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

**Estudos bioecológicos de *Neozygites floridana* (Entomophthorales:
Neozygitaceae) fungo patogênico de *Tetranychus evansi* (Acari:
Tetranychidae)**

Vanessa da Silveira Duarte

**Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração:
Entomologia**

**Piracicaba
2008**

Vanessa da Silveira Duarte
Engenheiro Agrônomo

**Estudos bioecológicos de *Neozygites floridana* (Entomophthorales:
Neozygitaceae) fungo patogênico de *Tetranychus evansi* (Acari:
Tetranychidae)**

Orientador:
Prof. Dr. ITALO DELALIBERA JR.

**Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Área de concentração:
Entomologia**

**Piracicaba
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Duarte, Vanessa da Silveira

Estudos bioecológicos de *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Neozygitaceae)
fungo patogênico de *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) / Vanessa Duarte da
Silveira . - - Piracicaba, 2008.

68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Ácaros 2. Biologia molecular 3. Controle biológico (Fitossanidade) 4. Dinâmica de
populações 5. Fungos 6. Solanaceae 7. Tomate I. Título

CDD 635.642
D812e

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

A Deus, pela dádiva da vida.

AGRADEÇO

Aos meus pais Vicente e Clemilda, e irmãos William e Priscila.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pelas condições oferecidas;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ítalo Delalibera Jr, pela sua atenção, disponibilidade, orientação e amizade;

Aos estatísticos Prof. Dr. Carlos Tadeu Dias e Fernanda Rizzato pelo apoio nas análises dos dados obtidos neste trabalho;

A CAPES que viabilizou a minha permanência no curso, fornecendo a bolsa de mestrado;

A minha família, obrigado pela paciência, inspiração e apoio não só durante o mestrado como também durante toda a minha vida acadêmica;

Aos amigos Adriana Ferreira, Ana Elizabete Lopes, Cherre Sade, Daian Oliveira, Gerane Celly, José Wilson Silva, Marcell Chiovato, Mariana, Mauro Leite, Monica Santos, Poliane Ribeiro, Rafael Valadares, Rochane Caram, Sabrina Assis, Simone Duarte, Thales Miller, Thiago Augusto de Moura;

As minhas amigas de república Nívia Dias, Sullivan Pereira, Ana Paula Neto e Kelly Justin pela amizade e companheirismo;

As famílias Pauli e Caviolli pela amizade e apoio durante minha permanência em Piracicaba;

A Giuliano Pauli, pelo carinho, amizade e companheirismo;

Aos amigos Ane Medeiros, Eveline Calderan, Renan Silva, Thiago Castro, Vitalis Wekesa, pelas contribuições durante o desenvolvimento dos trabalhos;

A todos meus amigos do Curso de Pós-Graduação pela troca de experiências e pelas dificuldades e vitórias que vivenciamos;

Ao eterno “mestre” Dr. Hamilton Oliveira, pelo ensinamento e incentivo;

A todos meus colegas do Setor de Zoologia pela cooperação. Especialmente, lembro com muita gratidão de Daiane Nunes, Erika Britto, Fernando Silva, Geraldo Vasconcelos, Guilherme Micaí, Janayne Resende, John Jairo, Marcos Bellini, Monica Mayumi, Rafael Castilho, Ralf Araújo, Renata Simões, Samuel Roggia, Tatiane Castro e muitos outros que não foram mencionados pelo espaço limitado;

Aos professores do Setor de Zoologia Agrícola, Carlos Flechtmann e Gilberto Moraes;
Aos funcionários do Setor de Zoologia Agrícola, Josenilton Mandro, José Luiz Piedade,
Lásaro Silva, Vera Durrer pela ajuda indispensável.

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
Referências.....	15
2 Dinâmica populacional de <i>Tetranychus evansi</i> (Acari: Tetranychidae) e do patógeno <i>Neozygites floridana</i> (Zygomycetes: Entomophthorales) em plantios de tomate e maria-preta em cultivos protegidos e em campo com diferentes regimes de aplicação de pesticidas	24
Resumo.....	24
Abstract.....	24
2.1 Introdução	25
2.2 Material e Métodos.....	29
2.2.1 Criação de <i>Tetranychus evansi</i>	29
2.2.2 Cultura estoque de <i>Neozygites floridana</i>	29
2.2.3 Métodos experimentais	29
2.3 Resultados	33
2.4 Discussão	45
Referências.....	50
3 Determinação da variabilidade genética dos isolados de <i>Neozygites floridana</i> através do seqüenciamento da região 18S do DNA ribossômico	57
Resumo.....	57
Abstract.....	57
3.1 Introdução	58
3.2 Material e Métodos.....	59
3.2.1 Criação de <i>Tetranychus evansi</i> e <i>Tetranychus urticae</i>	59
3.2.2 Cultura estoque de <i>Neozygites floridana</i>	59
3.2.3 Métodos experimentais	60
3.3 Resultados e Discussão.....	62
Referências.....	64

RESUMO

Estudos bioecológicos de *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Neozygitaceae) fungo patogênico de *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae)

O ácaro vermelho do tomateiro *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard é uma importante praga exótica de solanáceas na Europa e na África. Sugere-se que este ácaro tenha originado na América do Sul, região onde este não é considerado uma praga importante. Um importante inimigo natural de *T. evansi* no Brasil é o fungo *Neozygites floridana* Weiser e Muma que tem como principais características: alta virulência, restrita gama de hospedeiros e difícil crescimento *in vitro*. A taxonomia das espécies de *Neozygites* ainda é incerta, sendo que algumas espécies não podem ser separadas por caracteres morfológicos. Estudos moleculares são necessários para separar espécies e isolados de *Neozygites* patogênicos a ácaros tetraniquídeos. Isolados de *N. floridana* provenientes de *T. urticae* apresentam baixa virulência a *T. evansi*, e isolados de *T. evansi* apresentam baixa virulência a *T. urticae*. Através do seqüenciamento parcial da região 18S do DNA ribossômico de *N. floridana* verificou-se que o isolado de *T. evansi* (LQ2) apresenta 98% de similaridade ao isolado de *T. urticae* (LQ3), mas estes dois isolados apresentam alta divergência com outros isolados patogênicos a outros ácaros tetraniquídeos. Por exemplo, a similaridade entre dois isolados coletados em *T. urticae*, LQ3 e ARSEF662, é de somente 90%, indicando que os fungos identificados como *N. floridana* possam pertencer a diferentes espécies. Embora *N. floridana* seja o principal inimigo natural associado a *T. evansi* na maioria das regiões brasileiras monitoradas até o momento, o papel deste patógeno na regulação populacional da praga ainda não havia sido determinado. Neste estudo, monitorou-se o impacto das epizootias do patógeno nas populações de *T. evansi* em experimentos de campo e ambiente protegido em quatro ciclos de cultivo em maria-preta e em tomateiro com e sem aplicação de pesticidas químicos. A densidade de *T. evansi* foi correlacionada com a incidência do fungo e às condições ambientais. O único inimigo natural encontrados nas folhas foi *N. floridana* e as observações feitas demonstraram que este é um importante fator de regulação das populações de *T. evansi* em tomateiro, especialmente em ambiente protegido. A sua introdução nos continentes onde esta praga foi recentemente introduzida pode contribuir para a redução do seu impacto nestes locais.

Palavras chave: *Neozygites floridana*; Epizootia; *Tetranychus evansi*; Caracterização molecular; Solanaceae

ABSTRACT

Bioecological studies of *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Neozygiteceae), the fungal pathogen of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae)

The tomato red spider mite, *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard is an important exotic pest of Solanaceae in Europe and Africa. It is suggested that this mite could have originated from South America, a region where it is not considered as an important pest. An important natural enemy of *T. evansi* in Brazil is the fungus *Neozygites floridana* Weiser and Muma that is characterized by high virulence, restricted host range and fastidious *in vitro* growth. The taxonomy of *Neozygites* species is still uncertain given that some species cannot be distinguished by morphological characteristics. Molecular studies are usually necessary for discrimination of species and isolates of *Neozygites* pathogenic to tetranychid mites. Isolates of *N. floridana* from *T. urticae* have low virulence towards *T. evansi* and vice versa. Through partial sequencing of the 18S ribosomal DNA region of *N. floridana*, it was verified that the isolate of *T. evansi* (LQ2) had 98% similarity to the isolate of *T. urticae* (LQ3), but these two isolates had high divergence from other isolates pathogenic to tetranychid mites. For example, the similarity between two isolates collected on *T. urticae*, LQ3 and ARSEF662, was only 90%, indicating that the fungi identified as *N. floridana* may be a species complex. Although *N. floridana* is the principal natural enemy associated with *T. evansi* in most regions surveyed in Brazil up to date, the role of this pathogen in regulation of *T. evansi* population has not been determined. This study monitored the impact of the epizootics of the pathogen on populations of *T. evansi* in experiments both in the field and protected environments in four planting dates on nightshade and tomato with and without pesticide applications. The density of *T. evansi* was correlated with the prevalence of the fungus and the environmental conditions. The only natural enemy observed was *N. floridana* and the data revealed that is the fungus is an important factor in the regulation of *T. evansi* populations in tomato, especially in protected environment. Its introduction to continents where this pest was recently introduced may contribute to the reduction of its impact in these regions.

Keywords: *Neozygites floridana*; Epizootic; *Tetranychus evansi*; Molecular characterization; Solanaceae

1 INTRODUÇÃO

Ácaros pertencentes à família Tetranychidae são importante praga em diversos cultivos em todo mundo (WALTER; PROCTOR, 1999). Por causa de sua grande capacidade reprodutiva os tetraniquídeos são capazes de destruir plantas dentro de um curto período se as condições ambientais forem favoráveis para seu desenvolvimento, ou seja, tempo quente e seco (JEPPSON; KEIFER; BAKER, 1975). Estes ácaros perfuram as células das plantas e ingerem o conteúdo celular extravasado. Os sintomas de injúrias nas folhas são manchas cloróticas, amarelecimento de grandes áreas e secamento. Em infestações severas, é possível perceber teias, produzidas por estes ácaros, cobrindo a folha (SMITH MEYER, 1996). Os danos resultam da perda de clorofila e redução da fotossíntese, assimilação de CO₂ e aumento da transpiração. Os distúrbios no metabolismo resultam em diminuição do crescimento, florescimento e produção (MATHEWS; TANSTALL, 1994).

O ácaro vermelho do tomateiro, *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, é provavelmente originário da América do Sul. Inicialmente este ácaro foi confundido com *Tetranychus marianae* McGregor, no nordeste do Brasil e na Ilha de Maurício (SILVA, 1954; MOUTIA, 1958). Mais tarde, Baker e Pritchard (1960) descreveram *T. evansi* com base em exemplares de populações coletadas em folhas de tomateiro (*Solanum esculentum* L.) na Ilha de Maurício.

A ocorrência de *T. evansi* já foi registrada na Argentina (FURTADO, 2006), Brasil (MORAES; McMURTRY; BAKER, 1987; SILVA; MORAES; KNAPP, 2008), Congo (BONATO, 1999), Estados Unidos, Porto Rico (MORAES; McMUTRY; BAKER, 1987), Portugal (FERREIRA; CARMONA, 1995), Espanha (FERRAGUT; ESCUDERO, 1999), França (MIGEON, 2005), Ilha de Reunião (GUTIERREZ; ETIENNE, 1986), Ilha Rodrigues (GUTIERREZ, 1974), Ilhas Virgens (MORAES; McMUTRY; BAKER, 1987), Israel, Itália (CASTAGNOLI, 2006), Zimbábue (BLAIR, 1983; KNAPP; WAGENER; NAVAJAS, 2003), Marrocos (EL-JAOUANI, 1988), Taiwan (HO; WANG; CHIEN, 2004), Quênia (KNAPP; WAGENER; NAVAJAS, 2003) e Senegal (DUVERNEY; KADE; NGUEYE-NDIAYE, 2005).

T. evansi foi introduzido no continente africano (GUTIERREZ; ETIENNE, 1986), tendo primeiro sido relatado naquele continente em Zimbábue, em 1979, sobre *Nicotiana tabacum* (BLAIR, 1983). Este ácaro é atualmente considerado uma praga importante em regiões africanas produtoras de tomate com reduções de até 90% da produtividade (SARR, 2002).

Embora em várias situações inimigos naturais tenham sido usados no controle de ácaros tetraniquídeos, a aplicação de acaricidas químicos ainda é o método de controle mais usado, mesmo com a redução da eficiência de vários produtos devido ao desenvolvimento de resistência dos ácaros (CRANHAM; HELLE, 1985). No continente africano, o controle químico de *T. evansi* em plantações de tomateiros não tem sido eficiente (BLAIR, 1983; SIBANDA et al., 2000; SAUNYAMA; KNAPP, 2003). Há interesse em se controlar esta praga na África com técnicas de controle biológico clássico, seguindo a tendência mundial de reduzir o uso de produtos químicos no controle de pragas.

A família Neozygitaceae pertencente à ordem Entomophthorales (Divisão Zygomycetes) tem sido encontrada atacando pequenos artrópodes como cochonilhas, pulgões, tripses e ácaros (KELLER, 1991), sendo o fungo entomopatogênico *Neozygites floridana* (Weiser e Muma) patogênico a diversas espécies de ácaros (KELLER, 1997). *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) foi encontrado em 1980, causando infecção em *T. evansi* e contribuindo para a redução populacional do seu hospedeiro (HUMBER; MORAES; SANTOS, 1981). Sugere-se que no Brasil a ação de inimigos naturais nativos possa contribuir para a manutenção de populações de *T. evansi* abaixo do nível de dano econômico.

Este grupo de fungo é capaz de infectar todas as fases de desenvolvimento dos ácaros, exceto o ovo (NEMOTO; AOKI, 1975; SELHIME; MUMA, 1966), com índice de infecção superior para as formas adultas. Carner e Canerday (1970), ao estudarem a ocorrência de epizootias de *Neozygites* sp. em populações de *T. urticae*, observaram que o nível de infecção diferiu com o estágio de desenvolvimento do hospedeiro, sendo a infecção superior em protoninfas, enquanto as larvas foram pouco infectadas. Resultados semelhantes foram observados por Elliot et al., (2000) ao estudar epizootias

de *N. floridana* no ácaro verde da mandioca, *M. tanajoa* no Brasil, onde a maioria dos ácaros mortos era constituída de fêmeas adultas.

Neozygites possui um espectro de hospedeiros restrito e consiste somente de patógenos obrigatórios, o que significa que estes somente crescem em hospedeiros vivos. Sua especificidade é uma grande vantagem em programas de controle biológico clássico e pode ser usado junto com outros agentes de controle biológico em manejo integrado de pragas (HOUNTONDJI et al., 2002). Insetos e ácaros infectados por fungos deste gênero morrem somente quando todos os nutrientes disponíveis forem utilizados, diferentemente de outros fungos entomopatogênicos (Deuteromycetes) que produzem toxinas que causam a morte do hospedeiro bem antes do fungo completar a colonização do corpo do hospedeiro. Neste estágio, o corpo do inseto ou ácaro está repleto de estruturas do fungo, que esporula rapidamente quando as condições são favoráveis (HAJEK, 1997).

Uma das primeiras observações de um fungo desta ordem infectando ácaros tetraniquídeos foi feita por Fisher (1951), no estado da Flórida. O fungo, uma espécie de *Neozygites*, foi responsável por um índice de mortalidade superior a 70% em populações naturais de *Panonychus citri*. Selhime e Muma (1966) observaram que *Neozygites floridana* (= *Entomophthora floridana*) é um importante agente de controle natural de populações do ácaro texano do citros *Eutetranychus banksi*. Em estudos de laboratório, o patógeno apresentou um índice de infecção acima de 60% para este ácaro, e de 20% para a espécie *E. sexmaculatus*. A primeira ocorrência dessa espécie em ácaro rajado, *Tetranychus urticae*, foi registrada por Carner e Canerday (1968), quando verificaram uma epizootia em lavouras de algodão em muitas localidades do Alabama, causando mortalidade de até 100% em populações de *T. urticae*, especialmente em indivíduos adultos (CARNER; CARNEDAY, 1970).

Na Índia, levantamentos foram realizados por Ramaseshiah (1971), durante os anos de 1968 a 1970. O fungo *N. floridana* foi observado infectando diferentes espécies de ácaros tetraniquídeos, incluindo *T. urticae*, e duas outras espécies de *Tetranychus* não identificadas (possivelmente *T. ludeni* Zacher e *Tetranychus cinnabarinus* ou *T. neocaledonicus*). Em algumas oportunidades, o índice de mortalidade em populações naturais de *Tetranychus* sp. atingiu de 80 a 100% dos indivíduos. Esse fungo foi

também constatado em populações de *Oligonychus hondoensis* no Japão (NEMOTO; AOKI, 1975).

Epizootias causadas por *N. floridana* foram relatadas em ácaros em diversas partes da América, Europa e Ásia (CARNER; CANERDAY, 1968; MUMA, 1969; NEMOTO; AOKI, 1975; SMITH; FURR, 1975; BRANDENBURG; KENNEDY, 1982). No Brasil, Humber, Moraes e Santos (1981) fizeram o primeiro registro deste fungo em Petrolina no estado de Pernambuco infectando *Tetranychus evansi*. Foi observado causando epizootia durante os meses de abril a junho de 1979, que corresponde ao final do período chuvoso nesta região. Durante esse período, corpos hifais e estruturas reprodutivas do fungo foram observadas na maioria dos ácaros mortos. Em 1988, foi observado em campos de mandioca na região central da Bahia, um considerável número de *M. tanajoa* mortos devido à epizootia causada por *N. tanajovae*. A partir desta constatação, foi conduzida uma investigação adicional, durante fevereiro a junho de 1990, para se determinar a distribuição deste patógeno em populações naturais do ácaro. Foram visitados 97 campos de mandioca em diferentes estados do nordeste do Brasil, encontrando-se o ácaro em 82 campos. Desses campos, em 41 foram encontrados ácaros infectados por *N. floridana*. Cerca de 75% dos campos onde se constatou a presença do fungo, a precipitação anual média variava entre 700 e 1300 mm (DELALIBERA JR.; SOSA-GOMEZ; MORAES, 1992). A importância de baixas temperaturas, alta umidade e escotofase total no desenvolvimento do fungo *N. floridana* é demonstrado por diversos estudos realizados por Oduor et al. (1995a, 1995b, 1996a, 1996b, 1997a). Oduor et al. (1996a) demonstraram que a luz suprime a produção de conídios de *N. floridana* sobre *M. tanajoa*, sendo os conídios liberados durante o período de escotofase. Períodos de alta umidade relativa é uma das condições necessárias para a germinação do conídio primário de vários fungos Entomophthorales (NEWMAN; CARNER, 1975; SHIMAZU, 1977; CARRUTHERS; HAYNES, 1986; HAJEK; CARRUTHERS; SOPER, 1990). Estudos realizados por Muma (1969), Saba (1974) e Brandenburg e Kennedy (1982) associaram a ocorrência de epizootias com períodos de chuvas fortes. Brandenburg e Kennedy (1982) observaram que epizootias em populações de *T. urticae* em campos de milho eram antecedidas por 2 dias de alta umidade relativa do ar (U.R.) e temperaturas amenas. Vários autores citam que *N.*

floridana produz conídios primários e secundários durante períodos de umidade relativa próxima a 100%, mas o mesmo não ocorre em períodos de baixa umidade (SELHIME; MUMA, 1966; SABA, 1974; CARNER, 1976). Elliot, Moraes e Mumford (2002) descreveram que a umidade relativa seria o principal fator determinante na ocorrência de epizootias causadas por *N. tanajoe* sobre populações de *M. tanajoa* no Brasil. O final da curva epizoótica foi caracterizado pelo aumento de temperatura, redução da umidade relativa e diminuição das chuvas.

Smitley, Brooks e Kennedy (1986) estudaram a influência das condições ambientais sobre a produção de conídios, a infecção e a patogenicidade de *N. floridana* sobre *T. urticae*. Estes autores verificaram que conídios primários e secundários foram produzidos em grande número entre 15 a 26°C e 100% U.R. Nenhum conídio foi produzido a 32°C ou em U.R. inferiores a 85%. A temperatura apresentou pouco efeito sobre a infecção causada pelo fungo (quando a U.R. era de 90-95%). Em estudo similar, a 30% U.R., nenhum ácaro foi infectado.

Outro ponto a ser considerado para a ocorrência de epizootias é a densidade populacional do hospedeiro e do patógeno. Tanada e Kaya (1992) afirmaram que a densidade da população do patógeno é um dos mais importantes fatores para iniciar uma epizootia. Segundo Watanabe (1987), as epizootias desenvolvem-se ou são mais evidentes nas altas densidades populacionais dos hospedeiros. Grandes densidades populacionais do hospedeiro proporcionam uma rápida dispersão do patógeno pelo campo, pois aumenta a probabilidade de contato entre os ácaros com a fonte de inóculo e também entre indivíduos doentes e sadios da população. Quando se utiliza a introdução de grande quantidade de inóculo do patógeno, de forma inundativa, a eficiência das liberações não depende da densidade populacional do hospedeiro.

No estudo realizado por Oduor et al. (1997b) para verificar qual seria o efeito da densidade populacional do hospedeiro na taxa de transmissão e duração da infecção em condições de laboratório, eles demonstraram que o patógeno pode reduzir o crescimento da população de *M. tanajoa*, mas não pode levar a extinção populações de ácaros. Só quando outros fatores como baixa qualidade da planta hospedeira, deslocamento e morte por chuva e vento interferem de forma efetiva na taxa de crescimento da população a população pode chegar a extinção. Em condições de

campo é provável que todos estes fatores interfiram nas populações do ácaro, podendo, portanto ocorrer um controle efetivo pelo fungo.

A família Neozygitaceae se caracteriza por apresentar uma pequena gama de hospedeiros. Segundo Keller (1997) existem 15 espécies de *Neozygites*, e cada espécie está restrita a uma pequena gama de hospedeiros. Por causa das incertezas quanto à delimitação de espécies dentro deste gênero, todos os patógenos deste grupo associados aos ácaros tetraniquídeos são identificados como *N. floridana*. Delalibera Jr. e Hajek (2004) demonstraram que o fungo associado ao ácaro *M. tanajoa* é altamente específico e não infecta outros hospedeiros e que isolados coletados de *T. urticae* infectam *M. tanajoa*, mas não são virulentos a esta segunda espécie. Delalibera Jr., Hajek e Humber (2004) realizaram uma comparação entre *N. tanajoae* e *N. floridana* utilizando características moleculares, fisiológicas e morfológicas e verificaram que morfológicamente as duas espécies são similares, mas são distintas quanto às características fisiológicas e moleculares, desta forma, justificando a separação desta como uma nova espécie.

Mais recentemente, foi demonstrado que isolados de *N. floridana* provenientes de *T. urticae* apresentam baixa virulência a *T. evansi*, e isolados de *T. evansi* apresentam baixa virulência a *T. urticae* (Ana Elizabeth Lopes informação pessoal). Como estes isolados são morfológicamente similares, seria necessário uma caracterização molecular para se determinar a variação genética e separação destes diferentes isolados.

A taxonomia dos fungos Zygomycetes tem sido historicamente mais complexa mais problemática e menos estudada (HUMBER, 2008). Técnicas moleculares em conjunto com as características morfológicas têm auxiliado na classificação de fungos deste grupo (JENSEN et al., 1998; WHITE et al., 2006). Técnicas moleculares já foram utilizadas para determinar a variação intraespecífica nos seguintes gêneros de Entomophthorales: *Pandora*, *Zoophthora*, *Entomophaga* (HODGE; SAWYER; HUMBER, 1995; HAJEK et al., 1996; JENSEN; EILENBERG, 2001; NIELSEN et al., 2001; TYMON; SHAH; PELL, 2004). Em membros da família Neozygitaceae, somente foram realizados estudos moleculares comparando a região 18S do DNA ribossomal, (DELALIBERA JR; HAJEK; HUMBER, 2004).

Poucos estudos foram conduzidos com isolados de *N. floridana* eficientes contra *T. evansi*, provavelmente devido à pequena importância de *T. evansi* como praga no Brasil. Levantamentos preliminares em campo sugerem que *N. floridana* seja um inimigo natural importante de *T. evansi*, indicando seu potencial para ser introduzido no continente africano. Entretanto, vários estudos são necessários para demonstrar a viabilidade técnica da introdução de *N. floridana* visando o Controle Biológico Clássico. O entendimento dos mecanismos de transmissão de entomopatógenos permitirá a previsão da sua capacidade de expansão dentro de uma população hospedeira, e, em alguns casos, do seu potencial como agente de controle microbiano (HARPER, 1987). Um dos pontos a serem elucidados seria como se dá a epizootia sobre populações de *T. evansi* e quais fatores afetam o desenvolvimento e permanência da doença em condições de campo. Outra questão seria a utilização de técnicas moleculares para correlacionar com a especificidade de hospedeiros e diferenças fisiológicas entre isolados provenientes de *T. evansi* e *T. urticae*.

Referências

BAKER, E.W.; PRITCHARD, A.E. The Tetranychoid mites of Africa. **Hilgardia**, California, v. 29, p. 455-574, 1960.

BLAIR, B.W. *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae): A new pest of tobacco in Zimbabwe. Bergerac, France: Coresta Phytopathology and Agronomy Study Groups, 1983. p. 1-6.

BONATO, O. The effect of temperature on life history parameters of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 23, p. 11-19, 1999.

BRANDENBURG, R. L.; KENNEDY, G. G. Relationship of *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) to two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in field corn. **Journal Economic Entomology**, Amsterdam, v. 75, p. 691-694, 1982.

CARNER G.R. A description of the life cycle of *Entomophthora* sp. in the two spotted spider mite. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 28, p. 245–254, 1976.

CARNER, G.R.; CARNERDAY, T.D. *Entomophthora* sp. As a factor in the regulation of the two-spotted spider mite on cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham MD, v. 63, n.2, p. 638-640, 1970.

CARNER, G.R.; CARNERDAY, T.D. Field and laboratory investigations with *Entomophthora fresenii*, a pathogen of *Tetranychus* spp. **Journal of Economic Entomology**, Lanham MD, v. 61, n. 4, p 956-959, 1968.

CARRUTHERS, R. I.; HAYNES, D. L. Temperature, moisture and habitat effects on *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) conidial germination and survival in the onion agroecosystem. **Environment Entomology**, College Park MD, v. 15, p. 1156–1160, 1986.

CASTAGNOLI, M. Un nuovo temibile fitofago per la fauna italiana: *Tetranychus evansi* (Baker e Pritchard) (Acari Tetranychidae). **Informatore fitopatologico**, Bologna, v. 5, p. 50-53, 2006.

CRANHAM, J.E.; HELLE, W. Pesticide resistance in Tetranychids. In : HELLE, W.; SABELIS, M.W. (Ed.). **Spider mites. Their biology, natural enemies and control**. Amsterdam. Elsevier, NY. p. 405-421, 1985.

DELALIBERA JR., I.; HAJEK, A.E. Pathogenicity and specificity of *Neozygites tanajoae* and *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) isolates pathogenic to the cassava green mite. **Biological Control**. Orlando, v. 30, p. 608–616, 2004.

DELALIBERA JR., I.; HAJEK, A.E.; HUMBER, R.A. *Neozygites tanajoae* sp. nov., a pathogen of the cassava green mite. **Mycologia**, New York v. 96 n. 5, p. 1002–1009, 2004.

DELALIBERA JR., I.; SOSA GOMEZ, D.; MORAES, G.J. Infection of *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) by the fungus *Neozygites* sp. (Entomophthorales) in northeastern Brazil. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 75, p. 145-147, 1992.

DUVERNEY, C.; KADE, N.; NGUEYE-NDIAYE, A. Essais preliminaires pour limiter les degats de Tetranychidae sur les cultures maraicheres dans le Sine-Saloum (Senegal). In: COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LES ACARIENS DES CULTURES DE L'AFPP. AGRO-MONTPELLIER, 12., 2005, Montpellier. Comptes rendus... **Annales AFPP**, Montpellier, n. 80, p.24-25, 2005.

EI-JAOUANI, N. **Contribution to the knowledge of acarines phytophages in Morocco and bio-ecological study of *Tetranychus evansi* Baker; Pritchard (Acarina: Tetranychidae)**. Memorie Diplome d'Ingenieur em Agronomie. Rabat, Morocco: Inst. Agron. Et Veterin. Hassan II, 1988. 230p.

ELLIOT, S.L.; MORAES, G.J.; MUMFORD, J.D. Importance of ambient saturation deficits in an epizootic of the fungus *Neozygites floridana* in cassava green mites (*Mononychellus tanajoa*). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 27, p. 11-25, 2002.

ELLIOT, S. L. ; MORAES, G.J. ; DELALIBERA JR., I. ; DA SILVA, C.A.D. ; TAMAI, M.A. ; MUMFOR, J.D. . Potential of the mite-pathogenic fungus *Neozygites floridana* (Entomophthorales : Neozygitaceae) for control of the cassava green mite *Mononychellus tanajoa* (Acari : Tetranychidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 90, p. 191-200, 2000.

FERRAGUT, F.; ESCUDERO, L.A. *Tetranychus evansi* Baker; Pritchard (Acari, Tetranychidae), una nueva araña roja en los cultivos hortícolas españoles. **Boletin de Sanidad Vegetal**. Serie Plagas, Madrid, v. 25, p. 157-164, 1999.

FERREIRA, M.A.; CARMONA, M.M. Acarofauna do tomateiro em Portugal. In: ALONSO-ZARAZAGA, M.A.; SART, A.C.; SAURA, E.G-B.; SANZ, P.G.; MOYA, I.I.; MUNGUIRA, M.L.; LUCIÁNEZ-SÁNCHEZ, M.J.; MORAL, V.L.; ALBADEJO, C.M.; CANO, J.M.; MATEO, M.P.M.; PIERA, F.M.; PÉREZ, E.M., ALDREY, J.L.N.; CASTILLO, C.R.; BENITO, M.J.S.; MONTESIONOS, J.L.V. (Ed.) **Avances em Entomologia Ibérica**. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales y Universidad Autónoma de Madrid, 1995. p. 385-392.

FURTADO, I.P. **Sélecton d'ennemis naturels pour la lutte biologique contre *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (Acari: Tetranychidae), en Afrique**. 185p. 2006. Thesis. (PhD) - Ecole Nationale Superieure Agronomique de Montpellier, France, 2006. 185p.

GUTIERREZ, J.; ETIENNE, J. Les Tetranychidae de l'île de la Réunion et quelques-uns de leurs prédateurs. **L' Agronomie Tropicale**. Madrid, v. 41, p. 84-91, 1986.

GUTIERREZ, J. Les espèces du genre *Tetranychus* Dufour (Acaries : Tetranychidae) Ayant une incidence économique à Madagascar et dans les îles voisines. Compétition entre les complexes *Tetranychus neocaledonicus* André et *Tetranychus urticae* Koch. **Acarologia**, Paris, v. 16, p. 258-270, 1974.

HAJEK, A.E. Ecology of terrestrial fungal pathogens. **Advanced Microbial Ecology**, New York, v. 15, p. 193-249, 1997.

HAJEK, A. E.; CARRUTHERS, R. I.; SOPER, R. S. Temperature and moisture relations of sporulation and germination by *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthoraceae), a fungal pathogen of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). **Environment Entomology**, College Park, v. 19, p. 85–90, 1990.

HARPER, J.D. Applied epizootiology: microbial control of insects. In: Fuxa, J.R., Tanada, Y. (Eds.), **Epizootiology of Insect Diseases**. Wiley, New York, p. 473–496, 1987.

HO, C. C.; WANG, S. C.; CHIEN, Y. L. Field observation on 2 newly recorded spider mites in Taiwan. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, v. 47, p. 391-402, 2004.

HODGE, K. T.; SAWYER, A. J.; HUMBER, R. A. RAPD-PCR for identification of *Zoophthora radicans* isolates in biological control of potato leafhopper. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 65, p. 1–9, 1995.

HOUNTONDJI, F.C.C.; YANINEK, J.S.; DE MORAES, G.J.; ODUOR, G.I. Host specificity of the cassava green mite pathogen *Neozygites floridana*. **BioControl**, Dordrecht, v. 47, p. 61-66, 2002.

HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 98, p. 262-266, 2008.

HUMBER, R.A.; MORAES, G.J.; SANTOS, J.M. Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by a *Triplosporium* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in Northeastern Brazil. **Entomophaga**, Paris, v. 26, n. 4, p. 421-425, 1981.

JENSEN, A. B.; EILENBERG, J. Genetic variation within the insect-pathogenic genus *Entomophthora*, focusing on the *E. muscae* complex, using PCR-RFLP of ITS II and LSU rDNA. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 307–312, 2001.

JENSEN, A. B.; GARGAS, A.; EILENBERG, J.; ROSENDAHL, S. Relationships of the insect-pathogenic order Entomophthorales (Zygomycota, Fungi) based on phylogenetic analysis of nuclear small subunit ribosomal DNA sequences (SSU rDNA). **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 24, p. 325-334, 1998.

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

KELLER, S. The genus *Neozygites* (Zygomycetes, Entomophthorales) with special reference to species found in tropical regions. **Sydowia**, Horn, v. 49, n.2, p. 118-146, 1997.

_____. Arthropod-pathogenic Entomophthorales of Switzerland. II. *Erynia*, *Eyniopsis*, *Neozygites*, *Zoophthora* and *Tarichium*. **Sydowia**, Horn, v. 43, p. 39-122, 1991.

KNAPP, M.; WAGENER, B.; NAVAJAS, M. Molecular discrimination between the spider mite *Tetranychus evansi* Baker; Prichard, an important pest of tomatoes in southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). **African Entomology**, Pretoria, v. 11, p. 300-304, 2003.

MATHEWS G. A.; TUNSTALL L. Insect pests of cotton. **CAB International**, Wallingford, UK. p. 408- 416, 1994.

MIGEON, A. Un nouvel acarien ravageur en France: *Tetranychus evansi* Baker et Pritchard. **Phytoma**, Paris, v. 579, p. 38-42, 2005.

MORAES, G.J.; McMURTRY, J.A.; BAKER, E.W.. Redescription and distribution of the spider mites *Tetranychus evansi* and *T. marianae*. **Acarologia**, Paris, v. 28, n. 4, p. 333-343, 1987.

MOUTIA, L. A. Contribution to the study of some phytophagous Acarina and their predators in Mauritius. **Bulletin of Entomological Research**, Fanham Royal, v. 49, p. 59-75, 1958.

MUMA, M.H. Coincidence and incidence of *Entomophthora floridana* with and in *Eutetranychus banksi* in Florida citrus groves. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.52, n.2, p. 107-112, 1969.

NEMOTO, H.; AOKI, J. *Entomophthora floridana* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) attacking the sugi spider mite, *Oligonychus hondoensis* (Acarina: Tetranychidae), in Japan. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 10, n. 2, p. 90-95, 1975.

NEWMAN, G. G.; CARNER, G. R. Environmental factors affecting conidial sporulation and germination of *Entomophthora gammae*. **Environment Entomology**, College Park, v. 4, p. 615–618, 1975.

NIELSEN, C.; SOMMER, C.; EILENBERG, J.; HANSEN, K.; HUMBER, R. Characterization of aphid pathogenic species in the genus *Pandora* by PCR techniques and digital image analysis. **Mycologia**, New York, v. 93, p. 864–874, 2001.

ODUOR G.I.; SABELIS M.W.; LINGEMAN R.; MORAES G.J.; YANINEK J.S. Modelling fungal (*Neozygites* cf. *floridana*) epizootics in local populations of cassava green mites (*Mononychellus tanajoa*). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 21, p. 485–506, 1997b.

ODUOR G.I.; YANINEK J.S.; MORAES G.J.; van der GEEST L.P.S. The effect of pathogen dosage on the pathogenicity of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) to *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 70, p. 127–130, 1997a.

ODUOR G.I.; MORAES G.J.; van der GEEST L.P.S.; YANINEK J.S. Production and germination of primary conidia of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) under constant temperature, humidity, and light conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 68, p. 213–222, 1996b.

ODUOR G.I.; YANINEK J.S.; van der GEEST L.P.S.; MORAES G.J. Germination and viability of capilliconidia of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) under constant temperature, humidity, and light conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 67, p. 267–278, 1996a.

ODUOR G.I.; MORAES G.J.; YANINEK J.S.; van der GEEST L.P.S. Effect of temperature, humidity and photoperiod on mortality of *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) infected by *Neozygites cf. floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 19, p. 571–579, 1995b.

ODUOR G.I.; YANINEK J.S.; van der GEEST L.P.S.; MORAES G.J. Survival of *Neozygites cf. floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) in mummified cassava green mites and the viability of its primary conidia. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 19, p. 479–488, 1995a.

RAMASESHIAH, G. Occurrence of an *Entomophthora* on Tetranychid mites in India. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 18, p. 421–424, 1971.

SABA, F. Life history and population dynamics of *Tetranychus tumidus* in Florida. **Florida Entomology**, Gainesville, v. 57, p. 47–63, 1974.

SARR, I.; KNAPP, M.; OGOL, C.K.P.; BAUMGÄRTNER, J. Impact of predators on *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard populations and damage on tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Kenya. In: CONGRESS INTERNATIONAL OF ACAROLOGY, 11., 2002, Merida. **Abstract...** Merida, 2002. p. 271.

SAUNYAMA, I.G.M.; KNAPP, M. The effects of pruning and trellising of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) on red spider mite (*Tetranychus evansi* Baker & Pritchard) incidence and crop yield in Zimbabwe. **African Crop Science Journal**, Pretoria, v. 11, p.269–277, 2003.

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

SIBANDA, T.; DOBSON, H. M.; COOPER, J. F.; MANIANGARIWA, W.; CHIIMBA, W. Pest management challenges for smallholder vegetable farmers in Zimbabwe. **Crop Protection**. Guildford, v. 19, p. 807–815, 2000.

SILVA, P. Um novo ácaro nocivo ao tomateiro na Bahia (*Tetranychus marianae* McGregor, 1950 – Acarina). **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador,. 1, p. 18-37, 1954.

SILVA, F. R., MORAES, G. J., KNAPP, M. Distribution of *Tetranychus evansi* and its predator *Phytoseiulus longipes* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) in southern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 45, p. 137-145, 2008.

SHIMAZU, M. Factors affecting conidial germination of *Entomophthora delphacis* Hori (Entomophthorales: Entomophthoraceae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 12, p. 260–264, 1977.

SMITLEY, D. R.; BROOKS, W. M.; KENNEDY, G. C. Environmental effects on production of primary and secondary conidia, infection and pathogenesis of *Neozygites floridana*, a pathogen of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 47, p. 325–332, 1986.

SMITH, J. W.; FURR, R. E. Spider mites and some natural control agents found on cotton in the delta area of Mississippi. **Environment Entomology**, College Park, v. 4, p. 559-560, 1975.

SMITH MEYER, M. K. P. **Mite pests and their predators on cultivated plants in Southern Africa**: Vegetables and Berries. Pretoria.: ARC - Plant Protection Research Institute, 1996, p.47-69. (Plant Protection Research Institute Handbook,6).

TANADA, Y; KAYA, H.K. Epizootiology, p.595-633. In: _____. **Insect Patology**. California: Academic Press, chap.16, 633p. 1992.

TYMON, A.M.; SHAH, P.A.; PELL, J.K. PCR-based molecular discrimination of *Pandora neoaphidis* isolates from related entomopathogenic fungi and development of species-specific diagnostic primers. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 4, p. 419–433, 2004.

WALTER, D.E; PROCTOR, H. Mites: Ecology, Evolution and Behaviour. Wallingford, CABI Publishing, 1999.352p.

WATANABE, H. The host population, p. 71-112. In Fuxa, J.R.; Tanada, Y (Ed.). **Epizootiology of insect diseases**. New York, Wiley, 555p. 1987.

WHITE, M. M., JAMES, Y. T., O'DONNELL, K., GARAFO, M. J., TANABE, Y., SUGIYAMA, J. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. **Mycologia**, New York, v. 98, n. 6, p. 872-884, 2006.

2 Dinâmica populacional de *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) e do patógeno *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) em plantios de tomate e maria-preta em cultivos protegidos e em campo com diferentes regimes de aplicação de pesticidas

Resumo

O fungo *N. floridana* é conhecido por causar epizootias em populações de tetraniquídeos. Condições ambientais como temperatura e umidade relativa, e a densidade hospedeira são fatores determinantes para a ocorrência de epizootias. Nenhum estudo havia sido feito sobre o impacto de *N. floridana* sobre populações de *T. evansi*. No presente estudo, avaliou-se a dinâmica populacional do ácaro e do fungo e a influencia das condições ambientais sobre estas populações, em ambiente protegido e em campo em plantas de maria-preta e tomateiros com e sem aplicação de pesticidas químicos. *N. floridana* foi o único inimigo natural associado a *T. evansi* e os resultados demonstram o impacto do fungo nas populações de *T. evansi* em tomateiro, especialmente em ambiente protegido. *N. floridana* ocorreu naturalmente durante todos os quatro ciclos de cultivo. Nos tratamentos onde o fungo surgiu a população do ácaro reduziu drasticamente, mantendo-as em níveis baixos. *N. floridana* surgiu em plantas de tomateiro mesmo quando as densidades populacionais de *T. evansi* eram relativamente baixas e mesmo nestas condições o fungo se manteve em elevadas taxas de infecção (> 50%). A aplicação de agrotóxicos aparentemente teve efeito direto sobre o fungo, tendo retardado o início da epizootia ou contribuído para menores taxas de infecção. *N. floridana* permaneceu em todas as estações do ano, mesmo sob amplitudes extremas de temperatura (51°C dia e 7°C noite). A precipitação não teve impacto aparente sobre a população. *N. floridana* apresenta potencial para ser utilizado como agente de controle biológico clássico em regiões onde este ácaro é a principal praga,

Palavras chave: *Neozygites floridana*; Epizootias; Solanaceae; *Tetranychus evansi*; Condições ambientais

Abstract

The fungus, *Neozygites floridana* is known to cause dramatic epizootics in populations of tetranychid mites. Environmental conditions such as temperature and relative humidity, and host density are factors that determine the occurrence of these epizootics. There exists practically no study on the impact of *N. floridana* on populations of *T. evansi*. In the present study, population dynamics of the mites and the fungus and the influence of environmental conditions on these populations were evaluated in the greenhouse and in the Field on nightshade and tomato plants with and without application of chemical pesticides. *N. floridana* was the only natural enemy found associated with *T. evansi* and the results demonstrated the impact of this fungus on the populations of *T. evansi* in tomato especially in the greenhouse. *N. floridana* occurred

naturally during the whole growing season of the crop. In the treatments where the fungus appeared, the mite population reduced drastically being maintained at low levels. *N. floridana* appeared in tomato plants even when the population density of *T. evansi* was relatively low and even at this conditions, the fungus maintained elevated rates of infection (> 50%). The application of pesticides apparently had direct effect on the fungus in that they retarded epizootic initiation or contributed to low infection rates. *N. floridana* was present during all seasons of the year, even at extreme temperature amplitudes (51°C Day and 7°C night temperature). Rain did not have an apparent impact on mite populations. *N. floridana* has the potential to be used as a classical biological control agent in regions where this mite is a principal pest.

Keywords: *Neozygites floridana*; Epizootics; Solanaceae; *Tetranychus evansi*; Environmental conditions

2.1 Introdução

Ácaros tetraniquídeos são pragas importantes de vários cultivos anuais e perenes (HELLE; VAN DE VRIE, 1974; WALTER; PROCTOR, 1999). O ácaro-vermelho-do-tomateiro, *Tetranychus evansi* Baker e Prichard é uma praga oligófaga que ataca algumas espécies de plantas pertencentes a família Solanaceae (MORAES; McMURTRY; BAKER, 1987; KNAPP; WAGENER; NAVAJAS, 2003; JEPSON; KEIFEIR; BAKER, 1975). Nas áreas de cultivo onde este ácaro praga tem importância agrícola, o manejo é realizado através da aplicação de acaricidas sintéticos (CRANHAM; HELLE, 1985; BLAIR, 1989). Devido às grandes perdas proporcionadas por esta praga, às dificuldades no seu controle através de produtos químicos e seguindo a tendência mundial de reduzir o uso de pesticidas químicos existe um interesse em se utilizar o controle biológico para o manejo desta praga.

Sugere-se que no Brasil a ação de inimigos naturais nativos possa contribuir para a manutenção de populações de *T. evansi* abaixo do nível de dano econômico. Humber, Moraes e Santos (1981) fizeram o primeiro registro do fungo *Neozygites floridana* infectando *Tetranychus evansi* em Petrolina no estado de Pernambuco. O patógeno foi observado causando epizootia durante os meses de abril a junho de 1979, que corresponde ao final do período chuvoso nesta região. Durante esse período, corpos hifais e estruturas reprodutivas do fungo foram observados na maioria dos ácaros mortos. Mais recentemente, a busca por inimigos naturais desta praga na América do Sul revelou que o ácaro predador *Phytoseiulus longipes* Evans seria um

candidato promissor para o controle de *T. evansi* (FURTADO et al., 2006). Entretanto, este predador somente foi encontrado em locais ao sul do Estado do Rio Grande do Sul. Em outras regiões do Brasil o inimigo natural mais comumente associado a *T. evansi* é o patógeno *N. floridana*. Entretanto, o impacto deste fungo nas populações de *T. evansi* ainda não é conhecido.

Epizootias causadas por fungos Entomophthorales são conhecidas em diversas partes do mundo, em ácaros tetraniquídeos que atacam diversas culturas como algodão (CARNER; CANERDAY, 1968; SMITH; FURR, 1975), milho (SMITLEY; KENNEDY; BROOKS, 1986), amendoim (BOYKIN; CAMPBELL; BEUTE, 1984), citros (MUMA, 1969), cedro (NEMOTO; AOKI, 1975), feijão (BRANDENBURG; KENNEDY, 1982) soja (KLUBERTANZ; PEDIGO; CARLSON, 1991). Também foram relatados infectando outros artrópodes como afídeos em algodão (STEINKRAUS; KRING; TUGWELL, 1991) afídeos em cereais (FENG et al. 1992), lagartas desfolhadoras em florestas (ANDREADIS; WESELOH, 1990), cigarrinhas em feijão (GALAINI-WHAIGHT et al., 1991), curculionídeos em alfafa (MORRIS et al., 1986), tripes em pepino (MONTSERRAT; CASTANE, SANTAMARIA, 1998).

A importância dos diferentes fatores bióticos no desenvolvimento destas epizootias é pouco conhecida, mas condições ambientais tais como a umidade relativa, temperatura, precipitação e radiação solar são consideradas determinantes na indução das epizootias de fungos (KLUBERTANZ, PEDIGO, CARLSON, 1991; HAJEK, 1997). Outros fatores que influenciam as epizootias são a biologia, comportamento, morfologia e densidade do hospedeiro, ou mesmo fatores ligados ao patógeno como forma de liberação e dispersão dos conídios e os mecanismos de sobrevivência do fungo (STEINKRAUS, 2006).

A família Neozygitaceae, pertencente à ordem Entomophthorales (Divisão Zygomycetes), tem sido encontrada atacando pequenos artrópodes como cochonilhas, pulgões, tripes e ácaros (KELLER, 1991), sendo *Neozygites floridana* (WEISER; MUMA, 1966) patogênico a diversas espécies de ácaros (KELLER, 1997). *Neozygites* possui um espectro de hospedeiros restrito e consiste somente de patógenos obrigatórios, o que significa que estes somente crescem em hospedeiros vivos. Insetos e ácaros infectados por fungos deste gênero morrem somente quando todos os

nutrientes disponíveis forem utilizados, diferentemente de outros fungos entomopatogênicos (Ascomycetes) que produzem toxinas que causam a morte do hospedeiro bem antes do fungo completar a colonização do corpo do hospedeiro. Neste estágio, o corpo do inseto ou ácaro está repleto de estruturas do fungo, que esporula rapidamente quando as condições são favoráveis (HAJEK, 1997).

A importância de temperaturas moderadas, alta umidade e escotofase total na esporulação de *Neozygites tanajoae* foi demonstrada por diversos estudos realizados por Oduor et al. (1995b, 1996a, 1996b). Oduor et al. (1996b) averiguaram que a luz suprime a produção de conídios de *N. tanajoae* sobre *M. tanajoa*, sendo os conídios liberados durante o período de escotofase. Condições de alta umidade relativa são relatadas como uma condição necessária para a germinação do conídio primário de vários fungos Entomophthorales (NEWMAN; CARNER, 1975; SHIMAZU, 1977; CARRUTHERS; HAYNES, 1986; HAJEK; CARRUTHERS; SOPER, 1990; STEINKRAUS; SLAYMAKER, 1994). Estudos realizados por Muma (1969); Saba (1974); Brandenburg e Kennedy (1982) associaram a ocorrência de epizootias com períodos de chuvas fortes. Brandenburg e Kennedy (1982) observaram que epizootias em populações de *Tetranychus urticae* em campos de milho eram antecedidas por 2 dias de alta umidade relativa do ar e temperaturas amenas. Oduor et al. (1995b) verificaram que fatores como luz, temperatura e umidade relativa afetam a viabilidade do conídio primário de *N. tanajoae*, e que a temperatura e umidade são os principais fatores que afetam a habilidade de germinar do conídio primário. No entanto, o desenvolvimento do fungo dentro do seu hospedeiro não é afetado pela umidade relativa e fotoperíodo (ODUOR et al., 1995b). Vários autores citam que *N. floridana* produz conídio primário e secundário durante períodos de umidade relativa próxima a 100%, mas o mesmo não ocorre em períodos de baixa umidade (SELHIME; MUMA, 1966; SABA, 1974; CARNER, 1976). Estudos realizados por Steinkraus e Slaymaker (1994) demonstraram que em *Neozygites fresenii*, uma pequena exposição do conídio primário a umidades próximas a 75% por um minuto pode reduzir para 29,4% a formação dos capiloconídios, no entanto quando exposto a 100% de umidade a porcentagem é de 76,2%. Elliot et al. (2002) descreve que a umidade relativa seria o principal fator determinante na ocorrência de epizootias causadas por *N. tanajoae* sobre

populações de *M. tanajoa* no Brasil. Onde se observou alta mortalidade causada pelo fungo no período entre junho e agosto, que se caracteriza pela presença de chuvas. O final do período de epizootia foi caracterizado pelo aumento de temperatura, redução da umidade relativa e diminuição das chuvas.

Smitley, Kennedy e Brooks (1986), estudaram a influência das condições ambientais sobre a produção de conídios, a infecção e a patogenicidade de *N. floridana* sobre *T. urticae*. Estes autores verificaram que conídios primários e secundários foram produzidos em grande número entre 15 e 26°C e 100% UR. Nenhum conídio foi produzido a 32°C ou em umidade relativa inferior a 85%. A temperatura apresentou pouco efeito sobre a infecção causada pelo fungo entre 90 e 95% de UR. Em estudo semelhante, nenhum ácaro foi infectado quando a umidade relativa estava em 30%.

A densidade populacional do hospedeiro e do patógeno também é citada como fator importante para o início das epizootias (TANADA; KAYA 1992; WATANABE 1987). Grandes densidades populacionais do hospedeiro proporcionam uma rápida dispersão do patógeno pelo campo, pois aumenta a probabilidade de contato entre os ácaros e a fonte de inóculo e também entre indivíduos doentes e sadios da população. Quando se utiliza a introdução de grande quantidade de inóculo do patógeno no campo, de forma inundativa, a sua eficiência independe da densidade populacional do seu hospedeiro.

No estudo realizado por Oduor et al. (1997) para verificar qual seria o efeito da densidade populacional do hospedeiro, taxa de transmissão e duração da infecção em condições de laboratório, foi demonstrado que o patógeno pode reduzir o crescimento da população de *M. tanajoa*, mas não pode levar à extinção as populações dos ácaros. Só quando outros fatores como baixa qualidade da planta hospedeira, deslocamento e morte por chuva e vento estão presentes, pode ocorrer um controle efetivo pelo fungo.

Estudos bioecológicos não haviam sido realizados para determinar o impacto das epizootias de *N. floridana* nas populações de *T. evansi* em experimentos de campo e ambiente protegido e para verificar a influência da precipitação sobre a população do ácaro. Maria-preta é uma planta daninha que pode servir como reservatório tanto para *T. evansi* quanto para o fungo em sistemas de produção de tomate e por isto foi também incluída neste estudo. A compreensão das influências dos fatores ambientais e do manejo da cultura, especialmente a aplicação de pesticidas, sobre a dinâmica

populacional do ácaro e do fungo, auxiliará no entendimento das relações patógeno-hospedeiro, importantes para o sucesso da utilização do patógeno para o manejo de ácaros pragas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Criação de *Tetranychus evansi*

Tetranychus evansi foi coletado em Piracicaba, São Paulo, Brasil. A criação de *T. evansi* foi mantida sobre plantas de tomate (*Solanum esculentum*) cultivar Santa Clara em casa-de-vegetação no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil. Somente fêmeas jovens de *T. evansi* foram utilizadas nos experimentos.

2.2.2 Cultura estoque de *Neozygites floridana*

Os isolados de *N. floridana* foram coletados a partir de cadáveres mumificados de *T. evansi* provenientes de Piracicaba/SP coletados sobre plantas de tomate (*Solanum esculentum*). Os isolados foram armazenados no Laboratório de Acarologia no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP. O armazenamento foi realizado a -10°C em recipientes hermeticamente fechados contendo sílica gel, e sobre a sílica gel foi adicionada uma camada de algodão.

2.2.3 Métodos experimentais

2.2.3.1 Delineamento experimental

Para avaliar a dinâmica populacional de *T. evansi* em plantio de tomate e maria-preta foram utilizados seis tratamentos. Três tratamentos foram mantidos em ambiente protegido: plantas de tomate com aplicação de agrotóxicos, plantas de tomate sem aplicação de agrotóxicos, planta de maria-preta sem aplicação de agrotóxicos; os outros

três tratamentos foram mantidos em campo: plantas de tomate com aplicação de agrotóxicos, plantas de tomate sem aplicação de agrotóxicos, plantas de maria-preta sem aplicação de agrotóxicos. O ambiente protegido consistiu de túneis de 4 x 5 metros com pé-direito de 2,5 metros de altura cobertos com plástico leitoso (0,15 micras) e saia em tela antivírus 50 mesh com 0,80 cm de altura e fechado na parte da frente e fundo com a mesma tela. Cada tratamento consistiu de cinco repetições com quatro plantas por repetição, sendo os tratamentos distribuídos em blocos casualizados. O experimento foi repetido quatro vezes durante novembro de 2007 a novembro de 2008.

2.2.3.2 Implantação do experimento

Aproximadamente 60 dias após a germinação as plantas foram infestadas adicionando-se 20 fêmeas de *T. evansi* em cada planta. Antes de adicionar os ácaros às plantas, foi realizada uma amostragem para constatar que as fêmeas da criação não estavam infectadas por *N. floridana*. As avaliações foram iniciadas 20 dias após a infestação. As plantas foram avaliadas em média por aproximadamente 60 dias durante quatro ciclos de cultivo. Os quatro ciclos de cultivos compreenderam os períodos de novembro de 2007 a janeiro de 2008, junho a julho de 2008, julho a outubro de 2008 e outubro a novembro de 2008. As avaliações foram encerradas quando as plantas entraram em senescência.

2.2.3.3 Aplicação de agrotóxicos

Nos tratamentos com aplicação de agrotóxicos, as plantas foram periodicamente pulverizadas com fungicidas Bion[®] 500WG (Acibenzolar-S-Metil) Orthocide[®] 500 (Captan) e Cuprocarb 350[®] (Oxicloreto de cobre) aplicados nas seguintes doses 5g/100L 240g/100L e 300g/100L de água, respectivamente. E com os inseticidas Tracer[®] (Espinosaide), Actara[®] 250 WG (Tiamedoxam), Decis[®] 25EC (Deltametrina) aplicados nas seguintes doses 17mL/100L; 20g/100L e 40mL/100L de água, respectivamente. As pulverizações seguiram calendário de aplicação de produtos utilizado por produtores da região de Piracicaba/SP. Os produtos foram aplicados quinzenalmente, sendo que em

uma semana era feita a aplicação dos inseticidas Espinosade e Tiamedoxam e na semana seguinte era aplicado os fungicida Oxicleto de Cobre, Captan e Acibenzolar-S-Metil e do inseticida Deltametrina, e assim sucessivamente até o final do experimento.

2.2.3.4 Avaliação foliar

As avaliações foram realizadas retirando-se uma folha da parte apical, mediana e basal de cada planta. Para padronização da área foliar avaliada foi utilizado um furador de 2 cm de diâmetro para marcar um círculo de 3,14 cm² na parte central da folha. A contagem dos ácaros foi realizada em lupa somente na área demarcada, e posteriormente foram retirados de cada folha dois ácaros que foram montados em lâmina de microscopia utilizando-se meio de Hoyer com corante azul de algodão. A contaminação e infecção pelo fungo *N. floridana* foi determinada ao microscópio de contraste de fase. As amostragens foram realizadas a cada dez dias durante os períodos de baixa infecção de *N. floridana* e a cada cinco dias quando se observou altos níveis de infecção pelo fungo. Foram também realizadas coletas de outros inimigos naturais associados ao ácaro-praga.

2.2.3.5 Coleta de dados de temperatura e umidade relativa em campo e casa-de-vegetação

A temperatura e umidade relativa do ar foram registradas por Data Logger Pecepectec® modelo DHT-2220, colocados no campo e em ambiente protegido próximos às plantas, para determinação das condições apropriadas para ocorrência das epizootias do fungo *N. floridana*. Foram também coletados dados de precipitação da estação meteorológica da Esalq/USP. Durante o primeiro ciclo de cultivo não foi possível coletar dados climáticos em ambiente protegido, por motivo de defeito nos aparelhos que se encontravam neste local.

2.2.3.6 Avaliação de focos iniciais de *N. floridana*

Para identificar de onde surgem os focos iniciais de *N. floridana* foram instaladas armadilhas adesivas no caule das plantas e nas bordaduras da área experimental. Fitas

adesivas de dupla face de aproximadamente 3 cm de largura foram colocadas em torno do caule das plantas. As fitas adesivas permaneciam no cultivo em ambiente protegido por 2 dias e depois de retiradas foram colocadas sobre lâminas de microscopia e analisadas em microscópio de contraste de fases para verificar se o ácaro está contaminado ou infectado pelo fungo. Pela marcação da posição dos ácaros seria possível identificar se este caminhava no sentido ascendente (vindo do solo) ou descendente da planta.

Armadilhas adesivas foram colocadas nas bordaduras do experimento de campo para coletar ácaros carregados pelo vento provenientes de outras áreas. As armadilhas foram confeccionadas com lâminas de microscopia de 26x76 mm, sendo adicionada a esta uma fita adesiva dupla face transparente para que os ácaros trazidos pelo vento ficassem aderidos na armadilha. As armadilhas foram mantidas em seis estacas de 1,50 m, colocadas em duas alturas em cada estaca, uma destas armadilhas foi instalada a 1,5 m e a outra a 1,0 m do solo. Sendo que em cada altura, foram colocadas 2 armadilhas em posições opostas e no topo das estacas também foi colocada uma armadilha adesiva, totalizando em 30 armadilhas. As lâminas foram montadas utilizando-se meio de Hoyer com corante azul de algodão e observadas ao microscópio de contraste de fase para verificar a presença de ácaros infectados ou contaminados pelo fungo.

2.2.3.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa SAS (SAS Institute Inc., 1999). Os dados de porcentagem de infecção (PI) e número de ácaros (NA) foram transformados por $TNA = \log_{10}(NA + 0,5)$ e $TPI = (PI + 0,5)^{-0,8}$, respectivamente para se obter uma regressão linear. Foi realizada uma seleção de modelos de regressão através do procedimento Stepwise. A variável porcentagem de infecção foi analisada apenas em ambiente protegido, pois a mesma não teve variabilidade no campo. Também consideramos a análise de correlação de Pearson entre as variáveis para selecionar o modelo mais apropriado, utilizamos o nível de significância de 5%. A temperatura noturna (TTNOT), e as umidades relativas máximas (URMAX), mínimas (URMIN) e noturnas (URNOT) em campo e ambiente protegido foram analisadas por

ANOVA, depois dos dados de temperatura noturna, máxima, e umidade relativa mínima e noturna terem sido transformados por $TTNOT = \log_{10}(TNOT)$, $TURMAX = (URMAX)^{11,5}$, $TURMIN = \log_{10}(URMIN)$ e $TURNOT = (URNOT)^{4,1}$, respectivamente. Quando diferenças significativas foram encontradas, comparações usando o teste Tukey HSD foram conduzidas para avaliar diferenças entre as médias em campo e ambiente protegido ($p < 0,05$).

2.3 Resultados

No primeiro ciclo de cultivo que compreendeu o período de novembro de 2007 a janeiro de 2008, *T. evansi* atingiu densidades muito mais elevadas em tomate do que em maria-preta em ambiente protegido, atingindo valores médios de 72 ácaros/3,14cm² enquanto em maria-preta o maior valor observado foi de 16 ácaros/3,14cm². Comparando as plantas de tomate em cultivo protegido, as que tiveram aplicação de agrotóxicos apresentaram valores médios de ácaros sempre superiores aos encontrados no tomate sem aplicação. As populações de *T. evansi* foram maiores nos tomateiros em campo do que em ambiente protegido. Em todos os tratamentos, a população de *T. evansi* aumentou gradativamente atingindo a maior densidade populacional em 05/01/08 (Figura 3.1). Na avaliação seguinte, 10 dias após, observou-se uma queda na densidade de *T. evansi* em todos os tratamentos. A redução populacional em tomateiro em ambiente protegido tanto com quanto sem aplicação de pesticidas provavelmente foi devido à epizootia de *N. floridana*. *N. floridana* foi detectado no início de Janeiro e em 15/01/08 aproximadamente 50% dos ácaros estavam contaminados pelo fungo. A porcentagem de indivíduos contaminados sempre foi maior que a infecção. O fungo não foi detectado nos ácaros provenientes das plantas em campo. A diminuição da infestação de *T. evansi* em tomateiro no campo esteve associada à deterioração das plantas devido a alta infestação do ácaro e também ao impacto das chuvas que foram elevadas neste período (Figura 3.2). A diminuição da infestação de *T. evansi* em dezembro em maria-preta se deve a uma infestação de mosca-branca, *Bemisia tabaci*, que culminou na segunda quinzena deste

mês e também pela senescência das plantas. Não foi encontrado nenhum outro inimigo natural associado a *T. evansi* além de *N. floridana*.

A amplitude térmica neste período não foi muito grande. A temperatura se manteve em torno de 25°C e a umidade relativa máxima atingiu valores máximos próximos a 100% e a UR média esteve acima de 70% durante todo o experimento o que provavelmente tenha favorecido a epizootia do fungo (Figura 3.1). A precipitação acumulada durante o período foi igual a 463 mm não tendo chovido somente no período de 21 a 27/11/08.

No primeiro ciclo de cultivo, as análises de regressão linear utilizando Stepwise revelaram que a variável que melhor explica o número de ácaros em campo ($p > 0,05$) e em ambiente protegido ($p < 0,0001$) foi temperatura média, sendo que as duas variáveis apresentaram uma relação positiva ($p = 0,0015$), ou seja, a medida que a temperatura média aumenta o número de ácaros tende a aumentar. Nas análises para explicar os parâmetros associados a variável porcentagem de infecção, apesar de a covariável umidade relativa média ser significativa no modelo ($p = 0,0041$) sua correlação com a variável resposta foi não significativa ($p > 0,05$). No modelo final ficaram apenas as covariáveis número de ácaros e umidade relativa mínima as quais possuem, uma relação negativa ($p < 0,0001$) e positiva ($p = 0,0152$), respectivamente, com a variável resposta porcentagem de infecção.

Figura 3.1.- Número médio de ácaros vivos por 3,14cm² de área foliar, porcentagem de infecção e contaminação pelo fungo *N. floridana* em ambiente protegido e campo e temperatura e umidade relativa do ar em campo durante o primeiro ciclo de cultivo

Figura 3.2 – Precipitação acumulada entre as avaliações no primeiro ciclo de cultivo

Durante o segundo ciclo de plantio, de junho a julho de 2008, em ambiente protegido se observou a presença de *N. floridana* desde a primeira amostragem em maria-preta e tomate sem aplicação de agrotóxicos. O fungo não foi constatado em nenhuma amostragem nos ácaros provenientes das plantas de tomate com aplicação de agrotóxicos. Nas plantas de tomate e maria-preta onde o fungo foi constatado as populações de *T. evansi* permaneceram em níveis muito baixos e não passou de 6 ácaros/3,14cm² durante todo o experimento. Por outro lado, nas plantas de tomate com aplicação de pesticidas, onde o fungo não surgiu, ao final do estudo a população de *T. evansi* era de aproximadamente 19 ácaros/3,14cm². Os níveis de infecção foram muito superiores em tomate comparado a maria-preta. Nesta fase do experimento observou-se grande número de ácaros mumificados em tomate sem aplicação de agrotóxicos sendo o valor máximo de aproximadamente 3 ácaros/3,14cm² observado em 7/7/08 (Figura 3.3). Em maria-preta ocorreu uma infestação de pulgões o que pode ter contribuído para um menor crescimento populacional de *T. evansi* juntamente com a ação do fungo *N. floridana*. Em campo não se observou a presença do fungo em nenhum dos tratamentos. A população do ácaro atingiu maiores densidades populacionais em campo do que em ambiente protegido, exceto em tomateiro com aplicação de pesticidas (Figura 3.3). Esta observação indica um papel do fungo na regulação das populações de *T. evansi* já que nos tratamentos onde o fungo ocorreu a população do ácaro não aumentou e nos tratamentos onde o fungo não apareceu as

populações do ácaro aumentaram. A precipitação não teve nenhum efeito na dinâmica dos ácaros já que não choveu em julho e as chuvas foram mínimas e somente no início de junho totalizando menos de 50 mm durante todo o período (Figura 3.4). Não foi observado nenhum outro inimigo natural que não *N. floridana* associado a *T. evansi*. Mesmo nas plantas onde não foi observado o fungo *N. floridana* a população do ácaro *T. evansi* não apresentou crescimento populacional acentuado comparado ao que ocorreu no verão no primeiro ciclo de cultivo. Isto deve ser devido às baixas temperaturas. A temperatura média esteve abaixo de 20°C na maioria no período amostral sendo que a temperatura noturna caiu abaixo de 10°C durante vários dias. Durante este período foi possível observar que a umidade relativa noturna foi maior em ambiente protegido que em campo ($F = 20,51$; $gl = 150$; $P < 0,0001$). O mesmo ocorreu para a umidade relativa máxima ($F = 20,38$; $gl = 150$; $P < 0,0001$) e média ($F = 10,12$; $gl = 150$; $P = 0,0018$), e temperatura mínima ($F = 4,16$; $gl = 150$; $P = 0,0342$) e máxima ($F = 22,94$; $gl = 150$; $P < 0,0001$). Estas condições em ambiente protegido podem ter favorecido o surgimento e permanência do fungo. A amplitude térmica neste período foi maior que no primeiro ciclo de plantio. Embora a flutuação da umidade relativa durante o dia e a noite tenha sido semelhante em campo e ambiente protegido, a umidade foi em geral maior em ambiente protegido. Uma observação interessante é que o fungo permaneceu em níveis elevados no período de 2 a 22/07/08 quando a umidade média esteve abaixo de 70% e durante o dia atingiu freqüentemente níveis menores que 30% e não atingiu valores próximos a saturação durante a noite.

Durante o segundo ciclo de cultivo em campo a variável número de ácaros é explicada no modelo pelas co-variáveis umidade relativa noturna e temperatura média as quais possui uma relação negativa ($p < 0,0001$) e positiva ($p = 0,0042$) com a variável resposta. Em ambiente protegido, o número de ácaros é correlacionado com as covariáveis umidade relativa máxima ($p = 0,0046$) e umidade relativa mínima ($p = 0,0469$) as quais possuem uma relação negativa com a variável resposta. Já a porcentagem de infecção de ácaros é explicada no modelo pela co-variável umidade relativa mínima que possui uma relação positiva com a variável resposta ($p < 0,0001$).

Figura 3.3.- Número médio de ácaros vivos por 3,14cm² de área foliar, porcentagem de infecção e contaminação pelo fungo *N. floridana* e temperatura e umidade relativa do ar em ambiente protegido e campo durante o segundo ciclo de cultivo

Figura 3.4 – Precipitação acumulada entre avaliações no segundo ciclo de cultivo

No terceiro ciclo de plantio em ambiente protegido em maria-preta e em tomate sem agrotóxicos, as populações de *T. evansi* atingiram densidades populacionais baixas, sendo o valor máximo observado de 16 ácaros/3,14cm² e 13 ácaros/3,14cm², respectivamente. *N. floridana* foi observado em tomateiro com e sem aplicação de agrotóxicos. Nas plantas de tomateiro sem aplicação de agrotóxicos o fungo surgiu no início do mês de setembro, enquanto em tomateiros com aplicação o fungo foi observado somente no final deste mês. A densidade de *T. evansi* ao final do experimento foi maior nas plantas com aplicação de agrotóxicos comparadas aquelas sem aplicação. Foi encontrado grande número de ácaros mumificados em tomateiro sem aplicação de pesticidas, atingindo um pico de aproximadamente 23 ácaros mumificados/3,14cm² na avaliação do dia 04/10/08 (Figura 3.5). Em maria-preta não se observou a presença do fungo, e mesmo assim houve um menor crescimento populacional de *T. evansi*. Isto pode estar associado ao fato de que as plantas ficaram altamente infestadas por pulgões e estes tenham competido pelo mesmo nicho que *T. evansi*. Não foi detectada a ocorrência do fungo em campo, e o número de ácaros encontrados foi superior ao encontrado em ambiente protegido em todos os tratamentos (Figura 3.5). Durante o período de maior infecção pelo fungo quando se observou 49% de infecção, a umidade relativa média foi de 50% e não atingiu valores próximos a 100% durante a noite. Os valores de temperatura em campo durante o experimento

tiveram alta amplitude térmica chegando a valores extremos de 8°C e 40°C, já em ambiente protegido os valores extremos de temperatura foram 7°C e 45°C. Em ambiente protegido se observou que as temperaturas máximas foram superiores aos valores máximos de campo ($F = 23,91$; $gl = 163$; $P < 0,0001$) (Figura 3.5). Além disso, a umidade relativa noturna foi maior em ambiente protegido do que em campo ($F = 21,71$; $gl = 163$; $P < 0,0001$). Em ambiente protegido se observa que as temperaturas máximas foram superiores aos valores máximos de campo (Figura 3.5). A precipitação ocorrida neste ciclo da cultura foi superior ao observado no ciclo anterior tendo sido registrado 140 mm de chuvas durante período de avaliações (Figura 3.6).

No terceiro ciclo de cultivo em campo a variável número de ácaros apresentou correlação significativa e positiva ($p=0,0438$) com a temperatura mínima. Já em ambiente protegido, o número de ácaros apresentou uma relação positiva com a temperatura média ($p=0,0060$). Para a variável porcentagem de infecção, permaneceu no modelo final apenas as covariáveis número de ácaros ($p<0,0001$) e temperatura noturna ($p=0,0324$) as quais possuem uma relação negativa com a variável resposta.

Figura 3.5.- Número médio de ácaros vivos por 3,14cm² de área foliar, porcentagem de infecção e contaminação pelo fungo *N. floridana* em ambiente protegido e campo e temperatura e umidade relativa do ar em campo durante o terceiro ciclo de cultivo

Figura 3.6 – Precipitação acumulada entre as avaliações no terceiro ciclo de cultivo

No quarto ciclo de plantio, de outubro a novembro de 2008, a densidade população de *T. evansi* não ultrapassou 16 ácaros/3,14 cm², sendo o valor máximo encontrado em tomate sem agrotóxicos em campo. Ácaros infectados por *N. floridana* foram observados desde a primeira amostragem em todos os tratamentos exceto em maria-preta em campo, onde o fungo foi detectado na segunda avaliação. Já na segunda avaliação em 23/11/08, 65% dos ácaros estavam contaminados com o fungo nas plantas de tomateiro sem agrotóxicos em ambiente protegido. O número de ácaros mumificados aumentou com o passar das avaliações na maioria dos tratamentos, chegando a atingir 29 ácaros/3,14cm² em tomate com aplicação em campo. Neste ciclo de cultivo a aplicação de agrotóxicos parece não ter apresentado efeito direto sobre o fungo, exceto pelo fato de que nas duas últimas amostragens em 10/11 e 18/11 o número de ácaros mumificados foi superior em tomateiros sem agrotóxicos quando comparado com tomateiros com aplicação de agrotóxicos, em campo. No período que precedeu a maior porcentagem contaminação pelo fungo (65%), a umidade relativa média foi de 75% e não atingiu valores próximos a 100% durante a noite. Durante o quarto ciclo de cultivo, a diferença entre a temperatura e umidade relativa em campo e ambiente protegido foi menor que no segundo e terceiro ciclo de cultivo (Figura 3.7). Isso pode ter ocorrido por este experimento ter ocorrido na primavera onde não há uma redução drástica nas temperaturas durante a noite. A precipitação ocorrida neste ciclo

da cultura foi de 93 mm de chuvas. A precipitação parece não ter tido um impacto direto sobre a densidade do ácaro, pois nas duas últimas avaliações as densidades populacionais em tomateiros em campo foram ligeiramente superiores as densidades em ambiente protegido (Figura 3.8).

Figura 3.7.- Número médio de ácaros vivos e ácaros mumificados por 3,14cm² de área foliar, porcentagem de infecção e contaminação pelo fungo *N. floridana* e temperatura e umidade relativa do ar em ambiente protegido e campo durante o quarto ciclo de cultivo

Figura 3.8 – Precipitação acumulada entre as avaliações no quarto ciclo de cultivo

O número de ácaros coletados nas armadilhas em campo nos quatro ciclos da cultura aumentou com o incremento populacional de *T. evansi* nas plantas. No entanto, nenhum ácaro contaminado e/ou infectado pelo fungo, foi observado nas armadilhas. Desta forma, não foi possível constatar se focos iniciais de *N. floridana* são formados por ácaros infectados transportados pelo vento vindo de outras áreas. Como não ocorreu infecção por *N. floridana* nas plantas em campo também não foi possível perceber se os ácaros infectados são transportados de dentro para fora do plantio pelo vento. Em ambiente protegido, não foi encontrado nenhum ácaro contaminado e/ou infectado por *N. floridana* nas fitas adesivas colocadas nos caules das plantas. O número de ácaros encontrados nas fitas do caule aumentaram no decorrer do experimento seguindo o incremento na população de *T. evansi*.

2.4 Discussão

O fungo *N. floridana* ocorreu naturalmente durante todos os quatro ciclos de cultivo distribuídos em todas as estações do ano. Nenhum outro inimigo natural além de *N. floridana* foi encontrado associado a *T. evansi*. Nos tratamentos onde o fungo foi prevalente, as populações do ácaro *T. evansi* reduziram drasticamente e/ou foram mantidas em baixos níveis populacionais, indicando ser este um importante agente na regulação de populações de *T. evansi*. Mesmo durante o inverno quando as populações de *T. evansi* apresentaram baixo incremento populacional e as condições ambientais

pareciam ser inapropriadas para o fungo, altos níveis de infecção foram observados por longos períodos, contribuindo para a manutenção de baixos níveis populacionais de *T. evansi*.

No primeiro ciclo de cultivo mantido durante o final da primavera e começo do verão, as temperaturas foram mais altas e *T. evansi* alcançou elevados picos populacionais chegando a aproximadamente 85 ácaros/3,14 cm² em campo sobre plantas de tomateiro sem aplicação de agrotóxicos. As populações de *T. evansi* em campo foram maiores que as encontradas em ambiente protegido. Durante os dois ciclos de cultivo conduzidos predominantemente no inverno (incluindo o final do outono e início da primavera), as populações tanto em campo quanto em ambiente protegido foram inferiores as populações encontradas durante o primeiro ciclo de cultivo. Isso ocorreu devido à redução da temperatura durante este período.

Os agrotóxicos utilizados poderiam ter apresentado um efeito acaricida ou efeito estimulante nas populações de *T. evansi*. Dentre os agrotóxicos utilizados pelo menos um, o piretróide Deltametrina, é reconhecido por estimular o aumento da taxa reprodutiva de ácaros tetraniquídeos, num processo chamado de homoligose, (GERSON; COHEN, 1989; TRICHILO; WILSON, 1993). A aplicação de pesticidas aparentemente não teve um efeito na densidade populacional de *T. evansi*, já que não houve uma tendência nas diferenças entre as densidades em tomateiros tratados e não tratados com agrotóxicos. Por exemplo, quando se compara a densidade de *T. evansi* em plantas de tomateiro em campo onde o fungo não foi observado, observa-se que as densidades em plantas com aplicação de agrotóxicos foram iguais, maiores e menores do que em plantas sem aplicação de agrotóxicos no primeiro, segundo e terceiro ciclos de cultivo.

Em ambiente protegido, *N. floridana* surgiu tardiamente no primeiro ciclo de cultivo quando a densidade de *T. evansi* era alta, já no segundo e quarto ciclo de cultivo o fungo esteve presente desde a primeira avaliação e no terceiro ciclo de cultivo o fungo surgiu dia 01/09/08. Em campo, o fungo somente foi observado no último ciclo de cultivo. Uma das hipóteses para explicar a ausência do fungo é que as condições ambientais em campo não foram adequadas para o desenvolvimento do fungo nos três primeiros ciclos de cultivos. Entretanto, os parâmetros climáticos avaliados

aparentemente não justificam esta hipótese. Por exemplo, os níveis de UR em campo durante o quarto ciclo de cultivo quando o fungo foi detectado foram inferiores aos níveis do primeiro ciclo quando nenhum ácaro infectado foi observado. A prevalência do fungo sob grandes amplitudes de temperatura e umidade em ambiente protegido durante os quatro ciclos de cultivos em várias estações do ano sugere que condições propícias também tenham ocorrido em campo. Uma condição abiótica importante na dinâmica de doenças fúngicas é a incidência de raios ultravioletas (UV). Os efeitos de UV na sobrevivência de conídios devem ser maiores em campo do que em ambiente protegido, mas isto não foi avaliado neste estudo. Outro fator que pode explicar o não surgimento do fungo nos três primeiros ciclos de plantio em campo é que na área onde se instalou o experimento não havia sido cultivado plantas de tomate num passado recente. Nas instalações de ambiente protegido, plantas de tomateiro vinham sendo cultivadas e epizootias do fungo já tinha sido observadas anteriormente, o que pode ter provido este ambiente com inóculo do fungo.

N. floridana permaneceu mesmo sob condições extremas de temperatura, no inverno quando foram observadas temperaturas mínimas de até 7°C durante a noite, e chegando a temperatura máxima de 51°C durante o dia em ambiente protegido. Durante o experimento, em ambiente protegido, a umidade relativa média do ar não atingiu o ponto de saturação, os valores oscilaram entre 46 e 96%. Estudos em laboratório têm demonstrado a importância de fatores ambientais especialmente a temperatura e umidade relativa sobre a esporulação, processo fundamental para o estabelecimento do fungo. O processo de germinação é mais dependente da umidade relativa quando comparado a temperatura, e para que ocorra a conidiogênese é necessária que se atinja umidades relativas próximas do ponto de saturação (ODUOR, et al., 1996b; SMITLEY; KENNEDY; BROOKS, 1986; DELALIBERA et al. 2006). No entanto observamos que o fungo *N. floridana* atingiu taxas de infecção acima de 50% mesmo quando a umidade relativa do ar não atinge o ponto de saturação. Em condições de campo existem outras variáveis que em laboratório são difíceis de ser estimadas. Pequenos artrópodes que vivem na superfície da folha de plantas são influenciados pelo microclima gerado pelo processo de transpiração e respiração da planta (SMITH, 1954). A transpiração que ocorre na folha é fonte de umidade na

camada de ar de <5mm da superfície da folha. Assim, o microclima onde os ácaros permanecem, pelo menos por um determinado tempo, atinge facilmente a saturação (FERRO; SOUTHWICK, 1984; HOLTZER et al., 1988).

A precipitação não parece ter exercido efeito significativo diretamente sobre o fungo, pois em campo não foi constatada a presença de *N. floridana* nos três primeiros ciclos de cultivo em plantas submetidas a vários regimes pluviométricos. Por outro lado, o fungo *N. floridana* permaneceu em ambiente protegido sem a presença de chuvas, observando-se neste ambiente um grande número de múmias e altas taxas de contaminação e infecção.

A densidade populacional do hospedeiro é citada por diversos autores como um dos fatores limitantes para que ocorram epizootias (TANADA; KAYA, 1992; WATANABE, 1987), pois ela afeta a taxa de transmissão e conseqüentemente a taxa de infecção do patógeno. Durante o segundo ciclo de cultivo o fungo *N. floridana* surgiu quando a densidade de *T. evansi* era muito baixa e permaneceu causando altas taxas de infecção chegando a 70% de infecção mesmo quando a população do ácaro *T. evansi* não foi superior a 6 ácaros/3,14 cm². Ou seja, depois que o fungo se estabeleceu no local, ele conseguiu se manter mesmo com baixas populações do hospedeiro. Resultados semelhantes foram obtidos no quarto ciclo de cultivo onde o fungo surgiu e se manteve em baixas densidades do hospedeiro. Somente no último ciclo de cultivo foram encontrados alguns ácaros com esporos de resistência do fungo. Não se sabe quais fatores induzem a formação de esporos de resistência neste fungo. Os dados climáticos observados no período em que foram encontrados os esporos de resistência foram semelhantes a outros períodos onde não foram encontrados esporos de resistência. O esporo de resistência é uma forma do fungo se proteger de condições ambientais adversas e garantir sua permanência quando a população hospedeira está baixa. Não se sabe como este fungo conseguiu permanecer entre os ciclos de cultivo.

Durante o primeiro e o terceiro ciclo de cultivo, a ocorrência de *N. floridana* em ambiente protegido foi observada primeiramente em tomateiro sem aplicação de agrotóxicos e posteriormente em tomateiro com aplicação. No segundo ciclo de cultivo o fungo somente ocorreu em tomateiros sem aplicação de agrotóxicos. Estes resultados sugerem que os agrotóxicos utilizados no experimento podem ter efeitos deletérios

sobre a população do fungo. Os fungicidas são o grupo de agrotóxicos que apresentam maior efeito adverso na sobrevivência e eficiência de *N. floridana* (KLINGEN; WESTRUM, 2007, WEKESA; KNAPP; DELALIBERA JR., 2008). Um dos fungicidas utilizados foi o Captan (Orthocide® 500). Wekesa; Knapp; Delalibera Jr. (2008) em estudos de laboratório verificaram que o fungicida Captan tem efeito negativo sobre a esporulação e germinação de *N. floridana* dessa forma reduzindo a transmissão e desenvolvimento de epizootias. O efeito direto de agrotóxicos sobre epizootias naturais já havia sido relatado por outros autores (BRANDENBURG; KENNEDY, 1982; BOYKIN; CAMPBELL; BEUTE, 1984).

Dados de laboratório demonstram que ácaros *T. evansi* criados em maria-preta apresentam alta taxa de oviposição quando comparado aos ácaros criados em tomateiro, indicando que maria-preta seja um hospedeiro adequado para *T. evansi*. Porém observou-se neste estudo um crescimento populacional muito maior em tomateiro do que em maria-preta. Um dos fatores que podem explicar este resultado, é que durante todos os ciclos de cultivo as plantas de maria-preta foram infestadas com outros artrópodes, como pulgões, mosca-branca e ácaros eriofídeos, aumentando a competição pelo mesmo nicho de *T. evansi*.

As plantas hospedeiras podem afetar os níveis de contaminação, infecção e esporulação do fungo patogênico *N. floridana* e a mortalidade, mumificação de *T. evansi*. As diferenças entre as plantas hospedeiras podem ser atribuídas à características morfológicas como tricomas, tamanho da planta e arquitetura, ou químicas. Embora as diferenças morfológicas possam ter pouco impacto sobre a fisiologia dos fungos patogênicos, compostos químicos de plantas podem inibir ou até matar os fungos (HARBORNE, 1986). Ácaros mumificados em plantas de tomate produzem maior número de esporos, indicando que o fungo se reproduz melhor em ácaros que se alimentam sobre estas plantas, em comparação a maria-preta (WEKESA, V. W. dados não publicados). Quando a esporulação é afetada pela planta hospedeira ocorre uma redução nas taxas de transmissão e conseqüentemente uma menor taxa de infecção pelo fungo. Esse resultado corrobora com os resultados obtidos no segundo e quarto ciclo de cultivo onde o fungo *N. floridana* ocorreu em maria-preta,

mas a porcentagem de contaminação e infecção e o número de múmias produzidas foram inferiores aos valores encontrados em tomate em ambiente protegido

Não foi possível identificar de onde surgem os focos iniciais de *N. floridana*. Como o fungo não foi observado nos três primeiros ciclos de cultivo em campo, somente foi possível avaliar no último ciclo, se os ácaros chegam contaminados e/ou infectados pelo fungo quando a população de *T. evansi* está aumentando, ou se o fungo é disseminado quando os ácaros estão dispersando após atingirem altas taxas populacionais. Entretanto, nenhum ácaro infectado foi observado nas lâminas.

Este é o primeiro trabalho que demonstra o impacto de *N. floridana* sobre as populações de *T. evansi* em condições de campo, utilizando simultaneamente dois sistemas de cultivo de tomate em campo aberto e ambiente protegido. As epizootias naturais reduziram drasticamente as populações do ácaro, mantendo as populações em níveis baixos sem dano econômico aparente. Em nenhum momento foi encontrado outro inimigo natural associado a *T. evansi*. O fungo *N. floridana* ocorreu em todas as estações do ano em ambiente protegido, mesmo quando não se atingiu níveis de umidade relativa próximo ao ponto de saturação. Este patógeno apresenta potencial para ser utilizado como agente de controle biológico em regiões onde este ácaro é a principal praga, pois ele apresenta alta taxa de infecção e contaminação sobre a população hospedeira, mesmo quando a população hospedeira se encontra baixa.

Referências

ANDREADIS, T. G.; WESELOH, R. M. Discovery of *Entomophaga maimaiga* in North American gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, Stanford, v. 87, p. 2461-2465, 1990.

BAKER, E.W.; PRITCHARD, A.E. The Tetranychoid mites of Africa. **Hilgardia**, California, v. 29, p. 455-574, 1960.

BLAIR, B.W. Laboratory screening of acaricides against *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard. **Crop Protection**, Guildford, v. 8, p. 212-216, 1989.

BOYKIN, L. S, CAMPBELL, W.V, BEUTE, M. K. Effect of pesticides on *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) and arthropod predators attacking the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) in North Carolina peanut fields. **Journal of Economic Entomology**, Lanham MD, v. 77, p. 969-975, 1984.

BRANDENBURG, R.L; KENNEDY, G.G. Relationship of *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) to two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in field corn. **Journal of Economic Entomology**, Lanham md, v. 75, p. 691-694, 1982.

CARNER, G.R. A description of the life cycle of *Entomophthora* sp. in the two-spotted spider mite. **Journal Invertebrate Pathology**, New York, v. 28, p. 245-254, 1976.

CARNER, G.R.; CANERDAY, T.D. Field and laboratory investigations with *Entomophthora fresenii*, a pathogen of *Tetranychus* spp. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, MD, v. 61, p. 956-959, 1968.

CARRUTHERS, R. I.; HAYNES, D. L. Temperature, moisture and habitat effects on *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) conidial germination and survival in the onion agroecosystem. **Environment Entomology**, College Park MD, v. 15, p. 1156–1160, 1986.

CRANHAM, J.E.; HELLE, W. Pesticide resistance in Tetranychids. In : HELLE, W.; SABELIS, M.W. (Ed.). **Spider mites. Their biology, natural enemies and control**. Amsterdam. Elsevier, NY. p. 405-421, 1985.

DELALIBERA, Jr, I.; DEMÉTRIO, C.G.B.; MANLY, B.F.J.; HAJEK, A. Effect of relative humidity and origin of isolates of *Neozygites tanajoae* (Zygomycetes: Entomophthorales) on production of conidia from cassava green mite, *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) cadavers. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 489-496, 2006.

ELLIOT, S.L.; de MORAES, G.J.; MUMFORD, J.D. Importance of ambient saturation deficits in an epizootic of the fungus *Neozygites floridana* in cassava green mites (*Mononychellus tanajoa*). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 27, p. 11-25, 2002.

FENG, M.G.; JOHNSON, J.B.; NOWIERSKI, R.M.; POPRAWSKI, T.J. Epizootics caused by entomophthoralean fungi (Zygomycetes: Entomophthorales) in populations

of cereal aphids (Homoptera: Aphididae) in irrigated small grains of southwestern Idaho, USA. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.113, p. 376–390, 1992.

FERRO, D. N.; SOUTHWICK, E.E. Microclimates of small arthropods: Estimating humidity within the leaf boundary layer. **Environmental Entomology**, College Park, v. 13, p. 926-929, 1984.

FURTADO, I.P; MORAES, G.J; KRETER, S; KNAPP, M. Search for effective natural enemies of *Tetranychus evansi* in south and southeast Brazil. **Experimental and Applied Acarology**. Amsterdam. v. 40, p. 157-174, 2006.

GALAINI-WRAIGHT, S.; WRAIGHT, S.; CARRUTHERS, R. I.; MAGALHAES, B. P.; ROBERTS, D. W. Description of a *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthoraceae) epizootic in a population of *Empoasca kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) on beans in central Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 58, p. 311–326, 1991.

GERSON, U.; COHEN, E. Resurgences of Spider Mites (Acari: Tetranychidae) Induced by Synthetic Pyrethroids. **Experimental and Applied Acarology**. Amsterdam, v. 6, p. 29-46, 1989.

HAJEK, A.E. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. **Advances in Microbial Ecology**. New York. v.15, p. 193-249, 1997.

HAJEK, A. E.; CARRUTHERS, R. I.; SOPER, R. S. Temperature and moisture relations of sporulation and germination by *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthoraceae), a fungal pathogen of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). **Environment Entomology**, College Park MD, v. 19, p. 85–90, 1990.

HARBORNE, J.B. Systematic significance of variations in defense chemistry in the Solanaceae. In: D'ARCY WG, (Ed.). Solanaceae biology and systematics. New York: Columbia University Press, 1986. p.328-344.

HELLE, W; VAN DE VRIE, B.M. Problems with spider mites. **Outlook on Agriculture**. London, v. 8, p. 119-125, 1974.

HOLTZER, T.O.; NORMAN, J.M.; PERRING, T.M.; BERRY, J.S.; HEINTZ, J.C. Effects of microenvironment on the dynamics of spider-mites populations. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.4, p. 247-264, 1988.

HUMBER, R.A; MORAES, G. J; SANTOS, J.M. Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by a *Triplosporium* spp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in Northeastern Brazil. **Entomophaga**, Paris, v. 26, p. 421-425, 1981.

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

KELLER, S. The genus *Neozygites* (Zygomycetes, Entomophthorales) with special reference to species found in tropical regions. **Sydowia**, Horn, v. 49, n.2, p. 118-146, 1997.

_____. Arthropod-patogenic Entomophthorales of Switzerland. II. *Erynia*, *Eyniopsis*, *Neozygites*, *Zoophthora* and *Tarichium*. **Sydowia**, Horn, v. 43, p. 39-122, 1991.

KLINGEN, I, WESTRUM, K. The effect of pesticides used in strawberries on the phytophagous mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and its fungal natural enemy *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales). **Biological control**, Orlando, v. 43, p. 222-230, 2007.

KLUBERTANZ, T.H.; PEDIGO, L.P.; CARLSON, R.E. Impact of fungal epizootics on the biology and management of the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) in soybean. **Environmental Entomology**, College Park MD, v. 20. p. 731-735, 1991.

KNAPP, M; WAGNER, B; NAVAJAS, M. Molecular discrimination between the spider mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in Southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch. **African Entomology**, Pretoria. v. 11,p. 300-304, 2003.

MONTSERRAT, M.; CASTANE, C.; SANTAMARIA, S. *Neozygites parvispora* (Zygomycotina: Entomophthorales) causing an epizootic in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber in Spain. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.71, p. 165–168, 1998.

MORAES, G.J.; McMURTRY, J.A.; BAKER, E.W. Rediscription and distributions of the spider mites *Tetranychus evansi* and *Tetranychus marianae*. **Acarologia**, Paris, v. 28, p.333-343, 1987.

MORRIS, M.J.; ROBERTS, S.J.; MADDOX, J.V.; ARMBRUST, E.J. Epizootiology of the fungal pathogen, *Zoophthora phytonomi* (Zygomycetes: Entomophthorales) in field populations of alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) larvae in Illinois. **Great Lakes Entomology**, London, v. 29, p. 129–140, 1986.

MUMA, M.H. Coincidence and incidence of *Entomophthora floridana* with and in *Eutetranychus banksi* in florida citrus groves. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 52, n. 2, p. 107-112, 1969.

NEMOTO, H.; AOKI, J. *Entomophthora floridana* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) attacking the sugi spider mite, *Oligonychus hondoensis* (Acarina: Tetranychidae), in Japan. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 10, n. 2, p. 90-95, 1975.

NEWMAN, G. G.; CARNER, G. R. Environmental factors affecting conidial sporulation and germination of *Entomophthora gammae*. **Environment Entomology**, College Park MD, v. 4, p. 615–618, 1975.

ODUOR G.I.; SABELIS M.W.; LINGEMAN R.; MORAES G.J; YANINEK J.S. Modelling fungal (*Neozygites* cf. *floridana*) epizootics in local populations of cassava green mites (*Mononychellus tanajoa*). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 21, p. 485–506, 1997.

ODUOR G.I.; MORAES G.J.; van der GEEST L.P.S.; YANINEK J.S. Production and germination of primary conidia of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) under constant temperature, humidity, and light conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 68, p. 213–222, 1996b.

ODUOR G.I.; YANINEK J.S.; van der GEEST L.P.S.; MORAES G.J. Germination and viability of capilliconidia of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) under constant temperature, humidity, and light conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 67, p. 267–278, 1996a.

ODUOR G.I.; MORAES G.J.; YANINEK J.S.; van der GEEST L.P.S. Effect of temperature, humidity and photoperiod on mortality of *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) infected by *Neozygites cf. floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 19, p. 571–579, 1995b.

ODUOR G.I.; YANINEK J.S.; VAN DER GEEST L.P.S.; MORAES G.J. Survival of *Neozygites cf. floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) in mummified cassava green mites and the viability of its primary conidia. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 19, p. 479–488, 1995a.

SABA, F. Population dynamics of tetranychids in subtropical Florida. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ACARALOGY, 1971. The Hague. **Proceedings...**Prague: Junk, The Hague. 1971. p. 237-240.

SAS Institute Inc., 1999. **SAS/STAT User's Guide**. Version 8, 1st Ed. ,v.13. Cary, North Carolina :SAS Institute Inc,1999.

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

SHIMAZU, M. Factors affecting conidial germination of *Entomophthora delphacis* Hori (Entomophthorales: Entomophthoraceae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 12, p. 260–264, 1977.

SMITH, J.W; FURR, R.E. Spider mites and some natural control agents found in cotton in the delta area of Mississippi. **Environmental Entomology**, College Park MD, v. 4. p. 559-560, 1975.

SMITH, R.F. The importance of the microenvironmental in insect ecology. **Journal of Economic Entomology**.Lanham, v. 47, p. 205-210, 1954.

SMITLEY, D.R.; KENNEDY, G.G.; BROOKS, W.M. Role of the entomogenous fungus, *Neozygites floridana*, in population declines of twospotted spider mite. *Tetranychus urticae*, on field corn. **Entomologia Experimentalis et. Applicata**, Dordrecht, v. 41, p. 255-264, 1986.

STEINKRAUS, D. C. Factors affecting transmission of fungal pathogens of aphids. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 92, p. 125-131, 2006.

STEINKRAUS, D.C.; SLAYMAKER, P.H. Effect of temperature and humidity on formation, germination, and infectivity of conidia of *Neozygites fresenii* (Zygomycetes: Neozygitaceae) from *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 64, p. 130–137, 1994.

STEINKRAUS, D. C.; KRING, T. J.; TUGWELL, N. P. *Neozygites fresenii* in *Aphis gossypii* on cotton. Southwest. **Entomologist**, London, v. 16, p. 118-222, 1991.

TANADA, Y; KAYA, H.K. Epizootiology. In: _____. **Insect Pathology**. California: Academic Press, 1992. chap. 16, p.595-633.

TRICHILO, P.J.; WILSON, L.T. An ecosystem analysis of spider mite outbreaks: physiological stimulation or natural enemy suppression. **Experimental and Applied Acarology**. Amsterdam, v. 17, p. 291-314, 1993.

WALTER, D.E; PROCTOR, H. Mites: ecology, evolution and behaviour. Wallingford, CABI Publishing. 1999. 352p.

WATANABE, H. The host population. In: Fuxa, J.R.; Tanada, Y (Ed.), **Epizootiology of insect diseases**. New York: John Wiley, 1987 . p. 71-112.

WEKESA, V. W.; KNAPP, M.; DELALIBERA JR, I. Side-effects of pesticides on the cycle of the mite pathogenic fungus *Neozygites floridana*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, não publicado, 2008. DOI 10.1007/s10493-008-9168-4.

3 Determinação da variabilidade genética dos isolados de *Neozygites floridana* através do seqüenciamento da região 18S do DNA ribossômico

Resumo

Neozygites floridana é um fungo patogênico a ácaros da família Tetranychidae, e apresenta alta especificidade quanto ao hospedeiro. Os isolados estudados até o momento somente são virulentos ao hospedeiro do qual estes foram obtidos. Dois isolados morfológicamente semelhantes foram encontrados infectando o ácaro rajado, *Tetranychus urticae* (LQ3) e o ácaro vermelho do tomateiro, *T. evansi* (LQ2) e o potencial destes no controle destas duas pragas está sendo avaliado. Este estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética dos isolados de *N. floridana* através do seqüenciamento da região 18S do DNA ribossômico. Seqüências parciais do 18S rDNA destes isolados foram comparadas com as seqüências de *N. tanajoae* (BIN35G), *N. floridana* (ARSEF662) e *N. parvispora* (AF296760) depositadas no GenBank. O isolado de *N. floridana* proveniente de *T. evansi* (LQ2) e o isolado proveniente de *T. urticae* (LQ3) apresentam 98% de similaridade. Entretanto estes dois isolados apresentam similaridade inferior a 90% para os demais isolados, incluindo o isolado ARSEF662, que tem como hospedeiro a mesma espécie *T. urticae*. O isolado de *N. parvispora* foi o que apresentou maior porcentagem de divergência com todos os isolados. Apesar de morfológicamente semelhantes, estes fungos apresentam alta divergência na região 18S rDNA.

Palavras chave: *Neozygites floridana*; Região 18S rDNA; *Tetranychus evansi*; *Tetranychus urticae*; Seqüenciamento

Abstract

Neozygites floridana is a fungus pathogenic to mites in the family Tetranychidae and is highly specific to its hosts. The isolates studied up to date are only virulent to hosts upon which they were isolated. Two morphologically identical isolates were found infecting the two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (LQ3) and the tomato red spider mite, *T. evansi* (LQ2) and the potential of these isolates is being evaluated for the control of these two pests. The objective of this study was to evaluate the genetic variability of the isolates of *N. floridana* through sequencing of the 18S region of ribosomal DNA. Partial sequences of 18S rDNA of these isolates were compared with the sequences of *N. tanajoae* (BIN35G), *N. floridana* (ARSEF662) and *N. parvispora* (AF296760) deposited in the Gene Bank. The *N. floridana* isolate from *T. evansi* (LQ2) and the isolate from *T. urticae* (LQ3) had 98% similarity. Therefore, these two isolates had a similarity of less than 90% in relation to other isolates, including the isolate ARSEF662 which are from the same host species, *T. urticae*. The isolate of *N. parvispora* had the highest percent divergence from all isolates. Although morphologically similar, these fungi have high divergence at 18S rDNA region.

Keywords: *Neozygites floridana*; 18S rDNA region; *Tetranychus evansi*; *Tetranychus urticae*; Sequencing

3.1 Introdução

Neozygites floridana é um dos poucos fungos patogênicos encontrados provocando mortalidade natural sobre ácaros tetraniquídeos. Epizootias deste fungo já foram relatadas em populações de ácaros tetraniquídeos em diversas culturas (HUMBER; MORAES; SANTOS, 1981; BRANDENBURG; KENNEDY, 1982; CARNER; CANERDAY, 1970) e seu potencial na regulação das populações de ácaros já foi demonstrado (BRANDEBURG; KENNEDY, 1982; WEKESA et al., 2007). *Neozygites* pertence a ordem Entomophthorales cujo grupo consiste de fungos virulentos, altamente específicos e epizoóticos. A taxonomia deste grupo é muito complexa, e pouco estudada quando comparada a outros entomopatógenos (HUMBER, 2008).

A família Neozygitaceae inclui espécies associadas a pequenos artrópodes como tripses, ácaros e afídeos (KELLER, 1997). Por causa das incertezas quanto à delimitação de espécies dentro desta família, todos os patógenos deste grupo associados aos ácaros tetraniquídeos tem sido identificados como *N. floridana*. Delalibera Jr., Hajek e Humber (2004) realizaram uma comparação entre isolados patogênicos ao ácaro verde da mandioca e isolados patogênicos ao ácaro rajado e verificaram que morfologicamente as duas espécies são similares, mas são distintos quanto às características fisiológicas e moleculares. Baseado nestes estudos descreveram a espécie os isolados do ácaro verde da mandioca como uma nova espécie, *N. tanajovae*, separando-os de *N. floridana* patogênicos a outros tetraniquídeos.

A caracterização molecular é cada vez mais indispensável nos estudos com fungos entomopatogênicos. Técnicas moleculares têm sido utilizadas para compreender o grau de diversidade dos fungos usados no controle biológico de pragas (JENSEN et al., 1998; JAMES et al., 2006; BIDOCHKA et al., 1995; GAUTHIER et al., 2007), para esclarecer a taxonomia das principais espécies (DELALIBERA JR;HAJEK, 2004; HAJEK et al., 2003; WHITE et al., 2006; HIBBETT et al., 2007), para avaliar o estabelecimento e dispersão de patógenos no campo (CASTRILHO et al., 2007), e na caracterização de strains para garantir o direito de patente comercial.

O potencial de isolados de *N. floridana* provenientes de *T. evansi* está sendo avaliado para utilização no controle biológico clássico na África. Estes isolados são morfologicamente similares a isolados provenientes de outros ácaros tetraniquídeos mas apresentam um alto grau de especificidade ao hospedeiro do qual foi coletado. Técnicas moleculares têm demonstrado a variação intraespecífica nos seguintes gêneros de Entomophthorales: *Pandora*, *Zoophthora*, *Entomophaga* (HODGE; SAWYER; HUMBER, 1995, HAJEK ET AL., 1996, JENSEN; EILENBERG, 2001, NIELSEN et al., 2001, TYMON; SHAH; PELL, 2004). Poucos membros da família Neozygitaceae foram caracterizados molecularmente. Somente x isolados das espécies *N. tanajoae*, *N. floridana* e *N. parvispora* tiveram os genes da região 18S do rDNA seqüenciados (DELALIBERA JR.; HAJEK; HUMBER, 2004).

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Criação de *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae*

Ambas as espécies de ácaros fitófagos foram coletadas em Piracicaba, São Paulo, Brasil e mantidas em casa-de-vegetação no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil. A criação de *T. evansi* foi realizada sobre plantas de tomate *Solanum lycopersicum* cultivar Santa Clara que foram infestadas com fêmeas de *T. evansi*. Para a criação de *T. urticae* foram utilizadas plantas de feijão de porco, *Canavalia ensiformis* (L) (DeCandolle).

3.2.2 Cultura estoque de *Neozygites floridana*

Os isolados de *Neozygites floridana* foram coletados de cadáveres mumificados de *T. evansi* e de *T. urticae*. Para isso foram realizadas coletas em algumas partes do Brasil (Piracicaba, Recife e Uruguaiana) e de outros países (Argentina e Noruega) e sobre diferentes plantas hospedeiras. Este material foi posteriormente armazenado no Laboratório de Acarologia no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia

Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. O armazenamento foi realizado em recipientes hermeticamente fechados contendo sílica gel, sobre a sílica gel foi adicionada uma camada de algodão. Os ácaros mumificados foram colocados sobre essa fina camada de algodão e mantidos a -10°C.

3.2.3 Métodos experimentais

3.2.3.1 Determinação da variabilidade genética dos isolados de *N. floridana* através do seqüenciamento da região 18S do DNA ribossômico

Os isolados de *N. floridana* usados estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 3.2 – Isolados de *Neozygites floridana* utilizados no experimento.

Isolado	Ácaro Hospedeiro	Planta Hospedeira	Local de Coleta	Data
LQ1	<i>T. urticae</i>	Feijão de porco (<i>C. ensiformis</i>)	Piracicaba/SP	Julho/2004
LQ2	<i>T. evansi</i>	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>)	Piracicaba/SP	Setembro/2004
LQ3	<i>T. urticae</i>	Feijão de porco (<i>C. ensiformis</i>)	Piracicaba/SP	Abril/2006
LQ4	<i>T. evansi</i>	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>)	Recife/PE	Setembro/2006
LQ5	<i>T. marianae</i>	Sida sp.	Uruguaiana/RS	Fevereiro/2007
LQ6	<i>T. evansi</i>	Berinjela (<i>S. melongena</i>)	Paso de Los Libres/ Corrientes/ Argentina	Maio/2007
LQ7	<i>T. urticae</i>	Morango (<i>Fragaria</i> sp.)	Noruega/ Hogskoloveien	Setembro/2006

Para a extração do DNA, três ácaros mumificados de cada isolado foram individualizados em tubos de microcentrifuga de 0,5 mL. Adicionou-se 10µl de água destilada autoclavada de modo que todas as múmias ficassem submersas. As múmias foram maceradas utilizando palitos esterilizados, a fim de liberar os corpos hifais de dentro do corpo do ácaro. Em seguida o ácaro foi retirado e descartado.

Adicionou-se 100 µl de InstaGene Matriz (Bio-Rad), seguindo-se as instruções do fabricante. A solução foi incubada a 56°C por 30 minutos. Posteriormente a solução foi passada no vórtice em velocidade alta durante 10 segundos. Em seguida a solução foi centrifugada a 11.000 rpm por 3 minutos. Foi retirada uma alíquota de 40 µl do sobrenadante resultante e este foi acondicionado em um novo tubo. O DNA foi então armazenado a -10°C.

O DNA foi amplificado utilizando os iniciadores universais para fungos nu-SS –0021-59 (5'-CTGGTTGATTCTGCCAGT-3'; Gargas; DePriest, 1996), nu-SSU 1780-39 (5'-AATGATCCTTCCGCAGGT-3'; DePriest, 1993). Na reação de PCR foram adicionados 200 µM de cada dNTP, 15 mM MgCl₂, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase, 1 X Taq Buffer, 0,3 µM de cada iniciador e 10-100 ng DNA molde. A reação de cadeia da polimerase (PCR) foi conduzida com a desnaturação inicial por 3 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos com desnaturação por 1 minuto a 95°C, seguida pela fase de anelamento por 1 minuto a 54°C, extensão por 2,5 minutos a 72°C com um passo final de polimento por 10 minutos a 72°C. Para visualizar os produtos da amplificação foi utilizado eletroforese em gel de agarose 1,0% corados com brometo de etídio para se verificar a amplificação do DNA.

A purificação do produto de PCR foi realizada utilizando o Kit de Purificação da Qiagen ® seguindo as recomendações do fabricante. O produto de PCR purificado foi quantificado em gel de agarose 1,0% corados com brometo de etídio com marcadores de massa Low Ranger®.

O produto de PCR foi então seqüenciamento utilizando-se os iniciadores internos SSU5' (5'-GATTAGATACCGGTTGTAGTCTCA-3'), SSUINV3' (5'-TGGATAGCAAGGCATAGCGAG-3'), SSUINV5' (5'-TGAGCCTTTCGCGGTGTTG'-3') e COMPSSU5' (5'-TGAGACTACAACGGTATTCTAATC-3'), desenvolvidos por Delalibera Jr.; Hajek; Humber, 2004 e a partir das seqüências obtidas foram desenvolvidos outros dois iniciadores internos NFREV (5'-ATTAAACCGCACGCTCCA-3') e NFFWD (5'-AGCGCTACACTGCATGCAGCAA-3'), além dos iniciadores externos listados acima.

3.2.3.2 Análise dos dados

As seqüências foram alinhadas com outras seqüências da região 18S do DNA ribossômico de *N. floridana* utilizando o programa Clustal X (1.83) (THOMPSON et al., 1997). O alinhamento foi refinado empregando-se o programa Bioedit de alinhamento seqüencial (HALL, 1999). As seqüências obtidas foram comparadas com as bases disponíveis no GenBank para *Neozygites* spp. foram utilizados isolados provenientes dos Estados Unidos (Carolina do Norte, ácaro hospedeiro *T. urticae*, número de acesso do GenBank: AY233985), Benin (Cotonou, ácaro hospedeiro *Mononychelus tanajoe*, número de acesso do GenBank: AY233984) e Suíça (Zurique, inseto hospedeiro *Frankliniella occidentalis*, número de acesso do GenBank: AF296760).

3.3 Resultados e Discussão

A comparação das seqüências de *N. floridana* foi feita utilizando somente dois isolados dos listados acima (Tabela 3.1), pois as seqüências obtidas dos demais isolados foram parciais e muito curtas. Os iniciadores SSUINV3' (5'-TGGATAGCAAGGCATAGCGAG-3') e, SSUINV5' (5'-TGAGCCTTTCGCGGTGTTG'-3') não funcionaram e foram desenhados dois iniciadores baseados em seqüências de *N. floridana* obtidas, isso deve ter ocorrido pois naquelas posições os isolados devem ter seqüências diferentes das duas espécies (LQ2 e LQ3).

A comparação das seqüências da região 18S do DNA ribossômico de *N. floridana* utilizando 1670 pares de bases demonstrou que o isolado do ácaro *T. evansi* (LQ2) e o isolado do ácaro *T. urticae* (LQ3) apresentam 98% de similaridade. Estes dois isolados apresentam similaridade igual ou inferior a 90% aos demais fungos cuja seqüência utilizada para análise foi retirada do GenBank, incluindo seqüências de isolados de *N. floridana* isolado de *T. urticae* (ARSEF662), (Tabela 3.1). Delalibera, Hajek e Humber (2004) já haviam demonstrado diferenças nas seqüências da região 18S do rDNA de isolados de *N. floridana* e *N. tanajoe*. No entanto estes autores demonstraram que um isolado da Colômbia patogênico a ambos *T. urticae* e *M. tanajoe* e o isolado dos Estados Unidos (ARSEF662) patogênico a *T. urticae* e outros tetrânicos apresentam seqüências idênticas. A similaridade do isolado ARSEF662

de *N. floridana* aos isolados LQ2 e LQ3 da mesma espécie é menor do que a similaridade deste ao isolado BIN35G que pertence à espécie *N. tanajoae* (Tabela 3.1).

O isolado da Suíça, *N. parvispora*, foi o que apresentou maior porcentagem de divergência com todos os isolados. O isolado de tripes *N. parvispora* (AF296760) foi o isolado que apresentou maior distancia dos demais isolados. Este isolado difere dos demais por ser o único isolado patogênico a um membro da Ordem Insecta, todos outros isolados foram coletados infectando hospedeiros da Ordem Prostigmata.

Tabela 3.1 – Matriz de similaridade e divergência de *N. floridana* (ARSEF662), (LQ2) e (LQ3), *N. tanajoae* (BIN35G), *N. parvispora* (AF296760) estimada usando ClustalX 1.83. A porcentagem de similaridade é apresentada no triângulo superior e a porcentagem de divergência no triângulo inferior.

Isolados	LQ3	LQ2	ARSEF662	BIN35G	AF296760
LQ3	100	98	90	85	69
LQ2	2	100	89	85	69
ARSEF662	10	11	100	94	78
BIN35G	15	15	6	100	77
AF296760	31	31	22	23	100

A árvore filogenética ilustra as diferenças entre os isolados analisados. LQ2 e LQ3 apresentam maior proximidade genética que os demais, E o isolado ARSEF662 possui menor distancia genética dos isolados LQ2 e LQ3. O isolado (AF296760) é o mais distante filogeneticamente dos demais isolados, pois apresenta maior comprimento do braço 0,198 (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Árvore filogenética das sequências da região 18S rDNA de cinco isolados de *Neozygites* spp. A distância foi estimada utilizando ClustalX 1.83. O comprimento dos braços reflete a mudança de características. A escala da barra indica 0,02 mudanças de nucleotídeos. A árvore foi baseada nas sequências de *N. floridana* (ARSEF662), (LQ2) e (LQ3), *N. tanajoae* (BIN35G), *N. parvispora* (AF296760)

A dificuldade da classificação de espécies de *Neozygites* é dificultada pela pequena quantidade de caracteres taxonômicos válidos e dificuldades na investigação de estruturas, como esporos de resistência e rizóides, que são raramente observados em alguns isolados. Apesar de morfologicamente semelhantes *N. floridana* compreende um grupo de fungos distintos geneticamente e fisiologicamente. É possível que *N. floridana* seja um complexo de espécies da qual *N. tanajoae* foi o primeiro a ser separado. Mais estudos são necessários para elucidar o status taxonômico desse grupo, e para isso as seqüências do DNA ribossômico se apresenta como um bom instrumento para análises filogenéticas, mas há ainda a necessidade de se utilizar um número maior de isolados nestes estudos e os resultados aqui apresentados são apenas preliminares.

Referências

BIDOCHKA, M. J.; WALSH, S. A.; RAMOS, M. E.; LEGER, R. J.; SILVER, J. C.; ROBERTS, D. W. Pathogens in the *Entomophaga grylli* Species Complex of Grasshopper Pathogens Differentiated with Random Amplification of Polymorphic DNA and Cloned-DNA Probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 556-560, 1995.

BRANDENBURG, R. L.; KENNEDY, G. G. Relationship of *Neozygites Florida* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) to two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in field corn. **Journal Economic Entomology**, Amsterdam, v. 75, p. 691-694, 1982.

CARNER, G.R.; CARNERDAY, T.D. *Entomophthora* sp. As a factor in the regulation of the two-spotted spider mite on cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham MD, v. 63, n.2, p. 638-640, 1970.

CASTRILLO, L. A.; THOMSEN, L.; JUNEJA, P.; HAJEK, A. E. Detection and quantification of *Entomophaga maimaiga* resting spores in forest soil using real-time PCR. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 324-331, 2007

DELALIBERA JR., I.; HAJEK, A.E. Pathogenicity and specificity of *Neozygites tanajoae* and *Neozygites Florida* (Zygomycetes: Entomophthorales) isolates pathogenic to the cassava green mite. **Biological Control**. Orlando, v. 30, p. 608–616, 2004.

DELALIBERA JR., I.; HAJEK, A.E.; HUMBER, R.A. *Neozygites tanajoae* sp. nov., a pathogen of the cassava green mite. **Mycologia**, New York, v. 96 n. 5, p. 1002–1009, 2004.

DePRIEST, P. Small subunit rDNA variation in a population of lichen fungi due to optimal group I introns. **Gene**, Amsterdam, v. 134, p. 67–74, 1993

GARGAS, A.; DePRIEST, P.T. A nomenclature for fungal PCR primers with examples from introncontaining SSU rDNA. **Mycologia**, New York, v. 88, p. 745-748, 1996.

GAUTHIER, N.; DALLEAU-CLOET, C.; FARGUES, J.; BON, M. Microsatellite variability in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*: genetic diversity and population structure. **Mycologia**, New York, v. 99, p. 693-704, 2007.

HAJEK, A. E.; JENSEN, A. B.; HODGE, K. T.; EILENBERG, J. PCR-RFLP I is used to investigate relations among species in the entomopathogenic genera *Eryopsis* and *Entomophaga*. **Mycologia**, New York, v. 95, p. 262-268, 2003.

HAJEK, A. E.; HODGE, K. T.; LIEBHERR, J. K.; DAY, W. H.; VANDENBERG, J. D. Use of RAPD analysis to trace the origin of the weevil pathogen *Zoophthora phytonomi* in North America. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 349–355, 1996.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Research** Oxford , v.41, p.95–98, 1999.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.; HUHNDORFF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAI, Y.-C.; GAMS, W.; GEISER, D.M.; GRIFITH, G.W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K.; KÖLJALB, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K.-H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIALIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.-M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASIO, R.; REEB, V.; ROGERS, J.D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.P.; SCHUESSLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M.; WINKA, K.; YAO, Y.-J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 509–547, 2007.

HODGE, K. T.; SAWYER, A. J.; HUMBER, R. A. RAPD-PCR for identification of *Zoophthora radicans* isolates in biological control of potato leafhopper. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 65, p. 1–9, 1995.

HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 98, p. 262-266, 2008.

HUMBER, R.A.; MORAES, G.J.; SANTOS, J.M. Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by a *Triplosporium* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in Northeastern Brazil. **Entomophaga**, Paris, v. 26, n. 4, p. 421-425, 1981.

JAMES, T.Y.; KAUFF, F.; SCHOCH, C.; MATHENY, P.B.; HOFSTETTER, V.; COX, C.J.; CELIO, G.; GUEIDAN, C.; FRAKER, E.; MIADLIKOWSKA, J.; LUMBSCH, H.T.; RAUHUT, A.; REEB, V.; ARNOLD, A.E.; AMROFT, A.; STAJICH, J.E.; HOSAKA, K.; SUNG, G.-H.; JOHNSON, D.; O'ROURKE, B.; CROCKETT, M.; BINDER, M.; CURTIS, J.M.; SLOT, J.C.; WANG, Z.; WILSON, A.W.; SCHÜBLER, A.; LONGCORE, J.E.; O'DONNELL, K.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; PORTER, D.; LETCHER, P.M.; POWELL, M.J.; TAYLOR, J.W.; WHITE, M.M.; GRIFTH, G.W.; DAVIES, D.R.; HUMBER, R.A.; MORTON, J.B.; SUGIYAMA, J.; ROSSMAN, A.; ROGERS, J.D.; P.STER, D.H.; HEWITT, D.; HANSEN, K.; HAMBLETON, S.; SHOEMAKER, R.A.; KOHLMAYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B.; SPOTTS, R.A.; SERDANI, M.;

CROUS, P.W.; HUGHES, K.W.; MATSUURA, K.; LANGER, E.; LANGER, G.; UNTEREINER, W.A.; LÜCKING, R.; BÜDEL, B.; GEISER, D.M.; APTROOT, A.; DIEDERICH, P.; SCHMITT, I.; SCHULTZ, M.; YAHR, R.; HIBBETT, D.S.; LUTZONI, F.; MCCLAUGHLIN, D.J.; SPATAFORA, J.W.; VILGALYS, R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, London, v.443, p.818–822, 2006.

JENSEN, A. B.; EILENBERG, J. Genetic variation within the insect-pathogenic genus *Entomophthora*, focusing on the *E. muscae* complex, using PCR-RFLP of ITS II and LSU rDNA. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 307–312, 2001.

JENSEN, A.B.; GARGAS, A.; EILENBERG, J.; ROSENDAHL, S. Relationships of the insectpathogenic order Entomophthorales (Zygomycota, Fungi) based on phylogenetic analyses of nuclear small subunit ribosomal DNA sequences (SSU rDNA). **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 24, p.325–334, 1998.

KELLER, S. The genus *Neozygites* (Zygomycetes, Entomophthorales) with special reference to species found in tropical regions. **Sydowia**, Horn, v. 49, n.2, p. 118-146, 1997.

NIELSEN, C.; SOMMER, C.; EILENBERG, J.; HANSEN, K.; HUMBER, R. Characterisation of aphid pathogenic species in the genus *Pandora* by PCR techniques and digital image analysis. **Mycologia**, New York, v. 93, p. 864–874, 2001.

THOMPSON J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.24, n.4, p.876–4882, 1997.

TYMON, A.M.; SHAH, P.A.; PELL, J.K. PCR-based molecular discrimination of *Pandora neoaphidis* isolates from related entomopathogenic fungi and development of species-specific diagnostic primers. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 4, p. 419–433, 2004.

WEKESA, V.W.; MORAES, G.J.; KNAPP, M.; DELALIBERA, Jr. I. Interactions of two natural enemies of *Tetranychus evansi*, the fungal pathogen *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) and the predatory mite, *Phytoseiulus longipes* (Acari: Phytoseiidae). **Biological Control**, Orlando, v. 41, p. 408-414, 2007

WHITE, M. M.; JAMES, T. Y.; O'DONNELL, K.; TANABE, Y.; SUGIYAMA, J. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. **Mycologia**, New York, v.96, p. 872-884, 2006.