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

**Estudos para o desenvolvimento de metodologia da produção *in vivo* do fungo
Neozygites floridana Weiser e Muma para controle do ácaro *Tetranychus*
urticae Koch**

Thiago Rodrigues de Castro

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

**Piracicaba
2011**

Thiago Rodrigues de Castro
Bacharel em Ciências Biológicas

Estudos para o desenvolvimento de metodologia da produção *in vivo* do fungo *Neozygites floricana* Weiser e Muma para controle do ácaro *Tetranychus urticae* Koch

Orientador:
Prof.Dr. ITALO DELALIBERA JR.

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

**Piracicaba
2011**

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

Castro, Thiago Rodrigues de

Estudos para o desenvolvimento de metodologia da produção *in vivo* do fungo *Neozygites floricola* Weiser e Muma para controle do ácaro *Tetranychus urticae* Koch / Thiago Rodrigues de Castro. - - Piracicaba, 2011.

86 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Ácaros parasitos de plantas 2. Controle biológico 3. Epizootias 4. Fungos entomopatogênicos I. Título

CDD 589.258
C355e

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

DEDICATÓRIA

**Para meus Pais, Idário e Sonia
e Irmãs, Tatiana e Adriana,
sem o apoio e inspiração de vocês, nada seria possível.**

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior, pelos ensinamentos e orientação dos últimos sete anos, além da confiança, amizade e paciência;

Ao Vitalis Wafula Wekesa, pela ótima orientação, ensinamentos e principalmente pela amizade;

À Prof^ª. Dr. Ingeborg Klingen e todos os funcionários da Bioforsk e UMB pela orientação, oportunidade e apoio no meu estágio no exterior;

Ao Prof. Dr. Carlos Holger Wenzel Flechtmann, pela ajuda na correção e ótimos ensinamentos nos últimos sete anos de convivência;

À Prof^ª. Dr. Clarice Garcia Borges Demétrio e Rafael Moral, pelo auxílio nas análises estatísticas;

À Prof^ª. Sumara Gilvia Tondati, pela amizade e ensinamentos;

Aos professores do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, pelo conhecimento adquirido;

À Silce Adeline Danelon Guassi, pela amizade e auxílio na correção;

À Vanessa da Silveira Duarte, pelo auxílio em todas as fases de desenvolvimento desta dissertação;

Ao aluno Anderson Ramos, pelo seu empenho e ajuda nos experimentos desta dissertação;

Ao aluno Renan Almeida (D-u-zuit), pelo auxílio nos experimentos;

A todos os colegas dos Laboratórios de Patologia e Controle Microbiano de Insetos e Acarologia Agrícola;

Aos irmãos da República Reserva Alcoológica BIOSFERA e Sérgio Damaso Jr. pela amizade e momentos de descontração;

Aos grandes amigos que sempre estiveram por perto nos momentos bons e ruins durante o mestrado, Salmão, Pipók, Napister, 100Talento, Bossa Nova, Carrara, Léo, Fer e Tanaja;

Den norske brødre og søstre, Andreas Saxi Jensen, Magnus Jakola Skansen, Ole Stabekk, Stian Slaatten Skistad, Offe, Anders, Martine Stave, David Gottfridsson, Anne Theoline Undheim, June Vastveit e Maren Bjorland, for å gi meg støtte og vennskap, Jeg håper å komme tilbake snart;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por conceder a bolsa de mestrado;

Ao apoio sem fim dado pela minha família.

"It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is the most adaptable to change."

Charles Robert Darwin

"Anyone who has never made a mistake has never tried anything new."

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Ácaros Tetraniquídeos	17
1.1.2 O ácaro <i>Tetranychus urticae</i>	17
1.2 Táticas de controle	18
1.3 <i>Neozygites floridana</i>	19
1.4 Cultura do morangueiro	22
1.5 Objetivos.....	23
Referências	24
2 EXIGÊNCIA DE UMIDADE RELATIVA E TEMPERATURA PARA ESPORULAÇÃO DO FUNGO <i>Neozygites floridana</i>	29
Resumo	29
Abstract.....	29
2.1 Introdução	30
2.2 Material e Métodos	31
2.2.1 Avaliação em laboratório.....	31
2.2.2 Análise dos dados	32
2.2.3 Avaliação em casa-de-vegetação.....	35
2.3 Resultados.....	35
2.3.1 Avaliação em laboratório.....	35
2.3.2 Avaliação em telados.....	39
2.4 Discussão	40
Referências	42

3 EFEITO DE FOTOPERÍODO E INTENSIDADE DE LUZ NA ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Neozygites floridana</i> do Brasil e da Noruega	45
Resumo	45
Abstract	45
3.1 Introdução	46
3.2 Material e Métodos	47
3.2.1 Testes de fotoperíodo e intensidade de luz	47
3.3 Resultados	48
3.4 Discussão	49
Referências	51
4 EFEITOS DE AGROTÓXICOS UTILIZADOS NA CULTURA DO MORANGO NA FORMAÇÃO DE CONÍDIOS PRIMÁRIOS E CAPILOCONÍDIOS DE <i>Neozygites floridana</i>	53
Resumo	53
Abstract	53
4.1 Introdução	54
4.2 Material e Métodos	56
4.2.1 Análise dos dados	58
4.3 Resultados	59
4.4 Discussão	61
Referências	63
5 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA PRODUÇÃO EM ESCALA DE <i>Neozygites floridana</i>	69
Resumo	69
Abstract	69
5.1 Introdução	70

5.2 Material e Métodos.....	72
5.2.1 Produção da planta hospedeira para criação de <i>T. urticae</i>	72
5.2.2 Criação de <i>Tetranychus urticae</i>	72
5.2.3 Produção de ácaros mumificados em laboratório.....	72
5.2.4 Testes de metodologia para produção massal.....	73
5.3 Resultados e Discussão	75
Referências	85

RESUMO

Estudos para o desenvolvimento de metodologia da produção *in vivo* do fungo *Neozygites floridana* Weiser e Muma para controle do ácaro *Tetranychus urticae* Koch

Uma das principais espécies de ácaro praga é o ácaro rajado, *Tetranychus urticae*. Um dos inimigos naturais mais importantes deste ácaro é o patógeno *Neozygites floridana*. Para viabilizar o uso deste patógeno através de liberações inoculativas, ainda são necessárias informações básicas para subsidiar o desenvolvimento de uma metodologia de produção em escala e para liberações do fungo em campo. Para tanto, foi determinado em laboratório, a exigência de umidade e temperatura para a esporulação do fungo, colocando-se ácaros mumificados em folhas de feijão-de-porco. A 80 e 85% de umidade, em nenhuma das temperaturas (13, 17, 21 e 25°C) ocorreu esporulação. O fungo esporulou pouco a 90% UR em todas as temperaturas. As melhores condições para formação de capiloconídios foram a 95% e 100% UR a 21°C e 25°C. Ácaros mumificados foram colocados para esporular em feijão-de-porco em telados em diferentes épocas do ano e a temperatura e umidade monitorada. Notou-se que acima de 13°C o fungo conseguiu produzir um número considerável de conídios primários (>130) mesmo a 90% UR. Entretanto, nesta UR somente a 25°C a produção de capiloconídios foi significativa (>389). Determinou-se o efeito da exposição de duas intensidades luminosas (2.960 Lux e 15.392 Lux), três fotoperíodos (24h de luz, 12:12h(L:E) e 24h de escuro) e duas temperaturas (18°C e 23°C), na produção de conídios primários e de capiloconídios de isolados da Noruega e do Brasil. Ácaros mumificados foram expostos aos diferentes tratamentos em BOD. Não foram encontradas diferenças entre os dois isolados nas duas temperaturas testadas. Os resultados para o fotoperíodo de 12:12h(L:E) foram similares aos encontrados para 24h de escuro. A inibição da luz na formação de capiloconídios foi maior no isolado Norueguês. Baixa intensidade de luz por 24h teve efeito moderado na esporulação dos dois isolados, mas inibiu fortemente a formação de capiloconídios no isolado Norueguês. Foram realizados estudos para avaliar o efeito de agrotóxicos utilizados na produção de morango no Brasil e na Noruega sobre a esporulação e produção de capiloconídios de *N. floridana* em laboratório. Os resultados revelaram que Tebuconazol, Fenpropatrina na concentração recomendada e Abamectina na metade da concentração recomendada, foram os menos agressivos a *N. floridana*. Foram também realizadas tentativas de produção em escala deste fungo. Através de inoculações experimentais em telado foi possível induzir epizootias em populações de *T. urticae* em plantas de feijão de porco em vasos nos telados. Liberações de quatro ácaros mumificados por vaso foi a forma mais prática de inoculação. Maiores quantidades de ácaros mumificados foram produzidos quando as condições climáticas foram caracterizadas por alta UR e $\approx 20^{\circ}\text{C}$, sendo que durante o inverno a produção não foi eficiente. O uso de lâmpadas e ventiladores durante o período noturno ao final da epizootia, foi eficiente em inibir a esporulação e garantir a qualidade dos ácaros mumificados para o armazenamento. Embora tenha sido possível produzir um grande número de ácaros mumificados, vários estudos ainda são necessários para desenvolver uma metodologia de produção em escala para que seja economicamente viável a sua utilização em campo.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; Epizootias; *Tetranychus* spp.; Controle biológico; *Neozygites floridana*; Controle microbiano

ABSTRACT

Studies for the methodology development of *in vivo* production of the fungus *Neozygites floridana* Weiser and Muma to control the mite *Tetranychus urticae* Koch

One of the main pest mite species is the Twospotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*. The most important natural enemy of this mite is the pathogen *Neozygites floridana*. To enabling the use of this pathogen through inoculative releases, basic information is still needed to support the large scale methodology development for fungus production and release in the field. It was determined in the laboratory, the humidity and temperature requirements for fungus sporulation, by placing mummified mites on Jack-bean leaves. There was no sporulation at any of the temperatures tested (13, 17, 21 and 25°C) at 80% and 85% RH. The fungus had low sporulation at 90% RH at all temperatures. The best conditions for the capilloconidia development were 95% and 100%RH at 21°C and 25°C. Mummified mites were placed to sporulate in Jack-bean plants inside screenhouses at different times of year and temperature and humidity were monitored. It was noted that above 13°C the fungus can produce a considerable number of primary conidia (> 130) even at 90%RH. However, only at 90%RH and 25°C the capilloconidia production is significant (> 389). It was determined the effect of exposure of two light intensities (2.960 Lux and 15.392 Lux), three photoperiods (24h of light, 12:12h(L:D) and 24h of darkness) and two temperatures (18°C and 23°C), on the production of primary conidia and capilloconidia of *N. floridana* isolates from Norway and Brazil. Fungus-killed cadavers by each of the isolates were exposed to different treatments in BOD. No differences were found between the two isolates in the two temperatures tested. The results for the 12:12h(L:D) were similar to those found for 24h of darkness. Light inhibition of capilloconidia formation was greater on Norwegian isolate. Low light intensity for 24h had a mild effect on sporulation of the two isolates, but strongly inhibited the formation of capilloconidia of the Norwegian isolate. Studies were carried out to evaluate the effect of pesticides used in production of strawberries in both countries on sporulation and capilloconidia production of *N. floridana* in the laboratory. The results showed that Tebuconazole and Fenpropatrin in the recommended concentration and Abamectin in half of the recommended concentration were the less aggressive to *N. floridana*. Attempts to scale production of this fungus were also made. Through experimental inoculations it was possible to induce epizootics of the fungus in *T. urticae* populations on Jack-beans, planted in pots in screenhouses. The most convenient way for inoculation of the fungus was to release four mummified mites per pot. Larger quantities of mummified mites by *N. floridana* were produced when climatic conditions were characterized by high RH and $\approx 20^{\circ}\text{C}$, during the winter production was inefficient. The use of light and fans at night during the end of the epizootic phase, was effective in inhibiting the sporulation of the fungus and ensure the quality of mummified mites for storage. Although it was possible to produce a large number of mummified mites, several studies are still needed to develop an economically viable methodology for large scale production for field use.

Keywords: Spider-mites; Entomopathogens; Epizootics; *Tetranychus* spp.; Biological control; *Neozygites floridana*; Microbial control

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ácaros Tetraniquídeos

Várias espécies de ácaros são importantes pragas agrícolas, principalmente aquelas que foram introduzidas em novas áreas sem o acompanhamento de seus inimigos naturais. Outras espécies podem se tornar praga em decorrência de modificações em seus habitats, que se tornam menos adequados para o desenvolvimento de seus inimigos naturais.

Ácaros tetraniquídeos são pragas de um considerável número de espécies de plantas cultivadas em todo o mundo incluindo muitas plantas ornamentais, hortaliças, plantas anuais e perenes (HELLE; VAN DE VRIE, 1974; WALTER; PROCTOR, 1999; WATERHOUSE; SANDS, 2001). Em condições ambientais favoráveis, os tetraniquídeos são capazes de destruir plantas dentro de um curto período devido à sua grande capacidade reprodutiva. Muitas espécies de tetraniquídeos produzem teia que são mais evidentes sob alta densidade populacional dos ácaros. As teias podem dar proteção contra inimigos naturais e estresse ambiental (GERSON, 1985). 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 finas cobrindo a folha (SMITH; MEYER, 1996; CRAEMER et al., 1998). Os danos resultam em perda da clorofila e redução da fotossíntese, assimilação de CO₂ e transpiração. Os distúrbios no metabolismo resultam em diminuição do crescimento, florescimento e produção (MATHEWS; TANSTALL, 1994).

1.1.2 O ácaro *Tetranychus urticae*

O ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch, é uma praga importante de mais de 150 plantas hospedeiras de importância econômica em todo o mundo (JEPPSON et al., 1975). À temperatura ambiente, o desenvolvimento de ovo a adulto é de aproximadamente 10 dias e cada fêmea pode depositar até 100 ovos, possibilitando o rápido aumento da população (MITCHELL, 1973). Devido a este fato, este é considerado uma das espécies mais importantes de ácaro-praga em todo o mundo (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

Segundo Moraes e Flechtman (2008), o ácaro *T. urticae* é reconhecidamente uma das pragas mais importantes do morangueiro, havendo um uso extensivo de acaricidas para o controle desta praga nesta cultura. Visando uma diminuição neste uso indiscriminado, alguns trabalhos

como o de Garcia (1992); Watanabe et al. (1994); Van de Vrie e Price (1994); Gerson et al. (2003); Bellini et al. (2006); Daghini (2006); Sato et al. (2007) e Bellini (2008) tem demonstrado a eficácia do uso de ácaros predadores para o controle desta praga.

1.2 Táticas de controle

T. urticae pode desenvolver resistência aos pesticidas químicos rapidamente quando estes são utilizados frequentemente e sob forte pressão de seleção. São vários os exemplos de resistência adquirida por esta espécie a acaricidas. Isto leva ao uso cada vez mais intensivo de novos agrotóxicos e da mistura de produtos para seu controle. Aplicações de acaricidas, inseticidas e fungicidas chegam a ser comumente realizadas 2-3 vezes por semana, sem o controle satisfatório dos organismos em várias plantas ornamentais.

Embora inimigos naturais sejam usados no controle de ácaros tetraniquídeos, os acaricidas são ainda o método de controle mais usado (CRANHAM; HELLE, 1985). A necessidade do desenvolvimento de estratégias alternativas de controle é crítica considerando o custo, redução da eficiência e impacto ambiental dos pesticidas. Por isso é essencial que estratégias múltiplas de controle biológico sejam desenvolvidas que possam ser usadas pelos agricultores e incorporadas a programas de manejo integrado de pragas (MIP). Uma destas alternativas é o uso de entomopatógenos, pois a maioria destes apresenta alta especificidade, ou seja, têm uma gama de hospedeiros restrita, o que resulta em um baixo risco a predadores e parasitóides. Mesmo no caso de patógenos com um espectro maior de hospedeiros, estes apresentam um risco menor do que os pesticidas e ainda têm a vantagem de poderem ser usados no manejo de um número maior de pragas (JACOBSON et al., 2001).

O manejo integrado de pragas é uma prática cada vez mais adotada em diferentes agroecossistemas. No manejo integrado, um dos aspectos mais importantes é a manutenção de inimigos naturais na cultura e isso pode ser feito através de sua conservação ou de liberações inundativas de inimigos naturais eficientes produzidos massalmente. Caso seja necessário o uso de agrotóxicos neste sistema de controle, busca-se sempre a utilização de produtos eficientes contra a praga, mas seletivos a seus inimigos naturais. Estas práticas devem ser adotadas com a finalidade de aumentar ao máximo a produção com mínimo possível de impacto ao ambiente.

Poucos microorganismos (fungos, vírus, bactérias e microsporídios) são patogênicos a ácaros. Duas espécies de fungos, *Hirsutella thompsonii* (Fischer) e *Neozygites floridana* (Weiser

e Muma), são importantes na regulação natural de ácaros fitófagos especialmente os da família Eriophyidae e Tetranychidae, respectivamente (CHANDLER et al., 2000). *N. floridana* tem sido observado infectando várias espécies de ácaros tetraniquídeos em várias agroecossistemas. Os fungos são capazes de penetrar diretamente pela cutícula do hospedeiro, não sendo necessária a ingestão pelo hospedeiro como acontece com a maioria dos outros patógenos (HALL; PAPIEROCK, 1982). Embora os fungos necessitem de alta umidade relativa esta condição é encontrada em cultivos protegidos em casas-de-vegetação, ou culturas que geram um microclima favorável como é o caso da cultura do morango. O gênero *Neozygites* possui um espectro de hospedeiros restrito e consiste somente de patógenos obrigatórios e são dificilmente cultivados em meios de cultura artificiais. Epizootias de *N. floridana* têm sido documentadas em ácaros em diversas culturas em vários países e resulta numa drástica redução populacional do hospedeiro.

1.3 *Neozygites floridana*

Membros da família Neozygitaceae, pertencente à ordem Entomophthorales (Divisão Zygomycetes), têm sido encontrados atacando pequenos artrópodes (KELLER, 1991), sendo o fungo entomopatogênico *N. floridana* patogênico a diversas espécies de ácaros (KELLER, 1997). Membros deste grupo de fungo são capazes de infectar todas as fases de desenvolvimento dos ácaros, exceto o ovo (NEMOTO; AOKI, 1975; SELHIME; MUMA, 1966), com índice de infecção maior para as formas adultas. Susilo e colaboradores (1994) encontraram níveis de infecção em fêmeas de aproximadamente o dobro do que as encontradas em machos, sugerindo uma infecção diferenciada entre os sexos, mostrando que as fêmeas parecem ser mais susceptíveis ao fungo. Carner e Canerday (1970), ao estudarem a ocorrência de epizootias de *Neozygites sp.* em populações de *T. urticae*, observaram que o nível de infecção em imaturos 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, *Mononychellus tanajoa* no Brasil, onde a maioria dos ácaros mortos era constituída de fêmeas adultas. *Neozygites* 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 Entomophthorales 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* (McGregor). 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* (McGregor). Em estudos de laboratório, o patógeno apresentou um índice de infecção acima de 60% para este ácaro, e de 20% para a espécie *Eotetranychus sexmaculatus* (Riley). A primeira ocorrência dessa espécie em ácaro rajado, *Tetranychus urticae*, foi registrada por Carner e Canerday (1968), quando verificaram uma epizootia destes ácaros em lavouras de algodão em muitas localidades do Alabama (EUA), causando mortalidade de até 100% em populações de *T. urticae*, especialmente em indivíduos adultos (CARNER; CARNEDAY, 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 *T. cinnabarinus* Boisd ou *T. neocaledonicus* André). 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* (Ehara) 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 observados na maioria dos ácaros mortos.

Em 1988, em campos de mandioca na região central da Bahia, um considerável número de *M. tanajoa* mortos devido à epizootia causada por *N. tanajoae* foi observado. 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).

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 tetraníquídeos têm sido 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. Atualmente estão sendo realizados estudos para a identificação da variabilidade genética existente entre isolados de *Neozygites*, que até os dias atuais são classificados como *N. floridana*, mas possuem hospedeiros diferentes (*T. urticae*, *T. evansi* e *Mononychellus planki*) indicando que provavelmente são espécies distintas, como o ocorrido nos estudos anteriores entre *T. urticae* e *M. tanajoe*.

O uso de ácaros predadores para o controle de *T. urticae* iniciou-se no Brasil recentemente. O controle tem se mostrado altamente efetivo, mas apresenta alguns gargalos no sistema de produção que poderiam ser complementados com o uso adequado de *N. floridana*. Dentre estas pode se citar as dificuldades encontradas na produção dos ácaros predadores nos meses de inverno, quando a produção de *T. urticae* utilizados na alimentação dos predadores é comprometida pelas baixas temperaturas. O controle que é feito para evitar epizootias naturais de *N. floridana* nas estufas de produção de *T. urticae* aumenta o custo de produção dos ácaros predadores. O fungo *N. floridana* surge como uma opção para suprir inimigos naturais

especialmente nos meses de baixa produção de ácaros predadores, já que o fungo pode ser armazenado por longos períodos em geladeira, ou congelador. Outro fator a ser contemplado é o do curto período de prateleira apresentado pelos ácaros predadores, já que depois de produzidos e embalados em potes próprios para a comercialização, estes não podem ser armazenados por muito tempo tendo então que ser vendidos em um curto período ou descartados. Foi demonstrado que *N. tanajoae*, um fungo muito próximo a *N. floridana*, permanece viável em ácaros mumificados por até dez anos em congelador (WEKESA; KNAPP; DELALIBERA Jr., 2008). A utilização de ácaros predadores em condições em que há uma infestação muito grande de *T. urticae* é muito pouco eficiente. Esta é uma situação onde a utilização do fungo como agente de diminuição destas populações de pragas seja uma opção viável.

O uso de microrganismos entomopatogênicos vem ocupando nichos de mercado em constante crescimento. O crescimento da produção orgânica assim como a busca por alternativas de controle pelos produtores que adotam técnicas tradicionais, têm resultado em maior uso de agentes de controle biológico.

1.4 Cultura do morangueiro

No cultivo convencional do morangueiro, a grande utilização de produtos químicos tem trazido preocupações tanto de caráter técnico quanto de comercialização, visto que este processo favorece a seleção de pragas resistentes, aumenta o risco de permanência de resíduos de defensivos nos frutos, assim como a intoxicação de agricultores e a contaminação do ambiente pela manipulação de agrotóxicos, caracterizando-se também um problema social.

O morangueiro é uma planta pertencente à família Rosaceae, gênero *Fragaria*, e a classificação botânica aceita atualmente para os cultivares comerciais é *Fragaria x ananassa* Duchesne (HANCOCK, 1990). É uma planta herbácea, de porte baixo e, embora perene, seu cultivo é anual, devido à queda na produtividade e na qualidade dos frutos em certos períodos do ano (PIRES, 1998). Ao nível mundial, o morango é uma das frutas cultivadas de distribuição mais ampla, devido a essa sua diversidade genotípica e à sua grande capacidade de adaptação ambiental (LARSON, 1994).

Nos últimos cinco anos, a produção brasileira de morango foi estimada pelo volume comercializado pelo CEAGESP em 10.000 toneladas, numa área total de 370 hectares, sendo o Estado de São Paulo, desde o início dos anos cinquenta, um dos líderes na produção de morango

nos país (PASSOS, 1999). Nesse Estado, a produção se destina, principalmente, ao consumo *in natura* e, embora a área de cultivo seja bastante restrita em seu território, ela representa, geralmente, a principal atividade agrícola nos municípios onde se desenvolve (CRUZ, 1999). Estes dados revelam um mercado promissor e crescente, sem mencionar lucrativo, já que a margem de lucro sobre a venda deste produto gira em torno de 34% (AGRA FNP PESQUISAS, 2011).

Pelo fato da maioria da produção ser consumida *in natura* existe uma preocupação quanto aos resíduos de pesticidas nesta cultura. Isto tem levado a um aumento pela procura de produtos oriundos de sistema orgânico ou produções integradas que utiliza de ferramentas como o controle biológico de pragas.

O patógeno *N. floridana* sendo um dos inimigos naturais mais importantes de *T. urticae* e outros ácaros tetraniquídeos deve ser considerado como uma ferramenta a ser aproveitada em qualquer sistema de cultivo de morango. Entretanto, vários estudos são necessários para demonstrar a viabilidade técnica da introdução inoculativa de *N. floridana*. Para tentar viabilizar o uso de *N. floridana* para o controle destes ácaros pragas alguns pontos terão que ser elucidados, como aspectos da ecologia básica do fungo, como exemplo, os efeitos da umidade, temperatura e fotoperíodo, além da susceptibilidade do fungo aos pesticidas utilizados na cultura. Outra área a ser explorada é a produção em larga escala de *N. floridana*, considerando que ainda não são encontrados na literatura informações sobre métodos de produção *in vivo*.

1.5 Objetivos

Esta dissertação teve o objetivo de investigar vários aspectos de *N. floridana* a fim de propiciar embasamento para futura produção massal. Os estudos se concentraram em quatro áreas: 1) efeito da luz (intensidade e fotoperíodo) na esporulação e germinação de isolados da Noruega e Brasil 2) efeito de agrotóxicos utilizados na cultura do morango sobre o fungo 3) avaliação de umidades e temperaturas ótimas para a produção “*in vivo*” e 4) Desenvolvimento de metodologias para a produção em escala de *N. floridana*.

A inibição da esporulação e germinação pela luz é um aspecto que pode ser explorado para a produção de cadáveres não esporulados para armazenamento ou para adequar o melhor momento para liberação do fungo em campo; Por isso foram realizados experimentos para averiguar os efeitos do fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura em dois isolados de *N. floridana*, um proveniente do Brasil, que possui clima tropical e fotofase sempre próxima de 12h,

e outro isolado da Noruega, um país de clima temperado e fotofase que chegam às 24h no extremo norte do país.

A utilização de pesticidas no controle de pragas é uma das mais importantes práticas que deve ser considerada na realização de bioensaios com patógenos. Por este motivo, vários agrotóxicos utilizados na produção de morango foram avaliados quanto a seus efeitos sobre *N. floridana*, a fim de determinar sua seletividade e adequação do uso deste fungo em programas de MIP na cultura do morango. Três acaricidas / inseticidas e dez fungicidas foram testados em duas concentrações: a dose comercial recomendada (CR) e 50% da dose comercial (CR / 2).

Outro fator importante são as condições climáticas que têm influência direta no desenvolvimento do fungo. Alta umidade e temperaturas amenas são importante para a esporulação de *Neozygites* spp. e estudos têm indicado que a exigência de umidade parece não variar significativamente entre os isolados de *N. tanajoae*, um fungo próximo a *N. floridana* (ODUOR et al., 1996). Estes estudos foram conduzidos com ácaros mumificados colocados em lâminas de vidros em diferentes combinações de umidade e temperatura sem a presença de plantas. Mais recentemente, foram conduzidos estudos avaliando as condições microclimáticas nos 5mm próximos a superfície foliar (BOULARD et al., 2002, 2004). Para isso foi criado uma nova metodologia para a avaliação de umidades e temperaturas ótimas para o desenvolvimento do fungo. Esta metodologia possibilitou uma visão mais realista sobre as condições que terão que ser oferecidas para o fungo na metodologia de criação massal.

No ultimo capítulo foram realizados testes de metodologias e adaptações a partir dos resultados encontrados nos experimentos desta dissertação, com o intuito de encontrar a melhor forma e melhores períodos para a produção deste fungo.

Referências

AGRA FNP PESQUISAS. **AGRIANUAL 2011**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2011. 482 p.

BELLINI, M.R. **Ecologia de ácaros plantícolas e sua importância no manejo de *Tetranychus urticae* (Acari, Tetranychidae) em plantas ornamentais**. 2008. 233 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BELLINI, M.R.; ARAUJO, R.V.; BALLAMINUT, J.C.C.; BERTI FILHO, E.; MORAES, G.J. Perspectivas para o controle biológico do ácaro rajado em gérberas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 1., 2006, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2006. p. 188.

BOULARD, T.; MERMIER, M.; JACQUES FARGUES J.; SMITS N.; ROUGIER M.; ROY, J.C. Tomato leaf boundary layer climate: implications for microbiological whitefly control in greenhouses. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 110, p. 159–176, 2002.

BOULARD, T.; FATNASSI, H.; ROY, J.C.; LAGIER, J.; FARGUES, J.; SMITS, N.; ROUGIER, M.; JEANNEQUIN, B. Effect of greenhouse ventilation on humidity of inside air and in leaf boundary-layer. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v.125, p. 225–239, 2004.

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, v. 75, p. 691-694, 1982.

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

_____. *Entomophthora* sp. As a factor in the regulation of the two-spotted spider mite on cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 63, n.2, p. 638-640, 1970.

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

CRAEMER, C.; DIPPENAAR-SCHOEMAN, A.; SMITH MEYER, L.; UECKERMANN, E.; VAN DEN BERG, A.; VAN DER MERWE, M. Mite on tomatoes: collecting, preserving, identification and control. **A manual for practical course in Acarology held in Pretoria, South Africa**. Pretoria: ARC- Plant Protection Research Institute, 1998. p. 28-29.

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, 1985. p. 405-421.

CRUZ, P.C. A situação da cultura do morangueiro no Estado de São Paulo. In: DUARTE FILHO, J.; CANÇADO, G.M.A.; REGINA, M.A.; ANTUNES, L.E.C.; FADINI, M.A.M. (Ed.). **Morango: tecnologia de produção e processamento**. Caldas: Editora Agropecuária, 199. p. 129-130.

DAGHINI, S. **Biological control of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) with phytoseiid predators (Acari: Phytoseiidae)**. Thèse – Mémoire (Protection des plantes et environnement – PPE), Agrocampus-Rennes, Montpellier, 2006.

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**, Lawrence, 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**, Lutz, v. 75, p. 145-147, 1992.

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.

FISHER, F.E. An *Entomophthora* attacking citrus red mite. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 34, p. 83-88, 1951.

GARCIA, I.P. **Estudos com *Phytoseiulus macropilis* (Banks, 1905) (Acari: Phytoseiidae) para o manejo de *Tetranychus urticae* (Koch., 1836) (Acari: Tetranychidae) na cultura do morangueiro (*Fragaria* spp.).** 1992. 64 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1992.

GERSON, U. Webbing. In: In: HELLE, W.; SABELIS, M.W. (Ed.). **Spider mites: their biology, natural enemies and control.** Amsterdam: Elsevier, 1985. v. 1A, p. 223-232.

GERSON, U.; SMILEY R.L.; OCHOA, R. **Mites (Acari) for pest control.** Oxford: Blackwell Science, 2003. 539 p.

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

HALL, R.A.; PAPIEROK, B. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. **Parasitology**, Cambridge, v. 84 p. 205-240, 1982.

HANCOCK, J.F. Ecological genetics of natural strawberry species. **HortScience**, Alexandria, v. 25 p. 869-871, 1990.

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

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

JACOBSON, R.J.; CHANDLER, D.; FENLON, J.; RUSSEL, K.M. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin with *Amblyseius cucumeris* Oudemans (Acarina: Phytoseiidae) to control *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber plants. **Biocontrol Science and Technology**, Dordrecht, v. 11 p. 391-400, 2001.

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

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

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

LARSON, K.D. Strawberry. In: SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P.C. (Ed.). **Handbook of environmental physiology of fruit crops**. Boca Raton: CRC Press, 1994. v. 1, p. 271-297.

MATHEWS G.A.; TUNSTALL L. **Insect pests of cotton**. Wallingford: CAB International, 1994. 593p.

MITCHELL, R. Growth and population dynamics of a spider mite (*Tetranychus urticae* K., Acarina: Tetranychidae). **Ecology**, Ithaca NY, v. 54, p. 1349-1355, 1973.

MORAES, G.J.; FLECHTMANN C.H.W. **Manual de acarologia**: acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2008. 288 p.

MUMA, M.H. Coincidence and incidence of *Entomophthora floridana* with and in *Eutetranychus banksi* in Florida citrus groves. **Florida Entomologist**, Lutz, 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**, Kudan-kita, v. 10, n. 2, p. 90-95, 1975.

ODUOR G.; DE MORAES G.J.; VAN DER GEEST L.P.S.; YANINEK J. Production and Germination of Primary Conidia of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) under Constant Temperatures, Humidities, and Photoperiods. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 68, p. 213-22, 1996.

PASSOS, F.A. Melhoramento do morangueiro no Instituto Agronômico de Campinas. In: DUARTE FILHO, J.; CANÇADO, G.M.A.; REGINA, M.A.; ANTUNES, L.E.C.; FADINI, M.A.M. (Ed.). **Morango**: tecnologia de produção e processamento. Caldas: Editora Agropecuária, 1999. p. 259-264.

PIRES, R.C.M. **Desenvolvimento e produtividade do morangueiro sob diferentes níveis de água e coberturas de solo**. 1998. 116 p. Tese (Doutorado em solos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

SATO, M.E.; SILVA, M.Z.; SOUZA FILHO, M.F.; MATIOLI, A.L.; RAGA, A. Management of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in strawberry fields with *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) and acaricides. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 42, p. 107-120, 2007.

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

SMITH MEYER, M.K.P. Mite pests and their predators on cultivated plants in Southern Africa. Pretoria: ARC- Plant Protection Research Institute, 1996. (Plant Protection Research Institute Handbook, 6). 90p.

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

SUSILO, F.X.; NORDIN, G.L.; BROWN, G.C. Age-specific and inter-sexual susceptibility of twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, to *Neozygites floridana* Weiser and Muma. **Journal of Kansas Entomological Society**, Washington, v. 67 n. 3, p. 293-296, 1994.

VAN DE VRIE, M.; PRICE, J.F. **Manual for biological control of twospotted spider mite on strawberry in Florida**, University of Florida. Gainesville: University of Florida, 1994. 10p. (Dover Research Station Report DOV 1994 – 1).

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

WATANABE, M.A.; MORAES, G.J.; GASTALDO JR, I.; NICOLELLA, G. Controle biológico do ácaro rajado com ácaros predadores fitoseídeos (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) em culturas de pepino e morango. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, p. 75-81, 1994.

WATERHOUSE, D.F.; SANDS, D.P.A. **Classical biological control of arthropods in Australia**. Canberra; Melbourne: CSIRO Entomology, 2001. 559p.

WEKESA V.W.; KNAPP, M.; DELALIBERA JR. I. Side-effects of pesticides on the life cycle of the mite pathogenic fungus *Neozygites floridana*. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 46, p. 287-297, 2008.

2 EXIGÊNCIA DE UMIDADE RELATIVA E TEMPERATURA PARA ESPORULAÇÃO DO FUNGO *Neozygites floridana*

Resumo

Foram realizados, em laboratório, estudos para a determinação da umidade e temperatura necessárias para a esporulação do fungo *Neozygites floridana*, utilizando uma metodologia que leva em consideração o microclima encontrado na superfície folhar. O objetivo foi determinar as condições favoráveis para o processo de produção e germinação dos conídios primários de *N. floridana*. Foram testadas as combinações das umidades de 80, 85, 90, 95% e temperaturas de 13, 17, 21 e 25°C. O fungo não esporulou a 80 e 85% de UR em nenhuma das temperaturas testadas. O fungo esporulou a 90% de UR em todas as temperaturas, mas com uma produção muito pequena de capiloconídios a 13°C. As melhores condições para formação de capiloconídios (forma infectiva) foi a 95% e 100% UR a 21°C e 25°C. Ácaros mumificados foram colocados para esporular em plantas de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) em telados em diferentes épocas do ano e a temperatura e umidade monitorada. Baseado nas observações em telados e nos estudos em laboratório observa-se que acima de 13°C o fungo consegue produzir um número considerável de conídios primários (>130) mesmo a 90% UR. Entretanto a 90% UR somente a 25°C a produção de capiloconídios é significativa (>389). Aparentemente existe uma interação entre a exigência de umidade e temperatura, sendo que em períodos curtos de UR > 95% e temperaturas > 21°C a produção de capiloconídios seja semelhante a períodos longos de UR > 95% e temperaturas < 21°C. Tais resultados indicam a necessidade de controle das condições ambientais para a produção massal deste fungo em casa de vegetação ou estufas, ou que a produção seja conduzida apenas nos meses quando as condições ambientais ideais, determinadas neste estudo, ocorram naturalmente (Novembro – Abril, em Piracicaba-SP Brasil).

Palavras-chave: Ácaros Tetraniquídeos; Fungos entomopatogênicos; Epizootias; Controle biológico; Exigências ambientais; Controle microbiano

Abstract

Laboratory studies were conducted to determine the humidity and temperature required for sporulation of the fungus *Neozygites floridana*, using a methodology that takes into consideration the microclimate on the leaf surface. The objective was to determine the favorable conditions for the process of formation and germination of the primary conidia of *N. floridana*. Combinations of 80, 85, 90, 95% of relative humidity (RH) and 13, 17, 21 and 25°C of temperature were tested. No sporulation was observed at RH of 80 and 85% for any of the temperatures. The minimum limit to trigger sporulation was 90% RH and 13°C, condition that allowed a very small production of capilloconidia. The best conditions for capilloconidia formation (infective form of the fungus) were 95% and 100% RH and 21°C and 25°C. Mummified mites were also placed on Jack bean plants (*Canavalia ensiformis*) inside screenhouses, at different times of the year where temperature and humidity were monitored. Based on the observations made in the screenhouses and laboratory studies the results shows that above 13°C the fungus can produce a considerable number of primary conidia (> 130) even at

90% RH. However at 90% RH, only at 25°C the capilloconidia production is significant (> 389). Apparently there is an interaction between the demand for humidity and temperature, and in short periods of RH $> 95\%$ and temperatures $> 21^{\circ}\text{C}$ capilloconidia production is similar to long periods of RH $> 95\%$ and temperatures $< 21^{\circ}\text{C}$. These results indicate the need for fine control of environmental conditions for the success of the fungus mass production in greenhouses or glasshouses, or that the production is conducted only during the months when an ideal environmental condition, determined in this study, naturally occur (November – April in Piracicaba-SP, Brazil).

Keywords: Spider-mites; Entomopathogens; Epizootics; *Tetranychus* spp.; Biological control; Environmental requirements; Microbial control

2.1 Introdução

Membros da família Neozygiteae pertencente à ordem Entomophthorales tem sido encontrados atacando pequenos artrópodes como cochonilhas, pulgões, tripses e ácaros (KELLER, 1991). A maioria das espécies desta família apresenta uma pequena gama de hospedeiros. Segundo Keller (1997) existem 15 espécies de *Neozygites*. Por causa das incertezas quanto à delimitação de espécies dentro deste gênero, todos os patógenos deste grupo associados aos ácaros tetraniquídeos têm sido referidos como *Neozygites floridana* (Weiser e Muma).

Neozygites consiste somente de patógenos obrigatórios, sendo difícil a produção destes em meio de cultura. Portanto a produção destes fungos tem sido feita somente *in vivo* (utilizando o organismo hospedeiro) em pequena escala, apenas para estudos em laboratório. Para o sucesso da produção e utilização em larga escala, ainda são necessárias informações básicas sobre a biologia e ecologia do fungo.

Alguns estudos já foram realizados em laboratório para definir alguns parâmetros abióticos importantes no desenvolvimento de isolados tropicais de *Neozygites tanajoae* e *N. floridana* por Oduor et al. (1995a, 1995b, 1996a, 1996b, 1997a, 1997b), Delalibera Jr. et al. (2006), Wekesa et al. (2010) Selhime e Muma (1966), Saba (1974) e Carner (1976). Tais estudos inferem que são necessários períodos de alta umidade relativa (UR $> 95\%$) e temperaturas amenas para que ocorra a esporulação do fungo em ácaros mumificados e a germinação do conídio primário, semelhante ao que é observado para 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 de *N. floridana* 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 (>90%) e temperaturas amenas (20°C). Elliot, Moraes e Mumford (2002) descreveram que a umidade relativa seria o principal fator determinante na ocorrência de epizootias causadas por *Neozygites tanajoae* sobre populações de *Mononychellus tanajoa* no Brasil. 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 observaram temperaturas ótimas entre os 15° e 26°C quando submetido a 100% UR. Não foi obtida produção de conídios acima de 32°C ou a níveis de UR menores que 85%, mostrando que a UR aparentemente possui mais importância que a temperatura na determinação da viabilidade de capiloconídios previamente estabelecidos.

Os estudos para determinação das exigências de umidade em laboratório listados acima foram conduzidos em colocando-se os ácaros mumificados para esporular em lamínulas, excluindo-se portanto, o efeito do microclima presente na superfície foliar a que o fungo está submetido (BOULARD et al., 2002, 2004). Para uma determinação mais precisa da temperatura e umidade necessária para esporulação, utilizou-se neste estudo, uma metodologia que leva em consideração o microclima encontrado na superfície foliar. A determinação exigências ótimas de UR e temperatura são importantes para produção deste fungo “in vivo” e para liberações inoculativas em campo para o controle de *Tetranychus urticae*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Avaliação em laboratório

Para testar as condições favoráveis para o processo de esporulação e germinação de *N. floridana*, foram utilizadas câmaras de plástico contendo 350 ml de solução de ácido sulfúrico na concentração necessária para obter as umidades relativas desejadas dentro da câmara (SOLOMON, 1952). Tais câmaras eram constituídas de um pote plástico redondo com capacidade de 3,2 l (22,9 x 21,3 x 12 cm - Sanremo®, linha Flor) que possui anel de borracha na tampa, proporcionando vedação hermética, semelhante ao utilizado por Vasconcelos (2006). Dentro destas câmaras foram colocados anéis de acrílico contendo na parte central uma tela de

plástica, sobre a qual eram apoiadas a 8 cm de altura as unidades experimentais, possibilitando fluxo de ar dentro da câmara, e impedindo o contato destas com a solução de ácido sulfúrico. Foram testadas as combinações das umidades de 80, 85, 90, 95% e temperaturas de 13, 17, 21 e 25°C. Estas temperaturas foram escolhidas de forma a contemplar as temperaturas médias do período noturno durante todos os meses do ano para a cidade de Piracicaba, baseado nos dados obtidos da estação meteorológica da ESALQ (<http://www.ler.esalq.usp.br/posto.html>) (Figura 2.1). As unidades experimentais eram constituídas de uma folha de feijão-de-porco, cujo pecíolo foi inserido em um tubo de vidro contendo aproximadamente 15 ml de água destilada. A extremidade do tubo foi lacrada com parafina, para segurar o pecíolo e evitar a saída da água. Em cada folha foram colocados dois ácaros fêmeas de *T. urticae* mumificados por *N. floridana* (Isolado ESALQ 1420). A folha foi apoiada com a parte abaxial voltada para baixo em suportes de arame fino que permitiam o encaixe de uma lamínula quadriculada e codificada alfanumericamente (Photo-Etched Coverslips – 18 x 18 mm – Electron Microscopy Sciences), que serviu como anteparo para coleta dos conídios primários e formação dos capiloconídios (Figura 2.2). Tal metodologia foi necessária para gerar uma condição mais próxima possível à encontrada no campo. Estas unidades experimentais foram mantidas dentro da câmara por 12 horas no escuro (Figura 2.3). Após este período, as lamínulas foram analisadas em microscópio óptico com contraste de fase (x100) para quantificação dos conídios presentes. Cada câmara foi hermeticamente fechada e foi utilizado um termohigrômetro digital (Instrutherm – HT-300) para a confirmação da umidade e temperatura. Para cada combinação de temperatura e umidade foram realizadas cinco repetições, instaladas em diferentes datas, contendo duas múmias cada, totalizando 10 múmias por tratamento.

2.2.2 Análise dos dados

Para dados de contagem é geralmente utilizado o modelo de regressão de Poisson, um modelo linear generalizado (NELDER; WEDDERBURN, 1972). Como prerrogativa deste modelo, espera-se que a *deviance residual* (uma medida do ajuste do modelo) fosse aproximadamente igual ao número de graus de liberdade do resíduo. No entanto, observou-se uma variação maior do que a esperada pelo modelo, fenômeno este conhecido como superdispersão (HINDE; DEMÉTRIO, 1998a, 1998b). Para modelar a superdispersão foi utilizada a função de variância $\text{Var}(Y_i) = \phi\mu_i$ em que ϕ é conhecido como parâmetro de

superdispersão. Sendo assim, foi utilizado um método de quase-verossimilhança para estimar os parâmetros do modelo, chamado de quasi-Poisson.

Dados de proporções são geralmente analisados usando um modelo de regressão binomial que também é um modelo linear generalizado (NELDER; WEDDERBURN, 1972). Como os dados de esporulação e germinação apresentaram superdispersão estes foram modelados usando-se a função para $\text{Var}(Y_i) = \phi m_i \pi_i (1 - \pi_i)$ sendo utilizado um método de quase-verossimilhança para estimar β e o parâmetro adicional ϕ (chamado fator de heterogeneidade).

Foram ajustados modelos quasi-Poisson aos dados de número de esporos primários, capiloconídios e total de esporos. Aos dados de proporções de germinação foi ajustado um modelo quasi-binomial. Prosseguiu-se, então, à obtenção dos intervalos de confiança para os valores ajustados pelos modelos. Todos os procedimentos foram implementados no software estatístico gratuito R, em sua versão 2.12.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

Figura 2.1 - Temperaturas médias (°C) noturnas (18h – 8h) na estação meteorológica da ESALQ

Figura 2.2 - Unidade experimental utilizada nos experimentos de umidade e temperatura

Figura 2.3 - Câmara contendo solução de ácido sulfúrico e termohigrometro para constatação de umidade e temperatura no interior da câmara dentro da BOD onde foram colocados os ácaros mumificados para esporulação

2.2.3 Avaliação em casa-de-vegetação

A metodologia consistiu na colocação de *T. urticae* mumificados pelo fungo *N. floridana*, na parte abaxial da folha de uma planta viva, sendo esta folha mantida com a parte abaxial voltada para cima. Foram colocados 10 ácaros mumificados, cada um em uma folha diferente, para cada data. Após 24 horas eram coletadas as folhas e no laboratório eram retirados discos de folha no local onde haviam ficado as múmias e verificada a esporulação em microscópio (x100). Para facilitar a contagem dos conídios, utilizou-se uma escala categórica, semelhante a utilizada previamente com este fungo por Wekesa (2010). A classificação foi feita da seguinte maneira: “Alta”, quando foram acima de 500 conídios, “Baixa”, entre 1 e 500 conídios, “Nula”, quando não foram encontrados conídios.

2.3 Resultados

2.3.1 Avaliação em laboratório

Ácaros mumificados colocados em folhas a 80 e 85% nas quatro diferentes temperaturas não esporularam e quando estes mesmos cadáveres foram colocados a 100% de umidade a 25°C, houve esporulação normal. Isto indica que a umidade próxima a superfície da folha não atingiu o limite mínimo que permite esporulação.

A 90% de umidade relativa a esporulação foi menor do que em umidades mais elevadas em todas as temperaturas, exceto a 25°C (Figuras 2.4 e 2.5). A germinação a 90% UR foi muito inferior comparativamente a 95% UR e 100% UR em todas as temperaturas. Na temperatura de 13°C foram encontrados em média 24 capiloconídios por ácaro mumificado, sendo o menor número encontrado. O melhor resultado a 90% de umidade relativa ocorreu a 25°C, com média de 373 capiloconídios/múmia. A porcentagem de germinação não variou muito entre as temperaturas a 90% UR, ficando entre 18 e 24%.

Tanto a esporulação quanto a germinação foram estatisticamente semelhantes a 95% e 100% UR. Foram encontradas médias de 312 capiloconídios à 13°C muito próximo dos 291 encontrados a 100% UR. A 17°C germinaram 610 conídios a 95% e 424 a 100% UR. As melhores condições para esporulação do isolado ESALQ1420 foram 21 e 25°C e 95 e 100% de UR com produção de grande quantidade de capiloconídios. A média de capiloconídios atingiu níveis duas vezes maiores nestas condições do que nas outras temperaturas e umidades testadas, indicando que a condição perfeita para a esporulação e germinação deste fungo, mesmo com a

ajuda do microclima da superfície foliar deve ser de no mínimo 21°C e umidade relativa de 95%, sendo produzido em média nesta condição 1432 capiloconídios por ácaro mumificado.

Figura 2.4 - Esporulação e germinação de *Neozygites floridana* sob diferentes níveis de umidade relativa e temperatura. Médias seguidas de mesma letra maiúscula (esporulação) e minúsculas (germinação) não indicam diferença estatística a 5% de significância analisadas pelo modelo de quase-Poisson (esporulação) e quase-binomial (germinação) entre as temperaturas e umidades

Figura 2.5 - Médias de esporulação e germinação em função das umidades relativas e as temperaturas testadas

As esporulações a 90% e 100% de umidade apresentaram valores semelhantes e tendência de aumento do número de conídios com o aumento da temperatura. A 90%, apesar de apresentar a mesma tendência dos outros níveis de umidade, as médias do número de conídios foram inferiores (Figura 2.5). A germinação dos conídios primários foi mais influenciada pela UR, especialmente a 90%, onde não se observou um aumento da porcentagem de germinação com o aumento da temperatura. Embora o fungo consiga esporular a 90% UR em todas as temperaturas a produção de capiloconídios nesta umidade foi reduzida. Da mesma forma, embora o fungo seja capaz de esporular a 13°C em $UR \geq 95\%$, a produção de capiloconídios foi pequena nesta temperatura.

2.3.2 Avaliação em telados

Tabela 2.1 - Esporulação de *Neozygites floridana* em plantas de feijão de porco em telados durante o período de agosto a novembro de 2010 e umidade relativa e temperatura no período noturno (18h–8h). A tonalidade do preenchimento das células da tabela indica a intensidade da esporulação, sendo células mais escuras as com maiores esporulações

Dia de Avaliação	Esporulação (%)			UR (%)			Horas com:		Temperatura (°C)			Horas com:	
	Alta	Baixa	Nula	Min.	Med.	Máx.	UR≥90%	UR≥95%	Min.	Média	Máx.	T≤13°C	T≥21°C
12/08/2010	0	0	100	37	72	94	2h30min	0h	13	18	26	45min	4h
19/08/2010	0	0	100	30	71	100	3h30	1h15	10	15	25	5h15min	2h15min
13/09/2010	0	0	100	29	65	88	0h	0h	17	21	28	0h	7h
20/09/2010	0	20	100	75	95	100	7h	1h45	17	19	24	0h	3h
27/10/2010	10	0	90	30	70	100	4h	2h15min	13	19	28	0h	4h15min
28/10/2010	10	40	50	60	75	95	3h	1h	18	23	32	0h	6h15min
29/10/2010	10	30	60	90	99	100	13h	12h	18	19	21	0h	45min
05/11/2010	80	10	10	69	94	100	12h45min	10h	16	20	26	0h	4h
08/11/2010	50	20	30	65	89	100	7h	6h45min	19	22	27	0h	8h30min
10/11/2010	0	0	100	68	88	94	9h	0h	16	17	22	0h	1h

Nos dias 12 e 19 de agosto e 13 de setembro não se observou produção de capiloconídios de *N. floridana* nos ácaros mumificados colocados nos telados. Este período foi caracterizado por noites frias e secas, atingindo níveis de UR médio inferiores a 72% e temperaturas médias inferiores a 21°C. Nestas datas observou-se $UR \geq 95\%$ em menos de 1h15min.

Em 20 de setembro e 27 de outubro, em menos de 20% dos ácaros mumificados observou-se uma baixa quantidade de capiloconídios (menos que 500 capiloconídios). Embora a UR máxima tenha atingido 100%, observou-se $UR \geq 95\%$ por períodos curtos (menos de 2h15min).

Nos dias 28 e 29 de outubro o fungo esporulou e germinou em mais de 40% dos ácaros mumificados. No dia 28, embora o período de UR altas não tenha sido longo (3 horas de $UR > 90\%$) a temperatura permaneceu acima de 21°C por mais de 6 horas. Já no dia 29, embora a temperatura não tenha se mantido acima de 21°C por longo período (apenas 45 minutos) a UR permaneceu alta durante toda a noite (12h > 90%).

As maiores densidades de capiloconídios nas folhas foram observadas em 05 e 08 de novembro quando a umidade atingiu níveis superiores a 90% por mais de 7 horas e temperaturas acima de 21°C por mais de 4 horas.

No dia 10 de novembro, não foi encontrado nenhum capiloconídio nos ácaros mumificados colocados nas folhas de feijão de porco nos telados. O período noturno desta data foi frio com temperatura média de 17°C e somente 1 hora com temperaturas acima de 21°C. Embora a UR tenha ficado acima de 90% por 9 horas, a UR máxima foi de apenas 94%.

2.4 Discussão

Foram realizados testes preliminares para o isolado Esalq1420 que comprovaram a ineficiência na esporulação deste isolado em lâminulas de vidro a umidades relativas menores ou iguais a 90% UR a 13, 17, 21 e 25°C (dados não apresentados). Isto já havia sido evidenciado por Oduor et al. (1996a, 1996b) e Delalibera et al. (2006) em trabalhos realizados com um fungo *Neozygites tanajoae*, fungo muito próximo filogeneticamente do *N. floridana*, ambos isolados de áreas tropicais. Nestes dois estudos, determinou-se que em lâminas o fungo *N. tanajoae* somente esporula a $UR > 95\%$.

Nos estudos descritos acima demonstrou-se que quando o fungo está presente na superfície abaxial de uma folha a esporulação ocorre a 90% de UR, indicando que o microclima

na superfície foliar é pelo menos 5% mais úmido do que o ambiente. Resultados semelhantes foram obtidos por Boulard et al. (2002, 2004), que em estudos em casas de vegetação, através de uso de micro sensores de temperatura, umidade e velocidade do vento (dataloggers), definiu que no período noturno, em folhas de tomateiro, pode ocorrer um incremento de 5% de UR do microclima criado pela folha a 5 mm da superfície foliar.

Brown e Hasibuan (1995) estudaram, em condições de laboratório, os efeitos de umidade e tempo de exposição na produção de conídios e na eficiência da transmissão de um isolado de *N. floridana* em *T. urticae*, proveniente de clima temperado, utilizando lamínulas como substrato de esporulação. Diferentemente do observado para o isolado ESALQ1420, originário de clima tropical, estes autores encontraram baixas esporulações a 80 e 90% de UR.

Nos estudos realizados no laboratório, foi possível avaliar o limite mínimo de esporulação deste fungo em condições mais realistas, já que foi considerada a presença do microclima da folha. Os dados obtidos pelos testes realizados nos telados confirmam os dados encontrados em laboratório. Baseado nos estudos de laboratório e em telados conclui-se que o fungo tem o desenvolvimento afetado por baixas temperaturas, por exemplo, a 13°C o fungo não apresenta esporulação e germinação significativa. Acima de 13°C, o fungo consegue produzir um número considerável de conídios primários (>130) mesmo a 90% UR. Entretanto, somente a 25°C e a 90% UR a produção de capiloconídios é significativa (>389). A esporulação e germinação foram semelhantes a 95% e 100% UR, com produção ótima de capiloconídios ocorrendo nestas umidades a 21 e 25°C (>1432). Aparentemente existe uma interação entre a exigência de umidade e temperatura, sendo que em períodos curtos de UR > 95% e temperaturas > 21°C a produção de capiloconídios seja semelhante a períodos longos de UR > 95% e temperaturas < 21°C, como pode ser observado no estudo em telado nos dias 27, 28 e 29 de outubro.

Apesar de não ocorrer produção substancial de capiloconídios nos limites mínimos de temperatura e UR, é possível que em condições sub-ótimas o fungo se mantenha no ambiente, mesmo que em baixa densidade, infectando pequenas quantidades de hospedeiros, até que ocorra um período de fatores abióticos ótimos, possibilitando assim a disseminação rápida da doença entre os hospedeiros, causando epizootias.

Tais resultados indicam a necessidade de controle das condições ambientais para a produção massal deste fungo em casa de vegetação ou estufas, ou que a produção seja conduzida apenas nos meses quando as condições ambientais ideais, determinadas neste estudo, ocorram naturalmente. Ainda é desconhecido o tempo mínimo nas condições ideais de UR e temperatura necessário para a esporulação. É possível que a produção deste fungo possa ser realizada com poucas horas de altas UR e temperaturas acima de 21°C. Estes dados são importantes para o melhor entendimento da epizootiologia deste fungo e será de grande valia para viabilizar um sistema de produção massal do mesmo e para futura utilização em campo.

Referências

- BOULARD, T.; MERMIER, M.; JACQUES FARGUES J.; SMITS N.; ROUGIER M.; ROY, J.C. Tomato leaf boundary layer climate: implications for microbiological whitefly control in greenhouses. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 110, p. 159–176, 2002.
- BOULARD, T.; FATNASSI, H.; ROY, J.C.; LAGIER, J.; FARGUES, J.; SMITS, N.; ROUGIER, M.; JEANNEQUIN, B. Effect of greenhouse ventilation on humidity of inside air and in leaf boundary-layer. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 125, p. 225–239, 2004.
- 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, v. 75, p. 691-694, 1982.
- BROWN, G.C.; HASIBUAN, R. Conidial discharge and transmission efficiency of *Neozygites floridana*, an entomopathogenic fungus infecting two-spotted spider mites under laboratory conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 65, p. 10–16, 1995.
- CARNER, G.R. A description of the life cycle of *Entomophthora* sp. in the two-spotted spider mite. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 28, p. 245-254, 1976.
- CARRUTHERS, R.I.; HAYNES, D.L. Temperature, moisture and habitat effects on *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) conidial germination and survival in the onion agroecosystem. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 15, p. 1156–1160, 1986.
- DELALIBERA JR., I.; DEMÉTRIO, C.G.B.; MANLY, B.F.J.; HAJEK, A.E. 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.; MORAES, G.J. de; 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**, Dordrecht, v. 27, p. 11-25, 2002.

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). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 19, p. 85-90, 1990.

HINDE, J.P.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. In: SINAPE: SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA, 13., 1998, Caxambu. **Anais...** Caxambu: SINAPE, 1998a. 73p.

_____. Overdispersion: models and estimation. **Computation Statistics and Data Analysis**, Voorburg, v. 27, p. 151-170, 1998b.

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

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

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

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 135, p. 370-384, 1972.

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

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**, Maryland Heights, v. 68, p. 213-222, 1996b.

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**, Dordrecht, 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**, Dordrecht, v. 19, p. 479-488, 1995a.

_____. Germination and viability of capilliconidia of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) under constant temperature, humidity, and light conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 67, p. 267–278, 1996a.

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**, Maryland Heights, v. 70, p. 127–130, 1997a.

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**, Dordrecht, v. 21, p. 485–506, 1997b.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 11 jul.2011.

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

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

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

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.

SOLOMON, M.E. Control of humidity with potassium hydroxide, sulphuric acid, or other solutions. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 42, p. 543-554, 1952.

VASCONCELOS, G.J.N. **Eficiência dos ácaros predadores *Phytoseiulus fragariae* e *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae) no controle de *Tetranychus evansi* e *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) em *Lycopersicon esculentum* e *Solanum americanum***. 2007. 83 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

WEKESA, V.W.; MORAES, G.J.; ORTEGA, E.M.M.; DELALIBERA JR., I. Effect of temperature on sporulation of *Neozygites floridana* isolates from different climates and their virulence against the tomato red spider mite, *Tetranychus evansi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 103, n. 1, p. 36-42, 2010.

3 EFEITO DE FOTOPERÍODO E INTENSIDADE DE LUZ NA ESPORULAÇÃO DE ISOLADOS DE *Neozygites floridana* do Brasil e da Noruega

Resumo

Neozygites floridana é um patógeno cosmopolita e um importante agente de controle natural de ácaros tetraniquídeos. Este fungo apresenta alta especificidade e causa frequentemente epizootias naturais em *Tetranychus spp.* Poucos estudos foram conduzidos para determinar o efeito da intensidade de luz e do fotoperíodo no ciclo de vida de *N. floridana*. Neste estudo determinou-se o efeito da exposição de duas intensidades luminosas [$40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (2960 Lux) e $208 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (15392 Lux)], três fotoperíodos (24h de luz constante, 12h de luz precedida de 12h de escuro e 24h de escuro constante) e duas temperaturas (18°C e 23°C), na produção de conídios primários e de capiloconídios (forma infectiva) de isolados de *N. floridana* em *Tetranychus urticae* provenientes da Noruega e do Brasil. Para isto, ácaros mumificados por cada um dos isolados foram expostos aos diferentes tratamentos em BOD. Não foram encontradas diferenças entre os dois isolados nas duas temperaturas testadas. Os resultados para o fotoperíodo de 12:12h (L:E) foram similares aos encontrados para 24h de escuro total (controle). No entanto, a inibição da luz na formação de capiloconídios foi maior no isolado Norueguês. A luz em baixa intensidade por 24h teve efeito moderado na esporulação dos dois isolados, mas inibiu fortemente a formação de capiloconídios no isolado Norueguês. Os resultados sugerem que a intensidade e o período de exposição à luz (fotoperíodo) podem exercer um importante papel na epizootiologia de *N. floridana*.

Palavras-chave: Ácaros Tetraniquídeos; Fotoperíodo; Fungos entomopatogênicos; Epizootias; *Tetranychus spp.*; Controle biológico; Condições ambientais

Abstract

Neozygites floridana is a cosmopolitan pathogen and an important natural control agent of spider mites. This fungus is highly specific and commonly causes epizootics in *Tetranychus spp* populations. Few studies have been conducted to determine the effect of light intensity and photoperiod on the life cycle of *N. floridana*. In this study, were determined the effects of exposure of two light intensities [$40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (2.960 Lux) and $208 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (15.392 Lux)], three periods of exposure (24h of constant light, 12h of light preceded by 12h of dark and 24 hours of constant darkness) and two temperatures (18°C and 23°C) in the production of primary conidia and capilliconidia formation (infective propagule) of isolates of *N. floridana* in *Tetranychus urticae* from Norway and Brazil. For this study, mummified mites for each isolate were exposed the different treatments in climatic chambers. No differences were found between the two isolates at the two temperatures tested. The results for the 12:12h photoperiod (L:D) were similar to those found for 24h of total darkness (control). However, inhibition of the capilliconidia formation by light was greater in the Norwegian isolate. The low intensity light for 24h showed a mild effect on sporulation of the two isolates, but strongly inhibited the capilliconidia formation in the Norwegian isolate. The results suggest that the intensity and the duration of light exposure (photoperiod) can play an important role in the epizootiology of *N. floridana*.

Keywords: Spider-mites; Photoperiod; Entomopathogens; Epizootics; *Tetranychus* spp.; Biological control; Environmental conditions

3.1 Introdução

A qualidade e a intensidade da luz são fatores que podem afetar esporulação, germinação de conídios, taxa de crescimento vegetativo ou indução de formação de estruturas reprodutivas (MINUSSI et al., 1977). A irradiação luminosa pode induzir, inibir ou ter efeito nulo sobre o crescimento e a esporulação de fungos, variando de acordo com o fungo estudado (COCHRANE, 1958).

Alguns fungos são estimulados pela ação da luz, como é o caso *Epicoccossorus nematosporus*, fungo atualmente estudado para ser utilizado como micoherbicida. Este fungo, em presença de intensidades luminosas de 3.000 a 7.500 lux tem sua produção de conídios estimulada, com maior influência da luz na produção de conídios do que a temperatura (HONG et al., 2002).

O fungo *Podosphaera pannosa* (wallr.) de Bary, causador da doença do míldio em plantas, tem a sua produção de conídios suprimida pela ação da luz (principalmente luz vermelha – 685-780 nm), sendo possível utilizar luz no controle deste fungo fitopatogênico (SUTHAPARAN et al., 2010a, 2010b; SHIBUYA et al., 2011).

Poucos estudos foram realizados para elucidar os efeitos de luz e fotoperíodo em fungos entomopatogênicos. Furlong e Pell (1997) estudaram a influência de fatores ambientais na persistência de *Zoophtora radicans* (Brefeld) e encontraram inibição deste fungo pela ação da luz, sendo a radiação solar considerada o fator que mais afetou a persistência de *Z. radicans* no ambiente.

Neozygites floridana Weiser and Muma é um patógeno cosmopolita e um importante agente de controle natural de ácaros tetraniquídeos. Este fungo apresenta alta especificidade e causa frequentemente epizootias naturais em *Tetranychus* spp. (HUMBER; MORAES; DOS SANTOS, 1981; KLUBERTANZ; PEDIGO; CARLSON, 1991; HOUNTONDJI et al., 2002; DELALIBERA Jr.; HAJEK, 2004; DUARTE et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009).

No entanto, uma das limitações para a utilização de *N. floridana* tem sido a falta de conhecimento sobre as exigências ambientais: umidade relativa, fotoperíodo e temperatura para completar o ciclo de vida e realizar processos biológicos (SMITLEY; BROOKS; KENNEDY,

1986; ODUOR et al., 1995; DELALIBERA Jr. et al., 2006). Estes fatores ambientais regulam a esporulação e a germinação do conídio primário, influenciando desta forma o processo de infecção e transmissão em condições de campo. Alta umidade relativa e temperaturas amenas são parâmetros necessários para a reprodução de muitos fungos, incluindo *Neozygites spp.* que esporulam apenas a umidades relativas acima de 95% (ODUOR et al., 1996; DELALIBERA Jr. et al. 2006).

Poucos estudos foram conduzidos para determinar o efeito da luz ou do fotoperíodo na esporulação, na germinação e no desenvolvimento de *N. floridana*. A esporulação do fungo ocorre no período noturno e a luz tem sido reportada como inibidora de esporulação (ODUOR et al., 1995, 1996). O desenvolvimento de métodos de produção massal e de estocagem de cadáveres contendo o fungo sobre condições ideais para manter a viabilidade e a virulência é um pré-requisito para a utilização deste fungo em ambas as estratégias de controle biológico, inundativa ou clássica (WEKESA; DELALIBERA JR., 2008). Por este motivo, a inibição da esporulação pela luz é um aspecto que pode ser explorado para a produção de cadáveres mumificados, para o armazenamento ou para adequar o melhor momento para liberação do fungo em campo. Entretanto, ainda são necessários estudos para quantificar o efeito da luz na esporulação de *N. floridana*. Neste estudo determinou-se o efeito da intensidade luminosa e a duração de exposição na esporulação e na produção de capiloconídios de isolados de *N. floridana* provenientes da Noruega e do Brasil. O Brasil possui latitudes mais próximas ao equador e fotofases próximas de 12 horas, diferente do que se encontra na Noruega, que por se encontrar próximo e em algumas regiões além do círculo polar ártico (extremo norte) chega a ter fotoperíodos com 24 horas de luz em algumas regiões no verão. A quantificação do efeito da luz é importante para o entendimento da ecologia do fungo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Testes de fotoperíodo e intensidade de luz

Os experimentos foram conduzidos colocando um ácaro mumificado no centro de uma lamínula quadriculada e codificada alfanumericamente (Photo-Etched Coverslips – 18 x 18 mm – Electron Microscopy Sciences) dentro de caixas de acrílico (11 cm – largura x 17,5 cm comprimento x 4 cm de altura) contendo papel filtro umedecido por água destilada, tampadas para a obtenção de 100% de umidade relativa. Em cada caixa colocou-se seis lamínulas, três

contendo o isolado brasileiro e três contendo o isolado norueguês. Estas câmeras foram mantidas em estufas de BOD (Sanyo MRL-351H) programadas com as condições necessárias para cada um dos tratamentos. Estes tratamentos consistiram de duas intensidades luminosas proporcionadas por lâmpadas fluorescentes (Mitsubishi/ORAM FL40SS W/37) nas incubadoras: $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (2960 Lux) proveniente de 3 lâmpadas ou $208 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (15392 Lux) de 15 lâmpadas e duas temperaturas: 18°C e 23°C e três fotoperíodos: 24h de luz constante, 12h de luz precedida de 12h de escuro e 24h de escuro constante. Estas temperaturas foram escolhidas por serem as que se mostraram ótimas para esporulação e germinação de cada isolado: 18°C para o isolado da Noruega e 23°C para o isolado ESALQ1420 do Brasil. As caixas plásticas foram embaladas em papel alumínio para propiciar o período escuro.

Após a exposição das múmias a cada uma das condições, a contagem dos números de conídios primários e capiloconídios nas lamínulas foram feitas em microscópio de contraste de fase (x100) em todos os campos alfanuméricos da lamínula. A germinação conidial total inclui conídios que estavam em processo de formação ou já haviam formado o capiloconídio. O percentual de germinação foi calculado pela divisão do número de capiloconídios pelo número total de conídios contados por lamínula, multiplicado por 100. O procedimento foi repetido cinco vezes e os dados foram analisados através do teste Duncan's multiple range test (GLM procedure) após transformação log para as médias de esporulação e transformação de arco-seno para as médias de porcentagem de germinação. As análises foram feitas utilizando-se o software SAS.

3.3 Resultados

Os resultados mostram que o período de 24h com intensidade luminosa de $208 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ inibe a esporulação de ambos os isolados nas temperaturas avaliadas quando comparado aos outros tratamentos de 12h de luz e 24h de escuro (tabela 3.1). Para a baixa intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, não foram encontrados efeitos do fotoperíodo na esporulação. No entanto, o efeito do fotoperíodo e da intensidade luminosa na formação de capiloconídios (germinação) foi diferente do resultado encontrado para esporulação. Em ambas as intensidades luminosas, o fotoperíodo de 24h de luz constante inibiu fortemente a germinação dos isolados nas duas temperaturas testadas. Ao contrário do esperado, a inibição da formação de capiloconídios foi maior no isolado norueguês nestas condições que a encontrada para o isolado brasileiro. Não foram observadas diferenças significativas na germinação entre 12h de fotoperíodo e 24h de

escuro para nenhuma das intensidades luminosas, temperaturas ou isolados (tabela 3.2). Não foram observadas diferenças significativas na germinação entre as temperaturas testadas.

Tabela 3.1 - Efeito do fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura na esporulação de cadáveres de *T. urticae* mumificados por isolados do Brasil e da Noruega do fungo *N. floridana*. (L = Luz, E = Escuro)

		18°C		23°C	
		BRASIL	NORUEGA	BRASIL	NORUEGA
208 $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	24L	89 $\pm$ 35 cA	405 $\pm$ 175 bA	197 $\pm$ 53 cA	351 $\pm$ 167 bA
	12LE	692 $\pm$ 183 bA	1070 $\pm$ 232 aA	1047 $\pm$ 180 abA	888 $\pm$ 204 aA
	24E	851 $\pm$ 145 abA	1067 $\pm$ 209 aA	970 $\pm$ 198 abA	917 $\pm$ 199 aA
40 $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	24L	823 $\pm$ 234 abA	842 $\pm$ 218 abA	539 $\pm$ 255 bcA	674 $\pm$ 148 abA
	12LE	801 $\pm$ 139 abA	986 $\pm$ 194 abA	832 $\pm$ 102 abA	749 $\pm$ 63 abA
	24E	1245 $\pm$ 198 aA	1016 $\pm$ 169 abA	1081 $\pm$ 162 aA	1158 $\pm$ 202 aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas pela mesma letra maiúscula nas linhas não são significativamente diferentes para o teste Duncan's multiple range test (GLM procedure) com 5 % de significância.

Tabela 3.2 - Efeito do fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura na formação de capiloconídios (germinação em %) de cadáveres de *T. urticae* mumificados por isolados do fungo *N. floridana* do Brasil e da Noruega (L = Luz, E = Escuro)

		18°C		23°C	
		BRASIL	NORUEGA	BRASIL	NORUEGA
208 $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	24L	23.8 $\pm$ 10.1bA	0.1 $\pm$ 0.1bB	22.3 $\pm$ 10.7bA	0.0 $\pm$ 0.0bB
	12LE	83.7 $\pm$ 6.9aA	82.5 $\pm$ 6.6aA	84.3 $\pm$ 6.4aA	68.5 $\pm$ 10.8aA
	24E	91.7 $\pm$ 2.5aA	85.3 $\pm$ 6.5aA	93.1 $\pm$ 1.7aA	76.9 $\pm$ 10.5aA
40 $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$	24L	37.3 $\pm$ 9.7bA	1.6 $\pm$ 0.7bB	33.0 $\pm$ 10.4bA	0.2 $\pm$ 0.1bB
	12LE	77.6 $\pm$ 4.9aB	82.1 $\pm$ 4.7aAB	93.2 $\pm$ 1.8aA	81.1 $\pm$ 4.8aAB
	24E	83.5 $\pm$ 8.2aA	93.4 $\pm$ 2.4aA	91.4 $\pm$ 3.7aA	87.2 $\pm$ 8.0aA

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas não são significativamente diferentes para o teste Duncan's multiple range test (GLM procedure) com 5 % de significância.

3.4 Discussão

Uma das hipóteses deste estudo era de que a esporulação e germinação dos conídios do isolado da Noruega fossem menos afetadas pela a luz em comparação ao isolado Brasileiro. Esta hipótese foi baseada no fato de que durante o verão na Noruega, o período de luz pode chegar a

24 horas dependendo da região (fenômeno conhecido como “Sol da Meia Noite”), enquanto no Brasil a fotofase é de aproximadamente 12h. Entretanto, foi observado que o isolado Norueguês apresentou menor formação de capiloconídios em comparação ao Brasileiro quando submetidos a luz contínua por 24h. É possível que os comprimentos de ondas testados sejam diferentes encontrados na Noruega que devido ao ângulo de incidência dos raios solares nos pólos tenham efeito menor do que aqueles observados nos trópicos. Na realidade a intensidade luminosa na região abaxial das folhas onde os ácaros mumificados se encontram, nestes dois países, não foi determinada para poder fazer comparações com o comprimento de ondas nas BODs onde os estudos foram executados. Entretanto, é possível que mesmo em dias longos na Noruega a luz que incide nos ácaros mumificados não seja intensa o suficiente para inibir a esporulação. Seriam ainda interessantes estudos em condições de campo para elucidar se existe influência do ângulo de entrada dos raios solares nestes isolados.

Estas descobertas provavelmente indicam que a esporulação pode continuar ocorrendo nos períodos iniciais da manhã e início da noite nos trópicos e em estações de dias longos em regiões temperadas no verão. A redução na germinação a 24 horas de baixa intensidade luminosa ($40 \mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) comparado a exposição de 12h de luz sobre mesma intensidade, indica que apenas 12h de ausência de luz seja suficiente para uma germinação eficiente.

As quantidades de capiloconídios diferiram bastante entre os tratamentos de 24 horas de luz nas duas intensidades luminosas para o isolado brasileiro. Estes resultados demonstram dependência direta da quantidade de capiloconídios com a intensidade luminosa para este isolado.

Oduor et al. (1996) foram os únicos a estudar os efeitos de diferentes condições luminosas em um fungo do gênero *Neozygites*. Assim como nos resultados encontrados por este estudo, os estudos com o fungo *N. tanajoae* (isolado também tropical) demonstraram haver mais capiloconídios germinados no escuro (44,9%) do que na presença de luz (20,3%).

Tais dados indicam, por exemplo, que a luz pode ser utilizada para o controle da doença causada pelo *N. floridana* em ácaros tetraniquídeos produzidos em larga escala em ambientes protegidos com o fim de alimentar criações de ácaros predadores, evitando que ocorram epizootias. A manipulação da luz pode também ser utilizada como ferramenta para evitar a esporulação deste fungo em sistema de produção de ácaros mumificados em larga escala para fins de controle biológico tanto em regiões de clima temperado quanto nos trópicos.

Esses resultados sugerem que a intensidade e a duração (fotoperíodo) da luz têm importância na epizootiologia de *N. floridana* no campo e devem ser levados em consideração para futuras liberações em campo e para a utilização na produção massal deste fungo.

Referências

COCHRANE, V. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley, 1958. 524 p.

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.; DEMÉTRIO, C.G.B.; MANLY, B.F.J.; HAJEK, A.E. 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.

DUARTE, V. S.; SILVA, R.A.; WEKESA, V.W.; DELAIBERA JR., I. Impact of natural epizootics of the fungal pathogen *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) on population dynamics of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in tomato and nightshade. **Biological Control**, Orlando, v. 51, n. 1, p. 81-90, 2009.

FURLONG, M.; PELL, J.K. The influence of environmental factors on the persistence of *Zoophthora radicans* Conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 69, n. 3, p. 223-233, 1997.

HONG, Y.K.; HYUN, J.N.; CHO, J.; UHM, J.; KIM, S. Factors affecting sporulation of a mycoherbicide, *Epicoccosorus nematosporus*, on the lesion of *Eleocharis kuroguwai*. **Journal of Plant Pathology**, Maryland Heights, v. 18, n. 28, p. 1-84. 2002.

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

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**, Lanham, v. 20, p. 731-735, 1991.

MINUSSI, E.; MACHADO, C.C.; MENTEN, J.O.M.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de *Stemphylium solani* Weber em meio de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 167-171, 1977.

ODUOR, G.I.; YANINEK, J.S.; VAND DER GEEST, L.P.S. Survival of *Neozygites cf. floridana* mummified cassava green mites and the viability of its primary conidia. **Biological Control**, Orlando, v. 19, p. 479-488, 1995.

ODUOR, G.I.; DE 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 temperatures, humidities, and photoperiods. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 68, n. 3, p. 213-222, 1996.

RIBEIRO, A.E.; GONDIM JR., M.G.; CALDERAN, E.; DELALIBERA JR., I. Host range of *Neozygites floridana* isolates (Zygomycetes: Entomophthorales) to spider mites. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 102, n. 3, p. 196-202, 2009.

SHIBUYA, T.; ITAGAKI, K.; TOJO, M.; ENDO, R.; KITAYA, Y. Fluorescent illumination with high red-to-far-red ratio improves resistance of cucumber seedlings to powdery mildew. **Hortscience**, Alexandria, v. 46, n. 3, p. 429-431, 2011.

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.

SUTHAPARAN, A.; STENSVAND A.; TORRE, D.; HERRERO, M.L.; PETTERSEN, R.I.; GADOURY, D.M.; GISLERØD, H.R. Continuous lighting reduces conidial production and germinability in the rose powdery mildew pathosystem. **Plant Disease**, Paul, v. 94, p. 339-344. 2010a.

_____. Specific light-emitting diodes can suppress sporulation of *Podosphaera pannosa* on greenhouse roses. **Plant Disease**, Paul, v. 94, p. 1105-1110, 2010b.

WEKESA, V.W.; KNAPP, M.; DELALIBERA JR., I. Side-effects of pesticides on the life cycle of the mite pathogenic fungus *Neozygites floridana*. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 46, p. 287-297, 2008.

4 EFEITOS DE AGROTÓXICOS UTILIZADOS NA CULTURA DO MORANGO NA FORMAÇÃO DE CONÍDIOS PRIMÁRIOS E CAPILOCONÍDIOS DE *Neozygites floridana*

Resumo

A intensa carga de agrotóxicos utilizados na cultura do morango tem influenciado na permanência e eficiência dos inimigos naturais das pragas, acarretando prejuízos para os agricultores e para o ambiente. *Neozygites floridana*, um fungo entomopatogênico, se destaca como importante agente de regulação natural de ácaros fitófagos. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de fungicidas, acaricidas e inseticidas utilizados na produção comercial de morango no Brasil e na Noruega sobre a esporulação e produção de capiloconídios do fungo *N. floridana* em laboratório. Foram testados treze pesticidas: tebuconazole, penconazol, azoxystrobina, iprodione, enxofre, cyprodinil+fludioxonil, fluazinam, propargito, procimidona, abamectina, imibenconazole e fenpropatrina. Tais produtos foram aplicados diretamente nos ácaros mumificados pelo fungo e que posteriormente foram levados a condições propícias para a esporulação e produção de capiloconídios (25°C, 100% UR e escuro total) por 12 horas. Após este período as lamínulas contendo os ácaros esporulados foram avaliadas para a contagem dos conídios primários e capiloconídios com o uso de microscópio óptico. Os resultados revelaram que tebuconazol (fungicida), fenpropatrina (inseticida) na concentração recomendada e abamectina na metade da concentração recomendada (acaricida), foram os menos agressivos a *N. floridana*. Os outros pesticidas avaliados apresentaram grande impacto na esporulação e/ou formação de capiloconídios do fungo em laboratório, sendo necessários estudos a campo para a indicação destes no manejo integrado de pragas nesta cultura.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; Epizootias; *Tetranychus* spp.; Controle biológico; Pesticidas; Manejo Integrado de Pragas; Compatibilidade

Abstract

The heavy load of pesticides used in the strawberry crop has influenced the permanence and effectiveness of natural enemies of several pests, resulting in losses to farmers and to the environment. *Neozygites floridana*, an entomopathogenic fungus, stands out as an important agent of natural regulation of phytophagous mites. This study aimed to evaluate the effects of fungicides, acaricides and insecticides used in commercial strawberry production in Brazil and Norway on the sporulation and capilliconidia formation of *N. floridana* in laboratory. Thirteen pesticides were tested: tebuconazole, penconazole, azoxystrobin, iprodione, sulfur, cyprodinil+fludioxonil, fluazinam, propargite, procymidone, abamectin, fenpropathrin and imibenconazole. These products were applied directly to the mummified mites, placed on coverslips and later were submitted to conditions ideal for sporulation and capilliconidia formation (25°C, 100% RH and total darkness) for 12 hours. After this period, the number of primary conidia and capilliconidia per mummified mites was counted using optical microscope. The results showed that tebuconazole (fungicide), fenpropathrin (insecticide) at the recommended concentration and abamectin (acaricide) at half of the recommended concentration were the least aggressive to *N. floridana*. The other pesticides evaluated had major impact on spore production

and/or formation of capilliconidia of this fungus in laboratory. Field studies are needed to indicate if these pesticides can be used in integrate pest management in this crops.

Keywords: Spider-mites; Pesticides; Entomopathogens; Epizootics; *Tetranychus* spp.; Biological control; Integrated Pest Management; Compatibility

4.1 Introdução

Ácaros da família Tetranychidae são pragas de um grande número de espécies de plantas cultivadas em todo o mundo incluindo plantas ornamentais, hortaliças, plantas anuais e perenes (HELLE; VAN DE VRIE, 1974; FLECHTMANN, 1985; WALTER; PROCTOR, 1999; WATERHOUSE; SANDS, 2001). Uma das principais espécies desta família é o ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch. Densidades superiores a cinco ácaros rajados por folíolo durante o período de crescimento do morangueiro diminuem significativamente a produção de frutos (SANCES et al., 1982; GIMENEZ-FERRER et al., 1994; WALSH et al., 1998).

A intensa aplicação de pesticidas exerce forte pressão de seleção e contribui para a rápida evolução da resistência do ácaro rajado a acaricidas. São vários os exemplos de resistência de populações de *T. urticae* a agrotóxicos (STUMPF; NAUEN, 2001; SATO et al., 2004; SUH et al., 2006; YORULMAZ; AY, 2009; NICASTRO; SATO; SILVA, 2009; KHAJEHALI; VAN LEEUWEN; TIRRY, 2009; HERRON; ROPHAIL, 1998, 2002). Isto leva ao uso cada vez mais intensivo de novos agrotóxicos e da mistura de produtos para seu controle. Aplicações de acaricidas, inseticidas e fungicidas que são realizadas 2-3 vezes por semana, sem o controle satisfatório dos organismos em várias plantas ornamentais, acarretam ressurgência de pragas, ocasionada pela eliminação de seus inimigos naturais (VAN DE VRIE et al., 1972).

Para evitar problemas como a ressurgência de pragas e a evolução da resistência, o manejo integrado de pragas é uma prática que tem sido cada vez mais adotada em diferentes agroecossistemas. No manejo integrado, preconiza-se a manutenção de inimigos naturais na cultura e isso pode ser feito através de conservação ou de liberações inundativas de inimigos naturais eficientes, produzidos em larga escala. Dificilmente é possível produzir economicamente muitas culturas sem o auxílio dos produtos químicos, por isso deve-se sempre buscar a utilização de produtos eficientes contra a praga, mas seletivos aos seus inimigos naturais. Estas práticas devem ser adotadas com a finalidade de maximizar a produção e reduzir o impacto ao ambiente. O sucesso do controle biológico depende da seleção de inimigos naturais eficientes, seguidas por

uma adequada tecnologia de criação massal e liberação (HAJEK; DELALIBERA; McMANUS, 2007).

A utilização de patógenos como agentes de controle biológico de ácaros fitófagos é estratégia adequada, pois muitas vezes estes patógenos são específicos de um determinado hospedeiro, sendo insignificante o seu impacto sobre outros inimigos naturais, especialmente predadores (CHANDLER et al., 2000; JACOBSON et al., 2001). Outra propriedade importante dos agentes patogênicos é que muitas espécies apresentam um grande potencial para inclusão no manejo integrado de pragas (MIP) devido a sua compatibilidade com agrotóxicos (SAMSON; ROMBACH, 1985). Para identificar a compatibilidade de pesticidas com entomopatógenos, a realização de bioensaio em laboratório é habitualmente o primeiro passo para a seleção de pesticidas a serem empregados no Manejo Integrado de Pragas (MORJAN; PEDIGO; LEWIS, 2002).

Apesar de poucos microrganismos (fungos, vírus, bactérias e microsporídios) serem patogênicos a ácaros, duas espécies de fungos, *Hirsutella thompsonii* (Fischer) e *Neozygites floridana* (Weiser e Muma), se destacam como importantes agentes de regulação natural de ácaros fitófagos, especialmente de ácaros da família Eriophyidae e Tetranychidae, respectivamente (CHANDLER et al., 2000). Esses fungos são capazes de penetrar a cutícula do hospedeiro, não sendo necessária a ingestão pelo hospedeiro como acontece na maioria dos outros patógenos (HALL; PAPIEROCK, 1982). *N. floridana* tem sido observado em diversas espécies de ácaros tetraniquídeos em vários agroecossistemas. O gênero *Neozygites* possui um espectro de hospedeiros restrito e consiste somente de patógenos obrigatórios e que são dificilmente cultivados em meios de cultura artificiais. A alta umidade relativa, exigida pelos fungos patogênicos, é encontrada em cultivos protegidos em casas-de-vegetação, ou culturas que geram um micro clima favorável como é o caso da produção de morango. Epizootias de *N. floridana* têm sido documentadas em diversas culturas em vários países e resulta numa drástica redução populacional do hospedeiro.

Muitos estudos já foram realizados para determinar a compatibilidade de agrotóxicos com vários fungos entomopatogênicos (KHALIL; SHAH; NAEEM, 1985; POPRAWSKI; MAJCHROWICZ, 1995; STERK et al., 1999; WELLS et al., 2000; BATISTA FILHO; ALMEIDA; LAMAS, 2001; NEVES et al., 2001; OLIVEIRA; NEVES; KAWAZOE, 2003; WEI; XIU-FANG; CHENG-FA, 2004; ANDALÓ et al., 2004; ER; GÖKÇE, 2004;

CUTHBERSON; WALTERS; DEPPE, 2005; ALIZADEH et al., 2007; SHAH et al., 2009; GATARAYIHA; LAING; MILLER, 2010; CUTHBERTSON et al., 2010), sendo restrito o número de trabalhos realizados especificamente com o fungo *N. floridana* (BRANDENBURG; KENNEDY, 1982, 1983; BOYKIN et al., 1984; SMITLEY et al., 1986; KLINGEN; WÆRSTED; WESTRUM, 2007; WEKESA; KNAPP; DELALIBERA JR., 2008; DUARTE et al., 2009). Estudos do efeito de pesticidas sobre *N. floridana* têm recebido menor atenção, principalmente devido às dificuldades associadas ao estabelecimento do cultivo *in vitro* deste patógeno (MORJAN; PEDIGO; LEWIS, 2002).

Para tanto, a proposta deste estudo foi avaliar o efeito de fungicidas, acaricidas e inseticidas utilizados na produção comercial de morango no Brasil e na Noruega sobre a esporulação e produção de capiloconídios do fungo *N. floridana* utilizando métodos laboratoriais que permitem a realização dos ensaios sem a necessidade de cultivo do fungo em meio artificial.

Estudos sobre a toxicidade de agrotóxicos utilizados rotineiramente nas plantações de morangueiro em *N. floridana* são de grande relevância considerando que este patógeno é um importante inimigo natural de *T. urticae* e deve ser afetado negativamente pelo sistema de produção especialmente pelo uso de fungicidas.

4.2 Material e Métodos

Foram testados treze pesticidas: tebuconazole (Folicur), penconazol (Topas), azoxystrobina (Amistar), iprodione (Rovral), enxofre (Thiovit Jet e Kumulus), cyprodinil+fludioxonil (Switch), fluazinam (Shirlan), propargito (Omite), procimidona (Sumilex), abamectina (Vertimec), imibenconazole (Manage), fenpropatrina (Danimen), todos utilizados no controle de pragas e doenças em plantações de morangueiro no Brasil e/ou na Noruega. Para o teste de compatibilidade desses produtos com o fungo *N. floridana*, ácaros mumificados e lamínulas quadriculadas e codificadas alfanumericamente (Photo-Etched Coverslips – 18 x 18 mm – Electron Microscopy Sciences) foram colocados sobre papel filtro em placas de Petri (9 cm de diâmetro) e levados para receber a aplicação dos pesticidas. Foram utilizadas aplicações de agrotóxicos em duas concentrações: 1) a concentração recomendada no rótulo do produto (CR) a metade desta concentração (CR/2) (Tabela 4.1), ambos acrescido de 0,05% de Tween 80, para tanto foi utilizado uma máquina pulverizadora controlada por computador (Bukard) própria para esses tipos de aplicações. Foram aplicados 2,6 mg/cm² das

soluções dos agrotóxicos com pressão de 0,5 bar para cada repetição. O tratamento controle foi feito com água acrescida de 0,05% de Tween 80. Cada placa de Petri contendo cinco lamínulas e cinco ácaros mumificados foi pulverizada com o respectivo tratamento, sendo este procedimento repetido três vezes para cada tratamento. Os ácaros mumificados pulverizados, assim como, as lamínulas foram colocados dentro de caixas de acrílico (11 largura x 17,5 comprimento x 4 cm de altura) contendo papel filtro umedecido por água destilada e fechadas com a tampa própria da caixa. As caixas contendo os diferentes tratamentos foram embrulhadas em papel alumínio e levadas a estufas de BOD a 25 ± 2 °C e 100% de umidade relativa por 12h em escuro total. Após este período, para determinar o efeito dos pesticidas, as lamínulas foram analisadas em microscópio óptico de contraste de fase contando-se o número de conídios primários e capiloconídios originários dos ácaros mumificados.

Tabela 4.1 - Especificações dos pesticidas utilizados nos experimentos de compatibilidade de *N. floridana* com agrotóxicos

Ingrediente ativo	Marca comercial (fabricante)	Tipo de pesticida (Grupo químico)	Concentração Recomendada (CR)
Abamectina	Vertimec 18 EC (Syngenta)	Acaricida Inseticida Nematicida (<i>Avermectina</i>)	75 ml / 100 l
Azoxystrobina	Amistar 250 SC (Syngenta)	Fungicida (<i>Estrobilurinas</i>)	13 g / 100 l
Cyprodinil+ Fludioxonil	Switch (Syngenta)	Fungicida (<i>Anilinopyramidine+</i> <i>Phenylpyrrole</i>)	50 g / 100 l
Enxofre	Thiovit Jet (Syngenta)	Fungicida (<i>Inorgânico</i>)	300 g / 100 l
Enxofre	Kumulus (BASF)	Fungicida (<i>Inorgânico</i>)	300 g / 100 l
Fenpropatrina	Danimen 300 EC (Sumimoto)	Inseticida / Acaricida (<i>Piretróide</i>)	65 ml / 100 l
Fluazinam	Shirlan (Syngenta)	Fungicida (<i>Dinitroanilina</i>)	100 ml / 100 l
Imibenconazole	Manage 150 (Hokko)	Fungicida (<i>Triazol</i>)	100 g / 100 l
Iprodione	Rovral 75 WG (Bayer)	Fungicida (<i>Dicarboximida</i>)	150 g / 100 l
Penconazol	Topas 100 EC (Syngenta)	Fungicida (<i>Triazol</i>)	25 ml / 100 l
Procimidona	Sumilex 500 WP (Sumimoto)	Fungicida (<i>Dicarboximida</i>)	100 g / 100 l
Propargito	Omite 720 CE (Chemtura)	Acaricida (<i>Sulfito de alquila</i>)	30 ml / 100 l
Tebuconazole	Folicur 200 EC (Bayer)	Fungicida (<i>Triazol</i>)	75 ml / 100 l

4.2.1 Análise dos dados

Para dados de contagem é geralmente utilizado o modelo de regressão de Poisson, um modelo linear generalizado (NELDER; WEDDERBURN, 1972). Como prerrogativa deste modelo, espera-se que a *deviance residual* (uma medida do ajuste do modelo) fosse aproximadamente igual ao número de graus de liberdade do resíduo. No entanto, observou-se uma variação maior do que a esperada pelo modelo, fenômeno este conhecido como superdispersão (HINDE; DEMÉTRIO, 1998a, 1998b). Para modelar a superdispersão foi

utilizada a função de variância $\text{Var}(Y_i) = \phi \mu_i$ em que ϕ é conhecido como parâmetro de superdispersão. Sendo assim, foi utilizado um método de quase-verossimilhança para estimar os parâmetros do modelo, chamado de quasi-Poisson.

Dados de proporções são geralmente analisados usando um modelo de regressão binomial que também é um modelo linear generalizado (NELDER; WEDDERBURN, 1972). Como os dados de esporulação e germinação apresentaram superdispersão estes foram modelados usando-se a função para $\text{Var}(Y_i) = \phi m_i \pi_i (1 - \pi_i)$ sendo utilizado um método de quase-verossimilhança para estimar β e o parâmetro adicional ϕ (chamado fator de heterogeneidade).

Foram ajustados modelos quasi-Poisson aos dados de número de esporos primários, capiloconídios e total de esporos. Aos dados de proporções de germinação foi ajustado um modelo quasi-binomial. Prosseguiu-se, então, à obtenção dos intervalos de confiança para os valores ajustados pelos modelos. Todos os procedimentos foram implementados no software estatístico R, em sua versão 2.12.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

4.3 Resultados

Os produtos Kumulus e Switch mesmo na menor concentração inibiram totalmente a esporulação de *N. floridana*. Shirlan apresentou drástica redução na esporulação na menor concentração e inibiu totalmente a esporulação na concentração recomendada.

Os produtos Topas, Amistar, Manage, Sumilex, Rovral, Thiovit e Omite na metade da concentração recomendada inibiram em mais de 50% a esporulação. A redução na esporulação causada por todos estes produtos, exceto Manage, foi estatisticamente semelhante entre as duas concentrações testadas, indicando que o incremento em 50% na concentração do produto não resultou em aumento substancial do impacto destes na esporulação. A média de conídios produzidos nos ácaros mumificados pulverizados com a concentração recomendada de Manage foi de apenas 6 conídios.

Folicur e Danimen nas duas concentrações e CR/2 de Vertimec não apresentaram efeitos deletérios na esporulação do fungo. Entretanto, na concentração recomendada Vertimec apresentou drástica redução na produção de conídios primários.

Todos os produtos afetaram a formação de capiloconídios. Os produtos Shirlan, Rovral, Thiovit, Omite, Kumulus e Switch tiveram efeito deletério na formação de capiloconídios em

ambas as concentrações, impossibilitando o conídio primário de *N. floridana* de se transformar em capiloconídio (forma infectiva do fungo).

As duas concentrações (CR e CR/2) de Topas, Amistar, Manage e Sumilex apresentaram efeito grave na formação de capiloconídios. Os produtos Folicur, Vertimec e Danimen foram os que apresentaram menor efeito na produção de capiloconídios. Na CR/2, maior quantidade de capiloconídios foi observada em Folicur e na concentração recomendada não foi observada diferença significativa entre Folicur e Danimen.

Topas nas duas concentrações estudadas, apesar de ter mostrado apenas um efeito moderado na esporulação do fungo não permitiu a formação de capiloconídio. Assim, por impedir a formação de capiloconídios e, conseqüentemente, a ação do patógeno, o uso deste produto deve ser utilizado com cautela.

Tabela 4.2 - Efeito de pesticidas utilizados em morangueiro na esporulação (Nº de conídios por ácaro mumificado) e na formação de capiloconídios (% de germinação) de *N. floridana*

Marca comercial (Ingrediente Ativo)	Nº de conídios primário por ácaro mumificado		Germinação (%)	
	CR/2	CR	CR/2	CR
Água (Tween)	1834 A	1834 A	85 a	85 a
Folicur 200 EC (Tebuconazole)	1579 ABCD	1051 A	65 b	30 defg
Vertimec 18 EC (Abamectina)	1283 AB	13 EFG	45 c	26 f
Danimen 300 EC (Fenpropatrina)	1058 ABCD	1129 ABC	35 cde	40 cd
Topas 100 EC (Penconazole)	718 CDEF	311 BCDE	10 h	13 h
Amistar 250 SC (Azoxystrobin)	462 EF	47 EF	2 efgh	14 fhg
Manage 150 (Imibenconazole)	379 DEF	6 G	12 gh	13 gh
Sumilex 500 WP (Procimidona)	163 EF	116 EF	7 fgh	5 efgh
Shirlan (Fluazinam)	80 F	0 H	0 i	0 i
Rovral 75 WG (Ipiridione)	363 DEF	124 EF	2 h	0 i
Thiovit Jet (Enxofre)	162 EF	143 EF	0 i	0 i
Omite 720 CE (Propargito)	119 EF	143 EF	0 i	0 i
Kumulus (Enxofre)	0 H	0 H	0 i	0 i
Switch (Cyprodinil+Fludioxonil)	0 H	0 H	0 i	0 i

Letras diferentes (Maiúsculas = Esporulação / Minúsculas = Germinação) entre as linhas denotam diferença com 5% de significância para o teste de quasi-Poisson (Esporulação) e quase-binomial (Germinação).

4.4 Discussão

Embora *Neozygites spp.* seja um dos principais inimigos naturais de ácaros tetranychídeos, o efeito de agrotóxicos sobre este patógeno foi estudado por poucos autores. Normalmente, os estudos de campo são limitados a um número pequeno de produtos e demandam muito tempo e um grande esforço para detectar diferenças nos níveis de infecção ou na densidade de propágulos no solo. Por esta razão, há necessidade da geração de dados de laboratório, acerca do efeito de pesticidas sobre aspectos específicos do fungo como, esporulação e formação de capiloconídios.

Os efeitos prejudiciais de pesticidas sobre *N. floridana* dependem grandemente do princípio ativo, grupo químico, forma de aplicação e concentração dos agrotóxicos. Boykin, Campbell e Beute (1984) demonstram que a aplicação de benomil e mancozebe reduziu a incidência e eficiência de *N. floridana* sobre *T. urticae* em campos de amendoim. Brandenburg e Kennedy (1983) também descreveram uma menor incidência de *N. floridana* em *T. urticae* depois da aplicação dos fungicidas benomil e clorotalonil e associado a este efeito observou-se a inibição da formação de capiloconídios por estes fungicidas.

Klingen e Westrum (2007) realizaram bioensaios em laboratório com fungicidas e acaricidas utilizados na cultura do morangueiro na Noruega visando aumentar o conhecimento da compatibilidade de *N. floridana* a estes produtos. Tolyfluanid (Euparen M) e methiocarb (Mesurol 500 SC) não reduziram a mortalidade de ácaros inoculados com o fungo *N. floridana* (89,3% e 93,2% respectivamente) quando comparado ao controle que matou 80% dos ácaros, tolyfluanid também reduziu a esporulação do fungo para 15,5%. Fenhexamid (Teldor WG 50) e cyprodinil + fludioxonil (Switch 62.5 WG) reduziram a mortalidade de ácaros inoculados com o fungo, matando respectivamente 66,7% e 48,7%, sendo que Switch ainda aumentou o tempo necessário para o ácaro inoculado morrer (6,7 dias, comparado ao controle que foi de 6,1 dias). Este fungicida também inibiu a esporulação de *N. floridana* para 7,9%, sendo que o controle obteve 42,4% de esporulação. Tais dados corroboram os encontrados neste estudo, em que o Switch aplicado diretamente no ácaro mumificado inibiu completamente a esporulação de *N. floridana*. A partir destes resultados ficou evidenciado que os pesticidas químicos testados reduzirão potencialmente a sobrevivência e a eficiência deste inimigo natural em campo. No entanto, tais experimentos foram realizados com isolados noruegueses, que por serem adaptados a condições completamente diferentes das encontradas aqui no Brasil, também possuem diferenças na sua biologia e respostas a fatores ambientais. Estes autores utilizaram metodologia

para medir o efeito indireto dos agrotóxicos sobre o fungo enquanto os dados apresentados nesse estudo referem-se a aplicação direta dos produtos nos ácaros mumificados.

Wekesa, Knapp e Delalibera Jr. (2008) realizaram testes em isolados de *N. floridana* provenientes de *T. evansi* (ácaro vermelho do tomateiro) com produtos utilizados regularmente na cultura do tomateiro, sendo que o Omite, também foi testado, observando-se redução na esporulação, com produção estimada por escala categórica entre 100 e 500 conídios, semelhante à média encontrada neste estudo (143 conídios / ácaro mumificado).

Roggia (2010) através de testes em laboratório realizados com o fungo *N. floridana* demonstrou que dentre os pesticidas utilizados em plantações de soja, os que mostraram uma melhor compatibilidade com o fungo foram os inseticidas dos grupos dos piretróides e fungicidas dos grupos dos triazóis. Sobre outros fungos da mesma família foram realizados estudos por Smith e Hardee (1996) e Wells et al. (2000).

Vertimec se mostrou altamente tóxico para o fungo em concentrações recomendadas, mas o mesmo não apresentou efeito na menor concentração, demonstrando uma alta relação da toxicidade deste com a concentração aplicada. Para todos os outros produtos, exceto Manage, não se observou diferença estatística entre a CR/2 e CR para esporulação.

Os produtos contendo enxofre (Thiovit Jet e Kumulus) inibiram totalmente a germinação de *N. floridana*. Esse resultado é de grande relevância, pois produtos à base de enxofre são empregados extensivamente por horticultores que cultivam o morangueiro em sistema orgânico, a fim de controlar fungos fitopatogênicos. Como existem poucas alternativas ao uso de acaricidas sintéticos em sistema orgânico é fundamental utilização de fungicidas seletivos para preservação do fungo *N. floridana*, possibilitando maior ação deste na regulação das populações do ácaro rajado.

Os resultados encontrados para Folicur (fungicida), Danimen (inseticida) e para a menor concentração de Vertimec (acaricida), demonstram que estes produtos possuem um menor impacto no fungo, sendo estes indicados para futuros estudos de semi-campo e campo e futura introdução destes em programas de MIP.

Se um produto for considerado compatível (causando menos efeitos negativos na esporulação e produção de capiloconídios) com o patógeno em bioensaios laboratoriais (exposição máxima) pode-se assumir que também será seletivo no campo. Por outro lado, um produto considerado tóxico nos testes em laboratório não necessariamente será tóxico em campo.

Isto pode ser atribuído ao fato de que os fungos entomopatogênicos podem encontrar refúgios espaciais dentro da cultura, visto que aplicações de pesticidas a campo não apresentam perfeita cobertura. Desta forma, os produtos que apresentaram maior inibição de esporulação ou menor produção de capiloconídios, devem ser, portanto, evitados. Os produtos que apresentaram alta toxicidade e que são imprescindíveis no manejo de pragas e doenças deveriam ser testados a campo para confirmar a sua toxicidade ao fungo. Os produtos Folicur, Danimen e Vertimec são os mais indicados para serem utilizados no manejo integrado de pragas e doenças da cultura do morangueiro.

Referências

- ALIZADEH, A.; SAMIH, M.A.; KHEZRI, M.; RISEH, R.S. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. **International Journal of Agriculture and Biology**, Faisalabad, v. 9, n. 1, p. 31-34, 2007.
- ANDALÓ, V.; MOINO JR., A.; SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; SOUZA, G.C. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 46-67, 2004.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; LAMAS, C. Effect of Thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 437-447, 2001.
- BOYKIN, L.S.; CAMBELL, W.V.; BEUTE, M.K. Effects 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, 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, v. 75, p. 691-694, 1982.
- _____. Interactive effects of selected pesticides on the twospotted spider mite and its fungal pathogen, *Neozygites floridana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v. 34, p. 240-244, 1983.
- CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.G.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, v. 10, p. 357-384, 2000.

- CUTHBERTSON, A.G.S.; WALTERS, K.F.A.; DEPPE, C. Compatibility of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and insecticides for eradication of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 160, p. 35–41, 2005.
- CUTHBERTSON, A.G.S.; BLACKBURN, L.F.; NORTHING, P.; LUO, W.; CANNON, R.J.C.; WALTERS, K.F.A. Chemical compatibility testing of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* to control *Bemisia tabaci* in glasshouse environment. **International Journal of Environmental Science and Technology**, Tehran Iran v. 7, n. 2, p. 405-409, 2010.
- DUARTE, V.S.; SILVA, R.A.; WEKESA, V.W.; RIZZATO, F.B.; DIAS, C.T.S.; DELALIBERA JR., I. Impact of natural epizootics of the fungal pathogen *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) on population dynamics of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in tomato and nightshade. **Biological Control**, Orlando, v. 51, p. 81–90, 2009.
- ER, M.K.; GÖKÇE, A. Effects of selected pesticides used against glasshouse tomato pests on colony growth and conidial germination of *Paecilomyces fumosoroseus*. **Biological Control**, Orlando, v. 31, p. 398–404, 2004.
- FLECHTMANN, C.H.W. **Ácaros de importância agrícola**. São Paulo: Livraria Nobel, 1985. 150 p.
- GATARAYIHA, M.C.; LAING, M.D.; MILLER, R.M. *In vitro* effects of flutriafol and azoxystrobin on *Beauveria bassiana* and its efficacy against *Tetranychus urticae*. **Pest Management Science**, London, v. 66, p. 773–778, 2010.
- GIMENEZ-FERRER R.M.; ERB W.A.; BISHOP B.L.; SCHEERENS J.C. Host-pest relationships between the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) and strawberry cultivars with different levels of resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 87, p. 168–175, 1994.
- HAJEK, A.E.; MCMANUS, M.L.; DELALIBERA JR., I. A Review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. **Biological Control**, Orlando, v. 41, p. 1-13, 2007.
- HALL, R.A.; PAPIEROK, B. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. **Parasitology**, Cambridge, v. 84, p. 205-240, 1982.
- HELLE, W.; VAN DE VRIE, B.M. Problems with spider mites. **Outlook on Agriculture**, London, v. 8, p. 119-125, 1974.
- HERRON, G.A.; ROPHAIL, J. Tebufenpyrad (Pyranica®) resistance detected in two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) from apples in Western Australia. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 22, p. 633–641, 1998.
- _____. The stability of tebufenpyrad resistance in two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 26, p. 253–256, 2002.

HINDE, J.P.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. In: SINAPE: Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, 13., 1998, Caxambu. **Anais...** Caxambu: SINAPE, 1998a. 73p.

_____. Overdispersion: models and estimation. **Computation Statistics and Data Analysis**, Voorburg, v. 27, p. 151-170, 1998b.

JACOBSON, R.J.; CHANDLER, D.; FENLON, J.; RUSSEL, K.M. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin with *Amblyseius cucumeris* Oudemans (Acarina: Phytoseiidae) to control *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber plants. **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, v. 11 p. 391-400, 2001.

KHAJEHALI, J.; VAN LEEUWEN, T.; TIRRY, L. Susceptibility of an organophosphate resistant strain of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) to mixtures of bifenazate with organophosphate and carbamate insecticides. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 49, p. 185–192, 2009.

KHALIL, S.K.; SHAH, M.A.; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 13, p. 329-334, 1985.

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.

MORJAN, W.E.; PEDIGO, L.P.; LEWIS, L.C. Fungicidal effects of glyphosate and glyphosate formulations on four species of entomopathogenic fungi. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 31, n. 6, p. 1206-1212, 2002.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 135, p. 370-384, 1972.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E.; TCHUJO, P.T.; MOINO JR., A. Compatibility of Entomopathogenic Fungi with Neonicotinoid Insecticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 263-268, 2001.

NICASTRO, R.L.; SATO, M.E.; SILVA, M.Z. Milbemectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): selection, stability and cross-resistance to abamectin. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 50, p. 231–241, 2010.

OLIVEIRA, C.N.; NEVES P.M.O.J.; KAWAZOE, L.S. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 663-667, 2003.

POPRAWSKI, T.J.; MAJCHROWICZ, I. Effects of herbicides on *in vitro* vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 14, n. 1 p. 81-87, 1995.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 11 jul. 2011.

ROGGIA, S. **Caracterização de fatores determinantes dos aumentos populacionais de ácaros tetraniquídeos em soja**. 2010. 154 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SAMSON, R.A.; ROMBACH, M.C. Biology of the fungi *Verticilium* and *Aschersonia*. In: HUSSEY, N.W.; SCOPES, N. (Ed.). **Biological pest control, the glasshouse experience**. Ithaca: Cornell University Press, 1985. p. 34-42.

SANCES, F.V.; TOSCANO, N.C.; LAPRE, L.F.; OATMAN, E.R.; JOHNSON, M.W. Spider mites can reduce strawberry yields. **California Agriculture**, Oakland, v. 36, p. 15–16, 1982.

SATO, M.E.; MIYATA, T.; SILVA, M.; RAGA, A.; SOUZA FILHO, M.F. Selections for fenpyroximate resistance and susceptibility, and inheritance, cross-resistance and stability of fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Applied Entomology and Zoology**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 293–302, 2004.

SHAH, F.A.; ANSARI, M.A.; WATKINS, J.; PHELPS, Z.; CROSS, J.; BUTT, T.M. Influence of commercial fungicides on the germination, growth and virulence of four species of entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, v. 19, n. 7, p. 743-753, 2009.

SMITH, M.T.; HARDEE, D.D. Influence of fungicides on development of an entomopathogenic fungus (Zygomycetes: Neozygiteaceae) in the cotton aphid (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 25, n. 3, p. 677-687, 1996.

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.

STERK, G.; HASSAN, S.A.; BAILLOD, M.; BAKKER, F.; BIGLER, F.; BLÜMEL, S.; BOGENSCHÜTZ, H.; BOLLER, E.; BROMAND, B.; BRUN, J.; CALIS, J.N.M.; COREMANS-PELSENEER, J.; DUSO, C.; GARRIDO, A.; GROVE, A.; HEIMBACH, U.; HOKKANEN, H.; JACAS, J.; LEWIS, G.; MORETH, L.; POLGAR, L.; ROVERSTI, L.; SAMSOE-PETERSEN, L.; SAUPHANOR, B.; SCHAUB, L.; STÄUBLI, A.; TUSET, J.J.; VAINIO, A.; VAN DE VEIRE, M.; VIGGIANI, G.; VIÑUELA, E.; VOGT, H. Results of the seventh joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group ‘Pesticides and Beneficial Organisms’. **BioControl**, Dordrecht, v. 44, p. 99–117, 1999.

STUMPF, N.; NAUEN, R. Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 94 p. 1577–1583, 2001.

SUH, E.; HYUN KOH, S.; LEE, J.; SHIN, K.; CHO, K. Evaluation of resistance pattern to fenpyroximate and pyridaben in *Tetranychus urticae* collected from greenhouses and apple orchards using lethal concentration-slope relationship. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 38 p. 151–165, 2006.

VAN DE VRIE, M.; MCMURTRY, J.A.; HUFFAKER, C.B. Ecology of tetranychid mites and their natural enemies: a review. III. Biology, ecology, and pest status, and host–plant relations of tetranychids. **Hilgardia**, Oakland, v. 41 p. 387–403, 1972.

WALSH, D.B.; ZALOM, F.G.; SHAW, D.V. Interaction of the two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) with yield of day-neutral strawberries in California. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, p. 678–685, 1998.

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

WATERHOUSE, D.F.; SANDS, D.P.A. **Classical biological control of arthropods in Australia**. Canberra; Melbourne, CSIRO Entomology, 2001. 559p.

WEI, L.; XIU-FANG, W.; CHENG-FA, S. Impact of sixteen chemical pesticides on conidial germination of two entomophthoralean fungi: *Conidiobolus thromboides* and *Pandora nouryi*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, v. 14, n. 7, p. 737-741, 2004.

WEKESA, V.W.; KNAPP, M.; DELALIBERA JR., I. Side-effects of pesticides on the life cycle of the mite pathogenic fungus *Neozygites floridana*. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 46, p. 287–297, 2008.

WELLS, M.L.; MCPHERSON, R.M.; RUBERSON, J.R.; HERZOG, G.A. Effect of fungicide application on activity of *Neozygites fresenii* (Entomophthorales: Neozygitaceae) and cotton aphid (Homoptera: Aphididae) suppression. **Journal of Economical Entomology**, Lanham, v. 93, n. 4, p. 1118-1126, 2000.

YORULMAZ, S.; AY, R. Multiple resistance, detoxifying enzyme activity, and inheritance of abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 33, p. 393-402, 2009.

5 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA PRODUÇÃO EM ESCALA DE *Neozygites floridana*

Resumo

O fungo *Neozygites floridana* é encontrado naturalmente causando epizootias em populações de ácaros tetraniquídeos em campo no Brasil. Por apresentar grande capacidade de regulação natural de ácaros praga e considerando os problemas associados ao uso de acaricidas químicos para o controle destes ácaros, *N. floridana* pode ser uma importante ferramenta de controle. Para ser utilizado no manejo destas pragas, existe a necessidade do desenvolvimento de metodologias de produção do fungo em larga escala e de baixo custo. Como ainda não se conseguiu a produção *in vitro* de *N. floridana* uma opção é a produção *in vivo* na forma de ácaros mumificados pelo fungo em plantas. Este estudo objetivou o desenvolvimento de uma metodologia para a produção em escala do fungo *N. floridana* em ácaros *Tetranychus urticae*. Através de inoculações experimentais foi possível induzir epizootias do fungo em populações de ácaros *T. urticae* em plantas de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) plantadas em vasos em telados. A forma mais prática para a liberação do fungo foi a da liberação de quatro ácaros mumificados por vaso, colocados na parte abaxial de folhas das plantas. Maiores quantidades de ácaros mumificados por *N. floridana* foram produzidos quando as condições climáticas foram caracterizadas por alta umidade relativa e temperaturas amenas $\approx 20^{\circ}\text{C}$ (novembro a abril), sendo que durante o inverno a produção não foi eficiente. O uso de lâmpadas e de ventiladores durante o período noturno ao final da epizootia, quando um grande número de ácaros mumificados era observado nas folhas, foi eficiente em inibir a esporulação do fungo e garantir a qualidade dos ácaros mumificados para o armazenamento. Embora tenha sido possível induzir epizootias do fungo e produzir um grande número de ácaros mumificados, vários estudos ainda são necessários para desenvolver uma metodologia de produção em escala para que seja economicamente viável a sua utilização em campo.

Palavras-chave: Ácaro rajado; Fungos entomopatogênicos; Epizootias; *Tetranychus* spp.; Controle biológico; Produção massal

Abstract

Neozygites floridana is found naturally causing epizootics in spider mite populations in several Brazilian crops. Considering the high capacity of this natural enemy for regulation of pest mites populations and the problems associated with the use of chemical acaricides to control these mites, *N. floridana* may be an important control strategy. To be used in the management of these pests, it is necessary the development of methods for production of this fungus on a large scale at low costs. Since *in vitro* production of *N. floridana* is not possible, one option is the *in vivo* production in the form fungus-killed cadavers on plants. This study aimed to develop a methodology for large scale production of the fungus *N. floridana* in *Tetranychus urticae* mites. Through experimental inoculations in screenhouses, it was possible to induce epizootics of the fungus in populations of *T. urticae* mites on Jack-Bean plants (*Canavalia ensiformis*) planted in pots in screenhouses. The most practical way for release of the fungus was to put four

mummified mites per pot, placed on the abaxial side of the leaves. Larger quantities of mummified mites by *N. floridana* were produced when conditions were characterized by high relative humidity and warm temperatures $\approx 20^{\circ}\text{C}$ (November-April), while during the winter, the production was inefficient. The use of light and fans at night to stop the disease progression, when large numbers of mummified mites were found on leaves, was effective in inhibiting the sporulation and ensure the quality of mummified mites for storage. Although it was possible to induce epizootics of the fungus and produce a large number of mummified mites, more studies are needed to develop a methodology to scale up a economically feasible production system for field use.

Keywords: Twospotted spider mite; Entomopathogens; Epizootics; *Tetranychus* spp.; Biological control; Mass production

5.1 Introdução

O fungo *Neozygites floridana*, pertencente à ordem Entomophthorales (“Zygomycetes”) família Neozygitaceae, é patogênico a diversas espécies de ácaros (KELLER, 1997). Este fungo é capaz de infectar todas as fases de desenvolvimento dos ácaros, exceto o ovo (NEMOTO; AOKI, 1975; SELHIME; MUMA, 1966), com maiores índices de infecção para a fase adulta. *N. floridana*, quando na forma de ácaros mumificados, pode ser armazenado em congelador por muitos anos (WEKESA; DELALIBERA Jr., 2008). O fungo possui uma dispersão rápida no ambiente causando epizootias que dizimam as populações de ácaros praga, até mesmo em densidades altas.

O ácaro rajado, *Tetranychus urticae*, é uma praga cosmopolita, que possui mais de 150 plantas hospedeiras de alguma importância econômica em todo o mundo (JEPPSON; KEIFER; BAKER, 1975). As epizootias causadas por este fungo tem a capacidade de dizimar a população de *T. urticae*, sendo por isso uma ótima alternativa para o controle de pragas dentro dos preceitos do manejo integrado de pragas (MIP). O controle biológico do ácaro rajado no Brasil tem sido realizado pelo uso de ácaros predadores fitoseídeos e dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarrhizium anisopliae*.

O controle biológico é uma das estratégias adotadas no MIP e pode ser feito através da conservação, liberações inoculativas ou inundativas de inimigos naturais eficientes produzidos massalmente. Para o sucesso na produção de inimigos naturais é essencial o conhecimento amplo do comportamento, biologia e ecologia do organismo que será utilizado. Em posse destes conhecimentos iniciam-se os estudos para que este inimigo natural possa ser produzido de forma rápida, com baixo custo e com qualidade.

O Brasil possui um longo histórico de estudos de fungos entomopatogênicos, tendo seu início em 1920 quando *Penicillium anisopliae* (hoje *Metarrhizium anisopliae*) foi indentificado como um controlador natural de insetos (PESTANA, 1923 apud LI et al., 2010). A partir desta constatação, começaram a ser desenvolvidos estudos que tinham como objetivo viabilizar o uso deste agente de controle contra as pragas agrícolas. *Metarrhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são entomopatógenos que possuem uma grande quantidade de estudos científicos que possibilitaram sua produção e utilização em larga escala sendo produzido em muitas biofábricas no Brasil (LI et al., 2009). Outros fungos entomopatogênicos como *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa* vem sendo estudados para determinação de meios de cultura mais baratos e melhores para sua produção em larga escala (MASCARIN; ALVES; LOPES, 2010). Estes fungos podem ser produzidos eficientemente em larga escala utilizando-se meios simplificados e baratos, como por exemplo arroz autoclavado. Já a produção de *N. floridana* ainda não é possível de ser realizada pois este é um fungo extremamente especialista necessitando de meios de cultura ricos em nutrientes (LEITE et al., 2003), que além de muito dispendiosos, não propiciam crescimento satisfatório do fungo para produção em larga escala. Por ser um patógeno de difícil produção em meios de cultura sintéticos, a produção *in vivo* se torna a mais aplicável neste caso.

Assim também ocorreu com os ácaros predadores, que após o desenvolvimento de métodos de criação massal, passaram recentemente a ser utilizados comercialmente no controle de pragas (BELLINI, 2008). A produção destes ácaros depende grandemente das condições ambientais, tendo uma diminuição da produção nos meses mais frios. Outro entrave à utilização de ácaros predadores é sua curta vida de prateleira, pois precisam ser utilizados assim que são produzidos. As espécies de ácaros predadores atualmente comercializadas no Brasil, não são eficientes para elevadas densidades populacionais do ácaro praga (BELLINI¹, informação pessoal).

Os estudos descritos a seguir tiveram como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia viável para a produção em larga escala do fungo *N. floridana* em ácaros *T. urticae*, para que a partir destes estudos fosse possível o início de produções massais para utilização deste fungo entomopatogênico em MIP.

¹ BELLINI, M. R. PROMIP - Comércio, Pesquisa e Desenvolvimento de Agentes Biológicos Ltda.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Produção da planta hospedeira para criação de *T. urticae*

Esta metodologia foi adaptada a partir do método já utilizado na produção de ácaros predadores (BELLINI, 2008). Este método envolve o plantio semanal de plantas de feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis* (L) em telado. Utilizamos vasos de 2L, contendo solo e uma pequena quantidade de substrato vegetal PlantMax® da Eucatex, sendo utilizadas dez sementes/vaso e uma pequena cobertura de areia para evitar muita umidade no solo, diminuindo o surgimento de “fungus gnats” *Bradysia sp.* (Diptera: Sciaridae) praga que ataca as raízes das plantas, acarretando em perda de germinação das sementes, deficiência no crescimento e aparecimento de doenças. Após aproximadamente 15 dias (em condições favoráveis $\approx 25^{\circ}\text{C}$) realizamos a infestação das plantas com o ácaro rajado. As plantas foram irrigadas diariamente tendo uma manutenção semanal, com retirada de plantas daninhas e limpeza dos entornos dos telados, para garantir a qualidade das colônias dos ácaros.

5.2.2 Criação de *Tetranychus urticae*

As criações de *T. urticae* foram iniciadas com ácaros provenientes das criações mantidas sobre feijão-de-porco no Laboratório de Acarologia da ESALQ. A infestação foi realizada por meio do corte das folhas das plantas que apresentavam alta infestação por ácaros, e estas folhas foram colocadas sobre as plantas novas e fixadas com alfinete. Após dois dias, as folhas “velhas” foram retiradas.

5.2.3 Produção de ácaros mumificados em laboratório

O isolado utilizado neste estudo foi o ESALQ1420 (Piracicaba-SP) proveniente de *T. urticae* em feijão de porco, armazenado na forma de ácaros mumificados a -10°C em recipientes hermeticamente fechados contendo sílica gel e sobre este foi acondicionada uma camada de algodão. Os ácaros mumificados foram utilizados na produção de novos ácaros mumificados, sendo estes utilizados posteriormente na produção massal.

Para infectar *T. urticae* com *N. floridana*, ácaros mumificados foram colocados individualmente em discos foliares de feijão-de-porco (1,2 cm de diâmetro). Os discos foliares com os ácaros mumificados foram colocados sobre uma esponja saturada com água destilada dentro de placas de Petri (9 cm diâmetro). Estas placas foram mantidas fechadas por 24 h no escuro a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para a esporulação. A esporulação foi confirmada através da visualização dos

capiloconídios utilizando-se um microscópio óptico antes de introduzir 15 fêmeas de *T. urticae* nos discos foliares de feijão de porco. Os ácaros foram mantidos nestes discos por 24h (DELALIBERA; HAJEK, 2004) e então transferidos para discos foliares novos e maiores (2,2 cm em diâmetro) colocados em arenas (3 x 1,5 cm diâmetro x altura) fechada na sua extremidade superior por uma tampa própria do recipiente contendo uma abertura de 0,5 cm² fechada por “silk screen”, que possibilitava uma melhor troca gasosa, evitando um ambiente com alta umidade relativa e não possibilitando a esporulação dos ácaros mumificados formados, o fundo de cada recipiente foi forrado com algodão hidrófilo pouco umedecido com água destilada, apenas o suficiente para manter o disco de folha vivo. Estas unidades experimentais eram mantidas sob luz constante e baixa umidade relativa para evitar a esporulação dos ácaros mumificados formados. Os discos foliares foram verificados diariamente durante sete dias em busca de novos ácaros mumificados, sendo estes armazenados da maneira previamente citada.

Figura 5.1 - *Tetranychus urticae* mumificado pelo *Neozygites floridana* (Isolado ESALQ1420)

5.2.4 Testes de metodologia para produção massal

Para a produção de ácaros mumificados por *N. floridana* em larga escala, plantas de feijão de porco foram plantadas em telados. Os experimentos tiveram início em Janeiro de 2010. Foram adicionados cem vasos por telado, distribuídos em dois grupos de cinquenta vasos de cada lado do telado, cada vaso continha 10 sementes de feijão de porco. As plantas foram irrigadas manualmente na zona radicular e não houve aplicação de agrotóxicos. Foram instaladas lâmpadas incandescentes de 200W nos telados para evitar a ocorrência de esporulação dos ácaros mumificados formados, pois a luz inibe a esporulação de *Neozygites* (ODUOR, 1996). Duas semanas após o plantio, as plantas de feijão de porco foram infestadas manualmente por ácaros

sadios (sem a presença do fungo) das colônias de manutenção mantidas em laboratório. Após cerca de 10 dias realizamos a inoculação do fungo. Este procedimento foi antecedido pela amostragem de um ácaro proveniente de uma folha de cada vaso, seguido de posterior montagem em meio de Hoyer e azul de algodão, para a checagem da ocorrência natural do fungo antes da inoculação. Após a checagem, foi realizada uma inoculação piloto de *N. floridana* no período entre Fevereiro e Abril utilizando dois diferentes métodos de liberação:

Tratamento 1: Transferência direta de quatro ácaros mumificados por vaso, transferindo-os próximo a nervura central das folhas, utilizando um pincel.

Tratamento 2: Liberação do fungo através de 20 ácaros fêmeas por vaso infectados em laboratório usando metodologia descrita por Delalibera e Hajek (2004).

Nas liberações seguintes, utilizamos três tratamentos: Na primeira e segunda liberação colocamos quatro ácaros mumificados por vaso diretamente na parte abaxial das folhas de feijão de porco, sendo este procedimento realizado dentro do telado, totalizando 50 vasos. Concomitantemente, liberamos discos foliares contendo aproximadamente vinte ácaros vivos infectados pelo fungo por vaso nos outros 50 vasos restantes. Na terceira e quarta liberação, testamos se a densidade de ácaros mumificados liberados influenciaria na infecção de novos ácaros. Para tanto foram colocados oito ácaros mumificados diretamente na parte abaxial das folhas das plantas em 50 vasos, concomitantemente à inserção de quatro ácaros mumificados por vaso no restante dos 50 vasos. Na quinta liberação foi testado se o aumento da umidade através do fechamento dos telados por lonas plásticas translúcidas poderia aumentar a taxa de infecção. Neste caso, um telado fechado foi comparado a outro telado aberto, sendo mantidos os mesmos tratamentos de quatro e oito ácaros mumificados por planta da terceira e quarta liberação.

As avaliações foram iniciadas quatro dias após a liberação do fungo; estas consistiam na determinação da porcentagem de ácaros contaminados e/ou infectados pelo fungo *N. floridana* através da observação ao microscópio de contraste de luz. Considerou-se ácaro contaminado o ácaro que apresenta capiloconídio aderido ao corpo, e infecção a presença de corpos hifais dentro do ácaro.

A avaliação dos ácaros mumificados produzidos foi feita através da amostragem de 30 folhas coletadas aleatoriamente para avaliação em laboratório. Após ser detectado taxa de contaminação igual ou superior a 20%, o monitoramento passou a ser feito diretamente nos telados utilizando lupas de bolso (aumento de 20x) para a constatação de ácaros mumificados e

através da montagem de ácaros a cada 3 ou 4 dias até atingir 50% de contaminação. Quando constatadas grandes quantidades de ácaros mumificados, as folhas foram destacadas da planta e colocadas em painéis feitos de uma malha de plástico em ambos os lados e transferidos para uma sala com temperatura controlada (entre 15 e 18°C) contendo um desumidificador (Desidrat, Tecnal) para acelerar o processo de secagem. As folhas secas contendo os ácaros mumificados foram armazenadas, em recipientes plásticos com sílica gel e uma camada de algodão, em freezer com temperaturas entre -12 e -18°C sendo estes reservados ao uso em testes de liberação em campo. Para a retirada dos ácaros mumificados das folhas secas, utilizamos bombas de vácuo com mangueiras adaptadas e conectadas a pontas de micropipetas contendo algodão entre a mangueira e a ponteira, permitindo a passagem do ar, mas servindo como barreira para retenção dos ácaros aspirados. Após a coleta dos ácaros mumificados das folhas estes foram armazenados em recipientes plásticos contendo sílica gel e algodão, a -20°C.

5.3 Resultados e Discussão

Nas cinco liberações do fungo *N. floridana* realizadas em telados no período de fevereiro a novembro de 2010, houve um progresso em relação à melhor forma de se liberar o fungo, com menor custo e com melhor produtividade.

A primeira liberação realizada em fevereiro de 2010, foi realizada com intuito de descobrir as principais dificuldades na produção. Após 10 dias da liberação do fungo, foram coletados por volta de 22 ácaros mumificados por folha. Entretanto, estes ácaros mumificados apresentaram baixa qualidade, obtendo taxas de esporulação menores que 30%. Observamos que um número maior de ácaros (aproximadamente 30 por folha) nas mesmas folhas onde coletamos os ácaros mumificados apresentava o fungo esporulado ou com fungos saprófitas desenvolvendo sobre o cadáver esporulado, o que geralmente é observado após a esporulação por *Neozygites*. Também constatamos que não havia quase nenhum ácaro vivo nas folhas, evidenciando a fase final de uma epizootia. Como não foram feitas avaliações periódicas logo após a liberação, os ácaros mumificados produzidos permaneceram em condição ambiente dentro dos telados por muito tempo, perderam por esta razão seu potencial de esporulação e com isto a qualidade, para armazenamento e uso em liberações futuras. Outro fator que pode explicar isto foi à ocorrência de um período muito chuvoso durante a coleta dos ácaros mumificados, o que pode ter estimulado a esporulação dos mesmos, apesar da utilização de luz durante o período de coleta dos ácaros mumificados. Isto mostrou que o uso exclusivo da luz parece não ser o fator limitante para

esporulação do fungo. Por este ter sido um teste piloto, os parâmetros de temperatura e umidade não foram medidos nem controlados.

Diante dos problemas ocorridos durante a primeira liberação e para reduzir às condições favoráveis a esporulação do fungo, no final da epizootia foram colocadas bancadas de cimento que deixavam as plantas a aproximadamente 40 cm do chão do telado e foram colocados ventiladores para reduzir a umidade relativa do ar e evitar epizootias naturais pelo fungo.

Na segunda liberação, o fungo foi inoculado na forma de ácaros contaminados e de ácaros mumificados colocados diretamente na parte abaxial da folha. Ácaros infectados foram observados pela primeira vez após 7 e 8 dias apenas na área onde foram liberados ácaros mumificados. Na área onde foram liberados ácaros infectados o fungo somente foi observado após 12 dias. Observou-se uma alta taxa de contaminação após 14 dias da liberação do fungo, atingindo aproximadamente 50% dos ácaros onde o fungo foi liberado na forma de ácaros infectados. A partir de então ligamos as luzes para inibir a esporulação do fungo permitindo, entretanto que os ácaros infectados se tornassem mumificados. Porém, verificamos que a liberação de ácaros mumificados e ácaros contaminados foram feitas tardiamente, com isso os danos nas plantas devido à alta infestação de ácaros foi muito alto. As plantas morreram devido ao ataque dos ácaros antes da formação de grandes quantidades de ácaros mumificados, dificultando a coleta dos ácaros mumificados nas folhas secas e retorcidas.

Em geral, a taxa de contaminação pelo fungo foi maior que a taxa de infecção. A taxa de infecção apresentou uma tendência de aumento com o passar do tempo, tendo assim mais ácaros mortos pelo fungo (Figura 5.2). No entanto, a porcentagem de infecção tende a se reduzir na fase pós-epizootica, período este um pouco anterior à coleta das folhas para armazenamento. Aparentemente, o percentual de contaminação e infecção não diferiu entre os dois tratamentos (1: liberação de ácaros mumificados e 2: liberação de ácaros contaminados). No tratamento 1, foram coletados em média 38,4 ácaros vivos, 21,4 ácaros mumificados e 36,3 cadáveres com o fungo esporulado por folha, enquanto que para o tratamento 2 foram encontrados 34,5 ácaros vivos, 37,4 ácaros mumificados e 21,6 cadáveres com o fungo esporulado por folha. Estes ácaros mumificados apresentaram melhor qualidade que a primeira liberação do fungo em telado (teste piloto), apresentando taxa de esporulação de aproximadamente 50%, no entanto a coleta desses ácaros mumificados foi dificultada devido ao enrugamento e secagem das folhas, sendo necessário muito tempo para a realização da coleta.

Figura 5.2 - Taxa de contaminação/infecção pelo fungo *N. floridana*, Umidade relativa (%) e temperatura (°C) referentes à segunda liberação do fungo em telado, nos dois tratamentos: Com liberação de 20 ácaros contaminados (AC) e com liberação de quatro ácaros mumificados (4M) por vaso

Na terceira liberação realizada no período de 10/06 a 30/06, em que foram liberados quatro e oito ácaros mumificados por vaso, não ocorreu epizootia. Realizamos os mesmo procedimentos da segunda liberação. Em todas as avaliações realizadas não foram encontrados ácaros contaminados e/ou infectados pelo fungo. Muitos fatores podem estar relacionados ao insucesso desta tentativa, podendo estes fatores ser fatores ambientais (tempo frio e seco característico do inverno nesta região) como apresentado na figura 5.3. Diferentemente das condições climáticas da liberação anterior na terceira liberação a umidade raramente atingiu $UR > 95\%$ e as temperaturas mínimas (noturnas) foram sempre inferiores a 15°C .

Figura 5.3 - Umidade relativa (%) e temperatura (°C) durante o período da terceira liberação do fungo em telado

Figura 5.4 - Taxa de contaminação/infecção pelo fungo *Neozygites floridana* Umidade relativa (%) e temperatura (°C) durante a quarta liberação do fungo em telado, nos dois tratamentos: Com liberação de quatro ácaros mumificados (4M) e com liberação de oito ácaros mumificados (8M) por vaso

Na quarta liberação, realizada no período de 15/07 a 30/07 observou-se ácaros contaminados pelo fungo após dez dias da liberação de oito ácaros mumificados e quatorze dias

para o tratamento com quatro ácaros mumificados (Figuras 5.4). Entretanto, as inoculações não foram suficientes para causar uma epizootia. Assim como discutido para a terceira liberação, é provavelmente que as baixas temperaturas noturnas e os curtos períodos com umidade relativa acima de 95% dentro do telado não tenham favorecido o desenvolvimento e multiplicação do fungo. Neste período foram ainda observadas temperaturas máximas muito altas, próximas a 40°C, que podem afetar negativamente o fungo.

Na quinta liberação (03/11 a 22/11) foram utilizados dois telados, sendo que em um destes foi utilizado o sistema descrito nas liberações anteriores e o outro telado foi totalmente vedado com uma lona plastica translúcida, e uma mangueira era deixada ligada até o enxarcamento do solo para aumentar a umidade relativa do ar. Na liberação do fungo em telado aberto não ocorreu epizootia, não sendo encontrados ácaros contaminados ou infectados pelo fungo, enquanto que no telado vedado ocorreu uma epizootia. Comparativamente, as condições climáticas no telado fechado foram caracterizadas por umidades mais altas (Figuras 5.5 e 5.6). No telado vedado, os primeiros ácaros contaminados foram observados 9 dias após a inoculação de quatro e oito ácaros mumificados por vaso, respectivamente. O uso de quatro ventiladores e dois desumidificadores, no final da epizootia possibilitou a manutenção da umidade dentro do telado abaixo dos 50%, mesmo quando ocorria chuvas de fora do telado.

Figura 5.5 - Umidade relativa do ar (%) e temperatura (°C) durante a quinta liberação do fungo em telado, aberto nos dois tratamentos: Com liberação de quatro ácaros mumificados e com liberação de oito ácaros mumificados por vaso

Figura 5.6 - Taxa de contaminação/infecção pelo fungo *Neozygites floridana*, em telado fechado com lona plástica translúcida, umidades relativa do ar (%) e temperatura (°C) durante a quinta liberação do fungo *N. floridana*, nos dois tratamentos: com liberação de quatro ácaros mumificados (4M) e com liberação de oito ácaros mumificados (8M) por vaso

No telado vedado foram encontradas em média $6 \pm 0,6$ ácaros mumificados por folha e $8 \pm 0,7$ ácaros sadios por folha para o tratamento com quatro ácaros mumificados por vaso e $7 \pm 0,5$ ácaros mumificados por vaso e $8 \pm 0,4$ ácaros sadios por folha para o tratamento com oito ácaros mumificados por vaso. Apesar de o número médio de ácaros mumificados ter sido menor que na primeira (piloto) e segunda liberações, nesta os ácaros mumificados eram de melhor qualidade, apresentado taxas de esporulação acima de 60% e as plantas não apresentavam alto nível de dano, facilitando a coleta dos ácaros mumificados. O reduzido número de ácaros mumificados está relacionado à baixa densidade populacional da praga, resultante da rápida ação do fungo na regulação populacional dos ácaros. A melhor qualidade dos ácaros mumificados pode estar associada ao fato de que as folhas foram rapidamente coletadas e secadas, diferentemente das liberações anteriores onde os ácaros mumificados foram expostos por longos períodos a radiação luminosa, umidades e temperaturas não adequadas para preservação dentro dos telados. Nos tratamentos utilizando quatro ou oito ácaros mumificados por vaso, não se constatou diferença na produção de ácaros mumificados, indicando que a menor quantidade utilizada é eficiente para induzir as epizootias com gasto menor de ácaros mumificados.

Os resultados acima demonstram que a produção em larga escala de *N. floridana in vivo* é um processo viável, já que foram obtidas epizootias em telados que possibilitaram a produção de grande quantidade de inóculo do fungo. No entanto, estes mesmos resultados evidenciam uma grande dependência do fungo aos fatores ambientais sendo necessários mais ajustes na metodologia de produção aqui apresentada.

Estes entraves no sistema de produção em larga escala já eram esperados, visto que estudos realizados em laboratório e em pequena escala evidenciavam a grande influência dos fatores ambientais no ciclo de vida de *Neozygites*. Smitley et al. (1986), Oduor et al. (1996) e Delalibera et al. (2006), já haviam apresentado resultados sobre o impacto da temperatura e umidade na esporulação e a grande dependência de umidades relativas altas, próximo a saturação, na conidiogênese deste fungo. Como os trabalhos acima foram conduzidos em laboratório e não em plantas acreditava-se que a dependência de alta UR fosse menor na superfície abaxial da folha por prover um microclima mais favorável do que as condições encontradas no ambiente (BOULARD et al., 2002, 2004).

Os resultados indicam que o período de inverno na região de Piracicaba não foi adequado para induzir epizootias de *N. floridana* em *T. urticae*. Diferentemente do observado neste estudo,

Duarte et al. (2009) observaram epizootias de *N. floridana* em *T. evansi* em plantas de tomate e “Maria Preta” em condições extremas no inverno, em que foram registradas temperaturas entre 7°C e 51°C, não sendo atingidos pontos de saturação de umidade neste período, tendo valores de umidade oscilado entre 46 e 96% de UR.

Os principais problemas encontrados no sistema de produção adotado acima refere-se à dificuldade de indução de epizootias no inverno e o controle das condições climáticas nos telados no final da epizootia quando são necessários baixos níveis de umidade relativa para evitar que os ácaros mumificados formados esporulem. Como solução prática para estes problemas, existem pelo menos duas alternativas: 1) Utilizar estufas com temperatura, umidade e luminosidade controladas (tornando a produção mais eficiente e gerando ácaros mumificados de melhor qualidade, no entanto isto onera a produção) ou 2) Produção do fungo apenas nos meses em que se encontram as melhores condições para o desenvolvimento de *N. floridana*, sendo que isto ocorre aproximadamente entre os meses de novembro a abril na região de Piracicaba-SP. Este período deve variar para outras regiões do Brasil, dependendo das condições climáticas locais, sendo mais favoráveis em regiões com maiores períodos de alta umidade relativa e com temperaturas em torno de 20 graus no período noturno (18h às 8h). Após a produção, torna-se possível o armazenamento destes fungos em freezers até que seja necessária sua utilização em campo.

A descoberta de que é possível a liberação direta de ácaros mumificados ao invés de liberação de ácaros contaminados pelo fungo *N. floridana* é de muito interesse, visto que a liberação de ácaros mumificados é muito menos trabalhosa, diminuindo custos com mão-de-obra e tempo de produção de ácaros mumificados. A metodologia de contaminação de ácaros em laboratório para produção ou liberação em campo [utilizado, por exemplo, para liberação de *N. tanajoae* na África para controle biológico clássico do ácaro verde da mandioca (HOUNTONDJI et al., 2002; HOUNTONDJI, 2008)] exige o manuseio de milhares de ácaros, individualmente com o auxílio de um pincel, demandando muito tempo na sua execução.

Com base nos resultados encontrados no desenvolvimento da metodologia de produção de *N. floridana*, é possível inferir que para uma boa utilização deste fungo em campo ou mesmo para sua produção em telado, são necessárias condições ambientais específicas como alta umidade (>90%) por períodos consecutivos de algumas horas, ausência de luz e temperaturas amenas (próximas dos 20°C). Se tais requisitos forem cumpridos pode ser viável a utilização de

N. floridana, tanto a produção quanto a utilização deste fungo em liberações inoculativas principalmente em cultivos protegidos, como o caso da cultura do morangueiro, que devido ao seu sistema de produção este fungo possui grande possibilidade de ser introduzido com sucesso. Entretanto, vários estudos ainda são necessários para desenvolver uma metodologia de produção em escala para que seja economicamente viável a sua utilização em campo.

Referências

BELLINI, M.R. **Ecologia de ácaros plantícolas e sua importância no manejo de *Tetranychus urticae* (Acari, Tetranychidae) em plantas ornamentais**. 2008. 233 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BOULARD, T.; MERMIER, M.; JACQUES FARGUES, J.; SMITS, N.; ROUGIER, M.; ROY, J.C. Tomato leaf boundary layer climate: implications for microbiological whitefly control in greenhouses. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 110, p. 159–176, 2002.

BOULARD, T.; FATNASSI, H.; ROY, J.C.; LAGIER, J.; FARGUES, J.; SMITS, N.; ROUGIER, M.; JEANNEQUIN, B. Effect of greenhouse ventilation on humidity of inside air and in leaf boundary-layer. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v.125, p. 225–239, 2004.

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.; DEMÉTRIO, C.G.B.; MANLY, B.F.J.; HAJEK, A.E. 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.

DUARTE, V.S.; SILVA, R.A.; WEKESA, V.W.; DELALIBERA JR., I. Impact of natural epizootics of the fungal pathogen *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) on population dynamics of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in tomato and nightshade. **Biological Control**, Orlando, v. 51, n. 1, p. 81-90, 2009.

HOUNTONDJI, F.C.C. Lessons from interactions within the cassava green mite fungal pathogen *Neozygites tanajoae* system and prospects for microbial control using Entomophthorales. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 46, p. 195-210, 2008.

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.

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

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.

LEITE, L.; ALVES, S.; BATISTA FILHO, A.; ROBERTS, D. Effect of salts, vitamins, sugars and nitrogen sources on the growth of three genera of Entomophthorales: *Batkoa*, *Furia*, and *Neozygites*. **Mycological Research**, Oxford, v. 107, n. 7, p. 872-878, 2003.

LI, Z.; ALVES, S.B.; ROBERTS, D.W.; FANA, M.; DELALIBERA JR., I.; TANGD, J.; LOPES, R.B.; FARIA, M.; RANGEL, D.E.N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, Oxfordshire, v. 20, n. 2, p. 117-136, 2010.

MASCARIN, G.M.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 4, p.753-761, 2010.

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.

ODUOR, G.; MORAES, G.J. de; VAN DER GEEST, L.P.S.; YANINEK, J. Production and germination of primary conidia of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) under constant temperatures, humidities, and photoperiods. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 68, p. 213-222, 1996.

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

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.

WEKESA, V.W.; KNAPP, M.; DELALIBERA JR., I. Side-effects of pesticides on the life cycle of the mite pathogenic fungus *Neozygites floridana*. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 46, p. 287-297, 2008.