Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Controle microbiano de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) com *Hirsutella*
thompsonii Fisher**

Luciana Savoi Rossi-Zalaf

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Entomologia**

Piracicaba
2007

Luciana Savoi Rossi-Zalaf
Engenheiro Agrônomo

**Controle microbiano de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) com *Hirsutella thompsonii*
Fisher**

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO BATISTA ALVES**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Rossi-Zalaf, Luciana Savoi

Controle microbiano de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) com
Hirsutella thompsonii Fisher. - - Piracicaba, 2007.
124 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Ácaros parasitos de plantas 2. Controle biologia – Fitossanidade
3. Fungos entomopatogênicos 4. Leprose cítrica 5. Vetores de doenças de
plantas I. Título

CDD 632.6542

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus queridos pais, *Virgílio e Heloisa*, agradeço por todo amor, pelas palavras e gestos de incentivo e pelo apoio incondicional durante toda a minha vida. Vocês têm minha admiração para sempre.

Bruna e Luísa, minhas irmãs, obrigada pela lealdade, apoio e principalmente pela grande amizade que temos.

Henrique, meu marido e amigo, agradeço por sua presença tão importante, por todo o carinho, incentivo e respeito. Você é meu maior exemplo de dedicação e determinação.

DEDICO e OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao professor **Dr. Sérgio Batista Alves** pela confiança depositada em mim e pela amizade. Obrigada por todos os grandes e valiosos ensinamentos, mas em especial, aquele de que nunca podemos desistir perante as dificuldades da vida. São valores que sempre levarei comigo.

Aos colegas do laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, em especial à Solange Ap. Vieira, pela amizade e companheirismo.

Aos professores do Departamento de Entomologia da Esalq/USP. Em especial, agradeço ao Dr. Ítalo Delalibera Jr. pelas sugestões e auxílio na elaboração e correção do abstract, ao Dr. Celso Omoto pelo convívio durante os períodos de monitoria, ao Dr. Sinval Silveira Neto pelo apoio e valiosos ensinamentos e à Dra. Marinéia de Lara Haddad e pelo auxílio no entendimento das análises estatísticas.

Aos engenheiros agrônomos Dr. Rogério B. Lopes e Dr. Everaldo B. Alves, pela amizade e por todas as sugestões dadas durante o planejamento e execução deste trabalho. Ao colega Gabriel M. Mascarin pelo auxílio na realização das análises estatísticas e pela amizade. Ao colega Giuliano Pauli pela ajuda na realização dos experimentos de campo e amizade.

À minha grande amiga Dra Tatiele A. B. Fenilli, por todos os anos de convivência, por estar ao meu lado nos momentos de alegria e de dificuldade.

Aos colegas de curso da pós-graduação, em especial, Raquel Arouca, Juan G. Molina, Melissa Faion, Daniella Macedo, Fabiana Romano, Daniela de Almeida, Marcelo Poletti, Ana Lia P. Pedrazolli, Diogo Carvalho, Cláudio Franco, Isabela Bologna, Virgínia Damim, Carlos E. Faroni, Cláudia Brasil Vieira, Nádia Casarin e Estela de Carvalho pela amizade.

Aos funcionários da biblioteca, em especial à Silvia Zinsly pela atenção, simpatia e pela ajuda na correção das referências.

À Capes, pela bolsa de estudos que possibilitou a execução desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 Revisão Bibliográfica	11
2.1.1 Características morfológicas e plantas hospedeiras de <i>Brevipalpus</i> spp.	11
2.1.2 Bioecologia de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	13
2.1.3 Características de <i>Brevipalpus phoenicis</i> como vetor da leprose dos citros.....	15
2.1.3.1 Danos Diretos.....	15
2.1.3.2 Danos Indiretos.....	17
2.1.3.3 A leprose dos citros (CiLV).....	19
2.1.3.4 Prejuízos econômicos e medidas de controle da leprose dos citros.....	22
2.1.3.5 Perspectivas para o manejo do ácaro da leprose dos citros.....	24
2.1.4 O controle microbiano de ácaros em citros com fungos entomopatogênicos....	26
2.1.4.1 Entomophthorales.....	27
2.1.4.2 <i>Hirsutella thompsonii</i>	28
2.1.4.2.1 Descrição taxonômica e características morfológicas.....	28
2.1.4.2.2 Sintomas da doença e ciclo biológico.....	29
2.1.4.2.3 Produção “in vitro”.....	31
2.1.4.2.4 Ocorrência natural e utilização como micoacaricida.....	33
2.2 Material e Métodos.....	35
2.2.1 Criação e manutenção de <i>Brevipalpus phoenicis</i> em laboratório.....	35
2.2.2 Produção de <i>Hirsutella thompsonii</i> e preparação do inóculo para pulverização.....	36
2.2.3 Viabilidade de <i>Hirsutella thompsonii</i> produzido em meio de cultura completo sólido (MC-S), meio completo líquido (MC-L) e em arroz pré-cozido (APC).....	38
2.2.4 Infecção de <i>Hirsutella thompsonii</i> em <i>Brevipalpus phoenicis</i>	40
2.2.4.1 Determinação da curva de concentração-mortalidade de adultos de	

<i>Brevipalpus phoenicis</i> a <i>Hirsutella thompsonii</i>	40
2.2.4.1.1 Determinação das concentrações discriminatórias.....	40
2.2.4.1.2 Determinação das curvas de concentração-mortalidade.....	42
2.2.4.2 Patogenicidade de <i>Hirsutella thompsonii</i> a diversas populações de <i>Brevipalpus phoenicis</i> do Estado de São Paulo.....	44
2.2.4.3 Patogenicidade de <i>Hirsutella thompsonii</i> a ovos de <i>Brevipalpus phoenicis</i> ...	45
2.2.4.4 Efeito da temperatura e umidade relativa do ar na infecção de <i>Hirsutella thompsonii</i> em adultos de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	46
2.2.4.5 Caracterização morfológica e virulência de isolados exóticos de <i>Hirsutella thompsonii</i>	47
2.2.4.6 Persistência de <i>Hirsutella thompsonii</i> em folhas de citros.....	48
2.2.4.7 Efeito de <i>Hirsutella thompsonii</i> sobre a população de <i>Brevipalpus phoenicis</i> em condições de campo.....	49
2.2.5 Compatibilidade de <i>Hirsutella thompsonii</i> com acaricidas e sua associação com o produto Propargite (Omite 720 EC) para o controle de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	52
2.2.5.1 Compatibilidade “in vitro” de acaricidas registrados para o ácaro da leprose.....	52
2.2.5.2 Efeito de Propargite e <i>Hirsutella thompsonii</i> sobre adultos de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	55
2.3. Resultados e Discussão.....	56
2.4.1 Viabilidade de <i>Hirsutella thompsonii</i> produzido em meio de cultura completo sólido (MC-S), meio completo líquido (MC-L) e em arroz pré-cozido (APC).....	56
2.4.2 Infecção de <i>Hirsutella thompsonii</i> em <i>Brevipalpus phoenicis</i>	60
2.4.2.1 Determinação da curva de concentração-mortalidade adultos de <i>Brevipalpus phoenicis</i> a <i>Hirsutella thompsonii</i>	60
2.4.2.1.1 Determinação das concentrações discriminatórias.....	60
2.4.2.1.2 Determinação das curvas de concentração-mortalidade.....	61
2.4.2.2 Patogenicidade de <i>Hirsutella thompsonii</i> a diversas populações de <i>Brevipalpus phoenicis</i> do Estado de São Paulo.....	69

2.4.2.3 Patogenicidade de <i>Hirsutella thompsonii</i> a ovos de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	73
2.4.2.4 Efeito da temperatura e umidade relativa do ar na infecção de <i>Hirsutella thompsonii</i> em adultos de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	75
2.4.2.5 Caracterização morfológica e virulência de isolados exóticos de <i>Hirsutella thompsonii</i>	82
2.4.2.6 Persistência de <i>Hirsutella thompsonii</i> em folhas de citros.....	93
2.4.2.7 Efeito de <i>Hirsutella thompsonii</i> sobre a população de <i>Brevipalpus phoenicis</i> em condições de campo.....	97
2.4.3 Compatibilidade de <i>Hirsutella thompsonii</i> com acaricidas e sua associação com o produto Propargite (Omite 720 EC) para o controle de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	102
2.4.3.1 Compatibilidade “in vitro” de acaricidas registrados para o ácaro da leprose.....	102
2.4.3.2 Efeito de Propargite e <i>Hirsutella thompsonii</i> sobre adultos de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	106
3 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS	112

RESUMO

Controle microbiano de *Brevipalpus phoenicis* (Geijkes, 1939) com *Hirsutella thompsonii* Fisher

Avaliou-se o efeito de *Hirsutella thompsonii* ao ácaro da leprose dos citros (*Brevipalpus phoenicis*). Em laboratório, adultos foram mantidos em arenas sobre folhas de citros em placas contendo ágar-água solidificado. Foram avaliadas a patogenicidade e virulência do fungo ao ácaro, bem como sua persistência e compatibilidade com acaricidas. No campo, os ácaros foram confinados em arenas sobre frutos de laranja pré-infestados com adultos, sendo estes mantidos em plantas de citros. O isolado Esalq-1269 de *H. thompsonii* foi inoculado em populações do ácaro provenientes de diversas regiões do Estado de São Paulo. Para se verificar o efeito combinado da temperatura e umidade relativa do ar, o patógeno foi aplicado e os ácaros mantidos em condições controladas. A eficiência de Esalq-1269 foi comparada com isolados do banco de patógenos do Cenargen/Embrapa, os quais foram identificados. Além destes testes, determinou-se o efeito de Esalq-1269 em ovos de *B. phoenicis*. As avaliações da virulência e persistência foram realizadas a partir do patógeno produzido em meio de cultura completo e sólido (MC-S); meio completo e líquido (MC-L); arroz pré-cozido (APC) e arroz pré-cozido seco e moído (APC-SM). Nos bioensaios com os acaricidas, determinou-se a compatibilidade com agrotóxicos registrados para *B. phoenicis* em citros. O efeito de sub-concentrações de *H. thompsonii* e de Propargite (Omite 720 SC) foram avaliadas, isoladamente e em mistura, para o ácaro. Em todos os bioensaios, as suspensões contendo propágulos do fungo foram preparadas em diferentes concentrações e após a pulverização avaliou-se a mortalidade durante quatro dias. No experimento de campo o patógeno foi aplicado em diferentes concentrações. O primeiro experimento constou da testemunha e *H. thompsonii* produzida em APC (6kg/ha). O segundo experimento constou: testemunha, *H. thompsonii* produzida em APC (20kg/ha e 10kg/ha) e *H. thompsonii* produzida em MC-L (5L/ha). As avaliações foram realizadas após 10 e 20 dias das aplicações, verificando a sobrevivência de adultos e o número de ovos e ninfas. Esalq-1269 foi patogênico a adultos de *B. phoenicis* provenientes de todas as regiões do Estado avaliadas, porém com diferenças quanto suscetibilidade. Todos os isolados testados foram patogênicos a *B. phoenicis*, sendo Esalq-1269 o mais virulento. Nos testes de temperatura x umidade, observou-se que Esalq-1269 apresentou alta atividade a 30°C, independentemente da umidade relativa. Porém, baixas temperaturas prejudicaram o desenvolvimento da doença. O patógeno não apresentou efeito em ovos do ácaro. Nos testes de virulência, a menor CL₂₅ obtida foi para o fungo produzido em MC-S ($1,9 \times 10^5$ con/mL), já as CL₂₅ para o patógeno produzido em APC e APC-SM foram semelhantes. O fungo produzido em MC-L foi o que apresentou maior persistência em relação aos demais, sendo capaz de causar mortalidade devido ao efeito indireto. Quanto à toxicidade, a exceção de Dicofol e Cihexatina, todos os acaricidas foram compatíveis com o fungo. Observou-se efeito sinérgico entre a mistura patógeno x propargite, com alta mortalidade de *B. phoenicis* em sub-concentrações. Em campo, houve diferenças dos tratamentos com o fungo em relação à testemunha, havendo redução no número de adultos e de ovos.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; Ácaro da leprose dos citros; *Hirsutella thompsonii*

ABSTRACT

Microbial control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) with *Hirsutella thompsonii* Fisher

This study aimed to evaluate the effect of *Hirsutella thompsonii* on the false spider mite (*Brevipalpus phoenicis*). In laboratory bioassays, adults were confined to arenas prepared with citrus leaves in acrylic dishes containing water-agar. The pathogenicity and virulence of the fungus against *B. phoenicis* adults, the persistence in citrus leaves and the compatibility with acaricides were studied. Adults were maintained in arenas prepared with fruits which were placed in plants in the field. The *H. thompsonii* isolate Esalq-1269 was inoculated on mite populations from different regions of São Paulo state. Also, the combined effect of temperature and humidity was measured on the fungus performance when mites were maintained in controlled conditions. The efficiency of Esalq-1269 was compared to isolates from Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Besides these bioassays, the effect of Esalq-1269 isolate in eggs of *B. phoenicis* was determined. The virulence and persistence tests were conducted using the fungi produced on complete solid culture medium (MC-S); complete liquid culture medium (MC-L); rice (APC) and rice powder (APC-SM). Compatibility of acaricides registered for *B. phoenicis* control with Esalq-1269 was evaluated and the combined effect of Propagite (Omite 720 SC) with sub-doses of *H. thompsonii* was determined. Mortality of mites was observed during four days after application of conidial suspensions. In field tests, the pathogen was applied in different concentrations. In the first assay, fungi were produced in APC (6kg/ha). In the second test, three treatments were applied: *H. thompsonii* cultured on rice (APC) at two concentrations (20Kg/ha and 10 Kg/ha) and *H. thompsonii* produced by liquid fermentation (MC-L) (5L/ha). Observations were performed after 10 and 20 days after application and adult survival, number of eggs and nymphs per fruit were observed. The isolate Esalq-1269 caused high mortality in all populations of *B. phoenicis* tested. Also, this strain was the most virulent against the mite and it was negatively affected by low temperatures. At 30°C, high mortality of adults was observed regardless of humidity levels. *B. phoenicis* was not pathogenic to eggs of *B. phoenicis*. The lowest LC₂₅ value calculated was from pathogen produced in MC-S ($1,9 \times 10^5$ conidia/mL). The LC₂₅ values calculated to APC and APC-SM did not differ statistically. The pathogen produced by liquid fermentation was the most persistent in citrus leaves, causing higher levels of adult mortality. The acaricides Dicofol and Cyhexatin were toxic to Esalq-1269. Synergism between Propargite and *H. thompsonii* was observed resulting in high adult mortality under low concentrations. In field, results showed differences on concentration and time to death between treatments and control. Field applications resulted in reduction of adult and eggs.

Keywords: Entomopathogenic fungi; False spider mite; *Hirsutella thompsonii*

1 INTRODUÇÃO

Os ácaros fitófagos são considerados pragas-chave das mais diversas culturas agrícolas. Em citros, duas espécies destacam-se por seus danos diretos e indiretos: o ácaro da falsa-ferrugem-dos-citros (*Phyllocoptruta oleivora*) e, como maior destaque, o ácaro da leprose (*Brevipalpus phoenicis*). A importância desta praga está relacionada à sua capacidade de transmitir um rhabdovírus de ação localizada que ataca ramos, folhas e frutos, tornando a planta improdutiva.

Uma vez que o aparecimento dos sintomas da leprose nas plantas cítricas depende diretamente da distribuição de *B. phoenicis*, o controle da doença tem sido realizado mediante a redução populacional do vetor, basicamente pela aplicação de acaricidas químicos. Esta tática de controle, isoladamente, é responsável por uma série de problemas como desenvolvimento de resistência do ácaro aos produtos, contaminação de frutos e do aplicador, diminuição de agentes naturais controle, ressurgimento de pragas de importância secundária além de elevação dos custos de produção. A utilização exclusiva do controle químico promove o desequilíbrio ecológico na cultura, não se aplicando a um contexto de manejo integrado, em que outras tecnologias devem ser agregadas para reduzir problemas com as pragas e equilibrar os custos de produção, atendendo as exigências de um mercado consumidor cada vez mais rigoroso no consumo de produtos mais saudáveis.

Assim, a aplicação das estratégias de controle biológico das pragas de citros constitui uma alternativa moderna para reduzir os problemas gerados com a utilização maciça de agrotóxicos nesta cultura, com o objetivo de restaurar o equilíbrio biológico do pomar.

Dentre os inimigos naturais que devem ser preservados e podem ser utilizados efetivamente, destacam-se os fungos entomopatogênicos. Um gênero de grande importância é *Hirsutella*, principalmente *Hirsutella thompsonii* (Fisher) devido a sua ocorrência natural e patogenicidade para eriofídeos. Após seu isolamento a partir do ácaro-da-falsa-ferrugem-dos-citros em 1924, uma série de estudos relacionados ao ciclo de vida, identificação de novas espécies, patogenicidade a outros ácaros e organismos não-alvo, epizootiologia, técnicas de produção, seleção de isolados, detecção de toxinas, compatibilidade com outras táticas de controle foram realizados e auxiliaram no desenvolvimento deste fungo como bioinseticida o qual foi comercializado por um pequeno período na década de 1980 nos Estados Unidos.

Recentemente, trabalhos de laboratório e de campo vêm demonstrando o potencial de utilização deste patógeno no controle do ácaro da leprose dos citros (ACEVEDO; ROSAS, 2000; ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006).

Desta forma, na agricultura tradicional, o controle microbiano pode ser inserido como uma parte importante do manejo integrado, viabilizando a produção de citros mediante a associação de acaricidas químicos com os produtos biológicos. Para o setor citrícola adepto à produção orgânica, a utilização destes agentes microbianos é uma medida indispensável para redução dos danos causados por *B. phoenicis* e, conseqüente, a obtenção de produtos isentos de resíduos de agrotóxicos. O controle microbiano do ácaro da leprose representa uma estratégia viável que deverá minimizar a contaminação dos frutos com agroquímicos com repercussão social pelos menores níveis de contaminação dos consumidores e dos trabalhadores em campo. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar estudos sobre a patogenicidade de *H. thompsonii* a *B. phoenicis*, avaliando em laboratório e em campo a possibilidade de sua utilização como micoacaricida em citros.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Características morfológicas e plantas hospedeiras de *Brevipalpus* spp..

A família Tenuipalpidae apresenta aproximadamente 622 espécies de ácaros descritas e distribuídas em 30 gêneros. Dentre estes, *Brevipalpus* Donnadieu 1875 é o de maior destaque, pois apresenta cerca de 300 espécies identificadas (CHILDERS; RODRIGUES; WELBOURN, 2003a; WELBOURN et al., 2003). Devido ao aspecto achatado da maioria de seus representantes são vulgarmente denominados de “ácaros planos” (flat mite) ou “false spider mites” (WERNER; CHAIRMAN, 1982).

As espécies pertencentes a *Brevipalpus* apresentam tamanho diminuto e ocorrem em diferentes regiões do globo terrestre, especialmente locais de clima tropical e subtropical (AGUILAR; VARGAS, 1994; CHILDERS; RODRIGUES; WELBOURN, 2003a; OCHOA; SMILEY; GERSON, 1995). De maneira geral, o padrão reticulado do idiossoma, os tipos e a

disposição das setas pelo corpo são alguns dos caracteres importantes para identificação taxonômica dos tenuipalpídeos, podendo ocorrer variações dentro de uma mesma espécie (CHILDERS et al., 2001a; CHILDERS; RODRIGUES; WELBOURN, 2003a; WELBOURN et al., 2003). De acordo com Welbourn et al. (2003) para espécies de *Brevipalpus*, a identificação baseia-se no número de setas no dorso, número de *solenidia* presentes nos tarsos do segundo par de pernas e no padrão de reticulação da parte dorsal do idiossoma.

Os representantes de maior destaque do gênero *Brevipalpus* são *Brevipalpus californicus* (Banks), *Brevipalpus obovatus* Donnadieu e *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (CHILDERS; RODRIGUES; WELBOURN, 2003a; GONZÁLES, 1975; WELBOURN et al., 2003), os quais são cosmopolitas e polífagos. O caráter morfológico utilizado para a separação destes é o padrão de reticulação do propodossoma e opistossoma, o qual pode variar de acordo com a idade e o local de alimentação dos ácaros (WELBOURN et al., 2003).

Atualmente, são relacionadas muitas plantas hospedeiras destas três espécies. De acordo com dados publicados por CHILDERS; RODRIGUES; WELBOURN (2003a) foram registrados 928 espécies de plantas hospedeiras de *B. californicus*, *B. obovatus* e *B. phoenicis*, sendo 316 da primeira espécie, 451 da segunda e 486 da terceira, números que ressaltam a importância de *B. phoenicis* em relação às demais. A variedade de hospedeiros de *B. phoenicis* é muito grande, podendo ser monocotiledôneas ou dicotiledôneas que abrangem espécies de interesse agrônomo, medicinal, culinário, ornamental, espécies arbóreas e também plantas daninhas.

No Brasil, o principal hospedeiro de *B. phoenicis* são as plantas de citros (*Citrus* spp.), sendo que este ácaro apresenta status de praga-chave nesta cultura (GALLO et al., 2002). Além de *B. phoenicis*, *B. obovatus* e *B. californicus*, também são pragas de citros em outros países outras espécies do gênero *Brevipalpus*, como *Brevipalpus chilensis* Baker, *Brevipalpus karachiensis* Chaudhri Akbar & Rasool, *Brevipalpus lewisi* (McGregor), *Brevipalpus mcgregori* Baker, *Brevipalpus rugulosus* Chaudhri, Akbar & Rasool e *Brevipalpus tinsukiaensis* Sadana & Gupta (BAKER; SUIGONG, 1998 citados por CHILDERS et al., 2001a).

Além dos citros, outras espécies agrônomicas são hospedeiras de *B. phoenicis* no Brasil como, por exemplo, café (*Coffea arabica*) (CHAGAS; KITAJIMA; RODRIGUES, 2003) e maracujá (KITAJIMA et al., 1997). Na Ásia, sua importância como praga está relacionada ao cultivo de chá (OOMEN, 1982) e em diversas áreas geográficas do globo sua ocorrência é, principalmente, verificada em espécies de plantas ornamentais (CHILDERS; RODRIGUES;

WELBOURN, 2003a). A habilidade que estes organismos possuem de se adaptar a diferentes hospedeiros é devido à grande variabilidade genética das populações, o que foi comprovado após a constatação de alto grau de polimorfismo em fragmentos de DNA amplificado por técnicas de PCR (RODRIGUES; MOON; MACHADO, 1996).

Segundo estudos conduzidos por Groot et al. (2005) a adaptabilidade de *B. phoenicis* é possível pois esta é uma espécie que consiste em uma “coleção de clones especialistas”, segundo postulados de FNV (Frozen Niche Variation Model) proposto por Vrijenhoek em 1979. Isto significa que cada “clone especialista” ocupa um determinado nicho, em que a troca entre hospedeiros pode não ocorrer devido ao alto custo adaptivo. Estes aspectos foram comprovados quando populações provenientes de acerola, citros e *Hibiscus* sp. foram trocadas entre si e constatou-se alterações em sua sobrevivência e taxa reprodutiva (GROOT et al., 2005).

2.1.2 Bioecologia de *Brevipalpus phoenicis*

O ciclo biológico completo de *B. phoenicis* é composto por quatro estágios ativos (larva, protoninfa, deutoninfa e adulto) e quatro imóveis (ovo, protocrisálida, deutocrisálida e teliocrisálida) (CHILDERS et al., 2001a). Estes últimos, apesar de imóveis e quiescentes são fisiologicamente ativos e aparecem entre os estágios ativos (CHILDERS; FRENCH; RODRIGUES, 2003b).

Após o período de pré-oviposição os ovos são depositados em locais abrigados como fendas, lesões, escamas de cochonilhas, exúvias de ácaros além de grânulos de poeira (CHIAVEGATO, 1986). Estudos comprovaram que no caso de citros, as fêmeas de *B. phoenicis* ovipositam preferencialmente em ramos, frutos ou mesmo folhas com sintomas de verrugose, uma doença fúngica (*Elsinoe fawcetti*) que causa nas plantas a formação de pequenas lesões com consistência firme e semelhante à cracas (CHIAVEGATO; KHARFAN, 1993; CHILDERS et al., 2001a; MATINELLI; OLIVEIRA; PERECIN, 1976). Assim, nestes locais os ácaros tendem a se agregar para a alimentação e postura (CHILDERS; FRENCH; RODRIGUES, 2003b).

Os ovos do ácaro da leprose são elípticos e de coloração alaranjada-brilhante, medindo cerca de 84µm de comprimento e 60µm de diâmetro (RODRIGUES; MACHADO, 1999). Para facilitar sua adesão ao substrato estes possuem uma substância viscosa que dificulta sua remoção e protege também contra danos físicos (JEPPSON; KEIFER; BAKER, 1975).

Após a fase de ovo eclode a larva que apresenta coloração vermelho-brilhante e é ativa. Em sequência, iniciam-se os estágios ninfais que dão origem aos adultos. Tanto machos como fêmeas são observados em populações naturais, mas em geral os machos são relativamente raros (CHILDERS; FRENCH; RODRIGUES, 2003b; FLECHTMAN, 1985; HELLE; BOLLAND; HEITMANS, 1980). Segundo Pijnacker et al. (1980) citados por Groot et al. (2005) além de raros os machos encontrados não são funcionais, ou seja, incapazes de produzir esperma.

Este ácaro apresenta reprodução do tipo partenogênese telítoca e automítica, em que fêmeas dão origem a fêmeas haplóides com dois cromossomos ($n=2$) (PIJNACKER et al., 1980). A haploidia em fêmeas de *B. phoenicis* é causada pela presença de bactérias endossimbióticas que se desenvolvem no interior de seu corpo do ácaro causando um tipo de “feminilização” de indivíduos (WEEKS; MAREC; BREEUWER, 2001). Este processo biológico ainda não foi totalmente esclarecido, mas sabe-se que na ausência destes microrganismos as fêmeas partenogenéticas podem gerar machos haplóides. De acordo com Groot et al. (2005) a produção esporádica de machos deve-se à ineficiência na transmissão da bactéria entre indivíduos.

O ciclo biológico de *B. phoenicis* é influenciado por fatores como temperatura, umidade relativa e planta hospedeira (CHILDERS ET AL., 2003b; CHILDERS et al., 2001a). Quando mantidos em folhas de chá a 26°C o tempo de duração da fase de ovo foi de $9,5 \pm 1,7$ dias, $19,2 \pm 1,7$ dias para os estágios imaturos e $41,7 \pm 5,9$ dias para o ciclo completo (CHILDERS; FRENCH; RODRIGUES, 2003b). No caso de citros, o ciclo do ácaro em frutos de laranja “Pêra Rio” variou de 14,4 a 43,5 dias em temperaturas de 30°C e 20°C respectivamente, e umidade relativa de 60%. Quando comparados aos frutos, as folhas de citros foram consideradas menos adequadas como substrato para os ácaros pois foi observado um menor número de descendentes por fêmea, maior tempo de incubação dos ovos obtidos e também maior tempo de desenvolvimento do ciclo completo (17,6 dias a 30°C e 60% de umidade relativa) (CHIAVEGATO, 1986).

Apesar das diferenças entre estes substratos, citros é considerado um importante hospedeiro de *B. phoenicis*. Segundo observações realizadas por Trindade e Chiavegato (1994) *B. phoenicis* apresentou maior taxa reprodutiva em relação a *B. obovatus* e *B. californicus* quando mantido em frutos de citros, fato que não foi observado quando estas espécies foram criadas em azálea (*Rhododendron* sp.).

Em pomares cítricos do Estado de São Paulo, *B. phoenicis* ocorre praticamente o ano todo, com picos populacionais em épocas de menor precipitação pluviométrica entre os meses de maio a agosto (OLIVEIRA, 1986; RODRIGUES et al., 2003). Porém, a dinâmica populacional do ácaro em folhas, frutos e ramos é diferenciada em função de variáveis ambientais. Segundo Rodrigues et al. (2003) o nível populacional deste ácaro aumenta conforme os frutos se desenvolvem, acompanhando seu crescimento após 150 a 170 dias do início da florada.

2.1.3 Características de *Brevipalpus phoenicis* como vetor da leprose-dos-citros

2.1.3.1 Danos diretos

Os danos causados por *B. phoenicis* podem ser diretos, ou seja, decorrentes da alimentação dos indivíduos em diferentes partes da planta, e indiretos, devido à transmissão de vírus fitopatogênicos. Tanto em citros como em outras plantas os danos diretos causados pelo ácaro são observados, porém mais raramente. Devido à complexidade na observação e identificação das partículas virais, as injúrias causadas pela sua alimentação nos tecidos foliares são comumente confundidas com os sintomas da doença, uma vez que, os danos diretos não são significativos para alguns hospedeiros.

Em citros, a alimentação dos adultos ao longo da nervura central das folhas promove um amarelecimento dos tecidos da face oposta ao local onde os ácaros estão agregados. Esta alteração é causada pela injeção direta de substâncias tóxicas presentes na saliva dos ácaros em razão da alimentação, causando posterior necrose e conseqüente queda de folhas, principalmente em altas infestações (CHILDERS; FRENCH; RODRIGUES, 2003b).

Um estudo conduzido por Knorr e Malagutti em 1960 (citado por CHILDERS; FRENCH; RODRIGUES, 2003b) demonstrou que a ocorrência simultânea de verrugose (*E. fawcetti*) e de *B. phoenicis* em “seedlings” de citros causou intensa desfolha e morte das plantas após o aparecimento de manchas amareladas tanto nos locais de alimentação dos ácaros como também onde havia sintomas da infecção do fungo. Esta interação não foi esclarecida na ocasião, mas segundo o autor já foi identificada para outros ácaros fitófagos. O que ficou comprovado é que os danos mais severos foram observados quando os dois organismos ocorreram simultaneamente.

Além de folhas e “seedlings”, frutos de citros também são suscetíveis ao ataque direto de *B. phoenicis*. Desde 2001 várias regiões citrícolas do estado do Texas (EUA) vêm sendo inspecionadas para a constatação destes danos, especialmente pomares de laranjas e também “grapefruit” (CHILDERS et al., 2003c). As lesões causadas são caracterizadas pela ocorrência inicial de áreas esbranquiçadas com formato arredondado e irregular que aparecem formando depressões sobre a casca. Gradualmente, a parte central destas áreas torna-se necrótica e passa a apresentar coloração marrom com textura semelhante a cortiça. Em nenhum caso foi constatada a presença do vírus causador da leprose-dos-citros ou mesmo qualquer tipo de inclusão viral, o que reforça a idéia de que toxinas estão associadas ao aparecimento destas manchas. A extensão destes danos nos frutos depende do nível de infestação, mas estes ficam inviabilizados para a comercialização “in natura”.

Outras plantas que sofrem com a ocorrência de *B. phoenicis* são orquídeas (Orchidaceae), goiaba (*Psidium guajava* L.) e chá (*Camellia sinensis*). Em orquídea, os danos são semelhantes a um “prateamento” da área atacada que, posteriormente, torna-se bronzeada (CHILDERS; FRENCH; RODRIGUES, 2003b). Em goiaba, os sintomas em frutos recém-coletados de pomares na Venezuela foram classificados de acordo com escalas qualitativas de dano. Neste caso, os frutos apresentaram a formação de lesões de coloração marrom-avermelhada na base próxima à região da sépala, a qual tornou-se quebradiça (GUERERE; GONSÁLEZ, 2000; QUIRÓZ; POLEO; PETIT, 2002). Na cultura de chá em países asiáticos, os danos de *B. phoenicis* podem ser observados em todos os tecidos vegetais atacados (CHILDERS; FRENCH; RODRIGUES, 2003b). Semelhante ao que foi realizado em goiaba, amostras de chá coletadas em campos de produção na Indonésia foram submetidas à avaliação e determinação de níveis de danos em escalas qualitativas (YOUNG et al., 1995). Estes danos variam desde necrose na região do pecíolo foliar como desfolha intensa após a ocorrência da praga.

De acordo com Childers; French e Rodrigues (2003b) já foram descritos danos semelhantes a estes em várias outras espécies de plantas, mas em algumas culturas como café e maracujá estas injúrias não apresentam importância econômica significativa (Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies de plantas hospedeiras e descrição dos danos ocasionados por *Brevipalpus phoenicis* (adaptada de CHILDERS; FRENCH; RODRIGUES, 2003b)

Espécie vegetal	Danos	Local
<i>Aphelandra</i> sp.	Escurecimento e má formação das folhas	Florida (EUA)
<i>Carica papaya</i>	Formação de protuberâncias e bronzeamento	Hawai (EUA)
<i>Clerodendron siphonanthus</i>	Redução e enrolamento foliar	Índia
<i>Psisium guajava</i>	Manchas de coloração marrom na superfície do fruto	Venezuela
<i>Ligustrum japonicum</i>	Formação de galhas	São Paulo (BR)
<i>Cocos nucifera</i>	Formação de áreas com textura de cortiça ao redor do fruto	Índia
<i>Passiflora edulis</i>	Desfolha e morte	Hawaii (EUA)
<i>Portulaca oleraceae</i>	Desfolha e escurecimento de ramos	São Paulo (BR)
<i>Citrus aurantifolia</i>	Formação de manchas com halo e associação com fungo <i>E. fawcetti</i>	Venezuela
<i>Citrus</i> sp.	Queda de folhas que apresentam formação de placas com aspecto resinoso e com clorose na face oposta	Florida (EUA)
<i>Citrus sinensis</i>	Formação de galhas	São Paulo (BR)
<i>Camellia vinifera</i>	Manchas necróticas nas folhas	Ásia e África

2.1.3.2 Danos indiretos

O principal dano ocasionado por *B. phoenicis* é indireto e está relacionado com a sua capacidade de transmissão de um vírus de ação localizada pertencente à família Rhabdoviridae. Pelo menos em quatro espécies de plantas já foram descritos vírus transmitidos por *B. phoenicis* como leprose dos citros, mancha anular do cafeeiro, pinta verde do maracujazeiro e viroses de plantas ornamentais (KITAJIMA et al., 1997; KITAJIMA; REZENDE; RODRIGUES, 2003a; KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003b; REIS; CHAGAS, 2001; RODRIGUES et al.,

1994). Em todos os casos, a determinação e confirmação da etiologia da doença somente podem ser realizadas pela observação das inclusões virais nos tecidos atacados em microscópio eletrônico de transmissão.

Em citros este patógeno compromete seriamente a produção da planta e os sintomas de sua presença são caracterizados por manchas cloróticas nas folhas, ramos e frutos, queda acentuada e diminuição do peso dos frutos e até a morte quando o ataque do ácaro é severo. Assim, tanto a qualidade como a quantidade de frutos são prejudicadas e a planta pode tornar-se improdutiva. A importância e descrição da doença em citros têm sido amplamente discutidas pela literatura nacional e mundial (CHILDERS et al, 2001a; CHILDERS; FRENCH; RODRIGUES, 2003b; CHILDERS et al., 2003c; GUIRADO; SILVÉRIO, 1992; OLIVEIRA, 1994; RODRIGUES et al., 1994; RODRIGUES, 2000; SALVA; MASSARI, 1995).

As manchas cloróticas nas folhas de citros acompanham o sentido das nervuras apresentando um formato alongado e elíptico as quais tornam-se necrosadas com o passar do tempo (CHIAVEGATO; MISCHAN; SILVA, 1982; CHILDERS, 1994). Estas lesões são localizadas, de coloração marrom central com a presença de um halo amarelado (clorótico). Com relação ao tamanho, as manchas podem variar entre 10 a 30 mm mas chegam a ser maiores quando ocorre a união entre 2 ou mais. Nos frutos verdes as lesões são inicialmente amareladas e deprimidas o que reduz muito o valor comercial dos mesmos. Em ramos há formação de protuberâncias de coloração cinza ou marrom e textura de cortiça. Em casos mais extremos ocorrem intensa desfolha e morte da planta (RODRIGUES et al., 2003).

Outro aspecto relevante, é que a intensidade dos sintomas tanto em folhas como em brotos verdes e frutos pode mudar em função da variedade da planta hospedeira e estágio de desenvolvimento da doença. As variedades de “laranja doce” (*Citrus sinensis*) são consideradas as mais susceptíveis ao passo que em mandarinas e híbridos (“Murcote”) verifica-se baixa incidência de sintomas, o que indica a resistência ou tolerância destas plantas ao agente causal (OLIVEIRA, 1986; RODRIGUES et al., 2003).

Em café, os sintomas são semelhantes aos de citros com algumas diferenciações. Os danos principais aparecem nas folhas e nos frutos com maior frequência do que nos ramos, caracterizando-se por manchas cloróticas, de contorno quase sempre bem delimitado, por vezes com a presença de um ponto necrótico central (CHAGAS; KITAJIMA; RODRIGUES, 2003). Tanto nas folhas como nos frutos, as manchas apresentam normalmente a forma de anel, podendo

coalescer e abranger toda a área do limbo (REIS et al., 2000). Segundo Reis e Chagas (2001) a menor atividade da polifenoloxidase e maior porcentagem de compostos fenólicos e de açúcares totais presentes em frutos de plantas atacadas pela “mancha anular”, caracterizam uma redução significativa na qualidade da bebida.

Os sintomas verificados em maracujá são observados na planta toda e especialmente nos frutos maduros onde aparecem como pontos verdes que apresentam cerca de 2-5mm de diâmetro. O nome da doença, “passion fruit green spot vírus” (PFGSV), é originário da observação das manchas verdes que podem apresentar em seu interior uma área deprimida e necrótica. No geral, estes danos não prejudicam a qualidade dos frutos mas pode haver perda comercial quando são revendidos “in natura”. O principal prejuízo causado pelo vírus em maracujazeiro ocorre quando há ocorrência intensa do ácaro no tronco principal. A formação de várias lesões ao longo do tronco pode causar um “estrangulamento” do mesmo o qual impede a passagem dos produtos da fotossíntese para a parte inferior da planta causando sua morte (KITAJIMA; REZENDE; RODRIGUES, 2003a).

Em plantas ornamentais foram identificadas vários tipos de vírus transmitidos por *B. phoenicis*. Dentre estas são relacionadas: ligustro (*Ligustrum* spp.), hibisco (*Hibiscus* spp.), chapéu-turco (*Malvaviscus arboreus*), jasmim (*Cestrum nocturnum*), sálvia (*Salvia leucantha*), violeta (*Viola odorata*) entre outras ornamentais como *Hedera canariensis*, *Schefflera actinophylla*, *Clerodendron speciosum*, *Solanum violaefolium*, *Brunfelsia uniflora*, *Pittosporum* sp. e *Annona muricata*. Em todos estes casos o aparecimento de manchas circulares e cloróticas é a principal evidência da doença, o que certamente causa depreciação no valor estético das plantas (KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003b).

2.1.3.3 A leprose dos citros (CiLV)

A leprose dos citros (Citrus leprosis virus, CiLV) é uma doença cuja ocorrência tem sido reportada nas Américas, especialmente em países da América do Sul como Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Venezuela, enquanto que na América Central há relatos no Panamá, Costa Rica e Honduras (CHILDERS et al., 2001a; RODRIGUES et al., 2003). Na América do Norte já foi observada em pomares da Flórida, Texas e Califórnia (CHILDERS et al., 2003c). A

sua presença já foi constatada na Ásia e África, sendo o continente europeu o único ainda livre do vírus.

As primeiras publicações que relataram o aparecimento da doença em pomares dos EUA e do Brasil datam no início do século XX, quando sua sintomatologia e os danos em citros foram observados e descritos. Na realidade, de acordo com Fawcett (1907) citado por Childers et al. (2003c) os citricultores do condado de Pinellas na Flórida já haviam notificado a ocorrência da doença desde meados do século IX, cerca de 40 antes da publicação oficial.

Entre 1905 e 1925 os primeiros estudos foram conduzidos na tentativa de se identificar o agente causal da doença, quando não havia até então um vetor correlacionado com seu aparecimento. De acordo com revisão realizada por Rodrigues et al. (2003) a primeira hipótese é que a doença, na época conhecida como “Florida scaly back disease”, era causada por fungos fitopatogênicos como *Hysterogafium* e *Cladosporium herbarium*. Segundo os autores, o primeiro relato de sua ocorrência relacionada à de ácaros do gênero *Brevipalpus* foi realizado em 1950, também em pomares da Flórida. No Brasil, a relação entre a leprose dos citros (varíola) a partir da década de 1930 e o ácaro foi realizada 13 anos mais tarde, quando Mesumeci e Rossetti (1963) comprovaram que *B. phoenicis* foi capaz de induzir os sintomas da leprose.

Devido à estas observações, duas hipóteses surgiram para explicar a ocorrência dos sintomas da doença: a primeira era de que substâncias tóxicas presentes na saliva dos ácaros e introduzidas nos tecidos foliares no momento da alimentação dos mesmos causavam os danos. A segunda e mais evidente hipótese sugeria que as lesões eram provocadas por um vírus de ação localizada, transmitido também por ocasião da alimentação destes artrópodes (CHILDERS et al., 2001a; RODRIGUES et al., 1997).

De acordo com Rodrigues et al. (2003) a idéia de que a doença apresenta como agente etiológico um vírus foi reforçada por algumas evidências que passaram a ser constatadas com o avanço dos estudos nesta área. Primeiramente, ácaros provenientes de plantas com sintomas, e apenas estes, eram capazes de transmitir a doença para plantas saudáveis. Em segundo, a transmissão mecânica por enxertia foi realizada com dificuldade inclusive no Brasil (CHAGAS; ROSSETTI, 1980; CHIAVEGATO; MISCHAN; SILVA, 1982; COLARICCIO et al., 1995; RODRIGUES, 2000). Também com relação à transmissão mecânica, foi comprovada a sua ocorrência entre plantas de citros e desta para outras espécies. Finalmente, a principal evidência é de que partículas envelopadas e não-envelopadas, semelhantes à rabdovírus foram encontradas em

tecidos naturalmente infectados, o que foi possível com a observação em microscopia eletrônica de varredura (KITAJIMA et al., 1972). Nesta ocasião, constatou-se que as partículas eram do tipo “bastonetes”, semelhantes à vírus, de 40 a 50 nm x 100-110 nm no núcleo e no citoplasma das células.

Na última década, um grande número de informações sobre características do vírus e sua relação com o vetor e hospedeiros surgiram, o que vêm facilitando o entendimento da doença em campo para ações de manejo. De acordo com Childers; French e Rodrigues (2003b) a aquisição do vírus pelos ácaros ocorre por meio de sua alimentação em substratos contaminados, sendo que todos os estágios ativos de *B. phoenicis* são capazes de realizar a transmissão. Apesar desta informação, há evidências de que as larvas são mais eficientes se comparadas com adultos e ninfas (CHILDERS et al., 2001a; RODRIGUES, 2000).

Rodrigues et al. (1997) observaram um grande número de partículas de CiLV no interior de adultos virulíferos de *B. phoenicis*, constatando também a ausência de transmissão transovariana. Embora este fato tenha se confirmado para *B. phoenicis*, para as espécies *B. obovatus* e *B. californicus* já foi sugerida a hipótese da ocorrência de transmissão entre progênes, tendo sido comprovada também a transmissão transestadial (BOARETTO; CHIAVEGATO; SILVA, 1993; RODRIGUES et al., 1997). Assim, uma vez que o vírus é adquirido pelas larvas, estas são capazes de transmiti-lo durante todos os estádios de desenvolvimento até a fase adulta. Esta característica aumenta a probabilidade de incidência da doença em campo, pois o ciclo de vida da espécie é longo. Este aspecto reforça o caráter circulativo do vírus que não somente se acumula, mas também pode se multiplicar no interior do corpo do ácaro antes de ser efetivamente transmitido (RODRIGUES et al., 2003).

A citopatologia de CiLV indica que existem dois tipos de vírus, conhecidos como tipo “citoplasmático” (CiLV-C) e tipo “nuclear” (CiLV-N), os quais podem ser observados geralmente em células do parênquima vegetal nos locais onde aparecem os sintomas (CHILDERS et al., 2001a; KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003b; RODRIGUES et al., 2003). Embora estes dois tipos sejam distintos do ponto de vista citopatológico e morfológico e possam pertencer a gêneros ou espécies diferentes, não há diferenças com relação à sintomatologia, o que complica ainda mais sua identificação (CHILDERS et al., 2001a; KITAJIMA et al., 1997; RODRIGUES et al., 2003).

O tipo mais comum de ser observado é o citoplasmático (CiLV-C), sendo geralmente encontrado no lúmen do retículo endoplasmático (COLARICCIO et al., 1995; KITAJIMA et al., 1997). Normalmente, além das partículas bem características de vírus é possível verificar no citoplasma outras denominadas “viroplasmas”, as quais são elípticas com 3 a 5µm de diâmetro. A ocorrência de CiLV-C causa uma desorganização nos cloroplastos e hipertrofia do sistema lamelar destas estruturas (KITAJIMA et al., 1972; RODRIGUES et al., 2003). O tipo “nuclear” do vírus apresenta proporções menores em relação ao citoplasmático (40 a 50nm x 100 a 110nm) e está presente tanto no citoplasma como no núcleo da célula infectada. Estas mesmas características vem sendo observadas para outros vírus transmitidos por *Brevipalpus* spp., como por exemplo o “Orchid Fleck Vírus” (OFV) em orquídeas (KONDO; MAEDA; TAMADA, 2003).

Uma característica importante desta doença é que o vírus da leprose age na planta de maneira localizada, circulando muito pouco entre os tecidos foliares. Sendo assim, o aparecimento das lesões está condicionado à alimentação dos ácaros virulíferos, o que caracteriza o vetor como o principal agente de disseminação (RODRIGUES et al., 2003). A velocidade com que a doença evolui no campo é proporcional ao potencial de inóculo, ou seja, presença de lesões em relação aos tecidos saudáveis. A transmissão de CiLV por borbulhas infectadas é raramente verificada, porém pode ocorrer em locais que não sejam adotadas as medidas fitossanitárias adequadas.

2.1.3.4 Prejuízos econômicos e medidas de controle da leprose dos citros

No Estado de São Paulo a leprose dos citros tem sido constatada com maior frequência nas regiões Norte e Noroeste, pois são áreas onde o clima é mais quente e os períodos de estiagem são mais prolongados. Mais recentemente foi constatada sua ocorrência na região Sul (BASSANEZI, 2004). No ano de 1995, de acordo com dados publicados pelo Fundecitrus (Fundo Paulista de Defesa da Citricultura), a incidência da leprose dos citros foi verificada em mais de 60% dos pomares vistoriados do Estado (ROSSETTI et al., 2006). Estimativas recentes indicam que mais de 53% das plantas de citros do Estado apresentam sintomas da doença, sendo 22% com sintomas em ramos e frutos (BASSANEZI, 2004).

Os prejuízos econômicos devido à ocorrência de leprose nos pomares são muito significativos para o setor citrícola, pois as perdas geradas são quantitativas e qualitativas. Em geral, estas perdas ocorrem de maneira cíclica, estando associadas ao ano em que os citricultores não tiveram condições financeiras de adotar as práticas de manejo do vetor. No Estado de São Paulo, a presença do inóculo em pomares e a ausência de manejo para controle do ácaro acarretam sérios problemas após 2 a 3 anos, tempo médio que a doença leva para se disseminar na área (RODRIGUES et al., 2003).

Os danos causados pelo CiLV resultam na redução da produção dos anos seguintes, perdas de árvores e também incremento dos custos de controle. De acordo com Bassanezi (2004) a queda e a depreciação dos frutos lesionados variam de 0 a 2% quando há um controle eficiente da doença, e de 40 a 100% quando as medidas de controle não são adotadas. Obviamente, estes índices são dependentes de fatores como níveis de infestação do vetor, incidência da doença, idade e variedade das plantas e também das condições climáticas.

Estes dados revelam que a adoção das medidas de manejo da leprose é imprescindível em qualquer sistema de produção de citros. Porém, a necessidade de controle da doença para mantê-la em níveis aceitáveis acarreta em custos na produção, seja para o controle de *B. phoenicis* ou devido às práticas de poda, remoção e/ou substituição das plantas doentes. Assim, a redução destes custos depende diretamente de constantes melhorias no sistema de manejo e das tecnologias empregadas. Estudos que permitam melhor entendimento da epidemiologia da doença, comportamento do vetor, métodos de amostragem, estimativas de dano e nível de controle, tecnologia de aplicação de acaricidas, manejo da resistência de ácaros e métodos alternativos ao controle químico são essenciais para o sucesso do programa adotado (BASSANEZI, 2004).

As medidas de manejo adotadas pelos citricultores são diversificadas, sendo bastante discutidas pela literatura mundial e nacional (BASSANEZI, 2004; CHILDERS et al. 2001b; CHILDERS et al., 2003c; OLIVEIRA, 2004; RODRIGUES et al., 2003; RODRIGUES et al., 2001). Dentre as medidas de controle mencionadas pode-se citar: controle do vetor, podas e remoção das plantas doentes, instalação de cercas vivas, controle de plantas daninhas hospedeiras do ácaro, utilização de mudas sadias, plantio de cultivares resistentes à doença, além do controle sobre a circulação de pessoas e materiais nos pomares.

Embora o manejo integrado abranja a atuação combinada e racional de todas as táticas de controle com base no monitoramento das infestações do ácaro, a utilização indiscriminada de acaricidas ainda é a principal tática empregada para o controle da leprose, sendo considerada como a principal solução viável para esta problemática. No entanto, o uso constante dos acaricidas sem interrupções com outras medidas de controle não tem solucionado o problema da ocorrência desta praga.

2.1.3.5 Perspectivas o manejo do ácaro da leprose dos citros

O controle químico do ácaro da leprose é uma prática realizada na grande maioria dos pomares do Estado de São Paulo e por isto os investimentos na compra e aplicação de acaricidas representam os maiores custos na produção citrícola.

De acordo com Neves; Rodrigues e Gastaldi (2004) a crescente participação dos defensivos agrícolas na citricultura vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, especialmente devido à intensa utilização de acaricidas. No ano de 2003 foram gastos cerca de 70 milhões de dólares com a compra de acaricidas no Brasil, o que representa 53% do total dispendido pela citricultura para a obtenção de defensivos agrícolas de maneira geral. Estes números revelam que em média em uma propriedade de 25ha (400 plantas/ha) 30,48% dos custos operacionais totais devem-se à compra de agrotóxicos, sendo a maior parte acaricidas, o que caracteriza a cultura dos citros como a principal consumidora deste tipo de insumo.

O agravante a esta situação deve-se ao elevado número de aplicações dos produtos que são realizadas ao longo do ano. No geral, 2 a 3 aplicações de acaricidas são efetuadas após o final do período chuvoso e durante todo período de estiagem, quando a população de *B. phoenicis* começa, efetivamente, a aumentar (BASSANEZI, 2004). A frequência de realização destas práticas é resultado de problemas relacionados a métodos de amostragem e níveis de ação empíricos que tornam difícil a tomada de decisão. Segundo Gravena (2004) o nível de ação para controle do ácaro da leprose é de 10% de frutos ou ramos com ácaros presentes. No entanto, segundo Bassanezi (2004) as aplicações podem ser realizadas a partir da constatação dos primeiros ácaros ou em níveis de infestação de 1 ácaro em 15% de frutos/ramos amostrados.

Problemas relacionados à amostragem dos ácaros não são os únicos responsáveis pela aplicação intensiva de acaricidas nos pomares de citros. Outra justificativa dos citricultores para a

prática é a ocorrência simultânea do ácaro-da-falsa-ferrugem-dos-citros (*Phyllocoptruta oleivora*), também considerado praga-chave da cultura (GALLO et al., 2002). Apesar das duas espécies ocorrerem praticamente o ano todo, os períodos críticos de infestação de cada uma delas não é coincidente, sendo que enquanto *B. phoenicis* ocorre no inverno, *P. oleivora* é problema na época do verão. Assim, a frequência de aplicação de produtos somente para o controle destas duas pragas é realizada duas a quatro vezes ao ano (OMOTO, 1998).

A relação de defensivos agrícolas recomendados para o controle de ácaros em citros é bastante variada e abrange os mais diferentes grupos químicos, modos de ação e classes toxicológicas. De acordo com Rodrigues et al. (2003) e Omoto e Alves (2004) pode-se citar: piretróides/ésteres nor-pirétricos (acrinatrin, bifentrin, fenpropatrin), organoestânicos (cyhexatin, óxido de fenbutatin, azozyclotin), inorgânico (enxofre), dinitrofenóis (binapacril e dinocape), pyrrole (clorfenapir), pyrazóis (fenpiroximate, piridaben, fenazaquin), organoclorado (dicofol), fenoxiciclohexil (propargite), organofosforados/carbamatos (dimetoato, triazofós, etion, aldicarb), ciclodieno (endosulfan), lactona (abamectin), formamidina (amitraz), carboxamida (hexythiazox), benoiluréia (flufenoxuron) e cetoenol (spirodiclofen).

Apesar desta gama de opções e da aplicação intensiva nos últimos anos, falhas no controle do ácaro da leprose vêm sendo observadas devido ao aumento de problemas de resistência (OMOTO, 1998; OMOTO; ALVES, 2004). No caso de *B. phoenicis* estes problemas são agravados principalmente devido às características bioecológicas da praga, táticas de controle mal empregadas e genética da resistência, pois estes fatores são responsáveis pela rapidez com que ocorre este processo mediante grande pressão de seleção (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). Como exemplo desta situação, para produtos como dicofol, organoestânicos, hexythiazox e propargite foram encontradas populações resistentes de *B. phoenicis* (CAMPOS; OMOTO, 2002; FRANCO, 2002; KONNO; FRANCO; OMOTO, 2001; OMOTO; ALVES; RIBEIRO, 2000).

O desenvolvimento da resistência de *B. phoenicis* aos acaricidas certamente é um problema sério e que acarreta prejuízos diretos aos produtores devido às falhas no controle (OMOTO; ALVES, 2004). Estas falhas comprometem todo o sistema de manejo adotado e como consequência observa-se em campo aumento na incidência da doença.

Na tentativa de impedir maiores prejuízos vem ocorrendo o uso excessivo dos agrotóxicos, tanto em termos de aumento das doses recomendadas quanto a diminuição do intervalo entre as aplicações. As consequências deste processo são variadas e promovem efeitos indesejáveis que

afetam toda a cadeia produtiva da cultura. Além do aumento dos custos da produção, que é um fator que atinge diretamente o empresário agrícola, os danos ambientais causados ao agroecossistema são desastrosos e muitas vezes imensuráveis.

O comprometimento da população de inimigos naturais causa desequilíbrios que interferem em toda a dinâmica da cultura, reduzindo sua diversidade e seu efeito benéfico sobre as pragas de uma maneira geral. Segundo Alves (2004) a busca pela sustentabilidade do sistema com a ação de agentes de controle biológico deve ser favorecida, o que pode trazer como resultado final um controle satisfatório das pragas por períodos mais longos. Os principais aspectos que devem ser considerados para obter estes benefícios envolvem a adoção de práticas agrícolas e de agrotóxicos seletivos aos inimigos naturais bem como a potencialização e o incremento destes agentes de controle no pomar. Neste contexto, a utilização ou simplesmente a preservação dos entomopatógenos, predadores e parasitóides é uma prática importante e imprescindível para manter o equilíbrio e a sustentabilidade do sistema citrícola.

2.1.4 O controle microbiano de ácaros em citros com fungos entomopatogênicos

A ocorrência natural de agentes de controle biológico representados por parasitóides, predadores e entomopatógenos é de grande importância na supressão de pragas em culturas perenes, podendo ser introduzidos em áreas onde não são encontrados, incrementados ou mesmo protegidos (ALVES, 2004; COSTA JÚNIOR; LOPES, 2000).

O controle microbiano pela utilização de fungos entomopatogênicos é uma estratégia que pode ser empregada no controle de ácaros fitófagos, uma vez que estes patógenos juntamente com os vírus, são os principais grupos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças em suas populações (ALVES, 1998; VAN DER GEEST et al., 2000).

O número e a grande diversidade de espécies descritas que naturalmente atacam ácaros fitófagos são dois fatores que contribuem para aumentar o interesse por estes microrganismos a fim de explorar seu potencial de utilização. Para se ter uma idéia da diversidade, segundo revisões realizadas por Chandler et al. (2000) e Van der Geest et al. (2000) foram relacionadas mais de 58 espécies de fungos atacando 73 espécies de ácaros, sendo que para os deuteromicetos já foram descritos 10 gêneros associados a 29 espécies de acarinos. No caso de ácaros que

ocorrem em citros, dentre as espécies de fungos, destacam-se, principalmente, as da ordem Entomophthorales e *Hirsutella thompsonii* Fisher (Deuteromycetes) que são as mais estudadas.

Os Deuteromycetes, também conhecidos como “fungos imperfeitos” apresentam grande potencial para serem utilizados como micoacaricidas devido à possibilidade de produção em larga escala de algumas espécies. Para os ácaros que ocorrem citros espécies como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Lecanicillium lecanii* Viégas (= *Verticillium*) são relatadas como patogênicas para o ácaro-da-falsa-ferrugem-dos-citros (*P. oleivora*) e o ácaro-marrom-dos-citros (*Eutetranychus orientalis*), respectivamente (ALVES, et al., 2005; SEWIFY; MABROUK, 1991). Porém, o gênero de maior destaque entre todos é *Hirsutella*, especialmente *H. thompsonii* devido a sua importância como patógeno de eriofídeos (ALVES, 1998; CHANDLER et al., 2000; LIPA, 1971; MCCOY, 1996; POINAR JÚNIOR; POINAR, 1998; VAN DER GEEST et al., 2000). Neste trabalho serão abordados aspectos gerais de algumas espécies de Entomophthorales e de *H. thompsonii* devido à maior relevância em citros.

2.1.4.1 Entomophthorales

De acordo com Lipa (1971) os representantes da ordem Entomophthorales são os principais patógenos de ácaros, especialmente tetraniquídeos. Estes microrganismos são parasitas obrigatórios, o que significa que ocorrem infectando apenas indivíduos vivos e que a reprodução e morte do hospedeiro ocorrem após o esgotamento de todos os nutrientes (ALVES, 1998; HAJEK; LEGER, 1994). De acordo com Delalibera et al.¹ (em fase de elaboração), uma das suas principais características é sua capacidade de projetar os conídios a partir dos conidióforos e assim realizar a disseminação atingindo grandes distâncias do corpo do hospedeiro. As principais espécies citadas são pertencentes aos gêneros *Neozygites* e *Entomophthora*.

Em citros, a primeira observação de Entomophthorales infectando ácaros foi realizada em *Panonychus citri*, o ácaro-purpúreo-dos-citros, em pomares da Flórida (EUA). Constatou-se que *Neozygites* sp. causou mortalidade variável de 32 a 95% durante o fim do verão e começo do outono. Todos os indivíduos mortos apresentavam sintomas típicos da doença como corpo aparentemente distendido, sem consistência, com coloração avermelhada e aspecto “mumificado” (FISHER, 1951; POINAR JÚNIOR; POINAR, 1998).

¹ DELALIBERA JR, I; ALVES, S.B.; ROSSI-ZALAF; L.S. (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz). Controle microbiano de ácaros fitófagos.

Posteriormente, Weiser e Muma (1966) constataram a importância da espécie *Neozygites floridana* como um inimigo natural do “texas-citros-mite” (*Eotetranychus banksi*), especialmente estágios adultos. De acordo com Selhime e Muma (1966) apesar de *N. floridana* ser capaz de infectar todos os estágios de desenvolvimento de *E. banksi* com exceção dos ovos, as fêmeas adultas mostraram 49,2% de índice de infecção, enquanto que para protoninfas e deutoninfas estes valores foram de 16,5% e 20,2%, respectivamente.

A duração do ciclo de *N. floridana* em *E. banksi* varia de 5 a 6 dias (SELHIME; MUMA, 1966). Após a penetração no hospedeiro, o fungo se desenvolve por todo o corpo causando sua morte e rompendo o tegumento para extrusão e conidiogênese. Nesta etapa, são produzidos inicialmente os conídios primários que serão ejetados a grandes distâncias em condições de umidade relativa adequada. A partir destes, serão formados os conídios secundários que são os propágulos infectivos (VAN DE GEEST et al., 2000).

Em condições naturais, as epizootias de Entomophthorales estão diretamente associadas às condições ambientais, especialmente a períodos de mudanças bruscas de temperatura com aumento da umidade relativa do ar (ALVES, 1998; LIPA, 1971; VAN DER GEEST et al., 2000). De acordo com Muma (1969) epizootias de *N. floridana* em *E. banksi* causaram níveis de mortalidade que variaram entre 36,8% a 86,3% das amostras avaliadas em seis diferentes pomares cítricos, durante um período de quatro anos de observações constantes.

2.1.4.2 *Hirsutella thompsonii*

2.1.4.2.1 Descrição taxonômica e características morfológicas

O fungo *H. thompsonii* é uma espécie que pertence a subdivisão Ascomycotina classe Hyphomycetes, sendo que sua fase sexual pode ser *Cordyceps* ou *Torrubiella* (ALVES, 1998). Sua principal característica taxonômica é a formação de conidióforos de 10 a 15 µm de comprimento com a parte basal grossa e a extremidade afilada, o que confere um aspecto de “barril”. Segundo Humber² (informação verbal), geralmente, cada célula conidiógena é responsável pela formação de um conídio, ocorrendo também a formação de polifálides com 2 ou 3 conídios. Os conídios de *H. thompsonii* são de formato esférico e medem entre 2 a 4 µm de

² HUMBER, R. USDA-ARS – Plant protection research unit, Tower Road, Ithaca, NY (USA)

diâmetro. Além de apresentar textura rugosa e com várias saliências na superfície, os conídios apresentam-se recobertos por uma substância muscilaginosa cuja função é de proteção contra a dessecação além de facilitar o processo de adesão ao corpo do hospedeiro (ALVES, 1998; ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006a).

2.1.4.2.2 Sintomas da doença e ciclo biológico

Quando infectado por *H. thompsonii*, *P. oleivora* apresenta sintomas típicos como lentidão dos movimentos e alteração na coloração do tegumento. Segundo Lipa (1971) os ácaros que são normalmente amarelo-pálidos passam a apresentar uma coloração amarelo-bronzeado. Além destes aspectos morfológicos, os indivíduos doentes apresentam uma tendência a migrar para áreas do fruto com incidência de luz solar direta, diferentemente dos indivíduos sadios que procuram se abrigarem em locais sombreados (SPEARS; YOTHERS, 1924).

Os sintomas da infecção de *H. thompsonii* em *B. phoenicis* foram descritos por Rossi-Zalaf e Alves (2006a). Os ácaros doentes apresentaram alterações na coloração do tegumento e na movimentação, com enrijecimento ventral das pernas. Quando incomodados pelo toque com pincel ou pela incidência direta de luz, os indivíduos doentes exibiam um comportamento de “jogar” o corpo para trás mantendo apenas as pernas posteriores aderidas ao substrato. Todos os indivíduos mortos apresentavam as pernas enrijecidas ventralmente e mudanças na coloração do tegumento, sendo possível observar em microscópio ótico presença de sinais do patógeno na região posterior e no gnatossoma.

O ciclo biológico dos fungos entomopatogênicos inclusive de *H. thompsonii* no hospedeiro pode variar em função de características da espécie (suscetibilidade, comportamento, entre outros), condições ambientais (temperatura e umidade relativa), potencial de inoculo, virulência do isolado, etc (ALVES, 1998). A virulência de uma espécie ou isolado é uma característica biológica alterável e representa a intensidade com que a doença é causada (ALVES; LEUCUONA, 1998). Para *H. thompsonii* já foram observadas diferenças com relação à virulência e características morfológicas de dois isolados mutantes, os quais foram obtidos por meio da alteração genética de um isolado selvagem desta mesma espécie (MCCOY; STAMPER; TUVESON, 1984). Estes isolados mutantes, além de apresentarem alterações no

desenvolvimento e produção de conídios, foram mais virulentos para *P. oleivora* quando comparados ao isolado selvagem.

O processo de doença inicia-se com a adesão dos conídios ao corpo do hospedeiro os quais germinam em contato com o tegumento, iniciando a penetração por aberturas naturais como boca e ânus, dobras intersegmentais, lesões, base das setas, pernas, abertura genital e até mesmo pelos espiráculos. No caso de *H. thompsonii* os conídios que aderem à superfície do tegumento germinam e produzem enzimas como amilases, α -esterases, quitinases e elastases que degradam esta camada e permitem a entrada do patógeno no interior do corpo do hospedeiro (CEHRNIN et al., 1997). Para outras espécies como *Hirsutella necatrix* não há produção de elastases e este é um fator que influencia diretamente na virulência entre as espécies e isolados deste patógeno.

Uma vez dentro do hospedeiro inicia-se o processo de colonização interna e desenvolvimento vegetativo do patógeno. Este se desenvolve na hemocela, primeiramente na região central do corpo e posteriormente migrando para as regiões periféricas e pernas, e inicia a produção de micotoxinas. No caso de *H. thompsonii* a toxina identificada foi denominada Hirsutellina A (LIU et al., 1996). De acordo com estudos realizados por Omoto e McCoy (1998) com o ácaro-da-falsa-ferrugem-dos-citros a aplicação de 100 $\mu\text{g/mL}$ deste metabólito causou índices de mortalidade próximos de 100%, além de efeitos secundários como redução da fecundidade. Em outros insetos e ácaros além dos altos índices de mortalidade provocados pela toxina, já foram também relatados efeitos citotóxicos e indiretos. Rosas-Acevedo et al. (2003) observaram que metabólitos produzidos por *H. thompsonii* reduziram em até 100% a fertilidade de fêmeas de *Tetranychus urticae* seis dias após a inoculação. Testes realizados em insetos como *Galleria mellonella*, *Drosophila melanogaster* e *Bombyx mori* revelaram altos índices de mortalidade e também uma série de efeitos citotóxicos (VEY et al., 1993). Além das toxinas, eventualmente, ocorre a formação de sinema e clamidósporos, estruturas ovais multinucleadas que se tornam alongadas com o tempo. Estes últimos aparecem quando o patógeno encontra-se no interior do corpo do hospedeiro (MCCOY, 1996). Sua função é auxiliar a difusão do patógenos no corpo do ácaro até o momento da extrusão e conidiogênese.

Após a morte do hospedeiro ocorre a extrusão do patógeno também por aberturas naturais de onde cresce grande quantidade de micélio que, em condições de umidade relativa elevada, formam novas células conidiógenas e conídios. A distância em que se desenvolvem as hifas e projetam-se os conidióforos a partir do corpo do hospedeiro depende do tamanho do mesmo

(SOSA-GÓMES; NASCA, 1983). Para o ácaro da seringueira *Calacarus heveae* as hifas e conidióforos formados a partir dos ácaros mortos foram encontrados a uma distância até 15 vezes o comprimento do ácaro (TANZINI et al., 2000). Para *B. phoenicis*, o micélio se estendeu até 0,5mm do corpo do hospedeiro morto, crescendo em praticamente todas as direções sobre o substrato (ROSSI, 2002; ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006a).

O processo de conidiogênese e a produção de novos esporos ocorrem sempre em condições de alta umidade relativa, podendo ser observados até 12 a 14 horas após a morte do hospedeiro com intensa produção de conidióforos a 26°C (GERSON; KENNETH; MUTTATH, 1979). A duração de todo o ciclo em *P. oleivora* é de 96 horas quando a temperatura média é de 25-30°C (MCCOY, 1996). Em *B. phoenicis* o processo completo desde a adesão até a extrusão do fungo, leva cerca de 120 horas em condições abióticas semelhantes (ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006a).

2.1.4.2.3 Produção “in vitro”

H. thompsonii pode ser produzido “in vitro” por meio de diferentes sistemas que utilizam diversos meios de cultura líquidos e sólidos (VAN DER GEEST et al., 2000). Os primeiros testes de produção do patógeno em pequena e média escala foram realizados em meios de cultura sólidos a base de ágar-água.

Tentativas preliminares de produção deste fungo foram conduzidas por McCoy e Kanavel (1969). Após o isolamento de *H. thompsonii* de adultos de *P. oleivora*, o fungo purificado foi inoculado em diferentes meios a base de ágar: batata-dextrose; dieta de milho; solução de “Czapek”; sabouraud dextrose; “V-8 juice”; 1% de bacto-peptona; infusão de cérebro e coração; meio de soil-fungus modificado (MSF) e ágar-água. Em todos estes foi possível a produção de *H. thompsonii*, com diferenças quanto ao tempo de crescimento do fungo em cada meio. O crescimento vegetativo mais rápido foi observado nos meios V-8 juice, seguido de MSF e sabouraud dextrose, enquanto que os maiores índices de esporulação foram obtidos com batata-dextrose, sabouraud dextrose e ágar-água. Os autores concluíram que meio de cultura com alta concentração de nitrogênio, porém com baixa concentração de carbono são prejudiciais ao crescimento de *H. thompsonii*.

Após 1970, novos testes de produção foram realizados e *H. thompsonii* foi produzido com sucesso em meios de cultura semi-sólidos e líquidos em cultura submersa com sistema de aeração

(MCCOY, 1996; MCCOY; HIL; KANAVAL, 1975). Trabalho realizado por McCoy et al. (1972) citados por McCoy (1996), os autores utilizaram um meio denominado “standard” feito a base de dextrose, extrato de levedura, peptona, fosfato de potássio e cloreto de cálcio a pH 6,0 o qual promoveu níveis moderados de produção de conídios. Posteriormente, a produção do fungo foi realizada em meio a base de dextrose, peptona e sais básicos, promovendo rendimento de 30g de biomassa por litro (MCCOY; HIL; KANAVAL, 1975).

Winkelhoff e McCoy (1984) realizaram estudos nutricionais com 14 isolados de *H. thompsonii*, comparando diversos meios nutricionais e as estruturas produzidas. Neste trabalho, inicialmente foram testadas diferentes combinações de fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais (K_2HPO_4 , KCL, $MgSO_4$, $FeSO_4$ e $CaCl_2$) em água destilada e pH 6,0, totalizando 5 diferentes meios para produção do fungo em cultura submersa. Segundo os autores, todos os isolados testados apresentaram bom crescimento em todas as combinações de nutrientes avaliadas. No entanto, o meio de cultura preparado com sucrose, proteína hidrolizada de milho, NaO_3 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl e $FeSO_4$ em pH 6,0 foi o que apresentou melhor crescimento vegetativo, conidiogênese e esporulação do patógeno em cultura submersa. A adição de 0,2 % de Tween 80 ao meio líquido promoveu incremento na esporulação de $2,1 \times 10^5$ conídios/mL para $6,8 \times 10^5$ conídios/mL.

As estruturas de *H. thompsonii* obtidas pela produção em meios artificiais podem variar morfológicamente em função da disponibilidade de nutrientes (VAN DER GEEST et al., 2000). De acordo com Latgé; Cabrera e Prevost (1988) diferentes isolados de *H. thompsonii* produzidos “in vitro” apresentam pleomorfismo pronunciado. Para a variedade *H. thompsonii* var *synnematososa* a parede dos conídios submersos, estruturas obtidas de meio líquido, é diferente de conídios aéreos (WINKELHOFF; MCCOY, 1984). Os conídios produzidos em meio de cultura sólido apresentam parede rugosa, enquanto que em conídios submersos esta rugosidade é menos evidente.

Atualmente, a produção em média escala tem sido voltada para ensaios experimentais de controle de ácaros em campo. No México, por exemplo, Acevedo e Rosas (2000) produziram *H. thompsonii* em meio de cultura semi-sólido “H”, composto por uma mistura de batata e cenoura. Neste substrato, o fungo demorou em média 8 dias, produzindo biomassa de conídios e micélio. Após o décimo segundo dia da inoculação a mistura de micélio e conídios em meio de cultura foi homogeneizada em liquidificador e aplicada em campo. Para a obtenção de toxinas, Maimala et

al. (2002) utilizaram meio líquido a base de extrato de malte, peptona, extrato de levedura e glucose, obtendo um produto final com intenso crescimento micelial do fungo após 4 dias.

Além de *H. thompsonii* outras espécies de *Hirsutella* foram produzidas em meios artificiais. *Hirsutella kirchneri*, *H. necatrix* e *Hirsutella gregis*, todas isoladas de *Abacarus hystrix* foram facilmente cultivadas em meio de malt-ágar, babata-dextrose-ágar e sabouraud dextrose ágar (MCCOY, 1996).

2.1.4.2.4 Ocorrência natural e utilização como micoacaricida

A primeira constatação de *Hirsutella* sp. ocorrendo em ácaros de citros foi realizada na Flórida (EUA) em 1924 em populações do ácaro-da-falsa-ferrugem-dos-citros (*P. oleivora*) (SPEARS; YOTHERS, 1924). Segundo estes autores, em determinados períodos do ano a densidade populacional de ácaros presente nos frutos apresentava uma queda repentina para níveis próximos a zero, além de alterações no comportamento e aspecto físico dos indivíduos. Nesta ocasião, foram constatadas estruturas do patógeno presente nos ácaros mortos coletados nestas áreas. Apesar de estas observações terem sido realizadas em 1924 desde 1912 nas épocas de alta pluviosidade já eram observadas epizootias em campo. Somente em 1950 Fisher identificou o agente causal como sendo *H. thompsonii* (VAN DER GEEST et al., 2000). A partir daí, diversos estudos foram conduzidos no sentido de entender o processo de infecção de *H. thompsonii* em ácaros, em especial *P. oleivora*.

A ocorrência das epizootias naturais de *H. thompsonii* está associada à alta temperatura, alta umidade relativa e elevada densidade de hospedeiro (ALVES, 1998). No geral, epizootias naturais ocorrem quando há interação entre temperatura, umidade e patógeno, além da presença do hospedeiro-alvo (POINAR JÚNIOR; POINAR, 1998). Epizootias de *H. thompsonii* em *Aceria vaccinii* foram registradas em condições de alta umidade relativa com o aumento da chuva no início do verão e temperaturas amenas (BAKER; NEUNZIG, 1968). Para *Aceria guerreronis* as condições microclimáticas são limitantes às epizootias do fungo, sendo que a umidade relativa é o fator mais limitante (GOPAL; GUPTA, 2001).

Em citros, o principal grupo de ácaros suscetíveis a *H. thompsonii* são os eriofídeos, mas o fungo já foi encontrado atacando tetraniquídeos e tenuipalpídeos (MCCOY, 1996; POINAR JÚNIOR; POINAR, 1998; VAN DER GEEST et al., 2000). Na América Central e EUA, *H.*

thompsonii foi detectada ocorrendo naturalmente em populações de *P. citri*, *B. phoenicis*, *Polyphagotarsonemus latus*, *Eriophyes sheldoni*, *E. banksi*, *Eutetranychus sexmacultus*, *Typhlodromalus peregrinus* e *Tydeus gloveri* (ACEVEDO; ROSAS, 2000; ALVES, 1998; MUMA, 1955; ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006a; ZOEBISCH et al., 1992). No estado de São Paulo as epizootias naturais de *H. thompsonii* em *P. oleivora* foram relatadas por Alves (1986) e Correia; gravena e Krebksy (1992). Além de *H. thompsonii* outras espécies de *Hirsutella* já foram isoladas de ácaros de citros como *Hirsutella kirchneri*, *Hirsutella tydeicola* e *Hirsutella nodulosa* (PEÑA; OSBORNE; DUNCAN, 1996; SAMSOM; MCCOY, 1982; SZTEJNBERG; DORON-SHLOUSH; GERSON, 1997). Mais recentemente, *H. thompsonii* variedade sinematosa foi isolada de *B. phoenicis* em El Paraíso no estado de Colima (México) (ACEVEDO; ROSAS, 2006).

Devido à sua importância no controle natural de *P. oleivora* foi desenvolvido na década de 70 pela a empresa Abbott Laboratories nos EUA (Chicago, IL) um micoacaricida a base de *H. thompsonii* (isolado Fla.CBS 556.77b) que recebeu o nome comercial Mycar[®]. Este produto teve o registro liberado em 1981 para controle de eriofídeos em citros (MCCOY; COUCH, 1978; MCCOY; COUCH, 1982).

Nesta época, uma série de testes de campo foi realizada na tentativa de comprovar a eficiência de Mycar[®], inclusive comparando-o com acaricidas químicos (MCCOY; COUCH, 1982). Em um destes testes realizado em pomar de “Valência” o produto, um pó molhável, foi aplicado em várias concentrações (2,72; 1,81 e 0,90 Kg/454,5 L) além de um tratamento testemunha e outro com acaricida (Clorobenzilato 4E) (MCCOY; COUCH, 1982). Observou-se em campo que a aplicação de Mycar[®] reduziu na população de *P. oleivora* a praticamente zero após quatro semanas da aplicação de 1,81 a 2,72 Kg por 454,5 litros de água. Na primeira observação, o tratamento com a maior concentração apresentou a média de 2,8 ácaros/cm² de fruto enquanto que na testemunha observou-se 22,1 ácaros/cm² de fruto. Nos outros tratamentos com o fungo a densidade do ácaro manteve-se baixa durante todo o período de avaliação, enquanto que no tratamento com o acaricida houve um acréscimo significativo de ácaros por fruto 10 dias após a aplicação.

Em 1985, apesar de bons resultados e da alta virulência do fungo a produção e comercialização de Mycar[®] foi encerrada devido a problemas de estabilidade da formulação durante processos de estocagem e transporte do produto (MCCOY, 1996; VAN DER GEEST et

al., 2000). Atualmente, há um produto microbiano a base de *H. thompsonii* que foi desenvolvido na Índia como resultado de uma parceria entre a Universidade de Agricultura de Kerala (Bangalore) e a divisão de pesquisa e desenvolvimento da HAL (Hindustan Antibiotics Limited) para o controle do ácaro da necrose do coqueiro (*A. guerreronis*). Este produto é uma formulação a base de talco e foi denominado “Mycohit-T”. Desde 2001 vem sendo testado de campo para comprovação de sua eficiência e após estes testes a HAL demonstrou interesse em realizar testes de segurança para obtenção de seu registro na Índia (KUMAR; SINGH, 2001).

De acordo com Van der Geest et al. (2000) mesmo após a retirada de Mycar[®] do mercado, países como o Brasil e a Argentina continuaram aplicando diferentes isolados de *H. thompsoni* para o controle de ácaros em citrus. No México, em um pomar de *Citrus aurantifolia* avaliou-se a flutuação populacional de *B. phoenicis* e *B. obovatus* mediante a aplicação de suspensões de micélio de *H. thompsonii* (50g/L), malation (3mL/L) e diazinon (3mL/L) além da testemunha (água). O tratamento com o fungo mostrou-se o mais eficiente, promovendo queda na taxa populacional e conseqüente redução dos danos de *Brevipalpus* spp. em frutos e folhas. Depois de três aplicações o patógeno ainda persistiu nas plantas tratadas por até 6 meses, demonstrando possibilidade de estabelecimento na área (ACEVEDO; ROSAS, 2000).

Na maioria dos trabalhos consultados a utilização de *H. thompsonii* em testes experimentais tem conferido resultados razoáveis de controle de ácaros fitófagos em citros, revelando perspectivas favoráveis da utilização deste patógeno como eficiente micoacaricida. Porém, segundo Alves (1998) há necessidade de maior número de estudos, principalmente relacionados à epiozootiologia da doença para determinar condições favoráveis à aplicação do fungo. A produção de *H. thompsonii* em meio líquido é uma alternativa viável que possibilita sua produção em média escala a custos aceitáveis, desde que haja demanda do mercado. Outros estudos como a compatibilidade com agroquímicos e a estabilidade do patógeno no ambiente podem viabilizar a utilização deste fungo principalmente em culturas perenes, não necessariamente em estratégia de aplicação inundativa.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Criação e manutenção de *Brevipalpus phoenicis* em laboratório

Para estabelecer as colônias de *B. phoenicis* em laboratório, frutos de laranja das variedades “Pêra Rio” e/ou “Valência” foram coletados em pomares livres da aplicação de agrotóxicos e levados ao laboratório de “Patologia e Controle Microbiano de Insetos”. A população inicial de ácaros foi fornecida pelo Laboratório de “Resistência de Artrópodes a Pesticidas” do setor de Entomologia da ESALQ/USP, a qual foi devidamente identificada e denominada BEL-1 (Piracicaba).

Após a coleta dos frutos, foram selecionados os mais maduros, com aproximadamente 8 a 9 cm de diâmetro e com presença de pústulas de verrugose (*E. fawcettii*) na casca, condição que favorece o desenvolvimento da população do ácaro (CHIVEGATO; KHARFAN, 1993). Para limpeza e desinfestação, os frutos foram lavados em água corrente e enxugados em papel toalha. Em seguida, cada fruto foi submetido a um banho de parafina fundida em 2/3 de sua área total, deixando-se uma arena de, aproximadamente, 4 cm de diâmetro na superfície. Para evitar a fuga dos ácaros, a arena foi delimitada com cola adesiva (Tanglefoot®) (Figura 1 a, b).

Foram transferidos, para cada fruto, 50 ácaros adultos apresentando alta mobilidade, com auxílio de um pincel de um pêlo. Após a transferência, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas (28 x 43 x 12cm) contendo no fundo uma placa de isopor perfurada. As caixas foram mantidas em sala climatizada ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$; 12 horas de fotofase e $75\pm 10\%$ UR) por um período de 20 dias, aproximadamente. Após este período, os frutos mais velhos foram substituídos por frutos novos, sendo os mesmos preparados de acordo com a metodologia descrita anteriormente. A transferência de parte da população foi realizada colocando em contato a arena de confinamento dos frutos velhos com a dos frutos novos, para garantir a infestação dos mesmos.

2.2.2 Produção de *Hirsutella thompsonii* e preparação do inóculo para pulverização

O fungo utilizado nos bioensaios de laboratório e de campo foi *H. thompsonii* (Esalq-1269), o qual se encontra armazenado no banco de patógenos do laboratório sob óleo mineral e liofilizado em condições de baixa temperatura (-40°C). Este material, isolado de cadáveres de *C. heveae* coletados em seringueira na região de Caçú (GO), foi selecionado como altamente patogênico ao ácaro da leprose dos citros (ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006a).

Para os bioensaios de laboratório, o fungo foi produzido em meio de cultura sólido (MC-S), em arroz pré-cozido (APC) e em meio de cultura líquido (MC-L). Nos experimentos realizados

em campo, o material utilizado foi produzido em arroz pré-cozido (APC) e em meio de cultura líquido (MC-L), devido à quantidade utilizada.

A produção de *H. thompsonii* em meio de cultura sólido e completo (MC-S) foi realizada repicando-se o fungo em placas de Petri com o meio, previamente esterilizadas (Figura 1c). Este substrato foi preparado a base de ágar, diversos sais e outros nutrientes diluídos em água (0,36g de KH_2PO_4 ; 1,05g de $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,60g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0g de KCl; 10,0g de glucose; 5g de extrato de levedura; 20g de ágar; 1 litro de H_2O destilada), sendo esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após a repicagem, as placas foram mantidas por um período de 10 dias em câmara climatizada ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; 12 horas de fotofase e $70 \pm 10\%$ UR) para crescimento e produção de conídios. Para MC-L, a produção foi realizada utilizando-se o meio completo sem ágar em sua composição. Após a pesagem dos nutrientes e preparo, este foi colocado em erlenmeyers os quais foram submetidos à autoclavagem por 20 minutos a 120°C . Em seguida, um disco de 2 cm de diâmetro colonizado com o fungo foi adicionado em cada frasco, sendo estes colocados em agitador com rotação de 225-250 rpm por 5 dias. Em todos os casos as suspensões para a aplicação foram preparadas após o período de crescimento e esporulação do patógeno, ou seja, ao quinto dia após a inoculação (Figura 1d).

Em arroz pré-cozido (APC), a produção do patógeno foi realizada de acordo com o método das bandejas descrito por Alves e Pereira (1998). Neste caso, o arroz foi cozido durante aproximadamente 5 minutos em água e colocado no interior de sacos de polipropileno para autoclavagem. Após este processo, os sacos já resfriados foram inoculados com *H. thompsonii* em condições assépticas. O inóculo utilizado foi produzido em meio de cultura completo e líquido (MC-L), sendo inoculados 10mL de meio + fungo em cada saco. Em seguida, os sacos foram transferidos para a câmara climatizada ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; 12 horas de fotofase e $70 \pm 10\%$ UR) onde permaneceram por 10 dias para crescimento vegetativo e esporulação (Figura 1g).

Em todos os bioensaios realizados, as suspensões do patógeno foram preparadas da mesma maneira. Para o fungo produzido em MC-S, os conídios de *H. thompsonii* foram separados do meio utilizando-se uma alça de borracha estéril, sendo em seguida transferidos para tubos de vidro contendo água estéril mais espalhante adesivo (Tween 40[®]). A partir desta suspensão, foram obtidas três diluições sucessivas na proporção de 1mL da suspensão original para 9mL de água estéril mais espalhante adesivo. Em câmara de Neubauer, foram realizadas as contagem e determinação da concentração de conídios. Para o fungo produzido em arroz, foi retirada uma

amostra de 1g do substrato contendo o patógeno. Esta foi diluída em 9mL de água estéril mais espalhante adesivo por três vezes, sucessivamente, para contagem e quantificação da suspensão original. Para o fungo produzido em MC-L, uma alíquota do material foi retirada, triturada em liquidificador e submetida à contagem de propágulos/mL, não separando conídios submersos de pedaços de micélio. Em seguida, foram preparadas as suspensões para a pulverização dos ácaros.

2.2.3 Viabilidade de *Hirsutella thompsonii* produzido em meio de cultura completo sólido (MC-S), meio de cultura completo líquido (MC-L) e em arroz pré-cozido (APC).

Foi avaliada a porcentagem de germinação de conídios de *H. thompsonii* (Esalq-1269) produzidos em MC-S, MC-L e em arroz pré-cozido (APC). No caso do arroz, estas observações foram realizadas antes e após os processos de secagem (APC e APC-S) e moagem dos grãos (APC-SM). Para isto, após a esporulação de *H. thompsonii* sobre o arroz, uma parte deste material foi submetida apenas à secagem em câmara com fluxo laminar por 5 dias, sendo outra parte submetida à este processo e, em seguida, à moagem usando moinho modelo Marconi[®]. Neste equipamento, uma amostra dos grãos de arroz +fungo foi separada e submetida à trituração por 3 minutos, obtendo como produto final um pó fino de coloração acinzentada (Figura 1e, f).

Figura 1- A - Bandeja com frutos de laranja parafinados e utilizados para a criação de *Brevipalpus phoenicis* em laboratório. B - Detalhe das pústulas de verrugose e da arena confeccionada no fruto. C - *Hirsutella thompsonii* (Esalq-1269) produzido em MC-S. D - *H. thompsonii* produzido em MC-L. E - Moinho (Marconi®). F -Aspecto do pó obtido com a moagem de arroz + *H. thompsonii*. G - *H. thompsonii* produzida em APC após 10 dias em câmara climatizada

Amostras de 1g e/ou 1mL dos diferentes meios foram transferidas, individualmente, para o interior de tubos de vidro previamente esterilizados contendo 9mL de água estéril mais espalhante adesivo (Tween 40[®]). A suspensão obtida foi agitada por alguns minutos e submetida ao aparelho de vórtex por 2 minutos. Após a liberação dos conídios na água, foi realizada uma diluição sucessiva (9:1), sendo que uma alíquota de 0,1mL desta foi transferida, com auxílio de pipeta, para o interior de placas de Petri contendo MC-S. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, a suspensão foi espalhada na superfície do meio e, em seguida, as placas foram armazenadas em câmara climatizada ($26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; 12 horas de fotofase e $70 \pm 10\%$ UR) até o momento da avaliação.

Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de viabilidade e número de unidades formadoras de colônias (U.F.C.). Para a determinação da viabilidade, foram observados os números de conídios germinados e não germinados após 48 horas de incubação com auxílio de microscópio de luz. Para a determinação de U.F.C., foi realizada a contagem do número de colônias de *H. thompsonii* após 168 horas (7 dias) da incubação. A presença de contaminantes no meio de cultura também foi avaliada, sendo estes identificados. Para cada tratamento foram retiradas 5 amostras, totalizando 5 placas para avaliação da viabilidade e 5 placas para determinação de U.F.C.. Para o fungo produzido em MC-S, avaliou-se a viabilidade e esporulação de colônias de $0,95\text{cm}^2$, sendo quantificadas 5 colônias para determinação do número médio de conídios.

2.2.4 Infecção de *Hirsutella thompsonii* em *Brevipalpus phoenicis*

2.2.4.1 Determinação da curva de concentração-mortalidade de adultos de *Brevipalpus phoenicis* a *Hirsutella thompsonii*

2.2.4.1.1 Determinação das concentrações discriminatórias

Os bioensaios foram realizados utilizando-se folhas “tenras” de citros como substrato alimentar para os ácaros. Estas folhas foram coletadas em um pomar livre da aplicação de agrotóxicos e levadas para o laboratório para limpeza e desinfestação. Neste processo, cada folha foi individualmente lavada em água corrente e em seguida, utilizando-se um pedaço de algodão,

estas foram secas para retirada de insetos e/ou poeira. Em seguida, com o auxílio de um vazador de metal de 2,6cm de diâmetro, foram recortados discos foliares os quais foram inseridos, individualmente, no interior de placas acrílicas (3,5cm de diâmetro) contendo uma mistura de 4mL de ágar (2%) solidificado. Para garantir a fixação da folha ao ágar e evitar a fuga dos ácaros, foi confeccionada sobre esta uma barreira de 2mL da mesma mistura (ágar 2%), delimitando uma arena de confinamento (Figura 2 a,b).

A partir da colônia-estoque, 10 adultos de *B. phoenicis* foram separados e transferidos com o auxílio de um pincel de pêlo único para as placas acrílicas contendo as arenas. As fêmeas selecionadas foram aquelas que apresentaram coloração vibrante e alta mobilidade. O isolado testado foi Esalq-1269 o qual foi produzido em MC-S, MC-L e APC (item 3.2).

As arenas foram pulverizadas com suspensões de conídios em diferentes concentrações escolhidas aleatoriamente, mas espaçadas em escala logarítima entre si. Estas concentrações foram: $3,2 \times 10^2$, 1×10^3 , $3,2 \times 10^3$, 1×10^4 , $3,2 \times 10^4$, 1×10^5 , $3,2 \times 10^5$, 1×10^6 , $3,2 \times 10^6$, 1×10^7 conídios/mL. O equipamento utilizado para a pulverização foi a Torre de Potter (modelo Bukard Manufacturing Co Ltda) calibrada a 1.034 bar (15 libras/pol²) utilizando-se 2mL da suspensão. Para cada concentração do patógeno foram utilizadas 5 arenas, totalizando 50 ácaros por tratamento. Além dos tratamentos com o fungo, foi aplicada água estéril mais espalhante adesivo (testemunha).

Após as aplicações, as arenas foram transferidas para o interior de caixas plásticas contendo no fundo uma folha de papel toalha umedecida. Estas caixas foram fechadas e mantidas no interior de câmara climatizada tipo B.O.D. ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; 12 horas de fotofase e $70 \pm 10\%$ UR) durante todo o período em que se realizou o experimento. O monitoramento da temperatura no interior das caixas foi realizado utilizando-se termômetro digital (Thermometer[®]).

A avaliação foi realizada quatro dias após a aplicação (4 d.a.a.), anotando-se o número de indivíduos mortos. A mortalidade de ácaros foi corrigida em relação à testemunha utilizando-se a fórmula proposta por Schneider-Orelli (1947).

A partir destes resultados, foram selecionadas as concentrações que causaram entre 10% e 90% de mortalidade de ácaros. Em seguida, foram determinadas seis concentrações discriminatórias intercaladas entre si em progressão aritmética para a obtenção da curva de concentração-mortalidade.

2.2.4.1.2 Determinação das curvas de concentração-mortalidade

A curva de concentração-mortalidade de *B. phoenicis* para *H. thompsonii* foi determinada utilizando-se o fungo produzido em MC-S, MC-L, arroz pré-cozido (APC) e em arroz pré-cozido seco e moído (APC-SM). Em todos os testes, foram pulverizadas sobre os ácaros suspensões de $3,2 \times 10^5$, $6,3 \times 10^5$, $1,2 \times 10^6$, $2,5 \times 10^6$, $5,0 \times 10^6$, 1×10^7 conídios/mL de *H. thompsonii*, além da testemunha (água estéril mais espalhante adesivo). Estas concentrações são relativas ao valor logarítmico de 5,5 a 7,0 e espaçadas entre si em progressão aritmética.

Os ácaros adultos foram confinados no interior de arenas de folhas de citros, confeccionadas em placas acrílicas contendo agar-água (item 3.4.1.1). Para o interior de cada arena, foram transferidos 10 ácaros, sendo que para cada concentração testada foram utilizadas 10 arenas (100 ácaros/tratamento).

Após a aplicação do fungo, as arenas tratadas foram transferidas para o interior de caixas plásticas forradas com papel toalha umedecido e estas armazenadas em câmara climatizada ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; 12 horas de fotofase e $70 \pm 10\%$ UR) durante todo o período de avaliação. A avaliação foi realizada ao quarto dia após a aplicação (4 d.a.a.), anotando-se o número de ácaros mortos. Assim, observou-se em cada ácaro se havia movimentação das pernas com o toque do pincel e/ou se os indivíduos apresentavam sintomas da infecção pelo patógeno.

Os resultados foram analisados por meio do programa estatístico POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987) para determinação da concentração letal (CL_{25}) por meio de análise de Probit. Para a análise gráfica dos resultados, foi utilizado o programa Probit-Basics.

Para os tratamentos com o fungo produzido em MC-S, em APC e APC-SM, a pulverização foi realizada em Torre de Potter calibrada a 15 libras/pol² utilizando-se 2mL da suspensão. No caso do fungo produzido em MC-L, devido às suas características físicas (tamanho de partículas), a aplicação foi realizada por meio de um pulverizador manual do tipo “airbrush set”. De maneira semelhante, 2mL da suspensão fúngica foi pulverizada sobre as arenas contendo os ácaros (Figura 2 d,e). Neste caso, visando a padronização dos resultados, além do tratamento testemunha, o tratamento com o fungo produzido em MC-S também foi pulverizado nas mesmas condições. Para comparar estes dois métodos de aplicação, foi realizada a pulverização, tanto via Torre de Potter como via pulverizador manual, 2 mL de água em 10 lamínulas de vidro ($3,24\text{cm}^2$), as quais foram imediatamente pesadas em balança de precisão. Paralelamente, 2mL de

uma suspensão de *H. thompsonii* foi aplicada por estes dois métodos em 4 placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Após 7 dias da aplicação, foi realizada a contagem de U.F.C. (Unidades Formadoras de Colônias) em áreas demarcadas de $3,24\text{cm}^2$, totalizando 5 áreas/placa. Os resultados deste ensaio foram analisados pelo programa estatístico Statistical Analysis System (SAS 9.1).

Figura 2- A- Arenas de folhas de citros em placas de acrílico contendo agar 2%. B - Detalhe das placas utilizadas para os bioensaios de laboratório. C - Torre de Potter. D - Fonte de ar acoplada ao pulverizador. E - Detalhe do pulverizador manual

2.2.4.2 Patogenicidade de *Hirsutella thompsonii* a diversas populações de *Brevipalpus phoenicis* do Estado de São Paulo

A patogenicidade de *H. thompsonii* foi avaliada em diferentes populações de *B. phoenicis* provenientes de 5 regiões do Estado de São Paulo. As populações testadas foram obtidas junto ao laboratório de “Resistência de Artrópodes a Pesticidas” e foram coletadas em pomares de Piracicaba (Bel-1), Onda Verde (SJ151), Bauru (Ven05), Gavião Peixoto (ER266) e Barretos (Bar105) (Figura 3).

Para a realização dos testes, os ácaros adultos foram confinados em arenas de folhas de citros (item 3.4.1.1). Para cada população, foram preparadas 10 arenas contendo 10 indivíduos, totalizando 100 indivíduos inoculados para cada população. Deste total, 5 arenas foram pulverizadas com a suspensão de conídios do patógeno e as 5 restantes com água estéril mais espalhante adesivo (Tween 40[®]). A suspensão aplicada foi preparada a partir do patógeno produzido no meio padrão MC-S e quantificada conforme descrito no item 3.4.1.1, sendo utilizado neste caso uma concentração discriminatória (1×10^7 conídios/mL).

Após a pulverização em Torre de Potter, as arenas contendo os ácaros foram transferidas para caixas acrílicas forradas com folha de papel toalha umedecida onde foram incubadas dentro de câmara climatizada ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotofase) durante todo o período de avaliação. As avaliações foram realizadas após o terceiro e quarto dias da aplicação do fungo, observando-se o número de indivíduos mortos e com sinais do patógeno e o número de ovos de *B. phoenicis* encontrados.

Os resultados de mortalidade e de oviposição foram transformados em $\sqrt{x}$. Após a transformação, os mesmos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey) a 6% de probabilidade por meio do programa estatístico SAS 9.1.

Figura 3- Procedência das populações de *Brevipalpus phoenicis* inoculadas com *Hirsutella thompsonii* (Esalq-1269)

2.2.4.3 Patogenicidade de *Hirsutella thompsonii* a ovos de *Brevipalpus phoenicis*

Para a obtenção dos ovos, foram selecionadas fêmeas adultas recém-emergidas, as quais foram transferidas para o interior de arenas de folhas de citros. No total, foram confeccionadas 20 arenas, sendo transferidas 30 fêmeas por arena. Após 24 horas da transferência, os ovos encontrados foram retirados e descartados, sendo utilizados para os testes apenas aqueles obtidos após 48 horas da permanência das fêmeas nas arenas.

Com o auxílio de uma micro-tesoura, a área foliar contendo os ovos selecionados foi recortada e, em seguida, colada sobre novas arenas utilizando-se tiras de durex dupla face. Para cada arena foram transferidos 10 ovos, sendo que para cada tratamento foram preparadas 10 repetições.

A aplicação de *H. thompsonii* sobre os ovos foi realizada em Torre de Potter. Além do tratamento testemunha (2mL de água estéril mais espalhante adesivo), foi aplicada 2mL de suspensão de 1×10^7 conídios/mL do patógeno. Após as pulverizações, as arenas foram inseridas no interior de caixas acrílicas forradas com papel toalha e estas mantidas em câmara climatizada ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotofase) durante o período de avaliação. As avaliações foram realizadas diariamente até a constatação da eclosão das larvas.

O parâmetro avaliado foi o número de larvas eclodidas após 7 e 10 dias da aplicação do patógeno. Os ovos intactos foram transferidos para lâminas contendo azul lático e observados em microscópio de luz para constatação de sinais do fungo. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey) a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SAS 9.1.

2.2.4.4 Efeito da temperatura e umidade relativa do ar na infecção de *Hirsutella thompsonii* em adultos de *Brevipalpus phoenicis*

Os bioensaios foram realizados para avaliar, em laboratório, o efeito combinado da temperatura e da umidade relativa do ar na mortalidade do ácaro da leprose por *H. thompsonii*. Estes testes foram conduzidos por meio do confinamento dos adultos em atmosfera controlada.

Para a obtenção das umidades relativas avaliadas, foram utilizados dessecadores de vidro os quais foram previamente calibrados com soluções saturadas com ácido sulfúrico (H_2SO_4) em diferentes proporções, de acordo com metodologia desenvolvida por Teixeira Alves (1986).

As soluções foram calculadas para obtenção de 40%, 60%, 80% e 95% de umidade relativa do ar dentro dos dessecadores (Tabela 2). Após a calibragem, estes recipientes foram inseridos no interior de câmaras climatizadas com temperatura regulada (Figura 8). As temperaturas avaliadas foram de $18^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$, $22^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$, $26^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ e $30^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ em fotofase de 12 horas.

Tabela 2 – Concentração e volume das soluções de ácido sulfúrico (H_2SO_4)¹ utilizadas em dessecadores de vidro para obtenção de atmosfera controlada

Umidade relativa desejada	Volume (mL)	Concentração final da solução (mol.L ⁻¹)
40% - 45%	145	5,81
60% - 65%	140	5,36
80% - 85%	120	3,13
95% - 99%	100	0,00

¹ A concentração de H_2SO_4 inicial utilizada foi de 37,6N

Cada tratamento constou de seis repetições sendo que cada repetição foi composta de uma arena foliar de citros, confeccionada segundo a metodologia descrita no item 3.4.1.1. Para o interior das arenas, foram transferidos 20 ácaros adultos os quais foram pulverizados com 2mL de uma suspensão 1×10^7 conídios/mL de *H. thompsonii* (Esalq-1269) por meio de Torre de Potter. No tratamento testemunha, os ácaros foram pulverizados apenas com água estéril mais espalhante adesivo e portanto, cada dessecador recebeu simultaneamente ácaros tratados e não-tratados.

As avaliações foram realizadas ao quarto dia após a aplicação do fungo observando-se a mortalidade dos ácaros, sintomas da doença e sinais do patógeno (conidiogênese). Os resultados foram transformados em $\sqrt{x}$ e submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey) a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SAS 9.1.. Os resultados obtidos a 22 °C e 26°C foram submetidos à análise de regressão linear para determinação das umidades relativas ótimas nestas condições de temperatura.

2.2.4.5 Caracterização morfológica e virulência de isolados exóticos de *Hirsutella thompsonii*

Nesta etapa, algumas características morfológicas e a patogenicidade do isolado ESALQ-1269 foram comparadas às de quatro isolados de *H. thompsonii* provenientes do banco de patógenos do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenagen/Embrapa). Algumas informações destes isolados constam na Tabela 3.

Tabela 3 – Isolados de *Hirsutella thompsonii* provenientes do banco de patógenos do Cenagen/Embrapa

Número do isolado	Espécie identificada ¹	Hospedeiro	Local de procedência e ano de coleta
CG-524	<i>Hirsutella thompsonii</i>	<i>Phyllocoptruta oleivora</i>	EUA
CG-532	<i>Hirsutella thompsonii</i>	<i>Oligonychus</i> sp.	México / 1986
CG-540	<i>Hirsutella thompsonii</i>	Aleirodídeo	México / 1993
CG-541	<i>Hirsutella thompsonii</i>	<i>Aceria guerreronis</i>	México / 1986

¹ Identificação realizada pelo Cenagen/Embrapa

A avaliação morfológica dos isolados exóticos e do isolado Esalq-1269 foi realizada observando-se os parâmetros: forma e tamanho de conídios e conidióforos, aspecto e tamanho das colônias e produção de conídios. Inicialmente, os isolados foram produzidos em placas de Petri contendo MC-S, previamente esterilizados. Em cada placa, uma pequena porção do patógeno puro foi transferida com o auxílio de alça de platina em três pontos equidistantes. Para cada isolado, foram preparadas 2 placas as quais foram mantidas em câmara climatizada tipo BOD por dez dias até a avaliação ($26\pm 0,5^{\circ}\text{C}$; 12 horas de fotofase e $70\pm 10\%$ UR).

Para a determinação de conídios e conidióforos, foram preparadas lâminas contendo corante azul lático as quais foram observadas em microscópio de luz e medidos com tambor OSM (Ocular micrométrica, calibrada com micrômetro). De cada isolado, foram observados pelo menos três conjuntos de conídio + conidióforo. As medidas encontradas foram convertidas de acordo com o fator de correção do tambor (0,21599) utilizado para o aumento de 400 vezes. Em seguida a esta etapa, as lâminas foram observadas em microscópio de luz com câmara clara em aumento de 1000 vezes e as estruturas desenhadas em papel Canson.

As colônias presentes nas placas de Petri foram fotografadas e seu diâmetro determinado com uma régua. Em seguida, cada colônia foi retirada do meio de cultura com auxílio de um vazador de metal e inserida no interior de tubo de vidro esterilizado. Em cada tubo foram adicionados 10 mL de água estéril mais espalhante adesivo (Tween 40[®]) e as colônias raspadas com pincel de pêlos. A suspensão obtida foi submetida ao aparelho de vórtex para extração dos conídios por 1 minuto e, em seguida, a quantificação desta foi realizada por meio de câmara de Neubauer.

Os resultados de produção de conídios foram transformados em $\log x$ e os resultados de mortalidade de adultos referentes ao terceiro dia após a aplicação do patógeno foram transformados em $1/x$. Após a transformação, estes foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey) a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SAS (9.1).

2.2.4.6 Persistência de *Hirsutella thompsonii* em folhas de citros

Neste bioensaio as arenas de folhas de citros utilizadas foram preparadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.1.1.

Inicialmente, foram preparadas suspensões de *H. thompsonii* produzido em MC-S, MC-L e APC. As suspensões foram preparadas utilizando-se água estéril mais espalhante adesivo e inseridas no interior de tubos de vidro para contagem e padronização. Cada suspensão foi quantificada em 1×10^7 conídios/mL. Em seguida, as placas contendo as arenas de folhas de citros foram pulverizadas e acondicionadas em caixas acrílicas e mantidas em câmara climatizada até o momento de transferência de *B. phoenicis*. A pulverização foi realizada por meio de pulverizador manual do tipo “airbrush set”, utilizando-se 2 mL de cada suspensão. Os ácaros somente foram transferidos após 0, 24 e 72 horas da aplicação do patógeno. O mesmo procedimento foi realizado para a testemunha (água estéril mais espalhante adesivo).

Após a transferência, as arenas com os ácaros foram recolocadas nas caixas acrílicas e estas mantidas sob condições controladas ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; 12 horas de fotofase e $70 \pm 10\%$ UR). A avaliação da mortalidade dos indivíduos foi realizada após 4 dias da data de transferência.

Os resultados foram transformados em $\sqrt{x}$ e em seguida submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey) a 6% de probabilidade por meio do programa estatístico SAS 9.1.

2.2.4.7 Efeito de *Hirsutella thompsonii* sobre a população de *Brevipalpus phoenicis* em condições de campo.

Os experimentos de campo foram realizados em um pomar de citros da variedade “Pêra Rio” isento da aplicação de agrotóxicos, localizado na ESALQ-USP em Piracicaba (SP) no início da primavera de 2005.

Em ambos os testes, inicialmente, foram coletados neste local, frutos com pústulas de verrugose. No laboratório, estes frutos foram lavados e desinfestados e, em seguida, 2/3 da área de cada fruto foi submetida a um banho de parafina, de maneira a formar uma arena. Cada arena foi delimitada com cola adesiva (Tanglefoot®) e ao redor foi colocada uma tira de plástico transparente para facilitar o manuseio. O fungo utilizado foi produzido no laboratório em arroz pré-cozido (APC) pelo método das bandejas e em meio de cultura líquido (MC-L).

Uma vez preparadas, as arenas receberam os ácaros, sendo que em cada uma foram colocadas 30 fêmeas adultas que apresentavam alta mobilidade. Após a transferência, os frutos foram pulverizados com as suspensões do patógeno e imediatamente submetidos à secagem em

ambiente por alguns minutos. A pulverização foi realizada por meio de pulverizador do tipo “airbrush set”, sendo que cada fruto recebeu 5mL de suspensão (Figura 4 a,b). A infestação prévia dos frutos foi realizada para garantir a distribuição um número conhecido de adultos e permitir a avaliação do patógeno em condições de campo, uma vez que o padrão de distribuição de *B. phoenicis* em citros é agregado e complexo (BASSANEZI, 2004).

Após a secagem, cada fruto foi colocado no interior de uma rede de plástico para embalagem de frutas e esta envolvida por um barbante. No campo, estes foram pendurados nas plantas de citros adultas e mantidos até o período de avaliação quando foram então novamente levados ao laboratório. Os frutos foram distribuídos aleatoriamente e de maneira uniforme nos quatro quadrantes da planta, sempre na parte mediana.

No primeiro experimento o delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, sendo aplicados um tratamento testemunha (água estéril mais espalhante adesivo) e *H. thompsonii* produzida em APC (6Kg/ha). Neste caso, foram realizadas 5 repetições/tratamento sendo que cada fruto foi considerado uma repetição. No segundo experimento, o delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, sendo que cada planta foi considerada um bloco e foram utilizadas 10 plantas (10 repetições) (Figura 4c). Os tratamentos foram: testemunha, *H. thompsonii* (10Kg/ha), *H. thompsonii* (20Kg/ha), *H. thompsonii* produzida em meio líquido (5L/ha). Em todos os tratamentos de ambos os experimentos as suspensões receberam o óleo vegetal Natura 1 óleo na concentração de 0,8mL/L de água.

Figura 4- A- Detalhe da pulverização do fruto. B- Fruto pulverizado com proteção contra fuga dos ácaros e ação de predadores. C- Detalhe do pomar de citros onde foi instalado o experimento, cada planta foi considerado um bloco

Nos dois ensaios, as avaliações foram realizadas após 10 e 20 dias da aplicação. Os parâmetros foram: número de indivíduos nas arenas (adultos, ovos e ninfas), observando-se presença de ácaros doentes ou com sinais do patógeno e presença/ausência de predadores. Os indivíduos mortos foram examinados em microscópio de luz. Paralelamente, informações de temperatura e umidade relativa do ar, referentes ao período experimental, foram determinadas por um termohigrômetro. Foi realizada também uma consulta junto ao site do Departamento de Agrometeorologia da ESALQ/USP (<http://www.lce.esalq.usp.br/posto.html>) para constatação destas medidas.

No primeiro experimento, os resultados de sobrevivência de adultos foram transformados em $\sqrt{x}$. No segundo experimento, os resultados de sobrevivência de adultos e número de ninfas foram transformados em $\sqrt{x}$, enquanto que nos resultados referentes ao número de ovos utilizou-se a transformação $\log x$. Em seguida, todos os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey) a 10% de probabilidade por meio do programa estatístico SAS 9.1.

2.2.5 Compatibilidade de *Hirsutella thompsonii* com acaricidas e sua associação com o produto Propargite (Omite 720 EC) para o controle de *Brevipalpus phoenicis*.

2.2.5.1 Compatibilidade “in vitro” de acaricidas registrados para o ácaro da leprose

Em condições de laboratório, os testes de compatibilidade foram realizados para avaliar a interação entre diferentes moléculas de ação acaricida e o fungo *H. thompsonii*. Algumas informações sobre os produtos avaliados estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Acaricidas utilizados em citros para controle de *Brevipalpus phoenicis* e avaliados quanto à toxicidade para *Hirsutella thompsonii*

Nome comercial	Princípio ativo	Modo de Ação	Classe Toxicológica	Concentração de campo
Torque 500 SC	Óxido de Fenbutatina	Contato	III	80 mL/100L
Sipicatin 500 SC	Cihexatina	Não encontrado	I	50 mL/100L
Kumulus DF	Enxofre	Contato	IV	500g/100L
Omite 720 SC	Propargite	Contato	II	100mL/100L
Kelthane 480 CE	Dicofol	Contato	II	77mL/100L
Karathane EC	Dinocape	Contato	I	50mL/100L
Envidor	Espirodiclofeno	Não sistêmico	III	20-25ml/100L

Para os testes, os produtos, em concentrações pré-estabelecidas, foram individualmente adicionados a MC-S fundido, não solidificado contido em placas de Petri previamente esterilizadas. Após a solidificação do meio na placa, *H. thompsonii* foi inoculado utilizando-se uma alça de platina estéril. O inóculo utilizado foi produzido previamente em MC-S de acordo com a metodologia descrita no item 3.2. A inoculação foi feita no meio de cultura + acaricida em três pontos equidistantes entre si. Para cada tratamento, foram preparadas 5 placas, totalizando 15 colônias (repetições). Para o crescimento e reprodução do patógeno, as placas foram mantidas em câmara climatizada ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$; $70\pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotofase) por um período de 10 dias.

A avaliação da compatibilidade foi realizada mediante a avaliação de três parâmetros: crescimento vegetativo, esporulação e germinação de conídios.

O crescimento vegetativo foi determinado por meio da medição do diâmetro das colônias do patógeno na placa utilizando-se uma régua graduada (mm). Para determinar a esporulação, as colônias foram retiradas com auxílio de um vazador e inseridas em tubos de dieta contendo água destilada + espalhante adesivo (Tween®). A quantificação dos conídios em suspensão foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer.

Para determinar a germinação dos conídios de *H. thompsonii* após o contato direto com o acaricida, inicialmente foi preparada uma solução-estoque do produto usando-se duas vezes a concentração recomendada pelo fabricante. De maneira semelhante, foi preparada uma suspensão-estoque de 2×10^7 conídios/mL de *H. thompsonii*, ou seja, o dobro de uma dose discriminatória. A partir destas, foi retirado 1mL da solução-estoque do acaricida, o qual foi misturado a 1mL da suspensão-estoque do patógeno. A suspensão final obtida permaneceu em condições ambiente por aproximadamente 1 hora. Após este período, em placa de Petri contendo meio Batata-Detrose-Ágar, foi distribuído 0,1 mL da mistura acaricida+patógeno com auxílio de alça de Drigalsky. Foram preparadas 6 repetições (placas), sendo que as placas foram incubadas em câmara climatizada ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; $70 \pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotofase) por 48 horas para contagem do número de esporos germinados.

Os resultados de esporulação e crescimento vegetativo foram submetidos às fórmulas propostas por Alves, Moino Júnior e Almeida (1998b) e Alves et al³. (em fase de elaboração) para determinação da compatibilidade entre o patógeno e o agrotóxico:.

$$T = \frac{20 [\text{CV}] + 80 [\text{ESP}]}{100}$$

onde:

T: valor corrigido do crescimento vegetativo e germinação para classificação dos produtos;

CV: porcentagem de crescimento vegetativo comparado à testemunha;

ESP: porcentagem de esporulação comparada à testemunha.

$$T = \frac{47 [\text{CV}] + 43 [\text{ESP}] + 10 [\text{GER}]}{100}$$

onde:

T: valor corrigido do crescimento vegetativo, esporulação e germinação para classificação dos produtos;

CV: porcentagem de crescimento vegetativo comparado à testemunha;

³ ALVES, S.B.; HADDAD, M.L.; FAION, M.; SILVEIRA NETO, M.; BAPTISTA, G.C. (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz). **Biological index of toxicity classification of pesticides to entomopathogenic fungi.**

ESP: porcentagem de esporulação comparada à testemunha;

GER: porcentagem de germinação comparada à testemunha.

Assim, baseado nos valores de T estabelecidos por estes dois métodos os acaricidas foram classificados de acordo com níveis de toxicidade da Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de T para classificação do efeito de agrotóxicos em fungos entomopatogênicos de acordo com a classificação de Alves; Moino Júnior e Almeida (1998b) e Alves et al. (em fase de elaboração)

Classificação de 1998		Classificação de 2007	
Valor de T	Níveis	Valor de T	Níveis
0 a 30	Muito tóxico	0 a 50	Muito tóxico
31 a 45	Tóxico	51-89	Tóxico
46 a 60	Moderadamente tóxico	> 89	Compatível
> 60	Compatível	-	-

3.2.5.2 Efeito de Propargite e *Hirsutella thompsonii* sobre adultos de *Brevipalpus phoenicis*.

Em condições de laboratório, observou-se o efeito da associação entre o acaricida Propargite (Omite 720 EC) e *H. thompsonii* sobre fêmeas adultas e recém-emergidas de *B. phoenicis*. Para isso, inicialmente, foram preparadas 10 arenas de folhas de citros de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.1.1.. Em seguida, as arenas contendo os ácaros foram pulverizadas com as suspensões e soluções referentes aos tratamentos. O experimento foi inteiramente casualizado sendo que cada tratamento foi composto de dez arenas contendo dez adultos/arena (100 ácaros/tratamento).

O fungo *H. thompsonii* foi produzido em MC-S conforme descrito no item 3.2. Após a quantificação e preparo das suspensões do patógeno em concentrações pré-estabelecidas foi realizada a mistura com a solução do acaricida. Assim, os tratamentos realizados foram: testemunha (água estéril + espalhante adesivo), *H. thompsonii* (CL₂₅ 1,9x10⁵ conídios/mL), Propargite (CL₂₅ 155,70mL/1000L), CL₂₅ de *H. thompsonii* + CL₂₅ de Propargite. O valor da CL₂₅ de *H. thompsonii* foi estimado após a realização da curva de concentração-mortalidade do

ácaro ao patógeno (item 3.4.1.2) enquanto que o valor da CL_{25} do acaricida foi determinado em 2002 por Franco⁴ (informação verbal).

A aplicação foi realizada em Torre de Potter utilizando-se 2mL de cada calda para pulverização de 5 arenas. Após a pulverização, as arenas foram colocadas no interior de capela de fluxo laminar para secagem e, em seguida, transferidas para caixas acrílicas forradas com papel toalha. As caixas foram armazenadas em câmara climatizada ($26\pm0,5^{\circ}\text{C}$; $70\pm10\%$ de UR e 12 horas de fotofase) durante todo o período de avaliação. O ensaio foi repetido duas vezes.

As avaliações foram diárias até o terceiro dia após a aplicação (72 horas), sendo que o parâmetro observado foi a mortalidade de adultos/dia. Os resultados foram transformados em $\sqrt{x}$ e em seguida submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas por teste de Tukey (6% de probabilidade) por meio do programa estatístico SAS 9.1.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Viabilidade de *Hirsutella thompsonii* produzido em meio de cultura completo sólido (MC-S), meio completo líquido (MC-L) e em arroz pré-cozido (APC).

O meio de cultura completo e sólido (MC-S) foi o que promoveu maior viabilidade de conídios (99,4%) e alta capacidade de esporulação/área ($1,76\times10^6$ conídios/cm²). Não constatou-se a presença de contaminantes, embora *H. thompsonii* tenha apresentado crescimento mais lento no substrato, em relação a outras espécies como, por exemplo, *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Estes resultados comprovam que as características físicas e especialmente o alto valor nutricional de MC-S, foram os aspectos determinantes para o desenvolvimento de *H. thompsonii*. Porém, este é um meio de cultura utilizado para a produção em nível laboratorial, apenas para a obtenção de inóculo em um sistema de produção massal (ALVES; PEREIRA, 1998; LEITE et al., 2003).

Os outros substratos avaliados (MS-L, APC, APC-S e APC-SM) apresentaram diferenças quanto à capacidade de produção de *H. thompsonii* (Tabela 5).

⁴ FRANCO, C.R.. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Tabela 5 – Produção de conídios de *Hirsutella thompsonii* ($\pm$ EPM) em diferentes meios de cultura⁽¹⁾

Meio para produção	Viabilidade média de conídios após 48h (%)	U.F.C média/placa de contagem (10^{-5})	Concentração de conídios viáveis ⁽³⁾	U.F.C de contaminantes (%)
MC-L	96,8 $\pm$ 1,01 ⁽²⁾	0,014 $\pm$ 0,024	1,4 $\times$ 10 ³ $\pm$ 0,24	30
APC	86,83 $\pm$ 2,24	10,6 $\pm$ 0,20	1,0 $\times$ 10 ⁶ $\pm$ 0,02	3,19
APC-S	73,54 $\pm$ 5,23	23,4 $\pm$ 8,04	2,3 $\times$ 10 ⁶ $\pm$ 0,80	0,0
APC-SM	52,06 $\pm$ 6,49	2,8 $\pm$ 0,58	2,8 $\times$ 10 ⁵ $\pm$ 0,58	80,28

⁽¹⁾ MC-L (meio completo líquido); APC (Arroz pré-cozido); APC-S (arroz pré-cozido e seco); APC-SM (arroz pré-cozido seco e moído).

⁽²⁾ Para MC-L a leitura de viabilidade foi realizada após 24 horas.

⁽³⁾ Conídios/ml para MC-L e conídios/g para APC, APC-S e APC-SM.

Quando produzido no meio completo e líquido (MC-L) o fungo apresentou um crescimento mais rápido, porém com baixa produtividade quando comparada aos demais (1,4 $\times$ 10³ estruturas/mL). Após 42 horas observou-se a presença de massas de micélio submersas, todas com formato arredondado formando um tipo de “pellet” submerso, concentrado em função de força centrífuga executada pelo agitador. Em termos de rendimento, este tipo de produção gerou, em média, 1,4 $\times$ 10⁹ propágulos do fungo/100mL de massa fermentada, incluindo fragmentos de micélio e conídios submersos.

O índice de contaminação nas amostras foi de 30% em média e a viabilidade das estruturas, observada após 24 horas, foi de 96,8%. Neste caso, o principal contaminante foi uma espécie de bactéria do tipo baciliforme não identificada. Observações regulares deste meio de cultura após 6, 9, 12 e 24 horas de fermentação não evidenciaram a presença de blastósporos, com apenas poucos conídios submersos após 42 horas da inoculação. Mesmo após a centrifugação do material, a quantidade recuperada de conídios submersos foi muito reduzida. As massas de micélio, quando retiradas de MC-L e colocadas no interior de placas de Petri contendo BDA (batata-dextrose-ágar), deram origem a uma massa micelial, formando conidióforos e conídios aéreos após 24 horas.

De acordo com Van de Geest et al. (2000) as estruturas de *H. thompsonii* obtidas pela produção em meios artificiais podem variar morfológicamente em função da disponibilidade de nutrientes. Segundo Latgé; Cabrera e Prevost (1988) diferentes isolados deste patógeno produzidos “in vitro” apresentam taxa de pleomorfismo pronunciado, sendo observada a ocorrência dos conídios submersos. No entanto, de acordo com Winkelhoff e McCoy (1984) a produção destas estruturas é possível quando o substrato recebe a adição de componentes nutritivos especiais em sua constituição. Para *H. thompsonii* apenas um isolado de 14 testados foi capaz de produzir estes conídios após a adição de xarope de milho e Tween 80 no meio de cultura. A diferença morfológica básica destes em relação aos conídios aéreos é quanto à configuração da parede celular, como já foi constatado para *H. thompsonii* var *synnematososa* (WINKELHOFF; MCCOY 1984). Neste tipo de estrutura, a parede celular é fina com aspecto liso, bem diferente do que é observado nos conídios aéreos, em que a rugosidade da parede celular é uma característica nitidamente detectada e que tem função de auxiliar a adesão do conídio ao tegumento do hospedeiro (ROSSI-ZALAF; ALVES 2006a; WINKELHOFF; MCCOY 1984).

A produção do fungo utilizando-se substrato líquido pode ser mais vantajosa quando se pretende obter quantidades consideráveis de patógeno em um curto espaço de tempo. Porém, as estruturas formadas, na maioria das vezes blastósporos e, principalmente, massa micelial, podem ou não apresentar variação nos níveis de virulência, além de que a contaminação por bactérias torna-se um risco freqüente (ALVES; PEREIRA, 1998). Em larga escala, a produção em meio líquido têm sido cada vez mais utilizada, pois há maior possibilidade de controle das condições abióticas e das exigências nutricionais dos microrganismos (LEITE et al., 2003). De acordo com McCoy et al (1971) a produção de *H. thompsonii* via fermentação submersa é vantajosa, principalmente, porque a obtenção de fragmentos de micélio é elevada e há possibilidade de ocorrer a esporulação destas partículas no campo, em contato com a praga-alvo. Porém, a dependência de um alto nível populacional do hospedeiro é grande, uma vez que estas estruturas são sensíveis às variações climáticas. Desta forma, é importante a obtenção de um produto formulado, já que a formulação pode conferir ao patógeno maior estabilidade no ambiente e até maior persistência, especialmente quando a praga alvo ocorre em níveis populacionais baixos.

A produção de *H. thompsonii* em grãos de arroz pré-cozido (APC) apresentou maiores médias de concentração de conídios e U.F.C. em relação ao meio de cultura completo (MC-L). A principal diferença constatada foi de APC em relação à APC-S e APC-SM (Tabela 5).

Observou-se uma queda na viabilidade de conídios quando a massa fúngica (arroz + fungo) passou por processos de secagem com posterior moagem. Em APC a média de viabilidade foi de 86,8%, enquanto que APC-S foi de 73,04% e APC-SM foi de 52,06%. Inversamente proporcional foi o aumento da presença de contaminantes no produto final após a secagem e moagem, chegando a 80,2% em APC-SM. Estes índices indicam que, no caso de *H. thompsonii*, os processos de secagem dos grãos e moagem afetam a qualidade do produto final, tanto com relação à viabilidade dos conídios como em relação ao aumento na contaminação. Os níveis encontrados nestas observações estão acima dos níveis aceitáveis que são, no máximo, de 10% de contaminação e no mínimo 80% de viabilidade de conídios (LEITE et al., 2003).

Em relação à concentração de conídios viáveis, APC obteve 1×10^6 conídios/g, APC-S $2,3 \times 10^6$ conídios/g, sendo que APC-SM foi o que apresentou a menor concentração, com $2,8 \times 10^5$ conídios/g. Estas proporções correspondem a 1×10^{11} conídios/100Kg do produto para APC, $2,3 \times 10^{11}$ conídios/100Kg de produto para APC-S e $2,8 \times 10^{10}$ conídios/100Kg de produto APC-SM. A produção de *M. anisopliae* nestas mesmas condições permitiu rendimento médio de 6 a 11,4 Kg do fungo/100 kg do produto, com rendimento médio de 9% (ALVES; PEREIRA, 1998; LEITE et al., 2003). Desta forma, assumindo-se que, em média, 1g de conídios puros de *M. anisopliae* apresenta 5×10^{10} conídios, 6Kg de conídios puros deste fungo dão um rendimento de até 3×10^{14} conídios/100 Kg de arroz. Assim, fazendo-se uma comparação estimada, *H. thompsonii* produzido em APC pode apresentar um rendimento até 99,97% inferior à *M. anisopliae*. Em parte, a baixa produtividade de *H. thompsonii* em APC e em qualquer outro meio utilizado pode ser explicada pelas características morfológicas e fisiológicas da espécie, como a formação de 1 ou 2 conídios por conidióforo, o que diferencia este patógeno de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

No Brasil, os substratos sólidos, em especial grãos arroz, são os mais utilizados para a produção de fungos entomopatogênicos em larga escala, principalmente devido ao bom suprimento de nutrientes, água, aeração e ao baixo custo (ALVES; PEREIRA 1998; LEITE et al., 2003). Porém, no caso de *H. thompsonii* o arroz pré-cozido não se mostrou um meio adequado,

apesar da facilidade e do baixo custo, pois a qualidade do produto final obtida é baixa. Isto provavelmente tem relação com as necessidades nutricionais e fisiológicas do fungo.

2.4.2 Infecção de *Hirsutella thompsonii* em *Brevipalpus phoenicis*

2.4.2.1 Determinação da curva de concentração-mortalidade de adultos de *Brevipalpus phoenicis* a *Hirsutella thompsonii*

2.4.2.1.1 Determinação das concentrações discriminatórias

A patogenicidade de *H. thompsonii* (Esalq-1269) já foi avaliada para *B. phoenicis* em algumas destas concentrações citadas (ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006a). Todos os ácaros mortos observados apresentaram o sintoma característico do enrijecimento ventral das pernas e alterações na coloração e aspecto do tegumento, especialmente os submetidos às maiores concentrações do patógeno.

As mortalidades corrigidas de *B. phoenicis* por *H. thompsonii* variaram em função das diferentes concentrações do patógeno. Entre as concentrações $3,2 \times 10^2$ conídios/mL e 10^5 conídios/mL os níveis de mortalidade obtidos variaram de 0 a 4% (Figura 5). Apenas com a aplicação de $3,2 \times 10^5$ conídios/mL obteve-se 10% de mortalidade, seguido de 6% para 1×10^6 conídios/mL, 72% para $3,2 \times 10^6$ conídios/mL e 90% para 1×10^7 conídios/mL. O aumento de 3,2 vezes na concentração de conídios (1×10^6 para $3,2 \times 10^6$ conídios/mL) elevou em 66% os níveis de mortalidade de ácaros (de 6% para 72% para as respectivas concentrações), um padrão que tem sido verificado para outras espécies de fungos. Este aumento significativo está associado à capacidade do patógeno em causar a doença, em outras palavras, sua virulência (ALVES; LEUCUONA, 1998). Para fins de determinação da concentração-letal, é necessário que a resposta (mortalidade) seja gradativa em função do gradiente de concentração do patógeno nas suspensões aplicadas, e por isto, outros intervalos foram estabelecidos entre as concentrações de inóculo.

Figura 5- Mortalidade corrigida ($\pm$ EPM) de *Brevipalpus phoenicis* após quatro dias da inoculação de diferentes concentrações de *Hirsutella thompsonii*

Em função destes resultados, a determinação da virulência de *H. thompsonii* foi realizada utilizando o intervalo de concentrações a partir da menor, $3,2 \times 10^5$ con/mL até a maior, 1×10^7 con/mL. Entre estas, foram interpoladas mais quatro concentrações, espaçadas entre si, em progressão aritmética, com intervalo de 0,3. Assim, as concentrações estipuladas foram: $3,2 \times 10^5$, $6,3 \times 10^5$, $1,2 \times 10^6$, 5×10^6 e 1×10^7 conídios/mL, sendo que a partir delas foram realizados os testes de concentração-mortalidade para *H. thompsonii* produzido em diferentes meios de cultura.

2.4.2.1.2 Determinação das curvas de concentração-mortalidade

Todas as concentrações de *H. thompsonii* testadas aplicadas forneceram potencial de inóculo do patógeno capazes de infectar o ácaro, sendo que a mortalidade de adultos foi proporcional ao aumento da concentração de conídios. As maiores taxas de mortalidade corrigida foram observadas para o fungo produzido em MC-S, enquanto que as menores foram obtidas em ACP e ACP-SM (Tabela 6).

Tabela 6 - Mortalidade corrigida (% $\pm$ EPM) de *Brevipalpus phoenicis* após quatro dias da inoculação de *Hirsutella thompsonii* proveniente da produção “in vitro” em três diferentes substratos sólidos e um líquido⁽¹⁾

Concentrações (conídios ou propágulos/mL)	Substratos para a produção de <i>H. thompsonii</i>			
	MC-S	APC	APC-SM	MC-L
3,2x10 ⁵	34,02 $\pm$ 0,63	2,06 $\pm$ 0,28	1,10 $\pm$ 0,29	1,14 $\pm$ 0,26
6,3x10 ⁵	46,39 $\pm$ 0,67	6,19 $\pm$ 0,27	15,38 $\pm$ 0,49	12,50 $\pm$ 0,53
1,2x10 ⁶	50,52 $\pm$ 0,44	8,25 $\pm$ 0,23	16,48 $\pm$ 0,54	23,86 $\pm$ 0,49
2,5x10 ⁶	58,76 $\pm$ 0,54	14,43 $\pm$ 0,3	23,08 $\pm$ 0,47	37,50 $\pm$ 0,54
5x10 ⁶	81,44 $\pm$ 0,51	25,77 $\pm$ 0,38	29,67 $\pm$ 0,66	28,41 $\pm$ 0,33
1x10 ⁷	83,51 $\pm$ 0,6	41,24 $\pm$ 0,55	41,76 $\pm$ 0,66	54,55 $\pm$ 0,29

⁽¹⁾MC-S (meio completo sólido), APC (arroz pré-cozido), APC-SM (arroz pré-cozido após secagem e moagem); MC-L (meio completo líquido)

Os ácaros doentes apresentaram todos os sintomas da infecção pelo patógeno como alterações no comportamento, na coloração do tegumento e principalmente o enrijecimento ventral das pernas seguido de morte (ROSSI-ZALAF; ALVES 2006a). Os sinais do patógeno e as características dos sintomas da doença foram igualmente observados em todos os ácaros, independente do meio em que o fungo foi produzido. Algumas horas após a morte foi possível observar sinais do patógeno, caracterizados por hifas com formação de conidióforos típicos de *H. thompsonii* que emergiram, principalmente, da região posterior do corpo dos ácaros.

De um modo geral, os substratos em que o patógeno foi produzido afetaram a virulência de *H. thompsonii* para *B. phoenicis* (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 - Estimativa de concentração-mortalidade de *Brevipalpus phoenicis* à *Hirsutella thompsonii* produzida em meio de cultura completo e sólido, arroz pré-cozido e arroz pré-cozido seco e moído

Tratamento	N ⁽¹⁾	CL ₂₅ (conídios/mL) (95% I.C.)	Coef. Angular ± Desv. pad	χ ²	g.l
MC-S	100	1,9x10 ⁵ (4,8x10 ⁴ – 4,7x10 ⁵)	0,97±0,11	4,61	4
APC	100	4,7x10 ⁶ (3,4x10 ⁶ – 6,2x10 ⁶)	1,12±0,24	0,18	4
APC-SM	100	2,9x10 ⁶ (1,5x10 ⁶ – 4,8x10 ⁶)	0,89±0,17	2,45	4

⁽¹⁾ Número de ácaros no tratamento

Tabela 8 - Estimativa de concentração-mortalidade de *Brevipalpus phoenicis* à *Hirsutella thompsonii* produzida em meio de cultura completo e sólido e meio de cultura completo e líquido

Tratamento	N ⁽¹⁾	CL ₂₅ (conídios/mL) (90% I.C.)	Coef. Angular ± Desv. pad	χ ²	g.l
MC-S	100	2,2x10 ⁵ (1,4x10 ⁵ – 3,1x10 ⁵)	0,95±0,11	4,72	4
MC-L	100	1,9x10 ⁶ (3,3x10 ⁵ – 4,9x10 ⁶)	0,80 ±0,15	9,29	4

⁽¹⁾ Número de ácaros no tratamento

Em relação aos substratos sólidos MC-S, ACP e ACP-S, as CL₂₅ calculadas foram de 1,9x10⁵ conídios/mL, 4,7x10⁶ conídios/mL e 2,9x10⁶ conídios/mL, respectivamente. Comparando-se a amplitude dos intervalos de confiança (95% I.C.) entre as retas estimadas pode-se observar que, estatisticamente, apenas o valor da CL₂₅ de MC-S é superior aos demais, comprovando que *H. thompsonii* produzido neste meio apresentou maior virulência em relação ao patógeno produzido em arroz pré-cozido. Entre APC e APC-SM observa-se que, apesar deste último ser numericamente superior, os dois são estatisticamente semelhantes, ou seja, não há diferenças quanto à CL₂₅ devido à sobreposição dos intervalos de confiança (95%).

Para os meios MC-L e MC-S as CL₂₅ do fungo calculadas foram de 1,9x10⁶ propágulos/mL e 2,2x10⁵ conídios/mL, respectivamente, com sobreposição dos intervalos de confiança. Portanto, neste caso não houve interferência do meio de cultura na virulência de *H. thompsonii*. O mesmo resultado foi obtido por Hegedus et al. (1992) para *B. bassiana*, quando observaram que conídios

submersos e conídios aéreos apresentaram a mesma virulência quando aplicados em gafanhotos migratórios. No caso de *H. thompsonii* e *B. phoenicis*, considerando-se a pequena quantidade de conídios submersos produzidos em MC-L, a semelhança de seu grau de virulência com MC-S torna-se interessante, pois o fungo produzido em um substrato líquido apresenta outras estruturas infectivas e que podem influenciar o processo de doença. Além desta questão, este aspecto pode ser também explicado considerando as características hidrofóbicas dos conídios submersos, fenômeno que já foi relatado para *B. bassiana*. De acordo com Hegedus et al. (1992) conídios aéreos e submersos deste fungo apresentam hidrofobicidade similares, fenômeno causado pela configuração da parede celular dessas estruturas e que interfere na capacidade de adesão ao tegumento do hospedeiro, consequentemente interferindo na virulência.

De uma maneira geral, as variações nos níveis de virulência de *H. thompsonii* produzido nestes diferentes meios de cultura podem estar associadas à diversos fatores relacionados ao patógeno, ao hospedeiro entre outros.

Conceitualmente, a virulência é definida como o grau de capacidade do patógeno em causar doença e os níveis em que este processo é provocado (ALVES; LEUCUONA, 1998). É uma característica biológica alterável e representa a intensidade com que a enfermidade é causada. Algumas propriedades microbianas denominadas fatores de virulência podem acentuar ou não a patogenicidade, um caráter genético (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Estes fatores não são óbvios para alguns patógenos, mas no geral, envolvem a ocorrência e ação de toxinas no hospedeiro (endotoxinas e exotoxinas), ação de enzimas extracelulares (quitinases, lipases e proteases) e fatores celulares, que são intrínsecos à configuração dos patógenos. Como é considerado um fator quantitativo, o grau da virulência é determinado por parâmetros relacionados à mortalidade como DL_{50} , CL_{50} e/ou TL_{50} ou outros fatores, como redução no “fitness” (custo adaptativo) ou danos nos tecidos atacados pelo patógeno (SHAPIRO-ILAN et al., 2005).

Com relação ao hospedeiro algumas características bióticas intrínsecas à espécie-alvo podem interferir na virulência de determinado patógeno. Assim, suas estratégias reprodutivas, densidade, biologia, migrações e principalmente a predisposição à doença são fatores que afetam o desenvolvimento destas (ALVES; LEUCUONA, 1998). Diferentemente do que é observado em campo, estudos realizados em laboratório com espécies criadas artificialmente apresentam a vantagem de reduzir estas variações, obtendo-se assim resultados mais precisos. No caso de *B.*

phoenicis as variações são ainda menores, pois esta espécie apresenta reprodução por partenogênese telítoca (PIJNACKER et al., 1980) em que os indivíduos originados são “clones” e não estão sujeitos à grandes alterações quanto à resposta ao entomopatógeno.

Com relação aos aspectos do patógeno, diferenças quanto à qualidade nutricional dos meios de cultura utilizados para produção de *H. thompsonii* podem ter alterado seus níveis de virulência. Assim, os conídios de *H. thompsonii* provenientes de MC-S, que é um meio de cultura rico em diversos nutrientes, podem ser mais ativos e mais virulentos do que os conídios obtidos de APC, um substrato basicamente composto de amido. De acordo com Alves (1998) a produção de enzimas por entomopatógenos tem sido estudadas, entre outros objetivos, com a finalidade de correlacionar sua ocorrência à processos de especificidade, patogenicidade e virulência. Desta forma, embora muitos meios de cultura sejam capazes de manter intactas as características intrínsecas do patógeno, culturas “in vitro” comumente podem causar redução na virulência (TANADA; KAYA, 1993). Um exemplo ocorre com *H. thompsonii* e a produção de toxinas. Segundo Alves (1998) meios de cultura mais pobres em determinados nutrientes reduzem a capacidade do fungo em produzir a toxina Hirsutellina, alterando sua virulência. De acordo com Hegedus et al. (1992) aumento na virulência de blastósporos de *B. bassiana* a gafanhotos migratórios ocorre devido ao aumento na atividade metabólica destas estruturas, pois são produzidas em condições de abundância e riqueza de nutrientes.

Outro aspecto ligado à virulência está relacionado diretamente com a viabilidade das estruturas infectivas. Certamente, as condições mais adequadas de nutrição promoveram obtenção de maior quantidade de estruturas infectivas viáveis e ativas. Este aspecto pode explicar as diferenças na virulência de *H. thompsonii* produzida em MC-S e *H. thompsonii* obtida de APC e APC-SM, pois as concentrações efetivas que foram aplicadas aos ácaros foram proporcionais aos níveis de viabilidade de conídios. Porém, é interessante observar que mesmo estes níveis sendo menores, as taxas de virulência de *H. thompsonii* proveniente de APC e APC-SM não foram diferentes entre si pela sobreposição dos intervalos de confiança (95%) (Tabela 7). Observações semelhantes comprovaram que a baixa viabilidade de produtos a base de *H. thompsonii* também afetaram a eficiência de controle, conforme esperado. Segundo Gardner; Oetting e Storey (1982) uma formulação comercial de *H. thompsonii* com 40 a 45% de viabilidade de conídios utilizada para controle de *T. urticae* em casa-de-vegetação causou níveis de mortalidade não superiores a 42%, muito menores do que os demais testados. Para diferentes

formulações de *B. bassiana* (sílica gel, arroz moído, talco e farelo de milho) a viabilidade de conídios é muito variável em função das condições de estocagem e da formulação, o que acabou afetando os níveis de virulência em insetos-teste (*Solenopsis saevissima* e *Diatraea saccharalis*) (ALVES et al., 1996).

A capacidade de um patógeno causar a mortalidade do hospedeiro com baixo potencial de inóculo é um aspecto importante, especialmente no caso de *H. thompsonii*. Este fungo possui capacidade limitada de esporulação, especialmente quando produzido em um meio de cultura mais simples como é o caso do arroz. A baixa concentração de conídios provenientes desses meios pode promover a morte do ácaro em um curto espaço de tempo. Porém, não é possível afirmar que estes níveis de eficiência obtidos em laboratório serão os mesmos em situação de campo. No caso de ACP-SM, em que há possibilidade do aumento dos níveis de contaminação do produto e inviabilização dos conídios após a moagem, em campo, a eficiência pode ser drasticamente reduzida.

Os valores de CL_{50} apenas foram estimados pelo programa POLO-PC, uma vez que a mortalidade observada nos tratamentos foi superior à 50% somente para MC-S. Neste caso, observou-se o mesmo padrão descrito anteriormente, ou seja, a virulência de *H. thompsonii* produzido em MC-S foi superior aos demais tratamentos [$9,4 \times 10^5$ ($5,1 \times 10^5 - 1,4 \times 10^6$)]. Estes resultados revelam que a agressividade de *H. thompsonii* é relevante quando comparado a outras espécies de ácaros fitófagos. Para o ácaro branco, *P. latus* o valor da CL_{50} de *H. thompsonii* encontrada foi de 2×10^3 conídios/mL, muito inferior ao observado para adultos de *B. phoenicis* (PEÑA; OSBORNE; DUNCAN, 1996). Gardner; Oetting e Storey (1982) comprovaram que para *T. urticae* níveis de 97% de mortalidade foram observados quando se aplicou apenas um conídio na superfície do tegumento. De maneira semelhante, este patógeno vem se mostrando superior quando comparado à outras espécies de deuteromicetos aplicados em ácaros. Para *P. oleivora*, por exemplo, a CL_{50} de *B. bassiana* produzida em MC-S foi de $4,23 \times 10^6$ conídios/mL após 5 dias (ALVES et al., 2005). Já para *T. urticae*, a CL_{50} de um isolado comercial de *B. bassiana* (ESALQ-PL63) foi de $1,9 \times 10^7$ conídios/mL (TAMAI, 2002).

Além dos aspectos relacionados ao fungo e ao hospedeiro, a forma de aplicação da suspensão de conídios no hospedeiro foi um fator que alterou os níveis de virulência de *H. thompsonii*. Este fato pode ser comprovado e comparando os valores de CL_{25} de *H. thompsonii* produzido em MC-S, pois este foi aplicado sobre *B. phoenicis* por meio de torre de Potter e

pulverizador manual. As diferenças entre os dois equipamentos ocorrem, principalmente, com relação à distribuição das gotas da suspensão que atingiram o organismo-alvo. Assim, na aplicação via pulverizador o volume de calda aplicado foi, em média, duas vezes maior do que na torre, o que consequentemente alterou o número de estruturas que são depositadas sobre uma determinada área (Tabela 9). Mesmo assim, não foram observadas diferenças estatísticas quanto CL_{25} de *H. thompsonii* de acordo com os dois métodos de aplicação, o que indica que não houve efeito deste fator na virulência. Certamente, a torre de Potter é um equipamento de maior precisão devido à grande uniformidade tanto na deposição da calda como no tamanho de gotas formadas, sendo mais adequada para a realização de bioensaios de laboratório que exigem controle destas variações. Porém, não foi possível realizar a aplicação de *H. thompsonii* proveniente de MC-L via torre de Potter devido à formação das massas de micélio que entupiam o bico de pulverização.

Tabela 9 - Médias de volume de calda ($\text{mg}/\text{cm}^2 \pm \text{EPM}$) e do número de colônias de *Hirsutella thompsonii* ($\text{UFC}/\text{cm}^2 \pm \text{EPM}$) obtidas em dois métodos de aplicação, torre de Potter e pulverizador manual

Equipamento de aplicação	Colônias de <i>H. thompsonii</i> (UFC/cm^2)	Volume de calda aplicada (mg/cm^2)
Torre de Potter	$3,16 \pm 0,24$ A a	$1,69 \pm 0,36$ A a
Pulverizador manual	$11,77 \pm 1,33$ B b	$7,86 \pm B$ b

($P \leq 0,01$) Letras maiúsculas e minúsculas para comparação de médias nas colunas

A análise gráfica das curvas de concentração-mortalidade foi baseada na diferença entre os coeficientes angulares da reta (b). Assim, foi possível realizar uma comparação mais efetiva entre as retas de mortalidade que apresentaram paralelismo entre si (Figuras 6 e 7). Os valores calculados das potências relativas de APC e APC-SM em relação ao MC-S foram de 0,04 (0,03-0,07) e 0,07 (0,04-0,11), o que significa que para se obter os mesmos resultados observados para MC-S o valor da CL_{25} destes deve ser maior nestas respectivas proporções. No caso de MC-L e MC-S não houve diferença entre as retas.

Figura 6- Concentração-mortalidade de *Brevipalpus phoenicis* a *Hirsutella thompsonii*. A- *H. thompsonii* produzido em meio de cultura completo e sólido (MC-S). B- *H. thompsonii* produzido em arroz pré-cozido (APC). C- *H. thompsonii* produzido em arroz pré-cozido seco e moído (APC-SM)

Figura 7- Concentração-mortalidade de *Brevipalpus phoenicis* a *Hirsutella thompsonii*. A- *H. thompsonii* produzido em meio de cultura completo e sólido (MC-S). B- *H. thompsonii* produzido em meio de cultura completo e líquido (MC-L)

2.4.2.2 Patogenicidade de *Hirsutella thompsonii* a diversas populações de *Brevipalpus phoenicis* provenientes do Estado de São Paulo

De acordo com os resultados de mortalidade de *B. phoenicis* ao terceiro e quarto dias da aplicação houve efeito significativo da inoculação do patógeno em todas as populações do ácaro (Tabelas 10 e 11).

Após três dias da inoculação, observou-se que as maiores mortalidades nas populações de Gavião Peixoto, Bauru e Barretos, com índices acima de 80%. Nestas populações, os níveis observados não foram estatisticamente diferentes dos observados na população Piracicaba,

embora o número de mortos encontrados nesta última tenha sido um pouco inferior às demais. A população que apresentou o menor índice de mortalidade foi Onda Verde, sendo estatisticamente diferente à Gavião Peixoto, Bauru e Barretos, mas não diferindo de Piracicaba (Tabela 10). Neste caso, embora a mortalidade tenha sido bem inferior às demais (46%) observou-se um grande número de indivíduos moribundos, com sintomas da infecção pelo patógeno.

Tabela 10- Mortalidade de adultos de *Brevipalpus phoenicis* ($\pm$ EPM) coletados em diversas regiões citrícolas do Estado de São Paulo após três dias da aplicação de *Hirsutella thompsonii* (1×10^7 conídios/mL)

Tratamentos	Piracicaba	Onda Verde	Gavião Peixoto	Bauru	Barretos
Testemunha	4 $\pm$ 4 A a	2 $\pm$ 2 A a	0 $\pm$ 0 A a	0 $\pm$ 0 A a	4 $\pm$ 4 A a
<i>H thompsonii</i>	78 $\pm$ 11,6 B ab	46 $\pm$ 4 B b	94 $\pm$ 2,4 B a	84 $\pm$ 8 B a	94 $\pm$ 4B a

($P \leq 0,06$) Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha

Decorridos quatro dias da inoculação, não foram constatadas diferenças na mortalidade do ácaro entre as cinco populações (Tabela 11). Assim, apesar da morte dos adultos da população Onda Verde ter sido relativamente mais lenta, a porcentagem de mortos foi superior a 90%, sendo semelhante às demais. As populações mais sensíveis ao fungo foram as provenientes de Bauru e Barretos, com 98% de mortalidade. A grande maioria dos cadáveres encontrados apresentou sinais do patógeno.

Tabela 11 - Mortalidade de adultos de *Brevipalpus phoenicis* ($\pm$ EPM) coletados em diversas regiões citrícolas do Estado de São Paulo após quatro dias da aplicação de *Hirsutella thompsonii* (1×10^7 conídios/mL)

Tratamentos	Piracicaba	Onda Verde	Gavião Peixoto	Bauru	Barretos
Testemunha	4 $\pm$ 4 A a	4 $\pm$ 2,4 Aa	0 $\pm$ 0 Aa	0 $\pm$ 0 Aa	4 $\pm$ 4 Aa
<i>H thompsonii</i>	94 $\pm$ 4 Ba	94 $\pm$ Ba	96 $\pm$ 2,4 Ba	98 $\pm$ 2 Ba	98 $\pm$ 2 Ba

($P \leq 0,06$) Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha

Com relação à oviposição, foram observadas diferenças estatísticas quanto ao número de ovos encontrados entre as diferentes populações do ácaro e também entre os tratamentos testemunha e *H. thompsonii* (Tabela 12). De um modo geral, *H. thompsonii* afetou a taxa de postura do ácaro proveniente de todas as regiões, à exceção de Onda Verde.

As diferenças entre as populações foram observadas, separadamente, nos dois tratamentos. Na ausência do patógeno, houve uma variação na taxa de postura apenas entre as populações Piracicaba e Gavião Peixoto, sendo a primeira muito inferior à segunda. Já no tratamento com o entomopatógeno, observou-se que as fêmeas provenientes de Onda Verde ovipositaram mais em relação às de Piracicaba e Gavião Peixoto, não diferindo de Bauru e Barretos. Assim, à semelhança do que foi constatado com relação à suscetibilidade, os ácaros provenientes de Onda Verde foram menos afetados pelo patógeno em relação às demais regiões, uma vez que a média de ovos encontrados foi a mesma da testemunha. Provavelmente, este fato pode ser decorrente da velocidade de infecção e o atraso para o início do processo de doença, o que não afetou a capacidade de oviposição das fêmeas.

Tabela 13 - Média de ovos de *Brevipalpus phoenicis* ($\pm$ EPM) de diversas populações, observados após quatro dias da aplicação de *Hirsutella thompsonii* (1×10^7 conídios/mL)

Tratamentos	Piracicaba	Onda Verde	Gavião Peixoto	Bauru	Barretos
Testemunha	7 $\pm$ 2,6 A a	16,6 $\pm$ 1 A ab	17,4 $\pm$ 3,7 A b	13,8 $\pm$ 1,6 A ab	13,8 $\pm$ 2,4 A ab
<i>H thompsonii</i>	1,6 $\pm$ 0,8 B a	12,6 $\pm$ 2 A b	2,8 $\pm$ 0,6 B a	5,8 $\pm$ 0,8 B ab	5,6 $\pm$ 1,3 B ab

($P \leq 0,06$) Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha

De maneira geral, o desenvolvimento do processo de doença envolve características intrínsecas tanto do patógeno como do hospedeiro, os quais são afetados pelo ambiente. Com relação ao hospedeiro, os fatores envolvidos são as características da população como densidade, bioecologia e predisposição. No tocante ao patógeno, a virulência, patogenicidade, infectividade, disseminação, reprodução e sobrevivência são aspectos que devem ser considerados no desenvolvimento da doença (ALVES; LEUCUONA, 1998).

Este conjunto de fatores torna a doença um processo complexo, permitindo a ocorrência de uma grande variabilidade de respostas do hospedeiro. Assim, naturalmente há casos em que os hospedeiros são tolerantes aos patógenos, mas também há possibilidade de ocorrer redução na suscetibilidade natural deste devido à maior ou menor expressão de seus mecanismos de defesa. Neste sentido, os principais grupos de patógenos em que têm sido reportados casos de tolerância ou mesmo desenvolvimento de resistência são alguns vírus, bactérias e protozoários, embora o número seja insignificante se comparado aos casos de resistência à pesticidas (OMOTO; ALVES, 1998).

De acordo com Brieese (1986) citado por Nilsen; Kiena e Hajeck (2005), com relação aos fungos entomopatogênicos há uma tendência de hospedeiros tornarem-se não suscetíveis a esses patógeno. Este fenômeno já foi relatado para clones do pulgão *Acyrtosiphon psium* que apresentaram grande variabilidade de resposta à Entomophthorales como *Pandora neoaphidis*, *P. kondiensis* e também *Conidiobolus obscurus*, sendo alguns indivíduos não suscetíveis (FERRARI et al., 2001). Trabalho realizado por Nilsen; Kiena e Hajeck (2005) com linhagens de *Entomophaga maimaiga* e populações de *Lymantria dispar* provenientes da Ásia, Europa e América do Norte, demonstrou que estes insetos são diferentemente afetados pelo entomopatógeno. Estas observações também já foram constatadas para fungos imperfeitos (Deuteromycetes). Populações de *Melolontha melolontha* provenientes da Suíça apresentaram menor suscetibilidade à *Beauveria brongniartii* quando comparadas à populações da Itália (KELLER; SCWEIZER; SHAH, 1999).

No caso de *B. phoenicis*, a variabilidade de resposta a *H. thompsonii* pode ser explicada por fatores relacionados ao hospedeiro, uma vez que a qualidade do patógeno e as condições de temperatura e umidade foram controladas. Assim, a ocorrência de variabilidade genética entre as populações e as características do tegumento dos ácaros podem ter influenciado a suscetibilidade do hospedeiro ao patógeno, como fatores de predisposição.

Com relação à variabilidade genética, as mesmas populações de *B. phoenicis* observadas neste estudo foram avaliadas por Alves (2004) por meio de técnicas de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD-PCR). Neste caso, além de avaliar a variabilidade das populações das diferentes regiões, foram realizadas análises em ácaros provenientes de dois hospedeiros, citros (*C. sinensis*) e sansão-do-campo (*Mimosa caesapiniaefolia* Benth). Os resultados indicaram a existência de variabilidade genética entre as populações provenientes dos dois hospedeiros, mas sem variação entre as diferentes regiões geográficas para um mesmo hospedeiro. Assim, Alves (2004) citou que as variações observadas entre as populações dos dois hospedeiros podem ser explicadas devido à algumas peculiaridades da bioecologia de *B. phoenicis*. A primeira questão é quanto ao tipo de reprodução desta espécie que é partenogenética e favorece pouca ou ausência de variação (PIJNACKER et al., 1980). Em segundo, a capacidade limitada de dispersão que pode causar um isolamento espacial das populações impedindo o fluxo gênico (ALVES; CASARIN; OMOTO, 2005) e por fim, a possibilidade de existência de biótipos.

Com relação ao tegumento, esta é uma barreira físico-química que pode variar entre espécies ou mesmo intra-especificamente, dependendo das condições climáticas (ALVES; LEUCUONA, 1998). Para *B. phoenicis*, Rossi-Zalaf e Alves (2006a) comprovaram que a maioria dos conídios de *H. thompsonii* germinados estavam aderidos à superfície do histerossoma nas bases das setas, provavelmente regiões menos esclerotizadas. Assim, ácaros provenientes de regiões mais secas podem ter uma camada de cera mais espessa, o que dificulta o processo de penetração dos conídios e consequentemente a colonização. Uma vez que *B. phoenicis* apresenta uma baixa capacidade de dispersão (ALVES; CASARIN; OMOTO., 2005) as diferenças entre as populações podem ser expressas neste sentido. Observações semelhantes foram realizadas por Nilsen; Kiena e Hajeck (2005) com *L. dispar* e *E. maimaiga*. Embora tenham sido constatadas diferenças mínimas, as respostas de *E. maimaiga*, tanto em termos de virulência como em custo adaptativo, não foram as mesmas entre populações provenientes da Europa e da Ásia, indicando que estas alterações podem ser decorrentes das diferenças na composição da cutícula desses dois biótipos.

2.4.2.3 Patogenicidade de *Hirsutella thompsonii* a ovos de *Brevipalpus phoenicis*.

A aplicação de *H. thompsonii* em ovos de *B. phoenicis* não afetou, de maneira significativa, a eclosão de larvas do ácaro (Tabela 13). Após o quarto dia da obtenção dos ovos iniciou-se o aparecimento das primeiras larvas, atingindo quase 50% após 7 dias. Estes valores são semelhantes aos encontrados na literatura. De acordo com Childers; French; Rodrigues (2003b), em folhas de chá, o tempo de duração da fase de ovo a 26°C foi de $9,5 \pm 1,7$ dias. Entre os dois dias avaliados foram observadas diferenças estatísticas quanto à média de larvas eclodidas em cada tratamento, chegando a quase 80% no décimo dia, o que indica que a metodologia utilizada foi adequada para a realização dos bioensaios.

Ao sétimo dia, a porcentagem de indivíduos obtidos foi semelhante tanto na testemunha como no tratamento com o fungo. Após 10 dias, constatou-se cerca 77% de eclosão de larvas na testemunha contra 74% de *H. thompsonii*, valores que não diferiram estatisticamente entre si. As diferenças estatísticas apenas foram observadas entre os dias de avaliação, pois o número de larvas que eclodiram no décimo dia foi superior ao observado após sete dias, nos dois tratamentos. Nas duas avaliações observou-se 100% de larvas sadias. Esses insetos não apresentavam qualquer tipo de alteração comportamental e/ou sintomas e sinais da presença de *H. thompsonii*.

Decorridos dez dias da avaliação foi possível coletar ovos não infectados remanescentes sobre o substrato (arena foliar de citros) já em processo de degradação. Mesmo após a observação dos ovos esmagados em microscópio de luz, não foram encontrados, em nenhuma amostra, sinais e/ou sintomas do fungo.

Tabela 13 – Média de larvas de *Brevipalpus phoenicis* (% $\pm$ EPM) eclodidas após 7 e 10 dias da inoculação (d.a.a.) de *Hirsutella thompsonii* (1×10^7 conídios/mL) em ovos

Tratamentos	7 d.a.a.	10 d.a.a.
Testemunha	$49 \pm 6,5$ A a	$76,5 \pm 3,33$ A b
<i>Hirsutella thompsonii</i>	$44 \pm 4,5$ A a	$73,5 \pm 2,24$ A b

($P \leq 0,05$) Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha.

Embora os adultos de *B. phoenicis* sejam suscetíveis a *H. thompsonii*, o fungo não foi capaz de infectar seus ovos. Este fato pode estar associado às características físico-químicas do córion dos ovos. A dureza e rigidez desta membrana podem ter dificultado a germinação dos conídios e

penetração do fungo, não sendo digerido pelas suas enzimas e resistente aos danos mecânicos causados pelo turbo germinativo e/ou apressórios. Outro aspecto é quanto à presença da substância viscosa nos ovos, cuja função é a proteção de danos físicos (JEPPSON; KEIFER; BAKER, 1975). Neste caso, a presença de alguns compostos químicos pode ter inviabilizado os conídios.

No entanto, o efeito de algumas espécies de fungos entomopatogênicos a ovos de ácaros fitófagos tem sido avaliado e confirmado, o que reforça a idéia de que os ovos de *B. phoenicis* são tolerantes à infecção por *H. thompsonii*. Assim, os fungos *B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *M. anisopliae* foram patogênicos a ovos de *Tetranychus cinnabarinus*, um tetraniquídeo conhecido como “carmine spider mite”. Após uma semana da aplicação de conídios destes fungos sobre os ovos, observou-se que os mesmos apresentaram sintomas de infecção, como alterações na coloração e na estrutura física, tornando-se ligeiramente encolhidos (SHI; FENG, 2004). Também, *B. bassiana* conseguiu infectar ovos de *T. urticae*, causando alterações como mudança de coloração, tornando-os murchos e com presença de micélio e cristais em seu interior (TAMAI, 2002). Em *Tetranychus evansi*, a aplicação de diferentes concentrações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* constatou a suscetibilidade dos ovos às duas espécies de fungo, apresentando maior mortalidade em função do aumento da concentração (WEKESA et al., 2006).

2.4.2.4 Efeito da temperatura e umidade relativa do ar na infecção de *Hirsutella thompsonii* em adultos de *Brevipalpus phoenicis*

A mortalidade de ácaros por *H. thompsonii* foi influenciada pelas condições de ambiente as quais os indivíduos foram submetidos após a aplicação do patógeno (Tabela 14).

Em todas as temperaturas e umidades avaliadas foram constatadas diferenças estatísticas entre a mortalidade de ácaros na testemunha e a mortalidade promovida por *H. thompsonii*, a exceção da temperatura de 18°C. Nesta condição não houve diferenças entre o número de mortos pelo fungo e os ácaros não inoculados (testemunha), ou mesmo entre as umidades relativas no mesmo tratamento, sendo a maior média de mortalidade observada de 2,5 (95-99% de UR) para os ácaros inoculados com *H. thompsonii*. A baixa mortalidade observada comprova que o processo de doença foi muito afetado por estas condições de ambiente, especialmente 18 °C/40-45% de UR.

Nas demais condições de temperatura e umidade, a mortalidade de ácaros observada no tratamento com o fungo foi estatisticamente superior às observadas na testemunha. Neste tratamento, não houve diferenças de mortalidade, o que indica que *B. phoenicis* estabeleceu-se adequadamente ao substrato e suportou as condições, inclusive de alta umidade relativa. Já no tratamento com *H. thompsonii*, foi possível observar que a ocorrência da doença foi afetada pelas condições de temperatura e umidade a que os ácaros foram mantidos.

Os maiores índices de mortalidade foram constatados na temperatura de 30°C em todas as umidades avaliadas, não havendo diferenças entre elas. De maneira semelhante, as condições de 26°C/60-65%UR, 26°C/80-85%UR, 22°C/60-65%UR e 22°C/80-85%UR não diferiram de 30 °C em todas as umidades testadas, embora os valores de mortalidade observados tenham sido menores. Assim, tanto na temperatura de 26°C como na de 22°C, os ambientes que proporcionaram melhores condições ao patógeno foram os de umidades medianas de 60-65% e 80-85%, sendo superiores a 40-45% e 95-99% em ambos os casos.

Tabela 14 – Médias de mortalidade ($\pm$ EPM) de adultos de *Brevipalpus phoenicis* em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar após 4 dias da inoculação de *Hirsutella thompsonii* (1×10^7 conídios/mL)

Temperatura	Umidade Relativa (variação)	Testemunha	<i>Hirsutella thompsonii</i>			
18°C	40% - 45%	0,33 $\pm$ 0,2	A	a	0,67 $\pm$ 0,4	F a
	60% - 65%	0,17 $\pm$ 0,2	A	a	1,33 $\pm$ 0,4	EF a
	80% - 85%	0,50 $\pm$ 0,2	A	a	1 $\pm$ 0,3	EF a
	95% - 99%	0,5 $\pm$ 0,2	A	a	2,5 $\pm$ 1,9	EF a
22°C	40% - 45%	1 $\pm$ 0,3	A	a	4,17 $\pm$ 0,7	DE a
	60% - 65%	0,83 $\pm$ 0,4	A	a	13,5 $\pm$ 1,4	ABC b
	80% - 85%	0,83 $\pm$ 0,4	A	a	15,5 $\pm$ 0,7	AB b
	95% - 99%	1,83 $\pm$ 0,6	A	a	9,7 $\pm$ 1,1	BC b
26°C	40% - 45%	0,33 $\pm$ 0,2	A	a	6,83 $\pm$ 1,2	CD b
	60% - 65%	1 $\pm$ 0,3	A	a	13,3 $\pm$ 1,6	ABC b
	80% - 85%	1,17 $\pm$ 0,4	A	a	14,5 $\pm$ 1,1	ABC b
	95% - 99%	1,5 $\pm$ 0,7	A	a	9,5 $\pm$ 0,8	B b
30°C	40% - 45%	2,67 $\pm$ 0,5	A	a	17,2 $\pm$ 0,6	A b
	60% - 65%	2,7 $\pm$ 1,2	A	a	15 $\pm$ 0,9	A b
	80% - 85%	1,83 $\pm$ 0,5	A	a	17,6 $\pm$ 0,9	A b
	95% - 99%	1,7 $\pm$ 0,5	A	a	17,8 $\pm$ 0,8	A b

($P \leq 0,05$) Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha.

Um aspecto interessante observado é quanto à variabilidade dos índices de mortalidade constatados em todas as umidades relativas a 22°C e 26°C. Nestas duas condições de temperatura, a mortalidade aumentou com o aumento da umidade relativa do ar, mas tornou a cair quando estes níveis ultrapassaram 95%, condição em que havia a presença de água livre nos dessecadores. Esses resultados não foram constatados nas temperaturas de 18°C e 30°C, pois nessas condições a mortalidade manteve-se regular, sendo muito baixa ou muito alta,

respectivamente, nos dois ambientes. Assim, para 22°C e 26°C foi possível o estabelecimento de curvas de mortalidade com modelos matemáticos de previsão do tipo polinômios de segundo grau, calculados baseando-se nas médias das repetições (Figuras 8 e 9).

Assim, para a temperatura de 22 °C foi possível estabelecer a curva de mortalidade, na qual o número de mortos (y) é função da umidade relativa (x), podendo ser expressa pela seguinte equação: $y = -0,0111x^2 + 1,6072x - 42,481$. Realizando-se a primeira derivada desta equação foi determinada a umidade relativa ótima que ficou em torno de 72,4%UR, a qual pode promover uma mortalidade máxima de 78,5% de adultos infectados.

De maneira semelhante, para a temperatura de 26 °C a curva de mortalidade (número de mortos em função do tempo) é a seguinte: $y = -0,0085x^2 + 1,2023x - 27,805$. Assim, usando-se a primeira derivada da equação foi possível determinar que a umidade relativa ótima foi de 70,7%UR, permitindo uma mortalidade máxima de 73,55% de ácaros. Nos dois casos, as equações foram significativas, apresentando índices de R^2 iguais a 0,99 e 0,98, respectivamente.

Figura 8- Curva de mortalidade de *Brevipalpus phoenicis* após a aplicação de *Hirsutella thompsonii* e manutenção em condições de 22°C e diferentes umidades relativas do ar (%)

Figura 9- Curva de mortalidade de *Brevipalpus phoenicis* após a aplicação de *Hirsutella thompsonii* e manutenção em condições de 26°C e diferentes umidades relativas do ar (%)

De acordo com Alves e Leucuona (1998) apenas a presença de propágulos de um patógeno virulento sobre um hospedeiro suscetível não é condição suficiente para que este seja colonizado, sendo os fatores ambientais determinantes ao sucesso do processo de doença. A temperatura e umidade relativa são fatores abióticos que afetam consideravelmente o desenvolvimento de fungos entomopatogênicos e outros entomopatógenos. Estes efeitos são bastante amplos, não alterando apenas o processo de doença propriamente dito, mas também as etapas em que o patógeno encontra-se fora do corpo do hospedeiro. Assim, além da germinação dos conídios e da conidiogênese, a disseminação e sobrevivência no ambiente são afetados pela temperatura e umidade relativa (HAJECK; LEGER, 1994). Um aspecto a ser ressaltado é que o estudo dos fatores isoladamente não é representativo, daí a importância de simular o efeito combinado (ALVES; LEUCUONA, 1998).

Os limites térmicos ideais ao desenvolvimento de fungos entomopatogênicos estão entre 20°C e 30°C, mas estes podem variar dependendo da espécie (ALVES; LEUCUONA, 1998; HAJECK; LEGER, 1998). Para *H. thompsonii*, Keneth; Muttath e Gerson (1979) determinaram que este patógeno desenvolve-se bem em níveis de 25 a 30°C, assemelhando-se ao que vem sendo constatado para *B. bassiana*. Segundo McCoy (1996) neste limite térmico, os conídios de *H. thompsonii* demoram cerca de quatro horas para germinar e penetrar no hospedeiro, causando infecção e conseqüentemente a morte em torno de quatro dias, o que foi constatado para *B. phoenicis* neste trabalho. As temperaturas limitantes são aquelas que estão abaixo de 13°C e acima de 35°C (GERSON; KENNETH; MUTTATH, 1979). Comparativamente a outros fungos, esta espécie pode suportar grandes variações, diferente, por exemplo, de *Nomuraea rileyi*, a qual é mais exigente com relação a este fator. De acordo com Tang e Hou (2001) o limite deste fungo varia de 20 a 25 °C, sendo a sua patogenicidade a *Heliothis armigera* bastante afetada quando a temperatura encontra-se fora destes valores.

Com relação à umidade relativa, este é um fator abiótico muito importante para a germinação dos conídios e penetração de *H. thompsonii* na hemocèle de hospedeiros, um padrão já constatado para fungos entomopatogênicos em geral. Segundo Gerson; Kenneth e Muttath (1979), este microrganismo é dependente de altas umidades relativas para o sucesso da infecção, ou seja, quanto maior o tempo de permanência de um hospedeiro infectado por *H. thompsonii* em ambiente saturado, maior é a taxa de infecção. Embora isso seja o ideal para o patógeno, a doença

também pode ocorrer mesmo em condições adversas de umidade, pois os conídios germinam devido a presença de água no tegumento do hospedeiro.

Assim, os bioensaios realizados com *B. phoenicis* comprovaram que a virulência de Esalq-1269 foi influenciada pela temperatura e pela umidade relativa do ar, ficando evidente que algumas combinações destes fatores são mais determinantes que outras. No caso de 18°C, temperatura em que o patógeno apresentou menor desempenho, a ocorrência de níveis considerados ótimos de umidade relativa do ar não foi suficiente para que *H. thompsonii* promovesse a doença no ácaro. Este aspecto também foi constatado por Tang e Hou (2001) após estudarem o efeito da temperatura e umidade relativa na patogenicidade de *N. rileyi* para *H. armigera*. A não constatação da mortalidade de *B. phoenicis* ao quarto dia, em todas as condições de umidade, pode estar relacionada aos efeitos adversos da baixa temperatura no metabolismo dos conídios. Assim, é possível, que tenha ocorrido um atraso na germinação, e que a avaliação após 7 ou mais dias da inoculação permita a verificação de mortalidade dos adultos.

Por outro lado, temperaturas elevadas promoveram altos índices de mortalidade do ácaro da leprose, mesmo quando as condições de umidade relativa foram inferiores a 50%, como foi o caso do ambiente a 30°C. Uma possível explicação para este padrão de atividade de *H. thompsonii* (Esalq-1269) pode estar associada às características genéticas do isolado. Esta linhagem foi obtida de eriofídeos em seringais (*C. heveae*) na região de Caçú (MT), um local onde as temperaturas são elevadas e a umidade pode variar grandemente ao longo do ano. Este fato pode explicar a maior eficiência do fungo em uma temperatura elevada quando comparado com temperaturas mais amenas, de 22°C e 26°C. Há relatos na literatura que, embora os limites térmicos ideais ao desenvolvimento do fungo estejam entre 25 e 30°C, *H. thompsonii* pode suportar temperaturas mais elevadas. De acordo com Kanga, James e Boucias (2002), a utilização de um isolado desta espécie para o controle do ácaro *V. destructor*, um parasita de abelhas, foi muito eficiente quando aplicado em colméias com temperatura interna de 34±1°C, apesar do crescimento mais lento. Assim, em um contexto mais prático, este é um aspecto desejável para um isolado que será utilizado para controle de ácaros em citros no Estado de São Paulo, onde, mesmo no inverno, as temperaturas diárias podem alcançar 30°C com baixa umidade relativa do ar.

A determinação das umidades relativas ótimas nas temperaturas de 22°C e 26°C também reforçam esta hipótese. Se considerarmos que as umidades ótimas estimadas são de 72,4% e

70,7%, respectivamente para 22°C e 26°C, níveis inferiores à este valor podem permitir atividade do patógeno e obter eficiência de controle moderada, o que é positivo em termos de controle biológico. Desta forma, tanto durante verão, que é uma época de alta umidade relativa, como nos dias mais quentes do inverno, *H. thompsonii* pode ter uma boa eficiência sobre *B. phoenicis*, já que ácaro ocorre o ano todo no pomar de citros. Paralelamente, durante o verão, o fungo também pode causar a mortalidade do ácaro da falsa ferrugem dos citros (*P. oleivora*), promovendo controle desta praga cuja época de ocorrência é no início do ano. Porém, baixas temperaturas associadas a baixas umidades relativas do ar são condições inadequadas para *H. thompsonii* (Esalq-1269), o que pode comprometer o controle de *B. phoenicis* nos meses mais frios e secos do ano, como agosto. Assim, é importante ressaltar que no caso de leprose o sucesso da redução dos níveis de dano da praga está diretamente associado ao manejo do ácaro, combinando táticas de controle e buscando explorá-las de acordo com suas vantagens e também limitações.

2.4.2.5 Caracterização morfológica e virulência de isolados exóticos de *Hirsutella thompsonii*

A observação de alguns caracteres morfológicos dos isolados exóticos e do isolado nativo de *H. thompsonii* permitiu a constatação de diferenças entre estes (Tabela 15).

Das características avaliadas, apenas a dimensão dos conídios foi semelhante entre as diversas linhagens. Foram observados conídios com tamanhos variando de 4,60 a 4,88µm, sendo o isolado CG-532 o que apresentou maior dimensão de conídios quando comparado aos demais (5,5µm). A exceção de CG-541, os demais isolados apresentaram conídios com formato arredondado e rugosidade variável, a qual foi especialmente pronunciada em CG-540. Esta característica, frequentemente observada na espécie *H. thompsonii*, não foi constatada nos conídios de CG-541. Neste caso, observou-se grande variação na dimensão (3 a 6µm) e formato destes, que no geral apresentaram formato alongado e oval.

Com relação ao tamanho dos conidióforos, o único isolado que se destacou foi o CG-541, com uma média de 28,4µm ($\pm 2,47\mu\text{m}$). A amplitude do erro padrão da média comprova que houve grande variação quanto ao tamanho, sendo encontrados conidióforos medindo de 23,7 a 32,1µm, quase 2 vezes maior em relação aos demais isolados. Neste caso, as estruturas observadas eram bastante alongadas e não apresentavam aspecto de “barril”, outra característica importante de *H. thompsonii*. Não foi observada constrição nítida entre os conidióforos e as hifas,

sendo estes quase como uma simples continuação do micélio, muitas vezes com bifurcação formando 2 conidióforos.

Os demais isolados não foram estatisticamente diferentes quanto à dimensão dos conidióforos, mas algumas características puderam ser observadas. Com relação ao formato, todos apresentaram o aspecto de “barril”, sendo que para CG-524, CG-540 e CG 532 as bases dos mesmos eram bastante arredondadas, formando um tipo de constrição, o que não foi constatado para o isolado Esalq-1269. Para todos os isolados em preparações com material retirado das bordas das colônias foram constatadas presença estruturas globosas, semelhante a um “calo”, ao longo do comprimento das hifas, podendo ser uma estrutura precursora dos conidióforos. Em CG-524, outro aspecto relevante observado foi a grande quantidade de conidióforos bifurcados denominados polifiálides, com formação de 2 conídios na extremidade. Entre as fiálides observou-se que a distância média ficou entre 20 μ m para CG-541, 40 μ m para CG-532, 55 μ m para CG-524 e 75 μ m para o Esalq-1269. Não foi possível determinar a distância entre as fiálides para o isolado CG-540. Nas Figuras 10, 11 podem ser observadas as características morfológicas de cada um dos isolados de *Hirsutella* discutidos. O aspecto dos conidióforos variou entre estruturas perfeitamente retas e curvadas.

Figura 10.-Detalhes morfológicos de conidióforos e conídios dos isolados CG-524 (A), CG-540 (B) e CG-532

Figura 11- Detalhes morfológicos de conidióforos e conídios dos isolados Esalq-1269 (A) e CG-541 (B)

Com relação a produção constatou-se que os isolados de *H. thompsonii*, multiplicados em em MC-S, apresentaram diferenças quanto à taxa de esporulação e o diâmetro das colônias. Quanto à produção de conídios, CG-540 e CG-524 foram semelhantes com as menores produções, enquanto que CG-532 e Esalq-1269 foram semelhantes, porém produzindo 2 vezes mais conídios que os anteriores. É importante salientar que, embora tenha sido observado grande número de conidióforos bifurcados, CG-524 apresenta grande espaçamento entre fiálides, o que reduz sua capacidade de produção.

O isolado mais produtivo foi o CG-541, sendo estatisticamente diferente dos demais com concentração de esporos de 6×10^8 conídios/mL em média. Quanto ao diâmetro das colônias, CG-541 foi o isolado que promoveu maior crescimento no meio de cultura, com colônias variando de 5,2 a 5,6 cm² de diâmetro após 10 dias de incubação em condições controladas. Conforme já mencionado, o espaçamento entre fiálides para este isolado é o menor de todos os observados, fato que também pode explicar a sua maior produção de conídios.

No meio de cultura, o crescimento do patógeno foi homogêneo. Para CG-540, CG-524, CG-532 e Esalq-1269 as colônias apresentaram colorações acinzentadas variando em intensidade e sendo mais pronunciada em CG-524. O isolado CG-541 foi o que apresentou coloração mais clara, chegando a um tom de branco-amarelado (creme) (Figura 12). Não foi constatada para nenhum isolado, a produção de “exudados” no substrato onde ocorreu o crescimento dos isolados.

Tabela 15 - Características morfológicas e biológicas ($\pm$ EPM) dos isolados de *Hirsutella thompsonii* em meio de cultura completo e sólido (MC-S)

Isolados	Dimensão dos Conídios (μ m)	Dimensão dos Conidióforos (μ m)	Esporulação (conídios/mL)	Diâmetro das colônias (cm ²)
CG-540	4,6 $\pm$ 0,29Aa	11,9 $\pm$ 1,34Aa	1,9x10 ⁶ $\pm$ 0,32Aa	1,7 $\pm$ 0,10Bb
CG-524	5,1 $\pm$ 0,14Aa	14,3 $\pm$ 1,12Aa	1,1x10 ⁶ $\pm$ 0,16Aa	1,5 $\pm$ 0,04BCbc
CG-532	5,5 $\pm$ 0,68Aa	14,0 $\pm$ 0,76Aa	3,8x10 ⁶ $\pm$ 0,34Bb	1,3 $\pm$ 0,06Cc
CG-541	5,0 $\pm$ 0,75Aa	28,4 $\pm$ 2,47Bb	6,0x10 ⁸ $\pm$ 0,78Cc	5,4 $\pm$ 0,06Aa
Esalq1269	4,8 $\pm$ 0,47Aa	13,5 $\pm$ 0,64Aa	3,8x10 ⁶ $\pm$ 0,32Bb	1,7 $\pm$ 0,08Bb

(P $\leq$ 0,01) Letras maiúsculas e minúsculas para comparação de médias nas colunas

Figura 12- Características das culturas dos isolados de *Hirsutella thompsonii* em meio completo e sólido. A-Esalq-1269. B-CG-524. C-CG-532. D-CG-540 E- CG-541

A mortalidade do ácaro submetido à mesma concentração de inóculo dos isolados (CL_{25}) aumentou, gradualmente, em função do tempo em todos os tratamentos. Ao terceiro e quarto dias, não foram observadas diferenças estatísticas entre os isolados e em relação à testemunha, apenas ao quinto e sexto dias da inoculação. A suspensão de conídios aplicada, que correspondeu ao valor da CL_{25} ($1,9 \times 10^5$ conídios/mL), foi suficiente para causar a mortalidade na população diferenciando os níveis de virulência dos isolados (Figura 13).

Ao quinto dia, verificou-se que as taxas de mortalidades promovidas por Esalq-1269 e CG-524 foram significativamente diferentes e superiores à testemunha. Porém, não constatou-se diferenças desta para CG-532, CG-541 e CG-540 e nem entre os isolados. Já ao sexto dia, apenas Esalq-1269 foi superior à testemunha e aos demais linhagens, que não diferiram entre si. Assim, a virulência de Esalq-1269 foi comprovadamente superior em relação aos demais (Tabela 16).

Não foram verificadas alterações quanto aos sintomas exibidos pelos ácaros doentes. Todos apresentaram características típicas já descritas para a infecção por Esalq-1269.

Tabela 16 – Número de ácaros mortos (Média±EPM) após 3, 4, 5 e 6 dias da inoculação com suspensão de $1,9 \times 10^5$ conídios/mL dos isolados de *Hirsutella thompsonii*

Isolados	3 dia	4 dia	5 dia	6 dia
CG-532	0,0 ± 0,0 A a	1,2 ± 0,5 Aa	2,2 ± 0,5 BA ba	3,0 ± 0,4 BA ba
CG-541	0,2 ± 0,2 Aa	1,2 ± 0,5 Aa	2,8 ± 0,5 BA ba	4,0 ± 0,6 BA ba
CG-540	0,4 ± 0,2 Aa	1,6 ± 0,2 Aa	2,6 ± 0,5 BA ba	3,4 ± 0,5 BA ba
Testemunha	0,8 ± 0,3 Aa	1,0 ± 0,4 Aa	1,3 ± 0,3 B b	2,1 ± 0,8 C c
Esalq1269	0,8 ± 0,3 Aa	1,8 ± 0,3 Aa	4,0 ± 0,3 A a	5,2 ± 0,2 A a
CG-524	0,8 ± 0,2 Aa	2,0 ± 0,5 Aa	3,6 ± 0,5 A a	4,6 ± 0,6 BA ba

($P \leq 0,01$) Letras maiúsculas e minúsculas para comparação de médias nas colunas

Figura 13- Mortalidade (% $\pm$ EPM) de *Brevipalpus phenicis* após 3, 4, 5 e 6 dias da inoculação dos isolados de *Hirsutella thompsonii*

As características gerais e taxonômicas de *Hirsutella* têm sido amplamente discutidas desde a descoberta da espécie *Hirsutella entomorrhiza* por Patouillard em 1982, a qual foi isolada de coleópteros. Após a constatação de sua ocorrência em pomares da Flórida no início do século passado por Spears e Yothers (1924) o gênero *Hirsutella* têm sido considerado como um fungo imperfeito. Assim, taxonomicamente, este patógeno está posicionado no filo Deuteromycota (Fungos Imperfeitos), classe Hyphomycetes e ordem Moniliales, relacionados com os gêneros *Cordyceps* e *Hypocrella* do filo Ascomycota (ACEVEDO; ROSAS, 2006). No entanto, na prática, a correta determinação das espécies deste gênero é complexa devido à grande variabilidade (pleomorfismo) entre os isolados e a dificuldade de produção em meio de cultura padrão. Estas questões, muitas vezes, obrigam que a identificação deste patógeno seja realizada apenas com características do micélio presente nos hospedeiros infectados (MCCOY, 1996; MIETKIEWSKI; BALAZY; TKACZUK, 2000).

Devido a estas características, os isolados de *H. thompsonii* têm sido separados em três grupos distintos (variedades), os quais apresentam entre si diferenças taxonômicas e bioquímicas

(BOUCIAS; MCCOY; JOSLYN, 1982; SAMSON; MCCOY; O'DONNEL, 1980). As variedades de *H. thompsonii* são: *thompsonii*, *vinacea* e *synemata* (MCCOY; STAMPER; TUVESON, 1984; SAMSON; MCCOY; O'DONNEL, 1980).

Os conídios de *Hirsutella* são formados a partir de fiálides solitárias com 10-15 µm de comprimento, com a parte basal mais espessa que se afina em direção à extremidade (ALVES, 1998; BAKER; NEUNZIG, 1968; VAN DER GEEST et al., 2000). Estas características são parecidas com as que foram observadas nos isolados CG-540, CG-524, CG-532 e Esalq-1269. Embora estes sejam padrões gerais, o pleomorfismo é acentuado. De acordo com Baker e Neunzig (1968) há pelo menos sete variações de conidióforos para a espécie *H. thompsonii*, desde a intensidade da coloração dos mesmos até o posicionamento do conídio na fiálide, a qual mede de 6 a 10µm de comprimento. Avaliando 11 isolados de *H. thompsonii*, Samson; McCoy e O'Donnel (1980) observaram 3 tipos de células conidiógenas: fiálides solitárias com conídios apresentando rugosidade, conidióforos poliblasticos com conídios lisos e/ou ligeiramente ásperos e conídios subglobosos e elípticos em sinema. Apesar da predominância do primeiro tipo, estas características definem o pleomorfismo, pois todas podem ocorrer em um mesmo isolado.

A distância entre as fiálides observadas para os isolados CG-532, CG-524, CG-541 e Esalq-1269 foram semelhantes às observadas por Acevedo e Rosas (2006). Neste caso, os autores observaram que houve variação grande quanto a este caractere entre diferentes isolados de *H. thompsonii* com mínima de 33,5µm e máxima de 126,07µm, sendo que a maioria das linhagens apresentou distância entre conidióforos de 48,6 a 66,5µm. Baker e Neunzig (1968) destacam que a distância entre fiálides é variável, geralmente de 10 µm a 90 µm.

Com relação ao tamanho dos conídios, os valores observados neste estudo são superiores aos observados por Baker e Neunzig (1968). No presente trabalho, constatou-se que o diâmetro dos esporos foi de 2 a 3µm, 1,3 vezes inferior aos conídios de CG-540, os menores encontrados. Segundo Alves (1998) o tamanho médio de conídios está entre 2 a 4 µm e observações realizadas por Samson; McCoy e O'Donnel (1980) constataram conídios de 3 a 3,5 µm com isolados produzindo estruturas de até 4 µm de tamanho. A presença da substância mucosa envolvendo os conídios, constatada em todos os isolados, é outra característica importante de *Hirsutella* e foi verificada com frequência em isolados da variedade *thompsonii* (SAMSON; MCCOY; O'DONNEL, 1980). A ocorrência deste muco permite que a adesão ao hospedeiro seja facilitada, além de conferir ao conídio certa proteção contra fatores adversos (ALVES, 1998; ROSSI-

ZALAF; ALVES, 2006a; SAMSON; EVANS; LATGÉ, 1988; VAN DER GEEST et al., 2000). Outro aspecto que facilita a adesão é a presença de rugosidade da parede celular, característica que variou em intensidade entre os isolados CGs e Esalq. Este fato já foi comprovado em *Hirsutella* spp. (SAMSON; MCCOY; O'DONNELL, 1980).

A comparação dos parâmetros esporulação, diâmetro e morfologia das colônias dos isolados CGs e Esalq com outras linhagens, somente pode ser realizada se o meio de cultura utilizado for o mesmo ou semelhante, uma vez que a disponibilidade e/ou natureza dos nutrientes pode alterar algumas características dos patógenos quando submetidos aos substratos. Na literatura existe uma grande diversidade de meios de cultura utilizados para produção de *Hirsutella*, devido à suas peculiaridades no modo de produção e grande sensibilidade às variações nutricionais (MCCOY; KANAVAL, 1969; WINKELHOFF; MCCOY, 1984;). Porém, não há relatos da sua produção em MC-S. Assim, mesmo sendo substratos diferentes, os isolados testados foram comparados com alguns resultados encontrados na literatura.

Com relação às médias de esporulação, tanto os CGs como Esalq apresentaram médias superiores aos valores observados por McCoy; Stamper e Tuveson (1984), os quais comprovaram que o isolado CBS 556.77B de *H. thompsonii* var. *thompsonii* produzido em meio complexo a base de peptona (MCCOY et al., 1971) apresentou média de $7,3 \times 10^4$ conídios/mL após 11 dias de incubação. Para outros três isolados brasileiros de *Hirsutella* sp., a produção de conídios em MC-S variou de 8×10^4 a mínima e $7,2 \times 10^5$ conídios/colônia a máxima (ROSSI; ALVES, 2003).

Quanto ao diâmetro e morfologia das colônias, Acevedo e Rosas (2006) avaliaram o crescimento de 10 isolados de *H. thompsonii* provenientes do México em meio de cultura McCoy "E" + malta (WINKELHOFF; MCCOY, 1969). Observou-se que houve uma variação no diâmetro das colônias de 1,1 a 3,9 cm, sendo que um isolado apresentou crescimento de 1,12 a 1,55cm, cinco cresceram 1,56 a 1,86cm, dois 1,87 a 2,13cm e outros dois isolados 2,14 a 3,95cm. Assim, a média foi semelhante à constatada no presente trabalho, onde os isolados CGs e Esalq cresceram na faixa de 1,3 a 1,7cm, sendo a única exceção CG-541. De acordo com Samson; McCoy e O'Donnell (1980) o crescimento de *H. thompsonii* var. *thompsonii* em extrato de malte foi lento e com diâmetro de 2 a 2,5cm após 14 dias em 25°C.

As avaliações quanto à morfologia, especialmente a coloração das colônias, foram semelhantes às realizadas por Acevedo e Rosas (2006). Esses autores constataram que a coloração dos isolados de *H. thompsonii* variou entre branco, branco-amarelado, branco-

acinzentado, cinza-amarelado e cinza escuro, muito semelhante ao observado nos isolados CGs e Esalq. Segundo McCoy e Kanavel (1969) a aparência de colônias de *H. thompsonii* quando produzida em meios como SDA (sabouraud-dextrose-agar) e BDA (batata-dextrose-água) foram achatadas, de coloração acinzentada e intenso crescimento micelial. Para Samson; McCoy e O'Donnel (1980) *H. thompsonii* var *thompsonii* produzido em meio a base de extrato de malte, a coloração das colônias variou de cinza a verde-acinzentado chegando ao verde escuro, conforme o tempo de incubação.

Os níveis de mortalidade de *B. phoenicis* observados no presente trabalho demonstraram o maior potencial de Esalq-1269 quando comparados aos isolados exóticos. Segundo Rossi-Zalaf e Alves (2006a) este isolado foi superior a outros nativos de *Hirsutella* sp., causando os maiores níveis de mortalidade de *B. phoenicis* em relação aos demais. As diferenças de virulência entre isolados provenientes de locais diferentes a um mesmo hospedeiro são comumente relatadas na literatura e há alguns exemplos para ácaros fitófagos. Para o ácaro rajado (*T. urticae*) bioensaios de laboratório comprovaram a variabilidade na mortalidade de adultos tratados com isolados de *B. bassiana* de diferentes procedências, com índices de 60% a 80% (TAMAI et al., 2002a). Para o ácaro do coqueiro (*A. guerreronis*) a aplicação de 17 linhagens de *H. thompsonii* comprovou a patogenicidade dos mesmos após 48 horas, com variações de resultados, o que é referido pelos autores como decorrente da metodologia de bioensaios empregada (GOPAL; GUPTA, 2001). Para *B. phoenicis*, quatro diferentes isolados de *Hirsutella* promoveram mortalidade de 45,1% a 78,5% ao quarto dia da inoculação de suspensão com alta concentração de conídios (ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006a).

Assim, baseando-se nestas informações, aparentemente todos os isolados, a exceção de CG-541, são representantes de *H. thompsonii* var. *thompsonii*. De acordo com Samson; McCoy e O'Donnel (1980) esta variedade de *Hirsutella* é comumente encontrada em climas subtropicais, assim como *H. thompsonii* var. *vinacea*. O isolado CG-541 apresentou configuração muito diferente em relação aos demais observados, especialmente quanto ao formato, tamanho e distância dos conidióforos e ausência de substância adesiva envolvendo os conídios. Apesar de este isolado ter sido estudado como *Hirsutella* sp., existe grande possibilidade de não se enquadrar dentro deste gênero.

Embora estes padrões taxonômicos sejam bastante evidentes, outros parâmetros como estudos de patogenicidade e virulência, além de análises genéticas destes e de outros isolados de

Hirsutella podem auxiliar na determinação correta da espécie. Quanto a patogenicidade, de acordo com Hajek e Leger (1994), a variabilidade intraespecífica de fungos entomopatogênicos pode ser caracterizada baseando-se em diferenças neste parâmetro, mas deve-se considerar que a população do hospedeiro pode apresentar variações nas respostas ao patógeno decorrentes da dinâmica de suas características genéticas. Outro aspecto é que a patogenicidade e agressividade do mesmo podem estar relacionadas com as características morfológicas dos isolados e seu histórico de ocorrência, determinando assim sua atividade no hospedeiro (ACEVEDO; ROSAS, 2006). Já em relação às análises genéticas do fungo, análises eletroforéticas de enzimas comprovaram que, devido ao pleomorfismo acentuado em *Hirsutella* spp., os isolados morfológicamente iguais podem ser diferentes em nível celular (BOUCIAS; MCCOY; JOSLYN, 1982). Sem dúvida, estes aspectos reforçam a complexidade da descrição e identificação das espécies e variedades de *Hirsutella* em geral.

2.4.2.6 Persistência de *Hirsutella thompsonii* em folhas de citros

A persistência de *H. thompsonii* em folhas de citros variou, alterando sua infectividade ao ácaro da leprose. Esta variação ocorreu em função de dois fatores: efeito residual ao longo do tempo e origem (características) dos propágulos (Tabela 17). Foi possível comprovar que *H. thompsonii* promoveu mortalidade de *B. phoenicis*, mesmo não sendo aplicado diretamente sobre os ácaros, apesar dos níveis observados terem sido menores em relação a uma aplicação dirigida.

Com relação ao efeito residual, constatou-se que apenas em um tratamento (Ht-APC) houve redução significativa da mortalidade dos adultos com o passar do tempo, chegando apenas a 3,3% de mortalidade após 72 horas. Nos demais, não foram constatadas diferenças significativas nos três períodos de avaliação, mas mesmo assim, observou-se que em todos os tratamentos com o fungo houve uma tendência na redução da mortalidade de adultos, ao longo do tempo.

Em cada período de avaliação, foi possível comprovar as diferenças na mortalidade de ácaros entre os tratamentos. Assim, constatou-se que as características dos propágulos de *H. thompsonii* obtidos de diferentes meios de cultura, interferiram no efeito residual do patógeno e conseqüentemente na sua capacidade de infectar indiretamente o hospedeiro. Após 0 hora da aplicação do patógeno, ou seja, imediatamente após a pulverização, a maior mortalidade ocorreu em Ht-MC-L, com 32,7% de mortos, sendo estatisticamente superior aos demais tratamentos.

Nos demais tempos após a aplicação, este mesmo padrão foi observado, sendo Ht-MC-L superior aos demais, porém não diferindo de Ht-MC-S, depois de 72 horas. Assim, respectivamente após 24 e 72 horas, a mortalidade de *B. phoenicis* foi de 29% e 27,5%. Em contrapartida, o tratamento com menor efeito indireto sobre *B. phoenicis* foi *H. thompsonii* produzido em APC. Neste caso, as mortalidades observadas foram de 13,3%, 10,8% e 3,3% após 0, 24 e 72 horas da aplicação, não diferindo da testemunha no último tempo de avaliação, o que significa que este período foi suficiente para inviabilizar totalmente os conídios do patógeno.

A exceção de Ht MC-L, os picos de mortalidade ocorreram quando os ácaros foram transferidos após 24 horas da pulverização do patógeno sobre a folha de citros (Figura 14).

Tabela 17 – Mortalidade de adultos de *Brevipalpus phoenicis* (%±EPM) transferidos após 0, 24 e 72 horas, da pulverização de folhas de citros com propágulos de *Hirsutella thompsonii* (1×10^7 propágulos/mL) produzidos em três meio de cultura¹

Tratamentos	Tempo após a pulverização		
	0h	24h	72h
Testemunha	2,5±1,1 C a	3,3±1,7 C a	3,3±1,7 B a
Ht-MC-S	20,8±3 AB a	20±3,7 AB a	15±2,2 A a
Ht-MC-L	32,7±3,8 A a	29±5,6 A a	27,5±3,4 A a
Ht-APC	13,3±2,5 B b	10,8±3 B ab	3,3±1,7 B a

¹ MC-S (meio completo e sólido), MC-L (meio completo e líquido), APC (arroz pré cozido).

($P \leq 0,06$) Letras maiúsculas para comparação de médias na coluna e minúsculas para comparação de médias na linha.

Figura 14- Mortalidade de adultos de *Brevipalpus phoenicis* (% $\pm$ EPM) transferidos após 0, 24 e 72 horas da pulverização de folhas de citros com propágulos de *Hirsutella thompsonii* produzido em três meios de cultura (MC-L; MC-S e APC)

Apesar dos baixos índices de mortalidade observados em todos os tratamentos, ocorreu infecção de *B. phoenicis* por *H. thompsonii* nas condições avaliadas. De acordo com Rossi-Zalaf e Alves (2006b) adultos de *B. phoenicis* são suscetíveis ao efeito residual de *H. thompsonii* o qual promove mortalidade em diferentes níveis, dependendo do potencial de inóculo e da densidade populacional do hospedeiro. Porém, no presente trabalho, as estruturas infectivas do fungo foram capazes de persistir por pouco tempo no ambiente sem a presença do hospedeiro, pois, independentemente das suas particularidades determinadas pelos processos de produção, observou-se que houve um declínio da capacidade do fungo em infectar o ácaro.

O único tratamento em que a taxa de mortalidade manteve-se relativamente constante foi Ht MC-L, devido às algumas características físicas. Neste substrato, apesar do produto ter sido triturado para facilitar a aplicação e a diluição em água, observou-se que as massas de micélio submersas (pellet's), formadas durante o desenvolvimento de *H. thompsonii*, foram depositadas sobre as folhas, o que pode ter conferido ao fungo maior proteção contra a perda de viabilidade e,

conseqüentemente, maior persistência. Este efeito foi constatado por McCoy et al. (1971) após a aplicação em campo de *H. thompsonii* produzido em cultura submersa. Segundo estes autores foi possível observar o crescimento de *H. thompsonii* sobre as folhas a partir das micro-partículas de micélio, após 48 horas da pulverização. Esta característica foi considerada como um aspecto altamente vantajoso de *H. thompsonii*, pois pode permitir uma esporulação do patógeno nos locais onde se encontra o hospedeiro, o que aumenta sua persistência, densidade de inóculo e facilita a ocorrência da epizootia. Por outro lado, como desvantagens os autores colocam a alta sensibilidade destas estruturas frente às condições adversas de temperatura e umidade relativa.

Este mesmo fenômeno foi observado ocorrendo com produto comercial Mycar e mais recentemente com testes realizados na América Latina. De acordo com McCoy e Couch (1982) após 10 dias da aplicação do produto comercial em citros, observou-se crescimento e esporulação do patógeno sobre o substrato foliar e em frutos, embora isto tenha ocorrido na presença de 8 horas de água livre por dia. No México, aplicações de pellet's de micélio de *H. thompsonii* em pomares de citros para controle do ácaro da leprose constataram que, em situações de campo, o patógeno pode persistir no ambiente. (ACEVEDO; ROSAS, 2000). Os resultados observados neste estudo revelam que o fungo persistiu por mais de sete meses nos pomares onde foi aplicado, o que é, segundo os autores, resultado das combinações ideais de potencial de inóculo e condições ambientais. Em laboratório, comprovou-se que os conídios de *H. thompsonii* são capazes de crescer sobre as folhas de citros (ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006a).

Assim, levando-se em consideração que a produção de *H. thompsonii* é moderada se comparada a outros fungos mitospóricos como *B. bassiana* e *M. anisopliae*, a persistência do resíduo da aplicação é um aspecto importante para o manejo. Estas afirmações reforçam, novamente, a necessidade de estudos de formulação de *H. thompsonii* para melhor exploração de seu potencial como micoacaricida. Outra questão importante é como o patógeno poderia se comportar frente às baixas densidades populacionais do hospedeiro no campo, que, muitas vezes, ocorre no caso de *B. phoenicis*. Porém, apesar desta característica de distribuição desta praga, a simples ocorrência deste fenômeno pode promover um incremento no controle natural. Como o ácaro apresenta um comportamento críptico, vivendo e ovipositando em fendas dos frutos e locais protegidos da aplicação direta, o contato com fragmentos do patógeno pode aumentar gradativamente o número de focos iniciais da doença e favorecer a epizootia. Isto é perfeitamente possível devido à transmissão horizontal de *H. thompsonii* a partir de cadáveres do ácaro para

indivíduos sadios, conforme já foi comprovado em laboratório (ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006b).

2.4.2.7 Efeito de *Hirsutella thompsonii* sobre a população de *Brevipalpus phoenicis* em condições de campo.

No primeiro experimento foi possível constatar que a aplicação de 6Kg/ha de *H. thompsonii* (APC) afetou a sobrevivência de adultos de *B. phoenicis*, diferenciando-se estatisticamente da testemunha após 10 e 20 dias (Tabela 18). Porém, neste experimento, não foi possível observar o efeito no número de ovos e ninfas, uma vez que não foram constatadas diferenças em relação à testemunha em nenhuma das datas de avaliação. Provavelmente, o número de repetições utilizado foi muito baixo o que gerou uma grande variabilidade nos resultados as quais foram significativas na análise estatística. Este experimento teve como objetivo avaliar a metodologia estabelecida e constatou-se que foi possível recuperar os ácaros e observar a presença de formas jovens nas datas estabelecidas para as avaliações. Até os 20 dias, os frutos mantiveram-se em boas condições e presos às árvores, sendo que nenhuma repetição foi perdida.

Tabela 18 - Média de adultos (%±EPM) sobreviventes de *Brevipalpus phoenicis* por fruto, observados após 10 e 20 dias da aplicação de *Hirsutella thompsonii* em frutos de laranja pré-infestados (Experimento 1) (Piracicaba, 2005)

Tempo após a aplicação	Testemunha	Ht 6Kg/ha
10 dias	63,3±11,6 A a	30,6±5,9 A b
20 dias	28,6±3,7 A a	13,77±4,2 Ab

(P≤0,1) Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha.

No segundo experimento foi possível avaliar, mais criteriosamente, a ação do fungo sobre o ácaro, pois o mesmo foi realizado em delineamento experimental mais apropriado (blocos ao acaso). De acordo com a análise estatística realizada pelo programa SAS, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os blocos, o que significa que a variabilidade foi controlada e a metodologia adequou-se aos propósitos deste estudo.

Neste caso, a aplicação em campo de *H. thompsonii* sobre adultos de *B. phoenicis* causou, além da mortalidade direta destes, efeitos na taxa de oviposição (número de ovos/fruto) e conseqüentemente no número de ninfas encontradas por fruto. Estes efeitos foram verificados nos dois períodos de avaliações.

O tratamento dos frutos infestados com *H. thompsonii* promoveu a redução do número de adultos com o tempo. Aos 10 dias após a aplicação, todos os tratamentos com o fungo apresentaram número de ácaros inferior em relação à testemunha, sendo que não houve diferença entre tratamentos. Assim, a porcentagem média de adultos sobreviventes nesta data foi 9,3% no tratamento Ht-MC-L 5L/ha, 7% em Ht-APC 10Kg/ha e 6,3% em Ht-APC 20Kg/ha, enquanto que na testemunha observou-se 40% de sobrevivência. Depois de 20 dias, apenas o tratamento Ht-APC 10Kg/ha não diferiu estatisticamente da testemunha e apresentou sobrevivência de 6,3% contra 14,6% (Tabela 19).

Tabela 19 - Média de adultos (% $\pm$ EPM) sobreviventes de *Brevipalpus phoenicis* por fruto, observados após 10 e 20 dias da aplicação de *Hirsutella thompsonii* em frutos de laranja pré-infestados (Piracicaba, 2005)

Tempo após a aplicação	Testemunha	Ht 5L/ha	Ht 10 Kg/ha	Ht 20 Kg/ha
10 dias	40,0 $\pm$ 4,0 A a	9,3 $\pm$ 2,6 A b	7,0 $\pm$ 2,0 A b	6,3 $\pm$ 1,9 A b
20 dias	14,6 $\pm$ 4,0 B a	4,8 $\pm$ 2,7 A b	6,3 $\pm$ 2,8 A a	4,7 $\pm$ 1,0 B b

($P \leq 0,1$) Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha.

A redução mais significativa do número de adultos ocorreu entre o período da primeira para a segunda avaliação nos tratamentos testemunha e Ht-APC 20Kg/ha. No interior da arena de confinamento confeccionada nos frutos, não foram encontrados insetos e/ou ácaros predadores. Assim, a redução da sobrevivência na testemunha pode ter ocorrido devido ao acaso, sendo que alguns ácaros podem ter sido levados pelo vento ou pela água de chuva. Em todos os tratamentos com o patógeno foram encontrados poucos ácaros com sintomas de infecção por *H. thompsonii*, porém sem sinais de esporulação. Neste caso, os ácaros apresentavam-se aderidos à superfície do fruto, como se estivessem colados. Ácaros mortos por *H. thompsonii* com este aspecto já foram observados em folhas de citros (ROSSI-ZALAF; ALVES 2006a).

Com relação à taxa de postura, foi observada significativa redução do número de ovos encontrados nos tratamentos com o fungo em relação à testemunha. Na primeira avaliação (10 dias) o tratamento Ht-APC 20Kg/ha foi o que apresentou menor número de ovos/fruto (11,2) em relação aos demais e principalmente à testemunha (40,4) (Tabela 20). Não foram observados ovos com sintomas de infecção por patógenos, sendo que a maioria encontrava-se em locais do fruto contendo verrugose, conforme era esperado.

Tabela 20 - Número médio de ovos ($\pm$ EPM) de *Brevipalpus phoenicis* por fruto, observados após 10 e 20 dias da aplicação de *Hirsutella thompsonii* em frutos de laranja pré-infestados com adultos do ácaro (Piracicaba, 2005)

Tempo após a aplicação	Testemunha	Ht 5L/ha	Ht 10 Kg/ha	Ht 20 Kg/ha
10 dias	40,4 $\pm$ 2,1 Aa	18,0 $\pm$ 1,6 A ab	17,6 $\pm$ 2,4 A ab	11,2 $\pm$ 2,53 A b
20 dias	25,0 $\pm$ 2,2 Aa	5,0 $\pm$ 3,4B ab	6,2 $\pm$ 2,3 B b	4,11 $\pm$ 0,52 A b

($P \leq 0,01$) Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha

Aos 20 dias da aplicação, houve redução do número de ovos em todos os tratamentos, inclusive na testemunha. Esta redução ocorreu devido à eclosão das larvas, o que pode ser comprovado com o aumento destas de acordo com os resultados apresentados na Tabela 21. Neste caso, não foram constadas diferenças entre os tratamentos, sendo que os ovos viáveis deram origem a larvas sadias no período esperado. Devido às grandes quantidades de ovos, apenas no tratamento testemunha ocorreu o aumento significativo do número de formas jovens.

Tabela 21 - Número médio de formas jovens ($\pm$ EPM) de *Brevipalpus phoenicis* por fruto, observadas após 10 e 20 dias da aplicação de *Hirsutella thompsonii* em frutos de laranja pré-infestados com adultos do ácaro (Piracicaba, 2005)

Tempo após a aplicação	Testemunha	Ht 5L/ha	Ht 10 Kg/ha	Ht 20 Kg/ha
10 dias	12,1 $\pm$ 2,1 A a	16,7 $\pm$ 1,7 A a	15,6 $\pm$ 2,2 A a	14,8 $\pm$ 1,9 A a
20 dias	35,1 $\pm$ 1,1 B a	26,0 $\pm$ 2,9 A a	19,0 $\pm$ 3,0 A a	14,5 $\pm$ 1,2 A a

($P \leq 0,1$) Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha

Tentativas de controle de ácaros em citros com *H. thompsonii* são relatadas na literatura mundial desde o início do século 20. Experimentos realizados demonstraram que a dinâmica populacional de ácaros pode ser alterada em condições de campo, conforme já foi verificado para *P. oleivora* e também *B. phoenicis*.

No México, de acordo com Acevedo e Rosas (2001) a aplicação de uma suspensão de micélio de *H. thompsonii* (50g/L) em plantas de limão reduziram a população de *Brevipalpus* spp. a níveis inferiores dos encontrados em plantas tratadas com agrotóxicos (malation + diazinon) e no tratamento testemunha. Após as aplicações, as epizootias de *H. thompsonii* ocorreram por até 7 meses e impediram que a população de *B. phoenicis* atingissem os níveis populacionais iniciais. Neste caso, a média de adultos sobreviventes encontrados foi de 15 indivíduos/folha no tratamento com *H. thompsonii*, sendo que os níveis de mortalidade pelo patógeno atingiram 70% logo após a aplicação.

Trabalho com *P. oleivora*, McCoy et al. (1971) demonstraram para duas regiões citrícolas da Flórida (EUA) que a aplicação de fragmentos de micélio de *H. thompsonii* em diferentes concentrações causaram drásticas reduções na população de *P. oleivora* após 10 semanas do tratamento. Nestas áreas, as epizootias do patógeno acompanharam os níveis populacionais e distribuição da praga no campo. De maneira semelhante, a aplicação de Mycar[®] (Ht-ABG 6065) resultou altos níveis de eficiência de controle de *P. oleivora* após várias semanas (MCCOY; COUCH 1982).

As condições ambientais, especialmente de temperatura e umidade relativa do ar, são fatores abióticos que influenciam, significativamente, a ocorrência das epizootias em *H. thompsonii* em campo. No período em que o experimento foi realizado, os registros obtidos junto ao Departamento de Agrometeorologia da ESALQ/USP revelaram que a umidade do ar apresentou médias de 55% para a mínima e 96% a máxima, enquanto que para a temperatura a variação foi de 18,8°C a mínima e 27,5°C a máxima (Figura 15). As leituras realizadas no local do experimento foram de 83%, 56% e 80% de UR, respectivamente para a data de instalação do ensaio, após 10 e 20 dias, enquanto que os valores de temperatura foram de 30°C, 28,6°C e 25°C. Estas condições, mesmo não sendo as ideais, foram consideradas satisfatórias para a atuação de *H. thompsonii*, apesar de não terem sido encontrados ácaros com sinais do patógeno. Provavelmente, o processo de esporulação foi prejudicado devido ao baixo número de horas em que a umidade relativa manteve-se elevada.

Figura 15- Variação de temperatura e umidade relativa do ar referente ao período de 01 de outubro de 2005 a 31 de outubro de 2005 (Fonte: Departamento de Agrometeorologia da ESALQ/USP)

Embora a eficácia de *H. thompsonii* tenha sido comprovada há algum tempo para *P. oleivora* e mais recentemente para *B. phoenicis*, o padrão de distribuição dos ácaros nos pomares citrícolas é um fator que certamente diferencia o modo como as epizootias do fungo podem ocorrer em campo, alterando assim a eficiência de controle.

A distribuição homogênea e em altas densidades de *P. oleivora* favorece o contato dos hospedeiros com as estruturas infectivas do patógeno o qual, em condições abióticas adequadas, causa elevados índices de mortalidade em um curto espaço de tempo. De acordo com McCoy et al. (1971) o padrão da epizootia de *H. thompsonii* em campo seria diferente se este ácaro ocorresse em baixa densidade no pomar, justamente o que é verificado para *B. phoenicis*. Além da baixa densidade populacional que é uma característica desta espécie, os ácaros distribuem-se na planta especialmente em frutos com verrugose (BASSANEZI, 2004). Esta distribuição agregada ressalta a dependência da presença dos ácaros virulíferos como fonte de inóculo, uma vez que a distribuição das plantas com sintomas de leprose (CiLV) também segue este padrão. Assim, a eliminação destas fontes, também por meio do controle localizado, é de difícil realização, porém necessária. Para produtores orgânicos ou pequenos produtores a aplicação

dirigida de *H. thompsonii* baseada na amostragem prévia e em locais que seja detectada a presença dos ácaros é uma estratégia que pode garantir que as epizootias do patógeno ocorram mais rapidamente reduzindo as chances da transmissão do vírus da leprose.

2.4.3 Compatibilidade de *Hirsutella thompsonii* com acaricidas e sua associação com o produto Propargite (Omite 720 EC) para o controle de *Brevipalpus phoenicis*.

2.4.3.1 Compatibilidade “in vitro” de acaricidas registrados para o ácaro da leprose

Os níveis de toxicidade dos acaricidas testados a *H. thompsonii* foram determinados de acordo com duas propostas, a de Alves; Moino Júnior e Almeida (1998b) e a de Alves et al⁵ (em fase de elaboração). De todos os produtos avaliados, houve uma divergência entre os métodos apenas na determinação do nível de toxicidade de Kelthane 480 CE (Dicofol). Neste caso, este agrotóxico foi classificado como compatível a *H. thompsonii* (T=67,72) de acordo com a fórmula de 1998, enquanto que segundo a fórmula nova (2007) o mesmo foi classificado como tóxico ao patógeno (T=82). Para os demais produtos, não foram verificadas diferenças quanto à toxicidade (Tabela 22). Apesar destas constatações, o modelo mais usado é o de 1998, embora não considere o fator germinação de conídios (%) como um parâmetro matemático.

⁵ ALVES, S.B.; HADDAD, M.L.; FAION, M.; SILVEIRA NETO, M.; BAPTISTA, G.C. (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz). **Biological index of toxicity classification of pesticides to entomopathogenic fungi.**

Tabela 22 – Valores de T e níveis de toxicidade de acaricidas a *Hirsutella thompsonii* de acordo com as classificações de Alves; Moino Júnior e Almeida (1998b) e Alves et al. (em fase de elaboração)

Nome comercial	Valor de T (1998)	Nível de Toxicidade	Valor de T (2007)	Nível de Toxicidade
Torque 500 SC	130,98	Compatível	168	Compatível
Sipicatin 500 SC	20,48	Muito tóxico	29	Muito tóxico
Kumulus DF	99,86	Compatível	110	Compatível
Omite 720 SC	214,83	Compatível	237	Compatível
Kelthane 480 CE	67,72	Compatível	82	Tóxico
Karathane EC	232,0	Compatível	90	Compatível
Envidor	77,51	Compatível	97	Compatível

Os produtos classificados como compatíveis a *H. thompsonii* foram: Torque 500 SC (Óxido de Fenbutatina), Kumulus DF (Enxofre), Omite 720 SC (Propargite), Karathane EC (Dinocape) e Envidor (Espirodiclofeno). De acordo com dados disponíveis no site do Ministério da Agricultura (AGROFIT, 2006) estes acaricidas pertencem às classes toxicológicas III, IV, II, I e III, respectivamente, sendo que apenas o Dinocape é classificado como extremamente tóxico a mamíferos. O Sipicatin 500 SC (Cihexatina) foi considerado como muito tóxico a *H. thompsonii* e pertence a classe toxicológica I, ou seja, também é considerado como extremamente tóxico a mamíferos. Já o Kelthane 480 CE (Dicofol), que apresentou-se como compatível de acordo com Alves et al. (1998b) e tóxico o modelo proposto por Alves et al. (em fase de elaboração), pertencendo à classe II de acordo com o Agrofít (altamente tóxico). Portanto, de maneira geral, pode-se constatar que, embora o acaricida não seja tóxico ao entomopatógeno, pode ser muito nocivo a mamíferos ou outros agentes de controle, o que reforça a necessidade de aumentar o critério de classificação e seleção.

Outra avaliação importante a ser feita é a comparação dos níveis de toxicidade destes acaricidas com outros fungos entomopatogênicos. Alguns destes produtos foram avaliados por Tamai et al. (2002b) seguindo a metodologia proposta por Alves; Moino Júnior e Almeida (1998b), para a espécie *B. bassiana*. Neste trabalho constatou-se que Dicofol, Propargite e Cihexatina foram classificados como muito tóxico, moderadamente tóxico e muito tóxico ao

fungo, respectivamente, sendo apenas o último acaricida com efeito semelhante ao observado para *H. thompsonii*. Alves et al. (2000) avaliaram os efeitos de Enxofre, Propargite e Óxido de Fenbutatina em *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Lecanicillium* sp. na mesma metodologia descrita acima. Os resultados mostraram que tanto o Propargite como o Óxido de Fenbutatina foram compatíveis para as três espécies de fungos entomopatogênicos, enquanto que o Enxofre foi compatível apenas para *B. bassiana* e moderadamente tóxico para *M. anisopliae* e *Lecanicillium* sp.. Assim, em comparação com *H. thompsonii*, *M. anisopliae* e *Lecanicillium* sp. foram mais sensíveis ao Enxofre, porém com uma pequena diferença. Este mesmo produto foi avaliado e classificado por Faion (2002), levando-se em consideração a porcentagem de germinação de conídios, tanto para *B. bassiana* como para *M. anisopliae*, sendo considerado tóxico e compatível, respectivamente (Tabela 23).

Tabela 23 – Médias ($\pm$ EPM) de diâmetro das colônias, esporulação e germinação de conídios de *Hirsutella thompsonii* submetidos à ação de diferentes formulações de acaricidas registrados para o controle do ácaro da leprose dos citros

Nome comercial	Diâmetro das colônias (cm)	Esporulação (conídios/mL)	Germinação de conídios (%)
Testemunha	0,93 $\pm$ 0,04	1,6x10 ⁶ $\pm$ 0,13	99,83 $\pm$ 0,17
Torque 500 SC	0,92 $\pm$ 0,02	2,3x10 ⁶ $\pm$ 0,24	82,62 $\pm$ 2,01
Sipicatin 500 SC	0,32 $\pm$ 0,01	2,8x10 ⁵ $\pm$ 0,37	0,17 $\pm$ 0,16
Kumulus DF	0,73 $\pm$ 0,03	1,6x10 ⁶ $\pm$ 0,36	88,5 $\pm$ 2,43
Omite 720 SC	0,69 $\pm$ 0,04	4,0x10 ⁶ $\pm$ 0,36	69,63 $\pm$ 3,89
Kelthane 480 CE	0,58 $\pm$ 0,02	1,4x10 ⁶ $\pm$ 0,17	86,23 $\pm$ 0,65
Karathane EC	0,67 $\pm$ 0,02	1,3x10 ⁶ $\pm$ 0,25	89,13 $\pm$ 2,99
Envidor	0,64 $\pm$ 0,02	1,2x10 ⁶ $\pm$ 0,10	72,03 $\pm$ 1,93

O acaricida Sipicatin (Cihexatina) foi o que mais afetou o crescimento vegetativo de *H. thompsonii*, pois o valor do diâmetro das colônias foi de 0,32cm, cerca de 65,6% menor do que a testemunha (0,93cm). Porém, observando-se os valores referentes à esporulação, houve um estímulo da produção de conídios causado pelo produto, pois verificou-se um acréscimo de 75% de conídios/mL em relação a testemunha. Este mesmo fato foi constatado para os produtos

Torque (Óxido de fenbutatina) e Omite (Propargite), os quais produziram 43,8% e 400% a mais de conídios do que a testemunha, embora nestes casos o crescimento vegetativo tenha sido inferior ao controle. Observações semelhantes a estas foram realizadas por Tamai et al. (2002b), que comprovaram que alguns inseticidas promoveram o aumento da esporulação de *B. bassiana* em relação à testemunha, fato atribuído às características das formulações comerciais. Neste caso, é possível que o patógeno tenha utilizado algum nutriente presente na formulação do produto, o que estimulou a produção de conídios, não necessariamente alterando o crescimento vegetativo. Porém, no caso do Sipicatim, apenas a esporulação foi um parâmetro representativo, pois além do baixo crescimento vegetativo no meio de cultura, a porcentagem de germinação dos conídios foi muito baixa, próxima a 0%, o que justifica sua classificação como muito tóxico à *H. thompsonii*. Porém, o reduzido crescimento das colônias sobre o meio indica que, provavelmente, a toxicidade do produto está relacionada com o atraso na germinação dos conídios e não com sua total inviabilização. Como as leituras de viabilidade foram realizadas após 48 horas da inoculação do fungo no meio, não houve tempo suficiente para ocorrer a germinação. No caso dos outros agrotóxicos, a porcentagem de germinação ficou entre 69,6% a mais baixa a 89,1%.

A toxicidade de agroquímicos a *Hirsutella* spp. tem sido registrada na literatura, utilizando outras metodologias de determinação. De acordo com Sosa-Goméz; Manzur e Nasca (1987) a avaliação de diferentes produtos para três variedades de *H. thompsonii* (var. *thompsonii*, var. *vinacea* e var. *synnematosae*) foram realizadas observando-se o efeito dos mesmos no crescimento vegetativo e produção de conídios. Neste caso, avaliou-se o efeito de óleo mineral, Etil-clorpirifós (48%), Parathion 50%, e Mercaptotion (100%) os quais variaram em níveis de pouca toxicidade até muito tóxicos, respectivamente, independente da variedade. Recentemente, testes realizados na Polônia avaliaram o efeito de Dichlofluanida (Euparen 50 WP), Iprodione (Rovral 50 WP), Endosulfan (Thiodan 350 EC), Amitraz (Mitac 200EC), Hexythiazox (Nissorun 050 EC), Fosalone (Zolone 350 EC) e Pendimethalina (Stomp 330 EC) à espécie *H. nodulosa* (TKACZUK; LABANOWSKA; MIETKIEWSKI, 2004). Estes produtos, fungicidas, inseticidas/acaricidas e herbicidas, foram aplicados em diferentes concentrações com grande variação na resposta do patógeno. Assim, os mais tóxicos que inibiram o crescimento do fungo foram o Iprodione (fungicida), Endosulfan (inseticida) e Fosalone (inseticida), sendo o Dichlofluanida (fungicida) e Hexythiazox (acaricida) os menos agressivos ao patógeno.

As diferenças na resposta das espécies de fungos aos diversos grupos de agrotóxicos é bem conhecida. De acordo com Alves; Moino Júnior e Almeida (1998b), esta variabilidade ocorre em função da espécie e/ou linhagem do entomopatógeno, natureza química do agrotóxico, das formulações, do modo de ação, concentrações utilizadas, entre outros. Assim, além de inibição do crescimento, esporulação ou mesmo na germinação dos conídios, os agrotóxicos podem causar alterações bioquímicas ou promover mutações genéticas nos entomopatógenos, alterando assim sua suscetibilidade (ALVES et al., 2000). No tocante ao controle biológico, a seleção de linhagens de fungos entomopatogênicos resistentes a agrotóxicos seria um aspecto vantajoso e que poderia incrementar a atividade destes organismos em cultivos onde a aplicação de agrotóxicos é muito intensa. Por outro lado, estas mutações podem levar a perda de virulência, o que seria um aspecto negativo para o manejo integrado das pragas.

Em citros, estas considerações são particularmente importantes, não somente para *H. thompsonii*, mas para outras espécies de fungos entomopatogênicos que ocorrem naturalmente nesta cultura, como *Lecanicillium*, *Syngliocladium* sp. (Salmão da Ortézia) e hifomicetos que atacam cochonilhas de carapaça (GUARÍN-MOLINA et al., 2006). A escolha de agrotóxicos seletivos a estes e outros inimigos naturais pode ser importante para o manejo da cultura, mesmo em áreas onde não seja efetivamente realizado o controle microbiano.

2.4.3.2 Efeito de Propargite e *Hirsutella thompsonii* sobre adultos de *Brevipalpus phoenicis*.

A avaliação dos resultados comprova que houve diferenças entre os tratamentos quando comparados entre si na mesma data e também entre diferentes períodos de avaliação (Tabela 24). Ao longo do tempo, observou-se que a mortalidade de adultos no terceiro dia após a aplicação foi superior em todos os tratamentos quando comparada aos valores observados após um dia. Nos tratamentos com *H. thompsonii* (CL₂₅) e Propargite (CL₂₅) o número de indivíduos mortos observados foi proporcional às concentrações aplicadas, que corresponderam aos valores de concentração letal 25%.

Em cada data de avaliação foi possível observar que houve diferenças estatísticas entre os tratamentos. Após 24 horas, ocorreu quase 30% de mortalidade no tratamento mistura (fungo+ acaricida), sendo estatisticamente superior aos demais. Nos outros períodos de avaliação este mesmo padrão foi observado, com 56% de mortos após 48 horas e 76% após 72 horas. Nos

tratamentos onde o fungo e o acaricida foram aplicados individualmente, os níveis de mortalidade foram mais baixos, não ultrapassando 30% após 72 horas da aplicação.

Tabela 24 – Mortalidade de adultos de *Brevipalpus phoenicis* (%±EPM) após 1, 2 e 3 dias da aplicação de *Hirsutella thompsonii* (CL₂₅)¹, o acaricida Propargite (CL₂₅)² e uma mistura do patógeno + acaricida

Tratamentos	Dias após a aplicação		
	1	2	3
Testemunha	4,0±4,0 B a	4,0±4,0 C a	8,0±3,7 B b
<i>H. thompsonii</i> (CL ₂₅)	0,0±0,0 B b	6,0±2,4 BC ab	18,0±4,9 B a
Propargite (CL ₂₅)	4,0±2,4 AB b	14,0±2,4 B ab	24,0±6,0 B a
<i>H. thompsonii</i> + Propargite	28±11,0 A b	56,0±9,8 A ab	76,0±7,5 A a

¹ CL₂₅ de *H. thompsonii* = 1,9x10⁵ conídios/mL; CL₂₅ de Propargite = 155,7mL/1000L.

(P≤0,06) Letras maiúsculas para comparação de médias na coluna e letras minúsculas para comparação de médias na linha.

Assim, fica evidente que a associação de *H. thompsonii* com o acaricida Propargite resultou em uma interação positiva (sinergismo), aumentando a mortalidade de *B. phoenicis*. Este fato foi comprovado devido a mortalidade do ácaro que deveria ser, pelo menos, 50% já que as concentrações aplicadas foram as correspondentes à CL₂₅. Porém, após 48 horas, este valor foi 6% acima do esperado, atingindo 26% decorridas 72 horas (Figura 16).

Figura 16- Mortalidade de *Brevipalpus phoenicis* após 24, 48 e 72 horas da aplicação de *Hirsutella thompsonii*, o acaricida Propargite (Omite 720 CE) e uma mistura de fungo mais acaricida

A suscetibilidade de um indivíduo a um determinado patógeno pode ser maior ou menor em função de diversos fatores bióticos ou abióticos, ligados ao hospedeiro, ao agente de controle e ao ambiente (ALVES; LEUCUONA, 1998). Porém, quando o hospedeiro está submetido a um fator de estresse, pode ocorrer aumento significativo da suscetibilidade, como é o caso da aplicação de um inseticida em níveis não letais. Assim, os efeitos do entomopatógeno combinados com os efeitos do agrotóxico podem ser de natureza sinérgica, antagônica ou aditiva, sendo que existem várias modalidades de sinergismo as quais variam de acordo com as características dos agentes de controle (BENZ, 1971). Este aumento na suscetibilidade pode ser expresso em termos de mortalidade, mas este não é o único aspecto que evidencia a ocorrência deste fenômeno.

No caso da mistura entre *H. thompsonii* e Propargite, o efeito sinérgico pode ser explicado com base no modo de ação destes dois componentes. De acordo com Benz (1971), este fenômeno ocorre devido ao efeito de duas moléculas com modos de ação distintos, em que uma complementa o efeito da outra. Existem várias modalidades de sinergismo, mas no caso da

mistura de *H. thompsonii* e Propargite, o tipo suplementar é o que pode melhor explicar a relação. De acordo com Benz (1971), este sistema se caracteriza por dois componentes efetivos que em conjunto produzem efeito maior que a soma algébrica dos efeitos independentes ($A_{1+2} > A_1 + A_2$).

O fungo *H. thompsonii* penetra via tegumento (contato), como a maioria dos fungos entomopatogênicos. Após a adesão dos conídios no tegumento, os mesmos germinam após 6 a 12 horas e penetram no interior do corpo de *B. phoenicis*, colonizado a hemocele e causando morte após 72 horas devido aos danos físicos e ação de micotoxinas (ROSSI-ZALAF; ALVES, 2006a). O acaricida Propargite também atua por contato, porém age em nível celular como inibidor do metabolismo energético, interferindo na respiração celular por meio da inibição da enzima ATPase e, conseqüentemente, anulando a produção de adenosina trifosfato (ATP). Neste caso, o produto é classificado como inibidor da ATPase mediado pelo íon magnésio (MARÇON, 2006). Assim, possivelmente, o sinergismo da mistura é o resultado da combinação do efeito do acaricida em nível celular com a atividade das micotoxinas de *H. thompsonii*, o que gerou uma mortalidade rápida e que atingiu um grande número de adultos tratados com concentrações baixas.

O sinergismo entre fungos entomopatogênicos e agrotóxicos têm sido relatados na literatura, em especial o efeito de *B. bassiana* em mistura com inseticidas para o controle do besouro do Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) (ANDERSON et al., 1989; FURLONG; GRODEN, 2001). Nestes trabalhos, comprovou-se que há interação positiva entre este patógeno e alguns inseticidas, especialmente quando os produtos são aplicados em folhas utilizadas para a alimentação das larvas do inseto. No caso de ácaros fitófagos, artigo publicado por Irigaray; Mancebón e Moreno (2003) avaliou o controle do ácaro *T. urticae* com *B. bassiana* e inseticidas reguladores de crescimento. Neste trabalho, foram testados os produtos Alsystin (Triflumuron) e Naturalis -L (*B. bassiana*) individualmente e também a mistura em concentrações correspondentes à CL₄₀ e CL₂₀, respectivamente, em larvas. Os resultados evidenciaram que a mistura apresentou efeito antagônico sobre o ácaro, uma vez que os níveis de mortalidade de larvas foram inferiores aos do fungo aplicado individualmente. Para *B. phoenicis*, Alves et al. (2004) testaram a atividade do acaricida Dicofol (Kelthane 480 CE) em associação com os fungos *H. thompsonii* e *Lecanicillium* sp. sobre adultos do ácaro, constatando a redução

significativa no tempo letal da mistura em comparação com os componentes aplicados individualmente.

Do ponto de vista prático, a interação positiva entre o Propargite e *H. thompsonii* pode representar uma possibilidade de manejo, especialmente em áreas onde tenha sido constatada resistência do ácaro a acaricidas. A utilização de subdoses do produto não tem implicações na dinâmica da resistência, além de resultarem em menor contaminação ambiental, porém só são justificáveis se forem associadas ao patógeno. Por sua vez, a aplicação de baixas concentrações deste pode resultar em diminuição de custos. Porém, testes em campo e testes de compatibilidade com novas formulações de *H. thompsonii* são necessários para comprovar a eficácia do sistema e a constatação do sinergismo em condições de campo.

3 CONCLUSÕES

As características físicas e nutricionais do meio de cultura utilizado para a obtenção de *Hirsutella thompsonii* afetam sua capacidade de produção e níveis de virulência ao ácaro da leprose dos citros (*Brevipalpus phoenicis*). O meio de cultura completo e sólido (MC-S) promove maior crescimento e reprodução mais adequado do fungo quando comparado ao arroz pré-cozido (APC e APC-SM) e ao meio completo e líquido (MC-L). Quando produzido em MC-S, o patógeno é mais virulento ao ácaro se comparado ao fungo produzido em APC, APC-SM e MC-L.

As populações de diversas regiões do Estado de São Paulo apresentam diferenças na suscetibilidade ao fungo *H. thompsonii*.

Os ovos de *B. phoenicis* não são suscetíveis ao isolado Esalq-1269 de *H. thompsonii*.

A temperatura e umidade relativa são fatores que interferem na patogenicidade de *H. thompsonii* para adultos de *B. phoenicis*. A temperatura exerce efeito mais evidente do que a umidade relativa, sendo mais prejudicial quando o limite é inferior a 22°C. O isolado Esalq-1269 é tolerante a condições de temperatura elevada, sendo patogênico para *B. phoenicis* a 30°C, independentemente das condições de umidade relativa.

Os isolados Esalq-1269, CG-532, CG-524 e CC-540 pertencem à espécie *H. thompsonii* var. *thompsonii*. O isolado CG-541 não apresenta características morfológicas que permitam

classificá-lo como representante do gênero *Hirsutella*. Todos os isolados avaliados são patogênicos a *B. phoenicis*, sendo Esalq-1269 mais virulento para a praga.

A morte de *B. phoenicis* pode ocorrer quando este fungo não é aplicado diretamente sobre os ácaros. Porém, este efeito varia em função do substrato no qual o patógeno foi produzido. A persistência de *H. thompsonii* em folhas de citros diminui em função do tempo.

A aplicação em campo de *H. thompsonii* afeta a população de adultos e conseqüentemente a quantidade de ovos de *B. phoenicis*.

H. thompsonii é diferentemente afetado por acaricidas, pois o nível de toxicidade varia de acordo com a formulação. Dentre os produtos sete testados, todos registrados e utilizados para o controle de *B. phoenicis* em citros, apenas o Sipicatim 500 SC e o Kelthane 480 CE foram considerados muito tóxico e tóxico, respectivamente. A associação de concentrações sub-letais do acaricida Propargite (Omite 720 SC) e *H. thompsonii* causou efeito sinérgico em *B. phoenicis*. A mistura promove maior mortalidade de ácaros quando comparada à aplicação dos produtos separadamente.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, J.L.R.; ROSAS, L.S. Control biológico de *Brevipalpus* spp. em *Citrus aurantifolia* em Guerrero, México. **Manejo integrado de plagas**, Costa Rica, v.55, p.56-59, 2000.
- ACEVEDO, J.L.R.; ROSAS, L.S. Variabilidad de cepas de *Hirsutella thompsonii* a partir de ácaros fitófagos em três sistemas terrestres del estado de Colima, México. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, México, v.77, p.7-16, 2006.
- AGROFIT: SISTEMAS DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 12 dez.2006.
- ALVES, E.B. **Dinâmica da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) ao acaricida dicofol**. 2004. 79p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- ALVES, E.B.; CASARIN, N.F.B.; OMOTO, C. Mecanismos de dispersão de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) em pomares de citros. **Neotropical Entomology**, Vacaria, n.34, v.1, p.89-96, 2005.
- ALVES, E. B.; ALVES, S. B.; OMOTO, C.; CASARIN, N. F. B. Utilização de fungos entomopatogênicos em mistura com o acaricida dicofol no manejo da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., 2004, Gramado. **Resumos...** Gramado: SEB, 2004. p. 515.
- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. 407p.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos: In: _____. **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.11, p.289-381.
- ALVES, S.B. O controle microbiano sustentável de ácaros em citros. **Visão agrícola**, Piracicaba, n.2, p.87-89, 2004.
- ALVES, S.B.; LEUCUONA, R.E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.5, p.93-163.
- ALVES, S.B.; MOINO JÚNIOR., A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. São Paulo: FEALQ, 1998b. cap.8, p.217-238.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B.(Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, cap.27, p.845-867.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, B.M.; STIMAC, J.L.; VIEIRA, S.A. Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia alter prolongad storage at low, above-freezing temperaturas. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, v.6, p.575-581, 1996.

ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR., A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a. cap.20, p.637-710.

ALVES, S.B.; TAMAI, M.A.; ROSSI, L.S.; CASTIGLIONI, E. *Beauveria bassiana* pathogenicity to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 37, p.117-122, 2005.

ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; TAMAI, M.A.; MOINO JÚNIOR, A.; ALVES, L.F.A. Compatibilidade de produtos fitossanitários com entomopatógenos em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.21, n.2, p.289-294, 2000.

ANDERSON, T.E.; HAJECK, A.E.; ROBERTS, D.W.; PREISLER, H.K.; ROBERTSON, J.L. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.82, p.83-89, 1989.

BAKER, J.R.; NEUNZIG, H.H. *Hirsutella thompsonii* as a fungus parasite of the blueberry bud mite. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.61, n.4, 1117-1119, 1968.

BASSANEZI, R.B. Leprose dos citros: foco no controle do ácaro vetor. **Visão agrícola**, Piracicaba, n.2, p.25-29, 2004.

BENZ, G. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. (Ed.). **Microbial control of insects and mites**. Londres: Academia Press, 1971, cap.14, p.327-356.

BOARETTO, M.A.C.; CHIAVEGATO, L.G.; SILVA, C.D.A. da Transmissão da leprose através de fêmeas de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) e de seus descendentes, em condições de laboratório. **Científica**, São Paulo, v.21, n.2, p.245-253, 1993.

BOUCIAS, D.G.; MCCOY, C.W.; JOSLYN, D.J. Isozyme differentiation among 17 geographical isolates of *Hirsutella thompsonii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, n.39, p.329-337, 1982.

CAMPOS, F.J.; OMOTO, C. Resistance to hexythiazox in *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) from Brazilian citrus. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.26, n.3/4, p.243-251, 2002.

CEHRNIN, L. GAFNI, A.; MOZES-KOCH, R.; GERSON, U.; SZTEJNBERG, A. Chitolytic activity of the acaropathogenic fungi *Hirsutella thompsonii* and *Hirsutella necatrix*. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, n.43, p.440-446, 1997.

CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V. Transmissão experimental da leprose dos citros por meio de implantação de tecido foliar no caule. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n.5, p.211-214, 1980.

CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V. Coffee ringspot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in coffee. **Experimental and Applied Acarology**, Holanda, n.30, p.203-213, 2003.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of acari. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, v.10, p.357-384, 2000.

CHIAVEGATO, L.G. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.8, p.815-816, 1986.

CHIAVEGATO, L.G.; KHARFAN, P.R. Comportamento do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (G.) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, p.355-359, 1993.

CHIAVEGATO, L.G.; MISCHAN, M.M.; SILVA, M.A. Prejuízos e transmissibilidade de sintomas de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) Sabed, 1946 (Acari: Tenuipalpidae). **Científica**, São Paulo, v.10, n.2, p.265-271, 1982.

CHILDERS, C.C. Feeding injury to 'Robinson' tangerine leaves by *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae) in Florida and evaluation of chemical control on citrus. **Florida Entomologist**, Gainesville, n.77, p.265-271, 1994.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.; WELBOURN, W.C. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus* and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, n.30, p.29-105, 2003a.

CHILDERS, C.C.; FRENCH, J.V.; RODRIGUES, J.C. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, n.30, p.5-28, p., 2003b.

CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W.; WELBOURN, W.C.; RIVERA, C.; OCHOA, R. *Brevipalpus* como vectores de la leprosis de los cítricos. **Manejo Integrado de Plagas**, Costa Rica, v.60, p.61-65, 2001a.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.; KITAJIMA, E.W.; DERRICK, K.S.; RIVERA, C.; WELBOURN, W.C. Estrategia de manejo para romper el ciclo del vector *Brevipalpus* spp. – Rhabdovirus, causante de la leprosis de los cítricos. **Manejo Integrado de Plagas**, Costa Rica, v.60, p.71-75, 2001b.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; DERRICK, K.S.; ACHOR, D.S.; FRENCH, J.V.; WELBOURN, W.C.; OCHOA, R.; KITAJIMA, E.W. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, n.30, p.181-202, 2003c.

- COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O. CHAGAS, C.M.; GALETTI, C.M.; ROSSETTI, V.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 208-213, 1995.
- CORREIA, A.C.B.; GRAVENA, S.; KREBBSY, E.O. Primeira citação do fungo *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* parasitando *Phyllocoptruta oleivora* (Ashm.) (Acari, Eriophyidae) no Brasil. **Laranja**, Cordeirópolis, v.13, n.2, p.553-558, 1992.
- COSTA JÚNIOR, W.H.; LOPES, R.B. Fruticultura orgânica: alternativa de diferenciação. In: FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2000**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2000. p. 62.
- FAION, M. **Toxicidade de agrotóxicos utilizados no controle de *Bemisia tabaci* Biótipo B, sobre fungos entomopatogênicos**. 2004. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- FERRARI, J.; MÜLLER, C.B.; KRAAIJEWELD, A.R.; GODFRAY, H.C. Clonal variation and covariation in aphid resistance to parasitoids and pathogen. **Evolution**, Chicago, v.55, n.9, p.1805-1814, 2001.
- FISHER, F.E. An *Entomophthora* attacking citrus red mite. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.34, n.3, p.83-88, 1951.
- FLECHTMAN, C.H.W. **Ácaros de importância agrícola**. 6ed. São Paulo: Nobel, 1985. 189p.
- FRANCO, C.R. **Deteção e caracterização da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) ao acaricida propargite**. 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- FURLONG, M.J.; GRODEN, E. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.94, n.2, p.344-356, 2001.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, A.R.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Fealq, 2002. 920p.
- GARDNER, W.A., OETTING, R.D.; STOREY, G.K. Susceptibility of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, to the fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* Fisher. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 65, n.3, p. 458-465, 1982.
- GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.70, p.653-658, 1977.

GERSON, U.; KENNETH, R.; MUTTATH, T.I. *Hirsutella thompsonii* a fungal pathogen of mites. II. Host-pathogen interactions. **Annals of Applied Biology**, Londres, v.91, n.1, p.29-40, 1979.

GONZALEZ, R.H. Revision of the *Brevipalpus phoenicis* 'complex' with descriptions of new species from Chile and Thailand (Acarina, Tenuipalpidae). **Acarologia**, Montpellier, v.17, n. 1, p. 81-91, 1975.

GOPAL, M.; GUPTA, A. Has *Hirsutella thompsonii* the wherewithal to counter coconut eriophyoid mite scourge? **Current Science**, Bangalore, v.80, n.7, p.831-836, 2001.

GRAVENA, S. Manejo integrado de pragas é vital na produção de citros **Visão agrícola**, Piracicaba, n.2, p.54-59, 2004.

GROOT, T.V.M.; JANSSEN, A.; PALLINI, A.; BREEUWER, J.A.J. Adaptation in the asexual false spider mite *Brevipalpus phoenicis*: evidence for frozen niche variation. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, n.36, p.165-176, 2005.

GUARÍN-MOLINA, J.; ALVES, S.B.; MASCARIN, G.M.; PAULI, G. Avaliação da prevalência estacional dos fungos *Lecanicillium* sp.. e *Syngliocladium* sp. sobre *Orthezia praelonga* (Hemiptera: STERNORRYNCHA: ORTEZIIDAE) no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA 11., 2006, Recife, 2006. Recife: UFRPE, 2006. 1 CD-ROM.

GUERERE, P.; GONSÁLEZ, M.Q. Escalas cualitativas del dano hecho por el acaro plano, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Tenuipalpidae) a frutos del guayabo (*Psidium guajava* L.). **Revista da Facultad de Agronomia (LUZ)**, Caracas, v.17, n.471-481, 2000.

GUIRADO, N.; SILVÉRIO, J.L. Leprose e declínio: problemas sérios da citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v.13, n.2, p.541-552, 1992.

HAJEK, A.E.; LEGER, R.J. Interations between fungal pathogens and insects hosts. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.39, p.293-322, 1994.

HEGEDUS, D.D.; BIDOCHKA, M.J.; MIRANPURI, G.S.; KHACHATOURIANS, G.G. A comparison of the virulence, stability and cell-wall surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.36, p.785-789, 1992.

HELLE, W.; BOLLAND, H.R.; HEITMANS, W.R.B. Chromosomes and types of parthenogenesis in the false spider mites (Acari: Tenuipalpidae). **Genetica**, Amsterdam, v.54, p.45-50, 1980.

IRIGARAY, F.J.S.; MANCEBÓN, V.M.; MORENO, I.P. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and its compatibility with triflumuron: effects on the twospotted spider tem *Tetranychus urticae*. **Biological Control**, San Diego, v.26, n.2, p.168-173, 2003.

JEPPSON, L.R.; KEIFER, H.H.; BAKER, E.W. **Mites injurious to economic plants**. Berkeley: University of California Press, 1975. 614p.

KANGA, L.H.B.; JAMES, R.R.; BOUCIAS, D.G. *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, n.81, p.175-184, 2002.

KELLER, S.; SCHWEIZER, C.; SHAH, P. Differential susceptibility of two *Melolontha* populations to infections by the fungus *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, v.9, n.4, p.441-446, 1999.

KENNETH, R.; MUTTATH, T.I.; GERSON, U. *Hirsutella thompsonii*, a fungal pathogen of mites. I. Biology of the fungus *in vitro*. **Annals of Applied Biology**, Londres, n.91, p.21-28, 1979.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V. Passion fruit green spot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on passion fruit in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, p.225-231, 2003a.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, p.135-160, 2003b.

KITAJIMA, E.W.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S.; YUKI, V. Short rod-like particles associated with citrus leprosis. **Virology**, New Orleans, v.50, n.1, p.254-258, 1972.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V.; CHIAVEGATO, L.G.; PIZA JR, C.T.; MOROZINI, W. Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.4, p.555-559, 1997.

KONDO, H.; MAEDA, T.; TAMADA, T. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, p.215-223, 2003.

KONNO, R.H.; FRANCO, C.R.; OMOTO, C. Suscetibilidade de populações de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) a acaricidas organoestânicos em citros. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.88, n.4, p.705-709, p.2-13, 2001.

KUMAR, O.S.; SINGH, S.P. Coconut mite in India: biopesticide breakthrough. **Biocontrol News and Information**, Oxfordshire, v.22, n.4, p. 1-8, 2001.

LATGÉ, J.P.; CABRERA, R.I.; PREVOST, M.C. Microcycle conidiation in *Hirsutella thompsonii*. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, v.34, p.625-630, 1988.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Oesp, 92p. 2003.

LEORA SOFTWARE. **POLO-PC**. A user's guide to probit and logit analysis. Berkeley: Shattuck, 1987. 22p.

LIPA, J.J. Microbial control of mites and ticks In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. (Ed.). **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1971. cap.15, p.357-373.

LIU, J.C.; BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LIU, W.Z.; MARUNIAK, J. The mode of action of Hirsutellin A on eukaryotic cells. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, v.67, p.224-228, 1996.

MAIMALA, S.; TARTAR, A.; BOUCIAS, D.; CHANDRAPATYA, A. Detection of the toxin Hirsutellin A from *Hirsutella thompsonii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, v.80, p.112-126, 2002.

MARÇON, P.G. Modo de ação de inseticidas e acaricidas. Mogi Mirim: IRAC-BR: Comitê brasileiro de ação a resistência a inseticidas. <http://www.irac-br.org.br/bibliografias.htm> 15 dez. 2006.

MATINELLI, N.M.; OLIVEIRA, C.A.L. de; PERECIN, D. Conhecimentos básicos para estudos que envolvam levantamentos da população do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) na cultura dos citros. **Científica**, São Paulo, v.4, p.242-253, 1976.

MCCOY, C.W. Pathogens of eriophyoid mites. In: LINDQUIST, M.W.; SABELIS, M.W.; BRUIN, J. (Ed.). **Eriophyoid mites: their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier Science, 1996. cap.24, p.481-490.

MCCOY, C.W.; KANAVAL, R.F. Isolation of *Hirsutella thompsonii* from the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora* and its cultivation on various synthetic media. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, v.14, p.386-390, 1969.

MCCOY, C.W.; COUCH, T.L. *Hirsutella thompsonii*: a potential mycoacaricide. **Developments in Industrial Microbiology**, Washington, v.20, p.89-96, 1978.

MCCOY, C.W.; COUCH, T.L. Microbial control of the citrus rust mite with the mycoacaricide Mycar®. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.65, n.1, p.116-125, 1982.

MCCOY, C.W.; HIL, A.J.; KANAVAL, R.F. Large scale production of the fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* in submerged culture and its formulation for application in the field. **Entomophaga**, Catalluña, v.20, p.229-240, 1975.

MCCOY, C.W.; STAMPER, D.H.; TUVESON, R.W. Conidiogenous cell differences among mutant and wild-type pathotypes of *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, v.43, p.414-421, 1984.

- MCCOY, C.W.; SELHIME, A.G.; KANAVEL, R.F.; HILL, A.J. Supression of citrus rust mite populations with application of fragmented mycelia of *Hirsutella thompsonii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, 17, p.270-276, 1971.
- MESUMECCI, M.R.; ROSSETTI, V. Transmissão dos sintomas da leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.15, p.228, 1963.
- MIETKIEWSKI, R.; BALAZY, S.; TKACZUK, C. Mycopathogens of mites in Poland: a review. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, n.10, p.459-465, 2000.
- MUMA, M. H. Coincidence and incidence of *Entomophthora floridana* with and in *Eutetranychus banksi* in Florida Citrus Groves. **Florida Entomologist**, Gainsville, v.52, n.2, p.107-112, 1969.
- MUMA, M. H. Factors contributing to the natural control of citrus insects and mites in Florida. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.48, p.432-438, 1955.
- NEVES, E.M.; RODRIGUES, L.; GASTALDI, H.L.G. Defensivos agrícolas e custos na produção de citros. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.2, p.127-131, 2004.
- NIELSEN, C.; KIENA, M.; HAJEK, A.E. Virulence and fitness of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* in its host *Lymantria dispar*, for the pathogen and host strains originating from Asia, Europe, and North America. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, n.89, p.232-242, 2005.
- OCHOA, R.; AGUILAR, H.; VARGAS, C. **Phytophagous mites of Central America: an illustrated guide**. Turrialba: CATIE. 1994, 234p.
- OLIVEIRA, C.A.L. de. Flutuação populacional e medidas de controle do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, n.7, p.1-31, 1986.
- OLIVEIRA, C.A.L. de **Ácaros dos citros**. São Bernardo do Campo: Basf Brasileira, Departamento de Agroquímicos, 1994. 18p.
- OLIVEIRA, C.A.L. Cercas Vivas, quebra-ventos e plantas daninhas no manejo da leprose. **Visão agrícola**, Piracicaba, n.2, p.30-22, 2004.
- OMOTO, C. Acaricide resistance management of leprosis mite (*Brevipalpus phoenicis*) in brazilian citrus. **Pesticide Science**, Great Britain, v.52, p.189-191, 1998.
- OMOTO, C.; ALVES, S.B. Mecanismos de defesa de insetos contra entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.3, p.55-74.
- OMOTO, C.; MCCOY, C.W. Toxicity of purified fungal toxin hirsutellin A to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora* (Ash.). **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, v.72, p.319-322, 1998.

OMOTO, C.; ALVES, E.B. A resistencia dos ácaros a acaricidas em citros. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n.2, p.82-86, 2004.

OMOTO, C.; ALVES, E.B.; RIBEIRO, P.C. Detecção e monitoramento da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) ao dicofol. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.29, n.4, p.757-764, 2000.

OOMEN, P.A. **Studies on population dynamics of the scarlet mite, *Brevipalpus phoenicis*, a pest of tea in Indonesia**. Wageningen: Veenman & Zonen, 1982. 88p.

PELCZAR JR., J.M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações** 2nd ed. Tradução de Sueli Fumie Yamada, Tânia Ueda Nakamura, Tereza Cristina R.M. Oliveira, Benedito Prado Dias Filho, Lourdes Botelho Garcia. São Paulo: Makron Books, 1996. 517p.4v.

PEÑA, J.E.; OSBORNE, L.S.; DUNCAN, R.E. Potential of fungi as biocontrol agents of *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae). **Entomophaga**, Catalluña, v.41, p.27-36, 1996.

PIJINACKER, L.P.; FERWERDA, M.A.; BOLLAND, H.R.; HELLE, W. Haploid females pathenogenesis in the false spider mite *Brevipalpus obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). **Genetica**, Holanda, n.51, p.211-214, 1980.

POINAR JÚNIOR, G.; POINAR, R. Parasites and pathogens of mites. **Annual Review of Entomology**, Londres, 1998, n.43, p.449-469, 1998.

QUIRÓZ, M.G.; POLEO, N.; PETIT, Y.M. Evolución del daño del fruto de guayaba, *Psidium guajava* L., causado por *Brevipalpus phoenicis* (Geijkes) (Acari: Tenuipalpidae). **Entomotropica**, Maracay, v.17, n.1, p.91-96, 2002.

REIS, P.R.; CHAGAS, S.J.de R. Relação entre o ataque do ácaro-plano e da mancha-anular com indicadores da qualidade do café. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.25, n.1, p.72-76, 2001.

REIS, P.R.; SOUZA, J.C.; SOUSA, E.O.; TEODORO, V. Distribuição espacial do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) em cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.29, n.1, 177-183, 2000.

RODRIGUES, J.C.V. **Relações patógeno-vetor-plantas no sistema leprose dos citros**. 2000. 168p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

RODRIGUES, J.C.V.; MACHADO, M.A. Notes on a probable respiratory apparatus in eggs of *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). **Internacional Journal of Acarology**. Michigan, v.25, p.231-234, 1999.

RODRIGUES, J.C.V.; MOON, D.H.; MACHADO, M.A. Variabilidade genética entre populações de *Brevipalpus phoenicis* G. (Acari: Tenuipalpidae), através de marcadores RAPD. **Brazilian Journal of Genetica**, Ribeirão Preto, n.19, v.3, p.208, 1996.

RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L.; PRATES, H.S.; FREITAS, D.S. Leprose dos citros: importancia, histórico, distribuição e relações com o ácaro vetor. **Laranja**, Cordeirópolis, v.15, p.123-138, 1994.

RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L.; FREITAS, D.S.; PRATES, H.S. Virus-like particles associated with *Brevipalpus phoenicis* Geijkes (Acari: Tenuipalpidae), vector of citrus leprosis virus. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.26, n.2, p.391-395, 1997.

RODRIGUES, J.C.V.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, n.30, p.161-179, 2003.

RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; NOGUEIRA, N.L. Uma estratégia para o controle da leprose dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, n.22, n.2, p.411-423, 2001.

ROSAS-ACEVEDO, J.L.; BOUCIAS, D.G.; LEZAMA, R.; SIMS, K.; PESCADOR, A. Exudate from sporulating cultures of *Hirsutella thompsonii* inhibit oviposition by the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.29, p.213-225, 2003.

ROSSETTI, V.; COLARICCIO, A.; CHAGAS, C.M.; SATO, M.E.; RAGA, A. **Leprose dos citros**. São Paulo: Sociedade Amigos do Instituto Biológico. (Boletim Técnico, 6). <http://www.geocities.com/~esabio/leprose/leprose.htm>.

ROSSI, L.S. **Seleção de fungos entomopatogênicos e infecção de *Hirsutella* sp.em *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939)**. 2002. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ROSSI, L.S.; ALVES, S.B. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos e ciclo biológico de *Hirsutella* sp. em *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro. **Resumos...** São Pedro: ESALQ, 2003. p.97.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B. Horizontal transmission and residual effect of *Hirsutella thompsonii* to the false spider mite (*Brevipalpus phoenicis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA 11., 2006, Recife, 2006. Recife: UFRPE, 2006b. 1 CD-ROM.

ROSSI-ZALAF, L.S.; ALVES, S.B. Susceptibility of *Brevipalpus phoenicis* to entomopatogenic fungi. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.40, n.1, p.37-47, 2006a.

SALVA, R.A.; MASSARI, C.A. Situação do ácaro da leprose no estado de São Paulo (Levantamento – Fundecitros Agosto 1995). In: OLIVEIRA, C.A.L. de; DONADIO, L.C. (Eds.) **Leprose dos citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p.13-18.

SAMSOM, R.A.; MCCOY, C.W. A new fungal pathogen of the scavenger mite, *Tydeus gloveri*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, v.40, p.216-220, 1982.

SAMSON, R.A.; MCCOY, C.W.; O'DONNELL, K.L. Taxonomy of the acarine parasite *Hirsutella thompsonii*. **Mycologia**, Florida, n.72, p.359-377, 1980.

SAMSON, R.A.; EVANS, H.C.; LATGÉ, J.P. Atlas of entomopathogenic fungi. Netherlands: Wetenschappelijke uitgeverij Bunge, 1988. 187p.

SCHNEIDER-ORELLI, O. **Entomologisches Praktikum**: Einführung in die land – und forstwirtschaftliche Insektenkunde. Aarau: Zweite Aufl., 1947. 237p.

SELHIME, A.G.; MUMA, M.H. Biology of *Entomophthora floridana* attacking *Eutetranychus banksi*. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.49, n.3, p.161-168, 1966.

SEWIFY, G.H.; MABROUK, A.M. The susceptibility of different stages of the citrus brown mite, *Eutetranychus orientalis* Oudemans (Acarina: Tetranychidae) to entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5., 1990, Adelaide. **Proceedings and abstracts...** Adelaide: SIP, 1990. p.395.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; FUXA, J.R.; LACEY, L.A.; ONSTAD, D.W.; KAYA, H.K. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, n.88, p.1-7, 2005.

SHI, W.B.; FENG, M.G. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. **Biological Control**, San Diego, v.30, p.165-173, 2004.

SMILEY, R.L.; GERSON, U. A review of the Tenuipalpidae (Acari: Prostigmata) of Australia with descriptions of two new genera and four new species. **International Journal of Acarology**. Michigan, v.21, n.1, p.33-45, 1995.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; NASCA, A.J. Primera cita del hongo patógeno de ácaros, *Hirsutella thompsonii* (Fisher, 1950) para la República Argentina. **CIRPON – Revista de Investigación**, San Miguel de Tucuman, v.1, n.3, p.137, 141, 1983.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MANZUR, J.; NASCA, A. Influencia de algunos agroquímicos sobre tres variedades de *Hirsutella thompsonii* Fischer (Hyphomycetes: Noniliales). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.16, n.2, p.399-406, 1987.

SPEARS, A.T.; YOTHERS, W.W. Is there an entomogenous fungus attacking the citrus rust mite in Florida? **Science**, Washington, v.11, p.41-42, 1924.

SZTEJNBERG, A.; DORON-SHLOUSH, S.; GERSON, U. The biology of the acaropathogenic fungus *Hirsutella kirchneri*. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, v.7, p.577-590, 1997.

TAMAI, M.A. **Controle de *Tetranychus urticae* Koch com fungos entomopatogênicos**. 2002. 144p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.; FAION, M. Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.3, p.77-84, 2002a.

TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; FAION, M.; PADULLA, L.F. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.3, p.89-96, 2002b.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1993. 622p.

TANG, L.C.; HOU, R.F. Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lep. Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, n.125, p.243-248, 2001.

TANZINI, M.R.; ALVES, S.B.; MORAES, G.J.; TAMAI, M.A.; FERLA, N.J. An epizootic of *Calacarus heveae* (Acari: Eriophyidae) caused by *Hirsutella thompsonii* F. on rubber trees. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam v.24, n.2, p.141-144, 2000.

TEIXEIRA ALVES, R. **Determinação das exigências térmicas e hídricas do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. 1986. 131p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1986.

TKACZUK, C.; LABANOWSKA, B.H.; MIETKIEWSKI, R. The influence of pesticides on the growth of fungus *Hirsutella nodulosa* (Petch) – Entomopathogen of strawberry mite (*Phytonemus pallidus* ssp. *fragariae* Zimm.). **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Skerniewice, v.12, p.119-126, 2004.

TRINDADE, M.L.B.; CHIAVEGATO, L.G. Caracterização biológica dos ácaros *Brevipalpus obovatus* D., *B. californicus* B., e *B. phoenicis* G. (Acari: Tenuipalpidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.23, n.2, p.189-195, 1994.

VAN DER GEEST, L.P.S.; ELLIOT, S.L.; BREEUWER, J.A.J. BEERLING, E.A.M.; Disease of mites. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, n.24, p.497-560, 2000.

VEY, A.; QUIOT, J.M.; MAZET, I.; MCCOY, C.W. Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* in shake culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, v.61, p.131-137, 1993.

WEEKS, A.R.; MAREC, F.; BREEUWER, J.A. A mite species that consist entirely of haploid females. **Science**, Washington, v.292, p.2479-2481, 2001.

WEISER, J.; MUMA, M.H. *Entomophthora floridana* n.s. (Phycomycetes: Entomophthoraceae), a parasite of the texas citrus mite *Tetranychus banksi*. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.49, n.3, p.155-159, 1966.

WEKESA, V.W.; KNAPP, M.; MANIANIA, N.K.; BOGA, H.I. Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.130, n.3, p.155-159, 2006.

WELBOURN, W.C.; OCHOA, R.; KANE, E.C.; ERBE, E.F. Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, n.30, p.107-1033, 2003.

WERNER, F.G.; CHAIRMAN, C. **Commun names of insects and related organisms**. **Entomological society of America**, Lanham: s.n. 1982. 132p.

WINKELHOFF, A.J.; MCCOY, C.W. Conidiation of *Hirsutella thompsonii* var. synnematososa in submerged culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, v.43, p.59-68, 1984.

YOUNG, S.S.Y.; YEHLING, D.M.; SASTRODIHARDJO, S.; WRENSCH, D.L. Sampling population density of *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and assessment of feeding damage level on Indonesian Tea. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.88, n.2, p.283-287, 1995.

ZOEBISCH, T.G.; OCHOA, R.; VARGAS, C.; GAMBOA, A. Identificación y potencial del hongo *Hirsutella thompsonii* Fisher para el control de ácaros de importancia económica en América Central. **Manejo Integrado de Plagas**, Costa Rica, v.23, p.9-12, 1992.