20°C, inicia-se dentro do período de 2 horas após a inoculação;
- A produção total de tubos germinativos tende à igualar-se a de capiloconídios sobre o corpo do hospedeiro, a 20°C, 12 horas após a inoculação;
- A proporção de conídios secundários, dentro das formas geradas pelos conídios primários germinados sobre o inseto, a 20°C, não ultrapassa 25% em qualquer das regiões do corpo do hospedeiro;
- A formação de apressório e penetração do fungo, a 20°C, iniciam dentro do período de 6 horas após a inoculação;
- As penetrações dos isolados ocorrem em maior proporção no abdome, seguido do tórax e cabeça do inseto, sendo mais frequente nas membranas do corpo do que nos escleritos;

- Os isolados ARS-1590 e ARS-1261 são os mais indicados para o controle de *Empoasca kraemeri*;
- O isolado ARS-1590, a 20°C, apresenta menor CL₅₀ e menor tempo para iniciar a conidiogênese, após a morte do inseto;
- O isolado ARS-1261, a 20°C, apresenta menores tempos médios de incubação para matar o inseto, variáveis de 65,0 a 75,0 horas, e maior produção de conídios por inseto;
- A faixa de temperatura de 20 a 25°C é ótima para o patógeno, sendo a faixa de 15 a 20°C favorável;
- A introdução inoculativa do fungo *Zoophthora radicans*, via micélio seco na dosagem de 1 g/m², em campo de feijão infestado com *Empoasca* sp., é viável para a formação de focos primários da doença e indução de epizootia;
- O desenvolvimento epizootico do fungo sobre a população do inseto é dependente do período de orvalho e da densidade de cadáveres do inseto atacados pelo patógeno, sendo que em condições subótimas de umidade e inóculo, é dependente também da densidade populacional do hospedeiro; e
- O fungo reduz a alta infestação da praga em campo de feijão quando aplicado em região e época favorável.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. Epizootiologia. In: ALVES, S. B., ed. Controle Microbiano de insetos. Editora Manole Ltda, São Paulo, 1986a. p.29-60.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B., ed. Controle Microbiano de insetos. Editora Manole Ltda, São Paulo, 1986b. p.73-126.
- ANON. A preliminary study on the cultivation of *Entomophthora aphidis* and its use in controlling cotton aphids (*Aphis gossypii*) in the field. *Acta Entomologica Sinica* 19: 63-66, 1976.
- BENZ, G. Key factors: environment. In: FUXA, J.R. & TANADA, Y. eds. *Epizootiology of Insect Diseases*. John Wiley & Sons, New York, 1987. p.177-214.
- BEN-ZE'EV, I. Systematics of entomopathogenic fungi of the *Sphaerosperma* group (Zygomycetes: Entomophthoraceae) and their prospects for use in biological pest control. Rehovoto, Faculty of Agriculture, the Hebrew University of Jerusalem, 1980. (Ph.D. thesis).
- BEN-ZE'EV, I. & KENNETH, R.G. *Zoophthora radicans* and *Zoophthora petchi* sp. nov. (Zygomycetes: Entomophthorales), two species of the *Sphaerosperma* group attacking leaf-hoppers and frog-hoppers (Hom.). *Entomophaga*, 26(2): 131-142, 1981.

- BEN-ZE'EV, I.; KENNETH, R.G. & SOPER, R.S. The Entomophthorales of Israel and their arthropod hosts: seasonal occurrence. *Phytoparasitica*, 12(3-4): 167-176, 1984.
- BEYER, A.H. Experiments on the biology and tipburn disease of the bean leaf-hopper with methods of control (*Empoasca mali* de Baron). *J. Econ. Entomol.*, 15: 298-302, 1922.
- BREY, P.T.; LATGE, J.P. & PREVOST, M.C. Integumental penetration of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by *Conidiobolus obscurus* (Entomophthoraceae). *J. Invertebr. Pathol.*, 48: 34-41, 1986.
- BROBYN, P.J. & WILDING, N. Invasive and developmental processes of *Entomophthora* species infecting aphidids. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 69(3): 349-366, 1977.
- BROBYN, P.J. & WILDING, N. Invasive and developmental processes of *Entomophthora muscae* infecting houseflies (*Musca domestica*). *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 80(1): 1-8, 1983.
- BROBYN, P.J.; WILDING, N. & CLARK, S.J. The persistence of infectivity of conidia of the aphid pathogen *Erynia neophididis* on leaves in the field. *Ann. Appl. Biol.*, 107: 365-376, 1985.
- CARRUTHERS, R.I. & SOPER, R.S. Fungal diseases. In: FUXA, J.R. & TANADA, Y. eds. *Epizootiology of Insect Diseases*. John Wiley & Sons, New York, 1987. p.357-416.
- CARRUTHERS, R.I.; FENG, Z.; ROBSON, D.S. & ROBERTS, D.W. In vivo temperature-dependent development of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) mycosis of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:

Pyralidae). J. Invert. Pathol., 46: 305-311, 1985.

DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. & SOPER, R. Fungal diseases of cowpea pests in North, Northeast and Central West Brazil. XVI ANNUAL MEETING, SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY. New York, Resumos, 1983. p.42.

DUDLEY, J.E. The potato leafhopper and how to control it. U.S. Department of Agriculture Farmers' Bulletin No.1462. 1926. 12p.

DUMAS, J.L. & PAPIEROK, B. Virulence de l'Entomophthorale *Zoophthora radicans* (ZYGOMYCETES) à l'égard des adultes de *Aedes egypti* (Dipt.:Culicidae). *Entomophaga* 34(3): 321-330, 1989.

FENTON, F.A. & HARTZELL, A. Bionomics and control of the potato leafhopper *Empoasca mali* Le Baron. Agricultural Experiment Station, Iowa State College of Agriculture and Mechanic Arts. Research Bulletin No.78, 1923. p.376-440.

FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B.; MAGALHÃES, B.P. & LORD, J. C. Efeitos da combinação de temperatura, umidade relativa e concentração de inóculo de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. na mortalidade de *Cerotoma arcuata* (Olivier, 1971) (Coleoptera: Chrysomelidae). *An. Soc. ent. Brasil*, 18(2): 313-320, 1989a.

FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B.; MAGALHÃES, B.P. & ROBERTS, D.W. Efeito dos fatores físicos e bióticos na conidiogênese e sobrevivência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no interior de cadáveres de *Cerotoma arcuata* (Olivier, 1971) (Coleoptera: Chrysomelidae). *An. Soc. ent. Brasil*, 18(supl.): 147-156, 1989b.

- FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: BURGESS, H.D. ed. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. London, Academic Press, 1981. p.465-482.
- FERRON, P. Fungal control. In: KERKHUT, G.A. & GILBERT, L.I. eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon, Oxford, 1983. p.314-346.
- GALAINI, S. The efficacy of foliar applications of *Beauveria bassiana* conidia against *Leptinotarsa decemlineata*. Ithaca, NY, Cornell University, 1984. 94p. (M.S. Thesis).
- GALAINI-WRAIGHT, S.; WRAIGHT, S.P.; CARRUTHERS, R.I.; MAGALHÃES, B.P. & ROBERTS, D.W. Description of a *Zoophthora radicans* (Zygomucetes: Entomophthoraceae) epizootic in a population of *Empoasca kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) on beans in Central Brasil. *J. Invertebr. Pathol.*, no prelo.
- GETZIN, L.W. *Spicaria rileyi*, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni*. *J. Invert. Pathol.* 3: 2-10, 1961.
- GLARE, T.R.; CHILVERS, G.A. & MILNER, R.J. Capilliconidio as infective spores in *Zoophthora phalloides* (Entomophthorales). *Trans. Br. mycol. Soc.*, 85(3): 463-470, 1985.
- GLARE, T.R.; MILNER, R.J. & CHILVERS, G.A. The effect of environmental factors on the production, discharge and germination of primary conidia of *Zoophthora phalloides* Batko. *J. Invertebr. Pathol.*, 48: 275-283, 1986.
- GLARE, T.R.; MILNER, R.J.; CHILVERS, G.A.; MAHON, R.J. & BROWN, W.V. Taxonomic implications of interspecific

- variation amongst isolates of the aphid-pathogenic fungi *Zoophthora radicans* Brefeld and *Z. phalloides* Batko (Zygomycetes: Entomophthoraceae). Austral. J. Bot., 35: 49-67, 1987.
- GRAVENA, S. & LARA, F.M. Controle integrado de pragas e receitaário agrônômico. In: GRAZIANO NETO, F. (coord.). *Uso de Agrotóxicos e Receitaário Agrônômico*, São Paulo, Agroedições, p.123-160, 1982.
- HALL, R.A. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against Aphidids and scales. In: BURGESS, H.D. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*, London, Academic Press, 1981. p.483-498.
- HALL, I.M. & PAPIEROK, B. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology*, 84: 205-240, 1982.
- HARTMANN, G.C. & WASTI, S.S. Infection of the gypsy moth, *Porthetria dispar* with the entomogenous fungus, *Conidobolus coronatus*. *Entomophaga*, 19(3): 353-36-, 1974.
- HOFFMANN, C.B.; NEWMAN, G.G. & FOERSTER, L.A. Incidência estacional de doenças e parasitas em populações naturais de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 e *Plusia* spp. em soja. *An. Soc. ent. Brasil*, 8(1): 115-124, 1979.
- HYWEL-JONES, N.L. & WEBSTER, J. Mode of infection of *Simulium* by *Erynia conica*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 87(3): 381-387, 1986.
- JAUQUES, R.P. & PATTERSON, N.A. Control of the apple sucker, *Psylla mali* Schmidb., by the fungus *Entomophthora sphaerosperma* (Fresenius). *Can. Entomol.*, 94: 818-825, 1962.

- KENNETH, R.; MUTTATH, T.I. & GERSON, V. *Hirsutella thompsonii*, a fungal pathogen of mites. I. Biology of the fungus in vitro. *Ann. appl. Biol.*, 91: 21-28, 1979.
- KISH, L.P. & ALLEN, G.E. Conidial production of *Nomuraea rileyi* on *Pseudoplusia includens*. *Mycologia*, 68: 436-439, 1976.
- KOUSKOLEKAS, C.A. & DECKER, G.C. The effect of temperature on the rate of development of the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 59(2): 292-298, 1966.
- LATGÉ, J.P.; PAPIEROK, B & SAMPEDRO, L. Agressivité de *Conidiobolus obscurus* vis-a-vis du puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* (Hem.: Aphididae) 1. Comportement des conidies sur la cuticule avant la pénétration du tube germinatif dans l'insecte. *Entomophaga*, 27(3): 323-330, 1982.
- LEITE FILHO, A.S. & RAMALHO, F.S. Biologia da cigarrinha verde, *Empoasca kraemeri* Roos & Moore, 1957 em feijão e em feijão-de-corda. *An. Soc. entomol. Brasil*, 8(1): 93-101, 1979.
- LEITE, L.G.; FRAGA, A.I.A. & ALVES, S.B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuil e *Paecilomyces* sp. sobre *Nezara viridula* L. *Ecossistema*, 12: 20-24, 1987.
- MAGALHÃES, B.P. & CARVALHO, S.M. Insetos associados à cultura. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M. & YAMADA, T., eds. *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1988. p.572-589.

- MAGALHÃES, B.P.; LORD, J.C.; WRAIGHT, S.P.; DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoophthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculata* and *Eriopis connexa*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52: 471-473, 1988.
- MAGALHÃES, B.P.; BUTT, T.M.; HUMBER, R.A.; SHIELDS, E.J. & ROBERTS, D.W. Formation of appressoria in vitro by the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales). *J. Invert. Pathol.*, 55(2): 284-288, 1990.
- MANIANIA, N.K. & FARGUES, J. Specificité des hyphomycètes entomopathogènes pour les larves de lepidoptères noctuidae. *Entomophaga*, 29(4): 451-464, 1984.
- MAY, P.H. Socioeconomic profile of cowpea producers in Northern Brazil. s.l., s. ed., 12p. 1986.
- MCCABE, D. & SOPER, R.S. Preparation of an entomopathogenic fungal insect control agent. U.S. Patent 4, 530, 834 jul. 1985.
- MCGUIRE, M.R. *Erynia radicans*: studies on its distributions, patogenecity, and host range in relation to the potato leafhopper, *Empoasca fabae*. Urbana, University of Illinois, 1985. 60p. (Ph.D. thesis).
- MCGUIRE, M.R.; MORRIS, M.J.; ARMBRUST, E.J. & MADDOX, J.V. An epizootic caused by *Erynia radicans* (Zygomycetes: Entomophthoraceae) in an Illinois *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) population. *J. Invertebr. Pathol.*, 50: 78-80, 1987a.
- MCGUIRE, M.R.; MADDOX, J.V. & ARMBRUST, E.J. Effect of temperature on distribution and success of introduction

- of an *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) isolate of *Erynia radicans* (Zygomycetes: Entomophthoraceae). J. Invertebr. Pathol., 50: 291-301, 1987b.
- MILLSTEIN, J.A.; BROWN, G.C. & NORDIN, G.L. Microclimatic moisture and conidial production in *Erynia* sp. (Entomophthorales: Entomophthoraceae): in vivo moisture balance and conidiation phenology. Environmental Entomology, 12(5): 1339-1343, 1983.
- MILNER, R.J. Patterns of primary spore discharge of *Entomophthora* spp. from the blue green aphid, *Acyrtosiphon kondoi*. J. Invert. Pathol., 38: 419-425, 1981.
- MILNER, R.J. & BOURNE, J. Influence of temperature and duration of leaf wetness on infection of *Acyrtosiphon kondoi* with *Erynia neoaphidis*. Ann. appl. Biol., 102: 19-27, 1983.
- MILNER, R.J.; HOLDOM, D.G. & GLARE, T.R. Diurnal pattern of mortality in aphids infected by entomophthoran fungi. Entomol. exp. appl., 36: 378-42, 1984.
- MILNER, R.J. & LUTTON, G.G. Effect of temperature on *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko: an introduced microbial control agent of the spotted alfalfa aphid, *Therioaphis trifolii* (Monell) f. *maculata*. J. Aust. ent. Soc., 22: 167-173, 1983.
- MILNER, R.J.; LUTTON, G.G. & BOURNE, J. A laboratory study of the interaction between aphids, fungal pathogens and parasites. In: BAILEY, P. & SWINCER, D. eds. Proc. 4th Austr. Appl. Entomol. Res. Conf., Adelaide, p. 375-381, 1984.

- MILNER, R.J. & SOPER, R.S. Bioassay of *Entomophthora* against the spotted alfalfa aphid *Therioaphis trifolii* f. *maculata*. J. Invertebr. Pathol., 37: 168-173, 1981.
- MILNER, R.J.; SOPER, R.S. & LUTTON, G.G. Field release of an israeli strain of the fungus *Zoophthora radicans* (Brefeld) Batko for biological control of *Therioaphis trifolii*(Monell) f. *maculata*. J. Aust. ent. Soc., 21: 113-118, 1982.
- MISSONIER, J.; ROBERT, Y. & THOIZON, G. Circunstances épidémiologiques semblant favoriser le développement des mycoses a Entomophthorales chez trois aphides, *Aphis fabae* Scop.; *Capitophorus horni* Börner et *Myzus persicae* Sulz. Entomophaga, 15: 189-190, 1970.
- MURRIN, F. & NOLAN, R.A. Ultrastructure of the infection of spruce budworm larvae by the fungus *Entomophaga aulicae*. Can. J. Bot. 65: 1694-1706, 1987.
- NEWMAN, G.C. & CARNER, G.R. Diel periodicity of *Entomophthora gammae* in the soybean looper. Environ. Entomol. 4: 615-618, 1976.
- NORDIN, G.L.; BROWN, G.C. & MILLSTEIN, J.A. Epizootic phenology of *Erynia* disease of the alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae), in Central kentucky. Environ Entomol., 12: 1350-1355, 1983.
- PAPIEROK, B. Entomophthorales: virulence and bioassay design. Proc. 3rd Int. Colloq. Invertebr. Pathol. Brighton, United Kingdom, 1982, p.176-181.
- PAPIEROK, B. Données écologiques et expérimentalis sur les potentialités entomopathogènes de l'entomophthorale *Conidiobolus coronatus* (Costantin) Batko. Entomophaga,

30(3): 303-312, 1985.

PAPIEROK, B.; TORRES, B.V.L. & ARNAUT, M. Contribution a l'étude de la spécificité parasitaire du champignon entomopathogène *Zoophthora radicans* (Zygomycetes, Entomophthorales). *Entomophaga*, 29(1): 109-119, 1984.

PAPIEROK, B. & WILDING, N. Mise en évidence d'une différence de sensibilité entre 2 clones du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* Harr. (Homoptère: Aphididae) exposés à 2 souches champignon phycomycète *Entomophthora obscura* Hall & Dunn. C. R. Acad. Sci. Paris, Série D, 288: 93-95, 1979.

PIZZAMIGLIO, M.A. Aspectos da biologia de *Empoasca kraemeri* (Ross e Moore, 1957) (Homoptera: Cicadellidae) em *Phaseolus vulgaris* (Linnaeus, 1753) e ocorrência de parasitismo em ovos. *An. Soc. entomol. Brasil*, 8(2): 369-372, 1979.

POWELL, W.; WILDING, N.; BROBYN, P.J. & CLARK, S.J. Interference between parasitoids (Hym.: Aphididae) and fungi (Entomophthorales) attacking cereal aphids. *Entomophaga*, 31(3): 293-302, 1986.

RAMALHO, F.S. Efeitos da época de infestação da cigarrinha verde, *Empoasca kraemeri* Ross & Moore, 1957 na cultura do feijão. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 30^a. São Paulo, Resumos, 1978. p.15.

REMAUDIERE, G.; KELLER, S.; PAPIEROK, B. & LATGÉ, J.P. Considérations systématiques et biologiques sur quelques espèces d' *Entomophthora* du groupe *Sphaerosperma* pathogènes d'insectes (Phycomycètes: Entomophthoraceae). *Entomophaga*, 21: 163-177, 1976.

- SAMPEDRO, M.L.; LATGE, J.P. & UZIEL, A. Agressivité de *Conidiobolus obscurus* vis-à-vis du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. *Mycopathologia*, 86: 3-19, 1984.
- SAMUELS, K.D.Z.; HEALE, J.B. & LLEWELLYN, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invert. Pathol.*, 53: 25-31, 1989.
- SANTOS, J.H.; VIEIRA, F.V. & PEREIRA, L. Importância relativa dos insetos e ácaros hospedados nas plantas do feijão-de-corda, nos perímetros irrigados do DNOCS, especialmente no Ceará. a. Primeira lista. Fortaleza, Centro de Ciências Agrárias da UFCE, 1977. 29p.
- SAWYER, W.H. Observations on some entomogenous members of the Entomophthoraceae in artificial culture. *Am. J. Bot.*, 16: 27-121, 1929.
- SCHOONHOVEN, A.V.; GÓMES, L.A. & AVALOS, F. The influence of leafhopper (*Empoasca kraemerii*) attack during various bean (*Phaseolus vulgaris*) planta growth stages on seed yield. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Wageningen, 23(2): 115-120, 1982.
- SHIMAZU, M. Resting spore formation of *Entomophthora sphaerosperma* Fresenius (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). *Appl. Ent. Zool.*, 14(4): 383-388, 1979.
- SMITH, R.J. & GRULA, E.A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invert. Pathol.*, 37: 222-230, 1981.

- SOPER, R.S. Development of *Entomophthora* species as possible microbial insecticides. In: Proc. 1st US/USSR Conf. on Production, Selections and Standardisations of Entomopathogenic Fungi, p. 270-282. 1979.
- SOPER, R.S. *Erynia radicans* as a mycoinsecticide for spruce budworm control. In: Proceedings Symposium: Microbial Control of Spruce Budworms and Gypsy Moths. Windsor Jocks, Connecticut. p.69-76. Forest Service, U.S. Department of Agriculture, GTR-NE-100. 1985.
- SOPER, R.S. & MACLEOD, D.M. Descriptive epizootiology of an aphid mycosis. U. S. Dept. Agri. Tech. Bull., 1632, 1-17. 1981.
- STEINHAUS, E.A. Principles of Insect Pathology, New York, Toronto and London, McGraw-Hill, 1949. 757p.
- TEIXEIRA, S.M. & ROCHA, L.S.A. Análise sócio-econômica da produção. In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M. & YAMADA, T. eds. Cultura do Feijoeiro. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p.37-56, 1988.
- TEIXEIRA, S.M.; MAY, P.H. & SANTANA, A.C. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J.P.P. & WATT, E.E. (org.). O Caupi no Brasil. Brasília, IITA/EMBRAPA, p.99-138, 1988.
- TOMIYAMA, H. & AOKI, J. Infection of *Erynia blunckii* (Lak. ex Zimm.) Rem. et Henn (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in the diamond-back moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). Appl. Ent. Zool., 17(3): 375-384, 1982.

- TORIELLO, C.; IBANEZ, J.M.H.; MARTINEZ, R.L.; MARTINEZ, A.; GONZALEZ, L.L.; MIER, T.; CARRILLO, J. & LATGÉ, J.P. The pathogenic fungi of the spittlebug in Mexico. III. Innocuity of *Erynia neoaphidis* and *Conidiobolus major* in experimental animals. *Entomophaga*, 31(4): 371-376, 1986.
- UZIEL, A. & KENNETH, R.G. Survival capacity of capilloconidia over primary conidia at low humidity in *Erynia* (Subgen. *Zoophthora*) and *Neozygites fresenii* (Zygomycetes: Entomophthorales). In: SAMSON, R.A.; VLAK, J.M. & PETERS, D. eds. *Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology*. Proc. Fourth Int. Colloq. Invertebr. Pathol., Wageningen, The Netherlands, 1986. p.231.
- VALDERRAMA, H.; AVALOS, F.; GÓMES, L. & SCHOONHOVEN, A.V. Niveles previos de daño económico para *Empoasca kraemeri* en el cultivo del frijol en el Valle del Cauca. *Revista Colombiana de Entomología*, 3(314): 105-119, 1977.
- VANDENBERG, J.D. & SOPER, R.S. Prevalence of Entomophthorales mycoses in populations of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Environ. Entomol.*, 7: 847-853, 1978.
- VANDENBERG, J.S. & SOPER, R.S. A bioassay technique for *Entomophthora sphaerosperma* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J. Invert. Pathol.*, 33: 148-154, 1979.
- VAN ROERMUND, H.J.W.; PERRY, D.F. & TYRRELL, Influence of temperature, light, nutrients and pH in determination of the mode of conidial germination in *Zoophthora radicans*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 82(1): 31-38, 1984.

- WILDING, N. Effect of humidity on the sporulation of *Entomophthora aphidis* and *E. thaxteriana*. Trans. Br. mycol Soc., 53(1): 126-130, 1969.
- WILDING, N. *Entomophthora* conidia in the air-spora. J. Gen. Microbiol., 62: 149-157, 1970.
- WILDING, N. *Entomophthora* species infecting pea aphid. Trans. R. ent. Soc., 127: 171-183, 1975.
- WILDING, N. The effect of introducing aphid-pathogenia Entomophthoraceae into field populations of *Aphis fabae*. Ann. appl. Biol., 99:11-23, 1981.
- WILDING, N. The effect of fungicides on field populations of *Aphis fabae* and on the infection of the aphids by Entomophthoraceae. Ann. appl. Biol., 100: 221- 228, 1982.
- WILDING, N.; LATTEUR, G. & DEDRYVER, C.A. Evaluation of Entomophthorales for aphid control: laboratory and field data. In: SAMSON, R.A.; VLAK, J.M. & PETERS, D. eds. Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. Proc. Fourth Int. Colloq. Invertebr. Pathol., Wageningen, The Netherlands, 1986a. p.159-162.
- WILDING, N.; MARDELL, S.K. & BROBYN, P.J. Introducing *Erynia neoaphidis* into a field population of *Aphis fabae*: form of the inoculum and effect of irrigation. Ann. appl. Biol., 108: 373-385, 1986b.
- WRAIGHT, S.P.; BUTT, T.M.; GALAINI-WRAIGHT, S.G.; ALEE, L.L.; SOPER, R.S. & ROBERTS, D.W. Germination and infection processes of the Entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*. J. Invertebr. Pathol., 56: 157-174, 1990.

WRAIGHT, S.P. & ROBERTS, D.W. Insect control efforts with fungi. *Dev. Ind. Microbial.*, 28: 77-87, 1987.

YAMAMOTO, M. & AOKI, J. Periodicity of conidial discharge of *Erynia radicans*. *Trans. mycol. Soc. Japan*, 24: 487-496, 1983.

YENDOL, W.G. & PASCHKE, J.D. Pathology of an *Entomophthora* infection in the Eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*. *J. Invertebr. Pathol.*, 7: 414-422, 1965.

ZANG, M. & LUO, H. A preliminary study on *Entomophthora sphaerosperma* parasitizing *Empoasca flavescens*. *Acta Microbiol. Sin.*, 16: 256-257, 1976.