**PRODUÇÃO, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
E EPIZOOTIOLOGIA DE *Neozygites* sp.,
PATÓGENO DE *Mononychellus tanajoa***

ITALO DELALIBERA JÚNIOR

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Dr. GILBERTO JOSÉ DE MORAES

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

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Delalibera Júnior, Italo

Produção, distribuição geográfica e epizootiologia de *Neozygites* sp., patógeno de *Mononychellus tanajoa* / Italo Delalibera Júnior. - Piracicaba, 1996.
93p. : li.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Ácaro verde na mandioca - Controle biológico
2. Fungo para controle biológico
3. Mandioca - Praga I. Título

CDD 632.96
589.2

**PRODUÇÃO, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
E EPIZOOTIOLOGIA DE *Neozygites* sp.,
PATÓGENO DE *Mononychellus tanajoa***

Italo Delalibera Júnior

Aprovada em: 12/03/96

Comissão julgadora:

Gilberto José de Moraes - EMBRAPA/CNPMA

Sérgio Batista Alves - ESALQ/USP

Daniel R. Sosa Gomez - EMBRAPA/CNPSo

Dr. Gilberto José de Moraes
Orientador

Aos meus pais, Italo e Marlene

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Gilberto José de Moraes (EMBRAPA/CNPMA) e Sérgio Batista Alves (ESALQ/USP) pelas orientações e apoio na elaboração deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP), pelos valiosos ensinamentos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical (EMBRAPA/CNPMT) e ao Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) pelo apoio técnico e financeiro respectivamente.

Ao Dr. Richard A. Humber (USDA, Agricultural Research Service, Ithaca, New York) pelos ensinamentos e colaboração, especialmente nos estudos de produção “in vitro” de *Neozygites*.

Ao técnico agrícola Corifeu Francisco Buzetti e ao laboratorista Adriano de Medeiros Souza, pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos funcionários do convênio AESA-IITA, Carlos Alberto Domingues da Silva, Marco Antônio Tamai, Adailson Cardoso de Luna, Valter Ferreira da Silva, Rosicleide Severo Oliveira e Edinaldo Felipe Souza, pela valiosa colaboração.

À bibliotecária Kátia Maria de Andrade Ferraz, pelo auxílio na correção das referências.

Aos amigos Alcides Moino Júnior, Cinara F. G. Morales e José Maurício Simões Bento, pelo apoio e atenção dispensada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 - A cultura da mandioca	4
2.2 - Importância do ácaro verde da mandioca	5
2.3 - Controle de <i>Mononychellus tanajoa</i>	6
2.4 - Distribuição de <i>Neozygites</i> sp.	7
2.4 - Produção de Entomophthorales	8
2.4.1 - Produção "in vivo"	8
2.4.2 - Produção "in vitro"	9
2.5 - Epizootiologia de Entomophthorales	10
3 - MATERIAL E MÉTODOS	14

3.1 - Distribuição geográfica de <i>Neozygites</i> sp. no Nordeste do Brasil	14
3.2 - Produção de <i>Neozygites</i> sp.	15
3.2.1 - Produção "in vivo"	15
3.2.1.1 - Manutenção da criação de <i>M. tanajoa</i>	16
3.2.1.2 - Desenvolvimento de um método para produção "in vivo" ..	16
3.2.2 - Isolamento e produção "in vitro"	23
3.3 - Epizootiologia	25
3.3.1 - Variabilidade temporal da incidência inicial de <i>Neozygites</i> sp. em campos de mandioca.	25
3.3.2 - Disseminação de <i>Neozygites</i> sp. dentro do campo de mandioca	28
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 - Distribuição geográfica de <i>Neozygites</i> sp. no Nordeste do Brasil	29
4.2 - Produção de <i>Neozygites</i> sp.	33
4.2.1 - Desenvolvimento de um método para produção "in vivo"	33
4.2.2 - Isolamento e produção "in vitro"	46
4.3 - Epizootiologia	51
4.3.1 - Variabilidade temporal da incidência inicial de <i>Neozygites</i> sp. em campos de mandioca	51
4.3.2 - Disseminação de <i>Neozygites</i> sp. dentro do campo de mandioca	66
5 - CONCLUSÕES	72
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
7 - APÊNDICE	89

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. Localização dos campos avaliados no estudo de variabilidade temporal da incidência inicial de <i>Neozygites</i> sp. no município de Piritiba - Bahia, 1994.	27
Figura 2. Localização dos campos amostrados para determinação da distribuição de <i>Neozygites</i> sp. no Nordeste do Brasil no período de abril de 1993 a junho de 1994.	30
Figura 3. Esquema do método de produção “in vivo” de <i>Neozygites</i> sp. em <i>Mononychellus tanajoa</i>	44
Figura 4. Crescimento “in vitro” de <i>Neozygites</i> sp.. A - Início do crescimento dos corpos hifais, com diferentes tamanhos. B - Corpos hifais após 6 horas em meio de cultura. C - Aglomerado de corpos hifais em crescimento. D - Forma amebóide de crescimento.	47
Figura 5. Crescimento “in vitro” de <i>Neozygites</i> sp.. A - Formação de vacúolo na região central de um protoplasto em desenvolvimento. B - Divisão do protoplasto. C - Formação de conídio primário. D - Conídio primário formando vários capilares e capiloconídios.	48
Figura 6. Dinâmica populacional de <i>Mononychellus tanajoa</i> e fitoseídeos e níveis de infecção por <i>Neozygites</i> sp. nos campos 1 a 4 em Piritiba - Bahia, 1994 (densidade 1 = 1 a 24, 2 = 25 a 200 e 3 = >200 ácaros por folha).	52

Figura 7.	Dinâmica populacional de <i>Mononychellus tanajoa</i> e fitoseídeos e níveis de infecção por <i>Neozygites</i> sp. nos campos 5 a 8 em Piritiba - Bahia, 1994 (densidade 1 = 1 a 24, 2 = 25 a 200 e 3 = >200 ácaros por folha).	53
Figura 8.	Precipitação total e umidade relativa e temperatura médias entre cada amostragem e a amostragem anterior em Piritiba - Bahia, 1994.	56
Figura 9.	Níveis de <i>Mononychellus tanajoa</i> com esporos de resistência de <i>Neozygites</i> sp. em oito campos de mandioca e umidade relativa e temperatura entre 24 a 96 horas antes de cada amostragem em Piritiba - Bahia, 1994 (densidade 1 = 1 a 24, 2 = 25 a 200 e 3 = >200 ácaros por folha).	64
Figura 10.	Disseminação de <i>Neozygites</i> sp.. Porcentagem da área com <i>Neozygites</i> sp. a cada amostragem e densidade populacional de <i>Mononychellus tanajoa</i> nos campos 7 e 9 em Piritiba, Bahia - 1994 (densidade 1 = 1 a 24, 2 = 25 a 200 e 3 = >200 ácaros por folha).	67
Figura 11.	Disseminação de <i>Neozygites</i> sp. no campo 7 em Piritiba - Bahia, 1994.	69
Figura 12.	Disseminação de <i>Neozygites</i> sp. no campo 9 em Piritiba - Bahia, 1994.	70
Figura 13.	Frequência acumulada da constatação de <i>Neozygites</i> sp. em parcelas com diferentes densidades de <i>Mononychellus tanajoa</i> no campo 9 em Piritiba - Bahia, 1994.	71

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1. Produção de <i>Neozygites</i> sp. em diferentes unidades de multiplicação. Relação <i>Mononychellus tanajoa</i> sadios/mumificados utilizada = 25/1 (n = 4, 24 ± 1°C, 12 horas de fotofase e 70 ± 10% de umidade relativa, exceto na escotofase dos dois primeiros dias = 100%).	33
Tabela 2. Influência da densidade de <i>Mononychellus tanajoa</i> na infecção por <i>Neozygites</i> sp. (n = 20, 24 ± 1°C, 100% de umidade relativa nas 12 horas de escotofase e 70 ± 10% de umidade na fotofase).	36
Tabela 3. Efeito da umidade relativa durante a escotofase, na germinação de capiloconídios em <i>Mononychellus tanajoa</i> (n= 10, 24 ± 1°C, 70 ± 10% de umidade relativa durante as 12 horas de fotofase).	38
Tabela 4. Efeito do fotoperíodo na colonização de <i>Neozygites</i> sp. em <i>Mononychellus tanajoa</i> , a partir do quarto dia do início da exposição aos conídios produzidos por um ácaro mumificado (n = 50, 24 ± 1°C, 70 ± 10% de umidade relativa).	40
Tabela 5. Efeito do fotoperíodo na colonização de <i>Neozygites</i> sp. em <i>Mononychellus tanajoa</i> , a partir do segundo dia do início da exposição aos conídios produzidos por dois ácaros mumificados (n = 5, 24 ± 1°C, 70 ± 10% umidade relativa).	40
Tabela 6. Número de conídios primários produzidos por <i>Neozygites</i> sp. para <i>Mononychellus tanajoa</i> infectados em laboratório (n = 70) e coletados em campo (n = 50) (24 ± 1°C, 100% de umidade relativa e 0 horas de fotofase durante 16 horas).	42

Tabela 7.	Produção diária de <i>Neozygites</i> sp. em cada unidade de multiplicação contendo inicialmente um <i>Mononychellus tanajoa</i> mumificado e 25 fêmeas adultas sadias (n= 100).	43
Tabela 8.	Níveis de infecção de <i>Neozygites</i> sp. em <i>Mononychellus tanajoa</i> localizados nas folhas apicais e medianas na primeira amostragem onde o patógeno foi constatado em 8 campos de mandioca em Piritiba - Bahia, 1994.	54
Tabela 9.	Infecção de <i>Neozygites</i> sp. e densidade (médias $\pm$ desvios padrão) de <i>Mononychellus tanajoa</i> durante uma epizootia do patógeno em 8 campos de mandioca na região de Piritiba - Bahia, 1994.	62

PRODUÇÃO, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIZOOTIOLOGIA DE
Neozygites sp., PATÓGENO DE *Mononychellus tanajoa*

Autor: Italo Delalibera Júnior

Orientador: Dr. Gilberto José de Moraes

RESUMO

Neozygites sp. é considerado como um dos mais importantes inimigos naturais do ácaro verde da mandioca, *Mononychellus tanajoa* (Bondar), no Nordeste do Brasil. A viabilização do uso deste patógeno em campo requer o conhecimento da sua distribuição geográfica, de métodos de produção “in vivo” e “in vitro” e o entendimento das relações patógeno-hospedeiro, abordados neste estudo. *Neozygites* sp. foi constatado nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe. Ácaros infectados pelo fungo foram observados em 31,5% dos campos avaliados, predominantemente nas coletas realizadas durante os períodos úmidos, embora também tenham sido constatados ocasionalmente durante épocas secas. Estabeleceu-se um método para produção de *Neozygites* sp. utilizando-se como unidades de multiplicação discos de folha de mandioca onde foi realizado o contágio entre ácaros mumificados pelo patógeno e ácaros sadios. Crescimento de protoplastos de *Neozygites* sp. foi obtido em Meio de Grace + 0,35g/l de NaHCO₃ e no Meio 199 (com sais de Hank) + 26,68g/l de sacarose + 2,2g/l de NaHCO₃, quando foram enriquecidos com soro fetal bovino, às proporções de 5 ou 8% do volume total. A ocorrência do patógeno foi estudada no período de março a outubro de 1994 em 9 campos de mandioca em Piritiba - Bahia para o conhecimento de detalhes da epizootia. O período entre o início do surgimento de ácaros infectados em um dos campos, até à constatação de ácaros infectados em todos os campos durante a epizootia foi de 23

dias. A determinação da existência de uma variabilidade espaço-temporal na ocorrência inicial de *Neozygites* sp. em campos de mandioca, indica a conveniência da transferência do patógeno de um campo a outro para antecipar o início de epizootias em campos diferentes. Reduções nas populações de *M. tanajoa* estiveram correlacionadas com incrementos nos níveis de infecção por *Neozygites* sp. durante os meses de junho e julho. As epizootias foram caracterizadas por um curto espaço de tempo entre o surgimento do patógeno e a rápida redução nas altas densidades populacionais de *M. tanajoa*. Na fase pós-epizootica a densidade de *M. tanajoa* permaneceu por algum tempo em níveis muito reduzidos, diminuindo conseqüentemente a incidência do patógeno em campo. O surgimento de novos casos da doença foi proporcionalmente maior nas plantas com maior densidade populacional de *M. tanajoa* dentro de um mesmo campo. Ácaros infectados foram observados em maior proporção nas folhas apicais. Durante os meses de junho e julho ocorreu substancial formação de esporos de resistência. É possível que esta fase do ciclo biológico seja a principal forma em que o patógeno transponha os períodos de seca no Nordeste do Brasil.

PRODUCTION, GEOGRAPHIC DISTRIBUTION AND EPIZOOTIOLOGY OF
Neozygites sp., PATHOGEN OF *Mononychellus tanajoa*

Author: Italo Delalibera Junior

Adviser: Dr. Gilberto J. de Moraes

SUMMARY

Neozygites sp. is considered one of the most important natural enemies of the cassava green mite (CGM), *Mononychellus tanajoa*, in northeastern Brazil. The use of this pathogen in the field requires knowledge of its geographic distribution, methods for production in vitro and in vivo and understanding host/pathogen interactions. *Neozygites* sp. has been found in the Brazilian states of Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, and Sergipe. CGM infected by the fungus were observed in 31.5% of examined fields, predominantly during wet periods, although they also were recorded occasionally during the dry season. A method was established for in vivo production of *Neozygites* sp. using cassava leaf discs as multiplication units. Healthy CGM were inoculated by being placed on the leaf discs with a single mummified CGM. Growth of *Neozygites* sp. protoplasts was obtained in Grace's medium + 0.35g/l NaHCO₃ and in Medium 199 (with Hank's salts) + 26.68g/l sucrose + 2.2g/l NaHCO₃, enriched with fetal bovine serum at 5% or 8% of total volume. Epizootics were studied from March through October 1994 in nine cassava fields at Piritiba, Bahia. The time between appearance of

infected CGM in one field and their appearance in all fields during the epizootic was 23 days. The observed spatial-temporal variation in onset of *Neozygites* sp. epizootics in cassava fields suggests the possibility of inducing early epizootics and thereby reducing damage to CGM, through inoculative releases early in the rainy season. Reductions of CGM populations were correlated with an increase in the levels of infection by *Neozygites* sp. during April and July. The epizootics were characterized by a short time period between the appearance of the pathogen and rapid declines of CGM densities. In the post-epizootic phase, CGM density remained at very low levels, and the incidence of the pathogen in the field was also low during this period. The appearance of new cases of the disease was proportionally higher on plants with high CGM density within the same field. Infected CGM were observed in higher proportion on apical leaves compared to middle leaves. During June and July, formation of resting spores was recorded. It is possible that this is the main way the pathogen survives drought periods in northeastern Brazil.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, é cultivada em todas as regiões tropicais do mundo (BELLOTTI *et al.*, 1987a) e é uma importante reserva de alimento para subsistência nos prolongados períodos de seca que afetam o Nordeste do Brasil.

Vários fatores tem levado esta cultura a apresentar um rendimento abaixo do seu potencial. O ácaro verde da mandioca, *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae), é uma praga importante desta cultura, representando um dos principais fatores que limitam a sua produção, principalmente nas regiões semi-áridas do Nordeste.

O controle químico do ácaro verde não é utilizado devido basicamente à ausência de produtos registrados para uso em mandioca; baixa rentabilidade da cultura e baixo nível de instrução de grande parte dos agricultores que a cultivam, especialmente no Nordeste. Devido às características sociais, econômicas e biológicas da mandioca, o controle biológico tem sido citado como um dos métodos mais desejáveis para um programa de proteção sustentável de pragas e doenças desta cultura (ARAÚJO *et al.*, 1991; YANINEK & SCHULTHESS, 1993).

Os estudos de *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) no Brasil foram iniciados logo após sua primeira constatação no país em 1988 (DELALIBERA *et al.*, 1992). As observações têm demonstrado ser este um dos inimigos naturais mais importantes do ácaro verde na região Nordeste. Entretanto, os avanços nos estudos para o uso efetivo deste patógeno para o controle do ácaro verde têm sido limitados por diversos fatores, dentre os quais:

- 1 - A multiplicação de *Neozygites* sp., assim como outros Entomophthorales tem se mostrado muito difícil em meios de cultivo artificiais.

2 - A identificação precisa de fungos do gênero *Neozygites* tem sido grandemente dificultada pelas incertezas taxonômicas do grupo, o que implica a possibilidade de que diferentes strains ou espécies estejam sendo confundidos como um único grupo durante a realização dos estudos.

3 - A inexistência de um método eficiente de cultivo "in vivo", evitando-se contaminações indesejáveis, dificulta significativamente trabalhos como os de seleção de isolados do patógeno.

4 - Pouco ainda se conhece sobre a biologia, ecologia e epizootiologia deste patógeno.

O controle biológico do ácaro verde tem sido um dos principais objetivos do projeto “Proteção Fitossanitária Sustentável da Mandioca na América Latina e África: Um Enfoque Conservacionista” (PROFISMA), financiado pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), atualmente em execução no Nordeste. Através deste grande projeto duas estratégias de controle com o uso de *Neozygites* sp. deverão ser avaliadas: o controle biológico clássico, pela introdução de isolados promissores, e as liberações oportunas de biótipos nativos do patógeno, para antecipar as epizootias. A viabilização técnica destas atividades requerem a determinação prévia de métodos de produção de isolados para sua posterior caracterização fenotípica e genotípica e o conhecimento do processo de progressão da doença no campo, que indicará as épocas propícias para liberação do patógeno.

Este estudo teve por objetivos conhecer a distribuição geográfica de *Neozygites* sp. em cultivos de mandioca no Nordeste do Brasil, estabelecer métodos de produção “in vivo” e “in vitro” e conhecer alguns aspectos da epizootiologia do patógeno.

Avaliações abrangentes foram realizadas para o conhecimento da distribuição geográfica de *Neozygites* sp., complementando dados disponíveis na literatura.

Para o desenvolvimento de um método de produção “in vivo” foram realizados estudos para determinar o tipo de unidade de multiplicação de *Neozygites* sp. ,

a melhor densidade de *M. tanajoa* por unidade, para fornecer as melhores condições abióticas que estimulariam um maior contato dos ácaros com os conídios e proporcionariam uma maior germinação destes conídios e penetração do tubo germinativo. Também procurou-se adotar na fase de mumificação, condições inadequadas para a conidiogênese do patógeno que conservariam os ácaros mumificados até a sua coleta para armazenamento. Posteriormente avaliou-se a replicabilidade do método estabelecido e a viabilidade das múmias produzidas.

Os estudos de produção “in vitro” consistiram em estabelecer uma técnica de isolamento e avaliar os meios de cultura utilizados por BUTT & HUMBER (1989) para crescimento de *Neozygites* sp.

Estudos em campos de mandioca objetivaram conhecer a variabilidade temporal da incidência inicial de *Neozygites* sp. e sua subsequente progressão na região de Piritiba - Bahia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da mandioca

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae), é cultivada em todas as regiões tropicais do mundo e é a maior fonte de energia (amido) para 300 a 500 milhões de pessoas (BELLOTTI *et al.*, 1987a). A principal parte da planta consumida na alimentação humana são as raízes. As folhas são também comumente consumidas em alguns países da África, onde representam uma importante fonte de proteínas e vitaminas (JONES, 1959; MEGEVAND *et al.*, 1987).

A produção de mandioca na América do Sul, Ásia e África em 1993 foi de 27,5; 50,2 e 74,8 milhões de toneladas de raízes frescas, respectivamente. Os maiores produtores mundiais foram Brasil, Zaire, Nigéria, Tailândia e Indonésia. O Brasil produziu 21,7 milhões de toneladas naquele ano (FAO, 1994).

Apesar do cultivo da mandioca ser realizado em todo o território nacional, cerca de 50% da produção brasileira se concentra no Nordeste, sendo o Estado da Bahia o maior produtor (ANUÁRIO, 1991).

A mandioca foi introduzida da América tropical para a África no século XVI (JONES, 1959). Hoje é a principal fonte de carboidrato para mais de 200 milhões de pessoas no continente africano (MEGEVAND *et al.*, 1987), principalmente nas regiões mais pobres onde provê uma garantia de alimento para a subsistência da maioria dos agricultores (YANINEK & SCHULTHESS, 1993).

No período de 1969 a 1991 houve um decréscimo de 0,5% na área plantada e de 0,6% no rendimento de raízes de mandioca no Brasil (FRANCO *et al.*,

1993). Diversos fatores têm sido responsáveis pela manutenção da produtividade da mandioca bem abaixo de seu potencial, como o cultivo em solos e condições climáticas pouco adequadas, a incidência de pragas e de doenças.

2.2. Importância do ácaro verde da mandioca

O ácaro verde da mandioca, *Mononychellus tanajoa* (Bondar), foi descrito em 1938 com base em espécimes coletados no Estado da Bahia (MORAES et al., 1990).

Este ácaro ataca as plantas de mandioca, causando pontuações amareladas e deformações nas folhas. As hastes são também atacadas, tornando-se ásperas e pardacentas devido a alimentação dos ácaros. Segundo FLECHTMANN (1989) as plantas muito atacadas perdem as folhas, geralmente em primeiro lugar as superiores. Entretanto, esta afirmação não concorda com nossas observações na região Nordeste do Brasil. A queda das folhas ocorre primeiramente na parte basal e mediana da planta, ocorrendo uma redução no tamanho das folhas e encurtamento dos internódios na parte apical. Desfolhamento total pode ocorrer se o ataque persistir, mas as plantas raramente morrem (YANINEK et al., 1989b)

M. tanajoa é uma das pragas mais destrutivas desta cultura em partes da América do Sul e África, causando perdas variáveis no rendimento, dependendo da variedade, práticas culturais, condições agroecológicas locais e idade da planta quando o ataque ocorre (VEIGA, 1985; YANINEK et al., 1990). Na África, *M. tanajoa* é considerado atualmente uma das pragas mais sérias desta cultura em muitas regiões (YANINEK & HERREN, 1988), causando até 80% de perdas no rendimento (YANINEK et al., 1989b). No Brasil, VEIGA (1985) constatou perdas de 14 a 51,4% no Estado de Pernambuco. Na Colômbia, BYRNE et al. (1982) detectaram perdas de 15 a 73%.

2.3. Controle de *Mononychellus tanajoa*

O uso de pesticidas não é uma prática utilizada no sistema de produção da cultura no Nordeste do Brasil e na África, principalmente pelo fato de ser oneroso para o produtor. Por esta razão, por ser a mandioca uma cultura predominantemente de subsistência, de elevada importância social e pelas suas características biológicas (planta rústica de cultivo semi-perene), as tentativas de se estabelecer um método eficiente de controle biológico de *M. tanajoa* nesta cultura são extremamente desejáveis (ARAÚJO *et al.*, 1991; YANINEK & SCHULTHESS, 1993).

Na última década, consideráveis esforços têm sido dispendidos na busca de agentes de controle biológico eficientes em partes da América do Sul para sua introdução na África. Através destas explorações várias espécies de ácaros predadores de *M. tanajoa* pertencentes à família Phytoseiidae foram encontrados (BELLOTTI *et al.*, 1987b; MORAES *et al.*, 1990; 1991). Vários outros predadores e o fungo *Hirsutella thompsonii* Fischer foram encontrados por BELLOTTI *et al.* (1987b). Dentre estes predadores foram encontradas espécies de ácaros das famílias Blattisocidae e Tydeidae, e coleópteros dos gêneros *Holobus* (Staphylinidae) e *Stethorus* (Coccinellidae). Uma espécie não identificada do fungo *Neozygites* (Ordem Entomophthorales) foi encontrada causando grande mortalidade em *M. tanajoa* no Estado da Bahia, em agosto de 1988 (DELALIBERA *et al.*, 1992). Vários estudos foram realizados posteriormente para o conhecimento do potencial deste fungo para o controle do ácaro verde.

A especificidade de *Neozygites* sp., foi estudada por MORAES & DELALIBERA (1992), que não observaram nenhuma patogenicidade às duas principais espécies de ácaros predadores do ácaro verde no Nordeste do Brasil, *Amblyseius idaeus* (Denmark & Muma) e *Amblyseius manihoti* Moraes (= *A. limonicus* s.l.), ambos da família Phytoseiidae. Estes testes de laboratório indicaram a formação de um reduzido número de corpos hifais em alguns espécimes do tetraniquídeo *Tetranychus bastosi* Tuttle, Baker & Salles o que não foi observado em *Tetranychus urticae* Koch. Segundo

SOPER **et al.** (1988) os Entomophthorales incluem espécies com uma restrita gama de hospedeiros, que inclui apenas uma família ou gênero de insetos ou mesmo poucas espécies dentro de um mesmo gênero.

A importância de *Neozygites* sp. na redução populacional de *M. tanajoa* na Bahia foi relatada por DELALIBERA **et al.** (1991) e DELALIBERA & MORAES (1992) tendo-se observado em campo níveis de infecção superiores a 85%. GONDIM Jr. (1992) concluiu que *Neozygites* sp., juntamente com a precipitação pluviométrica, foram os principais fatores da redução populacional de *M. tanajoa* na Zona da Mata de Pernambuco.

ODUOR (1995) estudou o efeito de fatores abióticos nas diferentes fases de desenvolvimento de *Neozygites* cf. *floridana*. Segundo este autor as principais qualidades deste patógeno consistem no curto ciclo de vida comparado ao ciclo de vida de seu hospedeiro, na habilidade de infectar e matar todos os estágios ativos de *M. tanajoa*, na habilidade de um único conídio causar a morte do hospedeiro e na possibilidade de armazenamento do patógeno na forma de ácaros mumificados a baixos níveis de temperatura e umidade.

2.4. Distribuição de *Neozygites* sp.

Infecção de *M. tanajoa* por uma espécie de *Neozygites* (= *Triplosporium*) foi reportado pela primeira vez na Venezuela (AGUDELO-SILVA, 1986). *Neozygites* foi também reportado infectando *M. tanajoa* em Palmira, Colômbia (ALVAREZ AFANADOR, 1990).

No Brasil *Neozygites* sp. foi constatado em quase todos os estados do Nordeste, em áreas com precipitação anual entre 700 e 1300mm (DELALIBERA **et al.**, 1992). De acordo com YANINEK **et al.** (no prelo) o patógeno de *M. tanajoa* reportado no Quênia por BARTKOWSKI **et al.** (1988) como *Entomophthora* sp. pode também se

tratar de *Neozygites* sp.. YANINEK **et al.** (no prelo) relataram a ocorrência deste patógeno no Oeste da África.

A identificação específica deste fungo não tem sido possível, por causa das incertezas taxonômicas do grupo. Desta forma, não se sabe quantas espécies estão envolvidas nestes estudos (HUMBER **et al.**, 1981). ODUOR (1995), referindo-se ao mesmo patógeno utilizado no presente estudo, denominou-o *Neozygites* cf. *floridana*. Segundo SMITLEY **et al.** (1986a), pelo menos nove diferentes espécies de ácaros da família Tetranychidae têm sido relatadas como hospedeiros do fungo *Neozygites floridana*. Um dos hospedeiros mais estudados quanto à infecção por *N. floridana* é o tetraniquídeo, *T. urticae*.

2.4. Produção de Entomophthorales

O estabelecimento de técnicas de produção de inimigos naturais é um componente básico para o sucesso de programas de controle biológico. Embora alguns membros da ordem Entomophthorales sejam considerados uma alternativa atrativa ao uso de inseticidas químicos, até o momento são escassas as informações sobre o cultivo destes fungos em larga escala, sob condições de laboratório (URBANCZYK **et al.**, 1992). A dificuldade de produção em meios artificiais tem sido uma das principais limitações no estudo de Entomophthorales (SOPER **et al.**, 1988). Por esta razão, sua produção “in vivo” em muitos casos é de suma importância.

2.4.1. Produção "in vivo"

Muitos estudos demandam, como inóculo, considerável quantidade de organismos infectados para promover a transmissão da doença a outros organismos, tanto para avaliações em laboratório quanto para iniciar epizootias em campo

(MULLENS, 1989; GEDEN *et al.*, 1993). Isto tem levado alguns autores a estabelecer métodos replicáveis de produção "in vivo". Segundo CARRUTHERS & HAYNES (1985), citando vários autores, os estudos de transmissão entre moscas infectadas por *Entomophthora muscae* (Cohn) e moscas domésticas sadias, produziram no passado resultados inconsistentes, com níveis variados de sucesso e nenhuma replicabilidade. Por esta razão, CARRUTHERS & HAYNES (1985) desenvolveram um processo de produção em laboratório que permitiu uma taxa de infecção experimental média acima de 95%. Um método de produção de *E. muscae* em mosca doméstica foi desenvolvido também por GEDEN *et al.* (1993) a partir de modificações no método de Kramer & Steinkraus (1981).

A produção de patógenos "in vivo" requer o prévio conhecimento das condições ótimas para a transmissão e infecção da doença entre o hospedeiro mumificado e os hospedeiros sadios. Neste sentido, as informações obtidas por ODUOR (1995) são de fundamental importância. Entretanto, algumas informações sobre o efeito de fatores abióticos e unidades de multiplicação no desenvolvimento de *Neozygites* sp., necessários para o estabelecimento de um método de produção "in vivo", não estão relatados na literatura.

2.4.2. Produção "in vitro"

Produção de alguns gêneros de Entomophthorales tem sido conseguida em meio de cultura. Até o presente, tem se constatado a presença de protoplastos em espécies de pelo menos 5 gêneros de Entomophthorales (HUMBER, 1984). Hoje é possível o cultivo de protoplastos de *Entomophthora* e *Entomophaga* em meios relativamente simples (BEAUVAIS & LATGÉ, 1988; PERRY & LATGÉ, 1980; MILNER & SOPER, 1981), com produção de conídios (DUNPHY *et al.*, 1978; LATGÉ *et al.*, 1978). Entretanto, outros Entomophthorales somente têm sido cultivados em meios de cultura de tecidos suplementados com soro fetal de bovinos, altamente ricos

em nutrientes (BUTT & HEATH, 1988; BUTT & HUMBER, 1989; DUNPHY *et al.*, 1985; SOPER *et al.*, 1988; TU, 1990). BUTT & HEATH (1988) foram os primeiros a obter um crescimento de protoplastos "in vitro" de uma espécie ainda não identificada de *Neozygites*, patógeno de *T. urticae* e outros ácaros tetraniquídeos nos Estados Unidos. Estes autores utilizaram como inóculo corpos hifais extraídos de ácaros vivos infectados. Entretanto, este método de cultivo não possibilitou a produção de propágulos infectivos (WILDING, 1990). A produção de protoplastos tem sido atualmente de grande utilidade na realização de estudos de caracterização genética, bioquímica e biológica de espécies e para elucidação de problemas taxonômicos (BUTT *et al.*, 1994; SOPER *et al.*, 1988; URBANCZYK *et al.*, 1992) e diferenciação de strains (DUNPHY *et al.*, 1978; DUNPHY & CHADWICK, 1985; FUNK *et al.*, 1990). O uso desta técnica tem sido de fundamental importância nos casos em que é possível a regeneração do patógeno pela introdução dos protoplastos na hemolinfa do hospedeiro (TU, 1990).

ALVAREZ AFANADOR (1990) tentou sem sucesso, o isolamento de *Neozygites* em meios sólidos convencionais e em meios líquidos a partir da hemolinfa de *M. tanajoa* infectados.

2.5. Epizootiologia de Entomophthorales

A epizootiologia envolve os estudos dos fatores que determinam e controlam a dinâmica de doenças em populações dos hospedeiros (ALVES, 1986).

Fungos patogênicos a ácaros e insetos são frequentemente reportados como responsáveis por considerável e periódica mortalidade em populações de hospedeiros, evento este chamado de epizootia (BARR, 1979).

Segundo Tanada (1963), citado por ALVES (1986) o progresso de uma doença pode ser representado por uma curva epizoótica que se divide em três fases: pré-epizoótica, epizoótica e pós-epizoótica. A fase pré-epizoótica se caracteriza por um baixo número de hospedeiros doentes, resultando de focos primários da doença. A fase

epizootica se caracteriza por um elevado índice de doença em consequência da multiplicação e disseminação do inóculo produzido nos focos primários. A fase pós-epizootica se caracteriza pela diminuição do número de insetos atacados em relação à fase anterior.

Nos Estados Unidos, CARNER & CANERDAY (1968) observaram até 100% de infecção em populações de *T. urticae* por *Neozygites* (= *Entomophthora*) *fresenii* (Nowakowski).

VACANTE et al. (1994) descreveram na Itália uma epizootia de *Neozygites parvispora* (MacLeod & Carl) Remaudière & Keller em *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) em casa de vegetação, onde a infecção chegou a causar mais de 60% de mortalidade dos estágios móveis.

No Brasil, GALAINI-WRIGHT et al. (1991) constataram epizootias com até 55% de infecção de *Empoasca kraemeri* Ross & Moore (Hemiptera: Cicadellidae) por *Zoophthora radicans* (Brefeld) (Zygomycetes: Entomophthorales). McGUIRE et al. (1987b) observaram até 94% de infecção de *Empoasca fabae* (Harris) pelo mesmo patógeno em Illinois, Estados Unidos.

Até 100% de mortalidade de lagartas de *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) e 40% de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) causada por *Entomophaga aulicae* (Reichardt), foi observada na Georgia, Estados Unidos (HAMM, 1980).

BRANDENBURG (1985) observou até 91% de infecção de *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae) por *Zoophthora* (= *Erynia*) *phytonomi* (Arthur) em alfafa no Estado de Missouri, Estados Unidos.

No Estado de Connecticut, Estados Unidos, WESELOH & ANDREADIS (1992) constataram até 40% de lagartas de *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) infectadas por *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu & Soper.

Vários estudos têm indicado como principais fatores responsáveis pela redução de populações de ácaros as precipitações pluviométricas e infecções por patógenos, como *N. floridana* em *T. urticae* (SMITLEY et al., 1986b); *Neozygites*

(=*Triplosporium*) sp. em *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (HUMBER **et al.**, 1981) e *Neozygites* (= *Entomophthora*) *fresenii* em *Tetranychus* spp. (CARNER & CANERDAY, 1968).

Assim como a maioria dos fungos entomopatogênicos, os Entomophthorales exigem umidades próximas à saturação para produção e germinação de conídios (YENDOL, 1968; NEWMAN & CARNER, 1975; MILLSTEIN **et al.**, 1983; GLARE **et al.**, 1986; SMITLEY **et al.**, 1986a; HAJEK **et al.**, 1990; STEINKRAUS & SLAYMAKER, 1994; ODUOR, 1995). Tais condições ocorrem mais frequente e consistentemente durante a noite, quando ocorre redução na temperatura do ar para próximo ou abaixo do ponto de orvalho (GALAINI-WRAIGHT **et al.**, 1991; 1992). A temperatura também é um dos principais fatores abióticos que afetam o desenvolvimento do fungo *Z. (=Erynia) radicans* (McGUIRE **et al.**, 1987a; GALAINI-WRAIGHT **et al.**, 1991; 1992) e *N. cf floridana* (ODUOR, 1995). Um nível mínimo na densidade do hospedeiro, abaixo do qual o processo de infecção é muito reduzido, tem sido discutido como fator limitante no desenvolvimento da doença por Entomophthorales (GALAINI-WRAIGHT **et al.**, 1991; HAJEK **et al.**, 1993; ONSTAD **et al.**, 1990).

Neozygites fumosa (Spear) Remaudière & Keller é um dos principais responsáveis pela redução de *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero (Hemiptera: Pseudococcidae), uma importante praga de mandioca na África (LE RU **et al.** 1991). A doença dispersa muito rapidamente, em duas fases distintas (LE RU & IZIQUEL, 1990): uma fase inicial de implantação, estritamente correlacionada com o tamanho e estrutura das colônias do hospedeiro e uma segunda fase (a fase epizootica propriamente dita), a qual independe destes fatores.

A dinâmica das epizootias de doenças fúngicas é pouco esclarecida, e os fatores necessários para o desenvolvimento destas têm sido identificados para poucos sistemas de patógenos-hospedeiros, desta forma, as epizootias não podem ser prognosticadas (HAJEK **et al.**, 1993). Métodos convencionais para produção e

aplicação de fungos entomopatogênicos para controle de populações de insetos objetivam criar epizootias (Roberts & Hajek, 1992, segundo HAJEK *et al.*, 1993). No passado, esforços para o uso de fungos entomopatogênicos por liberações inundativas, similar ao uso de inseticidas químicos, frequentemente não apresentavam resultados desejados (HAJEK & LEGER, 1994). Uma das razões para isto é que muitos aspectos da dinâmica natural dos patógenos no campo, como os fatores limitantes da transmissão e subsequente infecção, não eram adequadamente conhecidos. A partir da década de 1970, particularmente por causa do renovado interesse em controle microbiano, os patologistas começaram a reconhecer a necessidade de entender quais interações são determinantes críticos da patogenicidade e desenvolvimento das epizootias (HAJEK & LEGER, 1994). Desde então a epizootiologia tornou-se uma das principais prioridades de pesquisa entre os patologistas de insetos (ONSTAD & CARRUTHERS, 1990). Embora mais de 700 espécies de fungos entomopatogênicos sejam atualmente conhecidas, somente 10 espécies tem sido ou estão no presente sendo desenvolvidas para controle aplicado de pragas (HAJEK & LEGER, 1994).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes coletados na mesma região onde os estudos de campo foram realizados, no distrito de Sumaré, município de Piritiba - Bahia, foram identificados como *Neozygites* cf. *floridana* pelo Dr. Sigfreud Keller (Federal Research Station for Agronomy, Zurich, Switzerland). Entretanto, não foi realizada a identificação específica do fungo utilizado nos estudos de laboratório e nas avaliações para determinação de sua distribuição geográfica. Desta forma, o patógeno é citado no presente estudo como *Neozygites* sp.

3.1. Distribuição geográfica de *Neozygites* sp. no Nordeste do Brasil

Foram realizadas explorações em 130 campos de mandioca em todos os estados do Nordeste, exceto o Estado do Rio Grande do Norte. Algumas avaliações foram realizadas durante um período de seca, nos meses de agosto e setembro de 1993, nos estados da Bahia, Maranhão, Piauí e Ceará. Outras avaliações foram realizadas nos períodos chuvosos, ou seja, novembro de 1993 (Bahia), março de 1994 (Bahia, Pernambuco, Ceará, Piauí, Alagoas e Sergipe) e junho de 1994 (Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Piauí e Maranhão).

A densidade populacional de *M. tanajoa* foi quantificada diretamente nos campos, com lupa de bolso de aumento 10X. Nas explorações realizadas em 1993, a densidade de *M. tanajoa* foi estimada realizando-se uma observação geral em um número não definido de folhas, atribuindo-se uma nota média para o campo. Nas avaliações posteriores, a avaliação da densidade populacional dos ácaros foi feita com base em 30

folhas por campo utilizando como unidade de amostragem a última folha totalmente desenvolvida da parte apical de cada planta. Esta folha distingue-se das demais folhas apicais por apresentar coloração mais escura, e das folhas mais velhas por formar um ângulo menor que 90° na junção do pecíolo ao caule (YANINEK *et al.*, 1989). Atribuiu-se para cada folha uma nota segundo a escala proposta por YANINEK *et al.* (1989), sendo 0 para folhas sem ácaros, 1 para folhas com 1 a 24 ácaros, 2 para folhas com 25 a 200 ácaros e 3 para folhas com mais de 200 ácaros.

Com relação à infecção por *Neozygites* sp., inicialmente procuraram-se em cada campo ácaros com sintomas da doença. Quando ácaros doentes ou mortos pelo fungo não foram constatados diretamente no campo, coletavam-se de 50 a 100 folhas da parte apical das plantas, as quais eram colocadas em caixa de isopor com gelo para posterior análise no laboratório, quando então se avaliava a presença de múmias provenientes de ácaros infectados que desenvolveram os sintomas da doença após a coleta.

Cada campo de coleta foi identificado através de suas coordenadas geográficas (latitude e longitude), determinadas com o uso de um aparelho GPS Receiver - PYXIS Modelo IPS-360, além de se determinar sua distância à localidade mais próxima.

3.2. Produção de *Neozygites* sp.

3.2.1. Produção "in vivo"

A produção "in vivo" de *Neozygites* sp. foi feita utilizando-se como hospedeiros fêmeas adultas de *M. tanajoa* provenientes de uma colônia iniciada com espécimes coletados na região de Cruz das Almas - Bahia. Para desenvolvimento do método de produção de *Neozygites* sp. foi necessária a obtenção de algumas informações sobre a biologia e seleção de unidades de multiplicação do fungo, não disponíveis na literatura.

3.2.1.1. Manutenção da criação de *M. tanajoa*

A criação de *M. tanajoa* foi realizada sistematicamente em plantas de mandioca variedade ‘Cidade Rica’, cultivadas em sacos plásticos de 5 litros. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, e pulverizadas ocasionalmente com Dimetoato 100CE (1ml/l) para eliminação de insetos e ácaros até 45 dias após o plantio das manivas. Após este período as plantas foram transferidas para uma sala e colocadas em contato com plantas previamente infestadas com *M. tanajoa*. Devido à ocorrência natural de *Neozygites* sp. na região de Cruz das Almas, a criação dos ácaros foi realizada em uma sala do insetário da EMBRAPA/CNPMF, a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa, condições estas inadequadas para o desenvolvimento do fungo. Esta sala, utilizada exclusivamente para criação de ácaros, apresentava prateleiras de madeira com iluminação de lâmpadas fluorescentes e incandescentes controladas por um timer proporcionando 12 horas de fotofase com $137 \pm 22 \mu\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$ de intensidade luminosa fotossinteticamente ativa na altura das plantas (medida pelo aparelho Steady State Porometer, modelo LI-1600). O controle de umidade e temperatura era mantido por um umificador de ambiente, um aparelho de ar condicionado e um termostato. A cada 15 a 20 dias metade das plantas era substituída por novas plantas, também com 45 dias de idade. A irrigação era realizada a cada 2 dias, colocando-se água diretamente nos sacos plásticos, para não atingir os ácaros nas folhas.

3.2.1.2. Desenvolvimento de um método para produção “in vivo”.

O estudo consistiu em ajustar as condições ideais de umidade, temperatura e fotoperíodo para as diferentes fases de desenvolvimento do fungo, assim como avaliar as condições e unidades de multiplicação apropriadas para manutenção do ácaro verde. Neste estudo, as fases de desenvolvimento do fungo foram denominadas de conidiogênese,

infecção (inoculação, germinação, penetração e início da colonização) e mumificação (colonização, morte e mumificação dos ácaros). Todos os estudos foram realizados em câmara incubadora para B.O.D. a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com intensidade luminosa entre 11 e $28 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de luz fotossinteticamente ativa de acordo com a distância das unidades de multiplicação até a fonte de luz, constituída por duas lâmpadas fluorescentes (luz do dia) de 15W. A temperatura selecionada para a condução dos estudos permite a conservação prolongada das folhas de mandioca e proporciona adequada produção e germinação dos conídios (ODUOR, 1995). As atividades foram realizadas no laboratório de entomologia da EMBRAPA/CNPMPF, utilizando-se ácaros mumificados por *Neozygites* sp. coletados em campos de mandioca em Cruz das Almas, em dezembro de 1993 (armazenados por 6 meses até o início do estudo) e ácaros verdes sadios da criação. Foram obedecidas as seguintes etapas para o desenvolvimento da atividade, sendo adotada a cada etapa a melhor combinação obtida nas etapas anteriores:

Escolha do tipo de unidade de multiplicação.

Foram testados três tipos de unidades de multiplicação como substrato para os ácaros verdes. Em dois tipos, as unidades foram feitas de discos de folhas de mandioca de 1,7 cm de diâmetro. Num destes tipos, os discos foram mantidos individualmente em recipientes de PVC (1,5cm de altura x 2,0cm de diâmetro), sobre dois discos de papel de filtro, umedecidos diariamente com auxílio de uma seringa, permanentemente vedados na parte inferior e tampados com um filme de polietileno, Magipac®, na parte superior. Após tampado, o filme de polietileno foi perfurado com microagulhas em várias posições, para maior aeração. No outro tipo, os discos foram colocados diretamente sobre uma camada de espuma de poliuretano permanentemente umedecida, dentro de placas de Petri de 9 cm de diâmetro por 2 cm de altura, mantidas abertas. Em cada placa de Petri foram mantidos 5 discos de folha. O terceiro tipo de unidade de multiplicação consistiu em folhas inteiras de mandioca colocadas sobre um suporte de arame de 19 x 12 x 6 cm dentro de caixas plásticas de 30 x 15 x 8 cm. Estas

folhas foram mantidas com os pecíolos imersos em água, em frascos de vidro de 2,5 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro, vedados junto aos pecíolos com Parafilme®. No fundo da caixa foi colocada uma folha de papel de filtro para absorver o excesso de umidade, sendo esta trocada a cada dois dias.

Antes da utilização, as folhas foram analisadas sob microscópio para certificar de que não continham conídios de *Neozygites*. Apenas folhas isentas destas estruturas foram utilizadas.

Com auxílio de um pincel fino, foram transferidos ácaros mumificados sobre cada unidade de multiplicação. Nas unidades de discos de folha foi transferido um ácaro mumificado pelo fungo para o centro de cada disco, enquanto que nas unidades em folhas inteiras foram colocados dez ácaros mumificados por folha, dispostos próximos às nervuras centrais dos lóbulos, a cerca de 0,5 cm da inserção do pecíolo. As placas de Petri e as caixas plásticas foram mantidas no escuro e tampadas por 16 horas, para se obter alta umidade relativa no interior do recipiente e promover a conidiogênese. A duração deste período foi definida considerando-se que a produção de conídios é iniciada rapidamente após a rehidratação das múmias (ODUOR, 1995) e que com o passar do tempo diminui a qualidade das folhas como substrato alimentar aos ácaros. Nesta fase, as unidades em discos de folha em recipientes de PVC foram mantidas totalmente vedadas com filme de polietileno. A confirmação da produção satisfatória de conídios nas arenas foi realizada antes da transferência dos ácaros, através de avaliação em microscópio. As unidades de multiplicação onde não se observara a presença de pelo menos 300 conídios foram descartadas.

No caso dos dois primeiros tipos de unidades de multiplicação, vinte e cinco ácaros sadios foram transferidos para cada unidade. Estes foram colocados próximo à borda do disco, fora da região onde os conídios estavam distribuídos, para que as cerdas do pincel não retirassem os capiloconídios ao se colocar os ácaros na folha. No caso do terceiro tipo de unidade de multiplicação, a transferência dos ácaros foi realizada agitando-se folhas altamente infestadas sobre a parte adaxial das folhas limpas das unidades. Ácaros em todas as fases móveis caíram sobre as folhas e se

moveram para a parte abaxial onde se encontravam os conídios. Metade das folhas, ou seja, duas de cada caixa, foram levadas no dia seguinte para um estereomicroscópio, para determinar o número de ácaros por folha. Constatou-se que $244 \pm 38,9$ fêmeas, além de um grande número de outras fases móveis transferiram-se para a parte abaxial. Cada ensaio consistiu de 10 discos de cada um dos dois primeiros tipos de unidades de multiplicação e de uma caixa com quatro folhas do terceiro tipo. O ensaio foi repetido quatro vezes.

Utilizou-se durante todo este ensaio uma fotofase de 12 horas. Nos três primeiros dias as unidades de multiplicação foram mantidas fechadas durante a escotofase, para proporcionar uma elevação da umidade relativa. Após este período, os ácaros foram transferidos para novas unidades de multiplicação, mantidas permanentemente abertas, a $70 \pm 10\%$ de umidade relativa. Nos dois primeiros tipos de unidades, os discos antigos foram colocados individualmente sobre discos de maior diâmetro (2,1 cm), esperando-se que os ácaros se movessem para este à medida que o disco antigo se desidratava. Após aproximadamente cinco horas, quantificou-se o número de ácaros remanescentes em cada disco. No terceiro tipo duas folhas novas foram colocadas em cada caixa, no quarto dia. Dois dias mais tarde, as quatro folhas inicialmente colocadas nas caixas foram retiradas, colocando-se em seu lugar mais duas novas folhas.

Determinação da densidade de ácaros por arena.

Inicialmente promoveu-se a conidiogênese do fungo como descrito no item anterior. Após a conidiogênese, foram transferidas 10, 25 e 50 fêmeas adultas sadias de *M. tanajoa* para cada unidade de multiplicação. O ensaio consistiu de 10 unidades de multiplicação para cada densidade de ácaros tendo sido repetido duas vezes. As unidades de multiplicação foram mantidas a 100% de umidade relativa durante as 12

horas de escotofase e $70 \pm 10\%$ de umidade durante a fotofase. Dois dias após os ácaros terem sido colocados nas unidades, todos foram montados em lâminas com Azul de Amann + meio de Hoyer, determinando-se o número de ácaros com capiloconídios aderidos ao corpo.

Efeito da umidade relativa na fase de infecção.

Foram utilizadas dez unidades de multiplicação para cada tratamento com a melhor densidade de *M. tanajoa* determinada no item anterior. Os tratamentos consistiram em submeter as unidades de multiplicação a $52 \pm 5\%$, $75 \pm 5\%$ e a 100% de umidade relativa durante as 12 horas de escotofase nos três primeiros dias após os ácaros serem colocados em contato com os conídios. O nível mais baixo de umidade ($52 \pm 5\%$) corresponde ao nível natural no interior de uma das incubadoras. O nível intermediário foi obtido colocando-se bandejas abertas com água, no interior de outra incubadora. O nível mais elevado (100%) foi obtido fechando-se as placas de Petri que continham as unidades de multiplicação. Os níveis de umidade foram registrados com auxílio de termohigrógrafos colocados em cada incubadora. Durante a fotofase as unidades de multiplicação foram mantidas em uma única B.O.D. a $70 \pm 10\%$ de umidade relativa, para evitar mortalidade dos ácaros que geralmente são altas quando submetidos a umidades elevadas por períodos prolongados. Após os três dias em que as unidades de multiplicação foram submetidas aos diferentes tratamentos, estas foram mantidas ininterruptamente a $70 \pm 10\%$ de umidade relativa. Cinco dias após o início do ensaio, todos os ácaros vivos e mortos foram montados em lâminas de microscopia para avaliação da porcentagem de infecção.

Influência do fotoperíodo na fase de mumificação de *M. tanajoa* por *Neozygites* sp.

Foram realizados dois ensaios para avaliar a influência do fotoperíodo na colonização e mumificação de *Neozygites* sp.

O primeiro ensaio objetivou avaliar a influência da utilização de 24 horas de luz na quantidade de ácaros mumificados produzidos, durante a fase de mumificação, comparando-se com arenas mantidas a 14 horas de luz, com ambos tratamentos mantidos a $70 \pm 10\%$ de umidade relativa. Utilizaram-se os melhores tratamentos obtidos nas fases anteriores de conidiogênese e infecção. Após os ácaros previamente infectados terem sido transferidos para novas unidades de multiplicação, dez unidades de multiplicação foram mantidas a 24 horas de fotofase, enquanto outras dez unidades de multiplicação foram mantidas a 14 horas de fotofase. Cada unidade de multiplicação era composta de 25 ácaros e o ensaio foi repetido 5 vezes.

O segundo ensaio foi realizado para avaliar a influência da utilização de 24 horas de luz na duração do período de colonização e mumificação de *Neozygites* sp. dentro do hospedeiro. Este ensaio difere do ensaio anterior por ter sido utilizado um curto período de contaminação, ou seja, o tempo em que os ácaros ficaram nos discos expostos aos conídios foi restringido para apenas 6 horas. Para tanto, foram utilizadas duas múmias por unidade de multiplicação, proporcionando uma maior quantidade de conídios. Após este período, os ácaros foram transferidos para novas unidades de multiplicação e mantidos por 12 horas no escuro com as placas de Petri tampadas. Posteriormente, metade das unidades foram mantidas a 24 horas de fotofase e a outra metade a 14 horas de fotofase. Os ácaros foram mantidos por 8 dias nas unidades de multiplicação, sendo que nos 3 primeiros dias as placas foram tampadas durante 12 horas por dia. O número de ácaros mumificados produzidos foi quantificado diariamente.

Viabilidade dos ácaros mumificados por *Neozygites* sp. produzidos em laboratório.

A produção de conídios a partir de ácaros mumificados obtidos em laboratório foi comparada àquela de ácaros mumificados coletados em campo em Cruz das Almas. A avaliação foi feita com base em 50 múmias produzidas em laboratório e 70 múmias coletadas no campo. Todos os ácaros mumificados utilizados neste estudo foram procedentes de um estoque armazenado por um período de 3 meses antes do início do trabalho, como descrito a seguir.

Os ácaros mumificados foram colocados em recipientes plásticos transparentes, de 5 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro, mantidos em geladeira a $8 \pm 1^\circ\text{C}$. Os recipientes continham no fundo um pedaço de algodão embebido em glicerol que proporcionou uma umidade relativa de $7 \pm 1\%$ em seu interior. A umidade foi determinada através de um termohigrômetro digital portátil. O sensor do aparelho foi mantido dentro do recipiente por 5 dias antes de serem realizadas as medições, vedado na tampa com Parafilme®, até que a umidade no interior do recipiente se estabilizasse. As avaliações da umidade foram realizadas a cada 3 horas, durante 2 dias. Sobre o algodão com glicerol foi colocado outro pedaço de algodão seco, e neste último foram depositadas as múmias.

Cada múmia foi colocada sobre uma lâmina de microscopia milimetrada, sobre a qual os conídios eram ejetados. As lâminas foram colocadas no interior de caixas plásticas de 18 x 15 x 9 cm (5 lâminas de cada procedência por caixa), contendo água e permanentemente tampadas de forma a aumentar a umidade relativa em seu interior. Para evitar o contato com a água, as lâminas foram colocadas sobre um suporte plástico que as mantinha a 4 cm da superfície da água. As caixas foram mantidas no escuro durante 16 horas. Após este período, o número de conídios produzidos foi avaliado.

Produção de múmias em laboratório

Para confirmação da replicabilidade do método de produção foram realizados dez ensaios com dez unidades de multiplicação utilizando as melhores combinações obtidas nas etapas anteriores.

3.2.2. Isolamento e produção "in vitro"

As atividades foram realizadas no laboratório de biotecnologia da EMBRAPA/CNPMPF.

Foram avaliados os seguintes meios, acrescidos dos ingredientes indicados.

- 950 ml de Meio de Grace (GIBCO®) + 0,35 g de NaHCO_3 + 50 ml de soro fetal bovino (GIBCO®).
- 950 ml de Meio 199 (com sais de Earle) (GIBCO®) + 26,68 g de sacarose + 2,2 g de NaHCO_3 + 50 ml de soro fetal bovino (GIBCO®).
- 950 ml de Meio 199 (com sais de Hank) (GIBCO®) + 26,68 g de sacarose + 2,2 g de NaHCO_3 + 50 ml de soro fetal bovino (GIBCO®).

Soro fetal bovino foi também utilizado na proporção de 8% do volume total. Incluiu-se o antibiótico estreptomicina, na dosagem de 100mg/l de meio. Antes dos meios serem filtrados, o pH foi ajustado para valores entre 6,5 a 6,7 acrescentando KOH ou HCl 1M. A filtragem dos meios foi realizada em filtros milipore (0,2 μ).

Corpos hifais extraídos da hemolinfa de ácaros verdes vivos foram utilizados como inóculo. Os ácaros foram obtidos da criação massal, mantida em laboratório, e infectados segundo o método descrito nos resultados do item produção de múmias em laboratório. Após um período de 24 horas expostos aos conídios, os ácaros que apresentavam somente um conídio aderido ao corpo foram coletados e separados em uma

nova unidade de multiplicação, onde permaneceram por mais 1 ou 2 dias até serem utilizados. Estes ácaros, ainda vivos, foram esterilizados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2,5% durante 3 minutos, e dissecados sob estereomicroscópio com luz transmitida, dentro de câmara de fluxo laminar. Inicialmente, procurou-se verificar o crescimento do patógeno nos meios de cultura testados. Para tanto, um ácaro infectado foi submerso em uma gota de meio de cultura em uma placa de Petri (1,5 cm de altura e 5,5 cm de diâmetro), sendo seu idiossoma perfurado de forma a extravasar seu conteúdo interno, com o auxílio de microagulhas (minuten). O restante do ácaro foi retirado e descartado. Posteriormente, a gota com o conteúdo interno do ácaro foi coletada com uma pipeta de Pasteur e diluída para 3 a 4 gotas do mesmo meio, mantidas separadamente em outra placa de Petri. Isto além de reduzir o risco de contaminação também facilitou o acompanhamento do crescimento do fungo. A placa de Petri foi vedada lateralmente com Parafilme® e invertida, fazendo as observações sobre o desenvolvimento dos corpos hifais a 160X a cada 3 horas. Posteriormente, as observações foram realizadas nas próprias gotas em que o conteúdo dos ácaros foi extraído, não se procedendo a sua diluição. Nesta fase, 5 a 6 gotas de meio foram colocadas sobre cada placa de Petri, sendo estas vedadas lateralmente com Parafilme®, e mantidas em B.O.D. a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase. Após a confirmação do crescimento do patógeno, este foi repicado para volumes maiores de meio em tubos de ensaio, adicionando-se meio com os protoplastos na proporção de aproximadamente 10% do volume total.

3.3. Epizootiologia.

3.3.1. Variabilidade temporal da incidência inicial de *Neozygites* sp. em campos de mandioca

O estudo foi realizado em oito campos de mandioca plantados em janeiro de 1993, no distrito de Sumaré, município de Piritiba. Foram escolhidas plantações de produtores, que representavam o sistema de cultivo usual na região. Todos os campos selecionados para este estudo tinham diferentes proporções das variedades ‘Pussi’, ‘Preta do Talo Vermelho’ e ‘Olho Roxo’. O espaçamento era de aproximadamente 1,0 x 1,0 metro, sem adubação, sem tratamentos fitossanitários, recebendo apenas capinas periódicas com amontoa. Os campos estavam localizados numa região climaticamente homogênea, distribuídos numa área de 5 km de raio (Figura 1), tendo aproximadamente ao centro a comunidade de Sumaré, onde foram instalados os equipamentos para registro de umidade, temperatura e precipitação. Os resultados de umidade e temperatura foram apresentados graficamente, utilizando-se as médias diárias do período compreendido entre cada amostragem e a amostragem anterior. A precipitação, por outro lado, foi apresentada pelo somatório dos índices diários entre cada amostragem e a amostragem anterior.

Os parâmetros avaliados foram a densidade populacional de *M. tanajoa* e o nível de infecção por *Neozygites* sp., durante o período de março a outubro de 1994. Durante a estação seca, as avaliações foram realizadas quinzenalmente, passando a semanais quando os primeiros sinais da ocorrência de ácaros infectados por *Neozygites* sp. foram observados na região. A densidade populacional de *M. tanajoa* foi avaliada em campo, analisando-se visualmente a infestação em 25 folhas apicais e 25 medianas, escolhidas ao acaso e conferindo-se uma nota para cada uma destas folhas segundo a escala proposta por YANINEK et al. (1989b). Para ácaros fitoseídeos, utilizou-se a amostragem pelo método de presença-ausência (LENIS et al., 1993), sendo os resultados expressos neste estudo em porcentagem de folhas com predadores. Durante a avaliação em campo, retirou-

se o lóbulo central de cada folha utilizada na estimativa da densidade de *M. tanajoa*, a fim de se coletar destes, ácaros vivos para a determinação da porcentagem de infecção. Os lóbulos foram colocados em sacos de papel e mantidos em caixa de isopor com gelo para o transporte ao laboratório. Duas fêmeas adultas foram coletadas ao acaso de cada lóbulo central e montadas em lâminas de microscopia com corante azul de Aman + meio de Hoyer (1:1). Um número maior de lóbulos era coletado sempre que a densidade populacional era visualmente muito baixa, buscando-se conseguir um total de 100 ácaros por campo em cada amostragem. Primeiramente quantificou-se o número de ácaros com conídios aderidos ao corpo, pressionando-se a seguir a lamínula sobre os ácaros, para que o conteúdo interno do ácaro fosse extravasado, facilitando a detecção de ácaros com corpos hifais ou com esporos de resistência.

Figura 1. Localização dos campos avaliados no estudo de variabilidade temporal da incidência inicial de *Neozygites* sp. no município de Piritiba - Bahia, 1994.

3.3.2. Disseminação de *Neozygites* sp. dentro do campo de mandioca.

A progressão da ocorrência natural do patógeno foi avaliada em dois campos no distrito de Sumaré. Um dos campos havia sido plantado em janeiro de 1993, que corresponde ao campo 7 da seção anterior, e outro em março de 1994, identificado como campo 9. Em cada um destes campos demarcou-se uma área de 2500 m² (50,0 x 50,0m), que foi subdividida em parcelas de 2,0 por 2,0 m, utilizando-se linhas de nylon presas a estacas de madeira. As avaliações consistiram de observações visuais em campo, com auxílio de lupa de bolso de aumento 10X, determinando-se a ocorrência de ácaros mortos com sintomas da doença. Foram amostradas quatro folhas por planta, sendo uma folha em cada quadrante, em uma planta por parcela. As avaliações foram realizadas a cada três dias, até a constatação de *Neozygites* sp. em todo o campo. No campo plantado em 1994, além da ocorrência do patógeno, foi também estimada a densidade populacional de *M. tanajoa* em cada uma das parcelas, com o objetivo de obter informações sobre a influência da densidade do hospedeiro e a dispersão do patógeno no campo. Também foi registrada a direção predominante dos ventos, mediante observações diárias no período da manhã em uma biruta instalada no campo, durante os meses de maio e junho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Distribuição geográfica de *Neozygites* sp. no Nordeste do Brasil

A densidade populacional de *M. tanajoa* foi bastante variável neste estudo. Em alguns campos, *M. tanajoa* não foi constatado, enquanto que em outros campos foram observados mais de 200 ácaros por folha.

Neozygites sp. foi detectado nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe, num total de 41 campos, isto é, 31,5% dos campos amostrados (Figura 2 e apêndice).

Nas avaliações realizadas durante o período seco, de agosto a setembro de 1993, ácaros infectados por *Neozygites* sp. foram constatados apenas na região central do Estado da Bahia. Nesta região, o patógeno foi encontrado apenas onde a densidade populacional de *M. tanajoa* era moderada a alta (notas 2 e 3). Na maioria das demais regiões exploradas neste período, o nível populacional de *M. tanajoa* esteve abaixo de 25 ácaros por folha (notas 0 e 1).

Ácaros mortos por *Neozygites* sp foram encontrados em apenas 5 dos campos amostrados nas duas primeiras semanas de março de 1994, logo após o início do período chuvoso, sendo 3 no Piauí, 1 no Ceará e 1 na Bahia. Nestes campos, a densidade de *M. tanajoa* esteve abaixo de 1,3. A média das notas atribuídas à densidade do ácaro verde variou de 0,0 a 2,5 por folha nos campos amostrados neste período.

Durante as explorações realizadas no período de 13 a 29 de junho de 1994, a incidência de *M. tanajoa* estava baixa em todas as regiões avaliadas, embora esta tenha sido a época em que *Neozygites* sp. foi observado com maior frequência.

Figura 2. Localização dos campos amostrados para determinação da distribuição de *Neozygites* sp. no Nordeste do Brasil no período de abril de 1993 a junho de 1994.

A média das notas atribuídas à infestação de ácaros variou de 0 a 1,7, sendo inferior a 0,5 em 64,5% dos campos. Em 11 dos 46 campos amostrados, nenhum ácaro foi encontrado. Em 22 campos, ou seja, 62,8% dos campos onde constatou-se ácaros no campo, foram encontrados ácaros mortos por *Neozygites* sp. Nos Estados do Piauí e Maranhão, a densidade do ácaro verde estava extremamente reduzida, observando-se ácaros infectados apenas no município de Floriano - Piauí. Nos 11 campos avaliados na parte norte do Piauí e em todos os campos avaliados no Maranhão, a média das notas atribuídas não ultrapassou 0,23, sendo que em 7 destes campos nenhum ácaro foi encontrado.

Neozygites sp. foi encontrado em regiões com condições climáticas bastante distintas. Os municípios com menores precipitações anuais onde o patógeno foi constatado foram Ipirá, Itaberaba e Biritinga na Bahia, com precipitação média anual de 754, 762 e 660 mm (BAHIA, 1994a, 1994b) respectivamente. Nestes locais a constatação do fungo ocorreu fora da época de maior precipitação. Por outro lado, Alagoinhas foi o município com maior precipitação anual (1.234 mm) em que o patógeno foi constatado neste estudo (BRASIL, 1992). A presença de *Neozygites* sp. em regiões com grande variabilidade climática e distantes geograficamente indica a possibilidade da existência de biótipos com diferenças genotípicas e/ou fenotípicas. Desta forma, novas explorações de inimigos naturais para utilização em programas de controle de *M. tanajoa* devem focar a seleção de isolados mais eficientes para as regiões semi-áridas, onde o ácaro causa maiores perdas. Como a exigência de alta umidade relativa para produção e germinação dos conídios parece ser um dos fatores mais críticos para uma maior prevalência do patógeno nestas regiões, investigações devem ser iniciadas buscando-se biótipos caracterizados por menor exigência de umidade para a conidiogênese e/ou maior resistência às condições adversas do ambiente. A caracterização de isolados quanto à virulência, especificidade, resposta a fatores abióticos como temperatura e luz ultra-violeta também merecem maiores estudos.

Os resultados obtidos confirmam as observações feitas por DELALIBERA *et al.* (1992) que constataram uma maior proporção de campos com *Neozygites* sp. em regiões com precipitação entre 700 e 1300 mm. As regiões onde o patógeno foi predominantemente encontrado nos levantamentos daqueles autores no período de 1989 a 1990 e novamente

neste estudo, concentram-se na parte central da Bahia, noroeste (Chapada Ibiapaba) e sul (Chapada Araripe) do Estado do Ceará e numa faixa de aproximadamente 150 Km da costa, entre os paralelos de 7° e 14° de latitude Norte (da Paraíba ao nordeste da Bahia). No presente trabalho, *Neozygites* sp. foi encontrado em 14 regiões em que não havia sido anteriormente registrado, sendo 4 na Bahia (Alagoinhas, Biritinga, Itaberaba, Rio Real), 7 no Ceará (Aracati, Sucatinga, Croatá, Itapajé, Ubajara, Guaraciaba do Norte, Viçosa do Ceará), 1 na Paraíba (Ingá), 1 no Piauí (Piripiri) e 1 em Sergipe (Cristinápolis).

A determinação da distribuição de *Neozygites* sp. e principalmente a coleta de ácaros mumificados para estudos, é dificultada pela curta duração da fase epizootica deste patógeno. Na fase pós-epizootica, a densidade de *M. tanajoa* permanece por algum tempo em níveis muito reduzidos, o que diminui a probabilidade de se constatar e coletar ácaros mumificados no campo. Desta forma, acredita-se que a abrangência do fungo no Nordeste ainda seja maior que a determinada neste estudo e em estudos anteriores.

Recuperação de esporos de resistência em solo é uma técnica já estabelecida para alguns Entomophthorales, como: *Conidiobolus thromboides*, *Entomophaga grylli* (LI **et al.**, 1988) e *E. maimaiga* (HAJEK & WHEELER, 1994). Desta forma, é possível detectar a presença destes patógenos através da coleta de amostras de solo para avaliação em laboratório. O lugar onde os esporos de resistência de *Neozygites* sp. persistem no ambiente ainda é desconhecido. O estabelecimento de um método de detecção e quantificação de esporos de resistência de *Neozygites* sp. no ambiente poderia ser utilizado para uma determinação mais eficiente de sua distribuição.

4.2. Produção de *Neozygites* sp.

4.2.1. Desenvolvimento de um método para produção "in vivo".

Escolha do tipo de unidade de multiplicação

A maior produção de *M. tanajoa* infectados por *Neozygites* sp. foi obtida em discos de folhas de mandioca mantidos em placas de Petri sobre espuma de poliuretano umedecida (Tabela 1). Nas unidades de discos de folhas em recipientes de PVC foram obtidas em média 7,9 múmias por múmia utilizada, enquanto nas unidades de folhas inteiras em caixas plásticas foi obtida somente 1,1 múmia por múmia utilizada.

Tabela 1. Produção de *Neozygites* sp. em diferentes unidades de multiplicação. Relação *Mononychellus tanajoa* sadios/mumificados utilizada = 25/1 (n = 4, 24 ± 1°C, 12 horas de fotofase e 70 ± 10% de umidade relativa, exceto na escotofase dos dois primeiros dias = 100%).

Tipo de unidade de multiplicação	Relação múmias obtidas/ múmia utilizada (± desvio padrão)
1. Disco de folha em placa de Petri	13,6 ± 1,5 a
2. Disco de folha em recipiente de PVC	7,9 ± 1,5 b
3. Folha inteira em caixa plástica	1,1 ± 0,4 c

C.V. = 16,7%

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey.

As unidades de multiplicação em recipientes de PVC não apresentaram eficiência satisfatória e demandaram maior uso de mão de obra para a manipulação.

Outro fator indesejável foi que em algumas das múmias produzidas o fungo havia iniciado a conidiogênese neste tipo de unidade de multiplicação antes que estas pudessem ter sido coletadas, possivelmente pela maior umidade no interior das unidades.

Apesar de ser mais prática, a utilização de folhas inteiras em caixas plásticas, apresentou uma baixa produção de múmias. Uma das desvantagens desta unidade é a perda de grande parte dos ácaros. A adição de novas folhas para que os ácaros se locomovessem naturalmente para estas, não se mostrou um método satisfatório. Somente 14% dos ácaros transferiram-se para as folhas novas, 4,7% permaneceram nas folhas velhas e o restante escapou ou morreu. Possivelmente, outro motivo para a menor produção de múmias nesta unidade de multiplicação foi a menor chance dos ácaros entrarem em contato com os conídios. Embora tenha sido utilizada a mesma relação ácaros sadios por múmias nas unidades de multiplicação com discos de folha e na unidade com folhas inteiras, a proporção entre área total da folha e a área do halo de projeção dos conídios é muito maior nas folhas inteiras em caixas plásticas. Desta forma, a probabilidade de um ácaro entrar em contato com os conídios é bem menor neste tipo de unidade.

Embora as unidades de multiplicação de discos de folhas mantidos em placas de Petri tenham proporcionado uma maior quantidade de múmias produzidas e apresente algumas vantagens sobre os outros dois tipos de unidades, o uso destas apresenta algumas limitações. Por um lado, a forma e o pequeno tamanho destas unidades facilitam a averiguação da existência de contaminantes nas folhas antes das múmias serem colocadas para a conidiogênese. Esta etapa é de grande importância para um controle de qualidade adequado na produção de isolados do patógeno, pois permite evitar a presença de conídios de outros isolados ou espécies de *Neozygites* nas folhas a serem utilizadas nas unidades de multiplicação. Outra vantagem deste tipo de unidade para produção “in vivo” consiste na facilidade de visualização do volume de conídios produzidos por cada múmia, sendo que desta forma somente são transferidos ácaros para unidades de multiplicação com uma quantidade satisfatória de conídios. Neste tipo de

unidade de multiplicação a transferência dos ácaros para novas unidades pode ser realizada de maneira mais prática que no caso de outros tipos de unidades. A utilização de discos de 2,1 cm de diâmetro para substituir os discos de 1,7cm de diâmetro facilitou o processo de transferência dos ácaros. Constatou-se que $71 \pm 16\%$ dos ácaros moveram-se para os discos novos em menos de 5 horas. Os ácaros restantes, que geralmente eram os que já estavam em estágio avançado da doença, foram transferidos com o pincel. Por outro lado, o trabalho de confecção dos discos de folha, a necessidade de transferência para novos discos devido a deterioração da folha de mandioca nestas condições e a perda de ácaros que se movem para a água limitam a quantidade de múmias que podem ser produzidas com o uso deste método.

Determinação da densidade de ácaros por arena

As maiores proporções de ácaros infectados foram obtidas utilizando 10 e 25 ácaros por unidade de multiplicação (Tabela 2). Entretanto, os maiores números de ácaros infectados foram obtidos nas unidades com 50 ácaros, seguido das unidades com 25 ácaros. Desta forma, 25 ácaros foi a melhor densidade para este tamanho de unidade de multiplicação, pois acima desta densidade não se consegue incremento substancial no número de ácaros infectados.

O halo de projeção dos conídios foi de aproximadamente $0,9 \pm 0,2$ cm de diâmetro, o que corresponde em média a 28% da área (18 - 42%) de um destes discos. A relação entre o tamanho do halo de projeção dos conídios e o tamanho dos discos de folhas de mandioca utilizados, proporcionou uma elevada taxa de infecção dos ácaros até a densidade de 25 ácaros por unidade. Embora o número médio de conídios produzidos por múmia (neste estudo foram utilizadas unidades com mais de 300 conídios) teoricamente seja suficiente para a contaminação de muitos hospedeiros, o número de ácaros infectados foi relativamente pequeno mesmo nas unidade com maior número de ácaros. Observa-se que ocorre uma grande concentração dos conídios dentro

da região do halo de projeção. Alguns destes conídios se aderem aos ácaros quando estes caminham nesta região, enquanto outros poderiam supostamente ser derrubados à superfície da folha por ação dos próprios ácaros. No caso destas unidades de multiplicação, muitos dos conídios não aderidos cairiam sobre a superfície da folha ou ficariam presos aos tricomas de maneira que a parte adesiva destes não mais estaria numa posição que facilitasse sua adesão às pernas ou ao corpo dos ácaros. É possível então, que se os conídios estivessem distribuídos em um halo maior, num disco maior de folha, ocorresse maior taxa de infecção em densidades mais elevadas de ácaros. Por outro lado, observou-se nas unidades de multiplicação com 50 ácaros, uma deterioração mais rápida do disco de folha e uma tendência maior dos ácaros se dispersarem caindo na água. O tamanho reduzido do disco de folha parece ser suficiente para a alimentação desta elevada densidade populacional por um curto período. Após este período, muitos ácaros são encontrados mortos nas bordas do disco em contato com a água. Possivelmente estes sejam alguns dos fatores pelos quais não se obteve maiores níveis de infecção em unidades com a maior densidade de *M. tanajoa*.

Tabela 2. Influência da densidade de *Mononychellus tanajoa* na infecção por *Neozygites* sp. (n = 20, 24 ± 1°C, 100% de umidade relativa nas 12 horas de escotofase e 70 ± 10% de umidade na fotofase).

Nº de ácaros/unidade	Infecção de <i>M. tanajoa</i>	
	relativa (% ± desvio padrão)	Absoluta/unidade (± desvio padrão)
10	88,4 ± 10,2 a	8,8 ± 1,0 a
25	81,4 ± 13,4 a	20,3 ± 3,3 b
50	51,2 ± 13,4 b	25,6 ± 6,7 b

C. V. = 16,9% (relativa) e 24,0% (absoluta/unidade)

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey.

BROWN & HASIBUAN (1995) estudando a eficiência de transmissão de *N. floridana* em *T. urticae* em condições de laboratório, não observaram aumento significativo na produção de múmias quando aumentaram de 100 para 200 ácaros sadios em arenas com 5 ácaros mumificados, ou seja, quando se aumentou a relação ácaros sadios/ácaro mumificado de 20/1 para 40/1.

Efeito da umidade relativa na fase de infecção

Os melhores níveis de infecção foram obtidos quando as unidades de multiplicação foram mantidas a 100% de umidade relativa durante a escotofase, nos três primeiros dias (tabela 3). A 100% de umidade relativa obteve-se uma infecção média de 92,2%, enquanto a 52 ± 5 % de umidade relativa, somente 18,8% dos ácaros se infectaram.

A manutenção das arenas a 100% de umidade durante a escotofase, promoveu uma maior germinação dos capiloconídios aderidos aos ácaros e penetração do tubo germinativo no corpo destes. A exigência de umidades relativas elevadas (próximo à saturação) para produção e germinação de conídios em Entomophthorales também foi relatada por YENDOL (1968), NEWMAN & CARNER (1975), MILLSTEIN et al. (1983), CARRUTHERS & HAYNES (1986), GLARE et al. (1986), SMITLEY et al. (1986a), HAJEK et al. (1990), STEINKRAUS & SLAYMAKER (1994). Segundo ODUOR (1995), embora a germinação de capiloconídios de *N. cf. floridana* em *M. tanajoa* seja maior em umidades relativas elevadas, tubos germinativos foram produzidos até a 89,9% de umidade a 13°C.

Além de promover maior germinação e penetração dos capiloconídios que estavam aderidos aos ácaros, a utilização de 100% de umidade nesta fase também permitiria restabelecer a conidiogênese do fungo nos ácaros mumificados, em períodos subsequentes de escotofase. Neste estudo, a conidiogênese foi interrompida quando as placas de Petri foram destampadas e as unidades de multiplicação foram mantidas por

12 horas a $70 \pm 10\%$ de umidade na luz. Quando, após este período, as placas de Petri foram novamente tampadas, a elevação da umidade no interior destas permitiria a ocorrência de uma nova produção de conídios por mais 12 horas (ODUOR, 1995).

Observou-se que durante as 12 horas em que as unidades de multiplicação foram mantidas a 100% de umidade ocorria muito pouca movimentação dos ácaros. Estudando o efeito da umidade na germinação dos capiloconídios, ODUOR (1995) obteve uma menor porcentagem de ácaros com capiloconídios quando submetidos a umidades acima de 98,2%. Isto provavelmente se deve a um efeito indireto da umidade relativa sobre o patógeno, influenciando o processo de infecção pela redução na movimentação dos ácaros. Isto deve ser mais crítico para *Neozygites* do que para outros patógenos que não necessitam do movimento do hospedeiro para promover o contato com os conídios. Embora taxas elevadas de umidade relativa sejam importantes para as fases de conidiogênese e germinação dos conídios, sua ocorrência por períodos prolongados apresenta efeitos negativos na contaminação e sobrevivência de *M. tanajoa*, que geralmente é desfavorecido por períodos prolongados de umidades elevadas. Desta forma, a utilização de $70 \pm 10\%$ de umidade relativa durante a fotofase é indicada para estimular a movimentação dos ácaros, aumentando assim a contaminação pelos capiloconídios e reduzindo a mortalidade de *M. tanajoa*.

Tabela 3. Efeito da umidade relativa durante a escotofase, na germinação de capiloconídios em *Mononychellus tanajoa* (n= 10, $24 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa durante as 12 horas de fotofase).

Umidade relativa (%)	<i>M. tanajoa</i> infectados (% $\pm$ desvio padrão)
100	92,3 $\pm$ 8,1 a
75 $\pm$ 5	72,4 $\pm$ 14,9 b
52 $\pm$ 5	18,8 $\pm$ 15,9 c

C.V. = 21,9%

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 1% pelo teste de Tukey.

Influência do fotoperíodo na fase de mumificação de *M. tanajoa* por *Neozygites* sp.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na produção total de múmias entre unidades que foram mantidas a 24 e 14 horas de fotofase a partir do quarto dia em que os ácaros foram colocados em contato com os conídios (Tabela 4). As unidades mantidas a 24 e 14 horas de fotofase produziram um total médio de 13,8 e 12,8 ácaros mumificados por múmia utilizada, respectivamente. Por outro lado, constatou-se um maior período de colonização e mumificação de *Neozygites* sp. nas unidades mantidas a 24 horas de luz. A mumificação ocorreu entre o quarto e oitavo dias após os ácaros serem colocados em contato com os conídios. Nas unidades mantidas a 14 horas de fotofase, a mumificação concentrou-se no quarto e quinto dias.

No segundo ensaio, quando as unidades de multiplicação foram mantidas a 24 e 14 horas de fotofase já a partir do segundo dia após os ácaros terem sido expostos aos conídios, constatou-se semelhantemente ao observado no ensaio anterior, que nas unidades mantidas sob 14 horas de fotofase, 80% dos ácaros mumificados surgiram 4 dias após a contaminação (Tabela 5). Por outro lado, no mesmo período, nenhum ácaro mumificado foi observado nas arenas sob luz contínua. A mumificação dos ácaros em arenas mantidas a 24 horas de fotofase ocorreu 5 a 8 dias após a contaminação.

O atraso na produção de múmias sob luz contínua no segundo ensaio, em relação ao primeiro ensaio, pode ser explicado pelo fato das unidades no segundo ensaio terem sido submetidas a esta condição já a partir do segundo ao invés do quarto dia.

Nas unidades de multiplicação mantidas a 14 horas de fotofase observou-se que alguns ácaros que se mumificaram próximo às bordas do disco (maior proximidade com a água), iniciaram a conidiogênese, chegando em alguns casos a ejetar conídios. Sob $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 24 horas de fotofase, não se observaram estas características nas múmias produzidas. Estes resultados corroboram os estudos de ODUOR (1995), que trabalhando com o mesmo fungo observou que sob luz contínua há uma drástica redução na formação de conídios, não ocorrendo conidiogênese abaixo de 94,8% de umidade relativa a 24°C.

Tabela 4. Efeito do fotoperíodo na colonização de *Neozygites* sp. em *Mononychellus tanajoa*, a partir do quarto dia do início da exposição aos conídios produzidos por um ácaro mumificado ($n = 50$, $24 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa).

Dias	Múmias obtidas por múmia utilizada (% do total de mumificação)	
	24 h de fotofase	14 h de fotofase
1	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
2	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
3	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
4	4,2 (30,2)	10,0 (78,8)
5	1,4 (10,4)	1,5 (11,4)
6	2,2 (15,8)	1,0 (7,7)
7	4,3 (31,4)	0,2 (1,9)
8	1,7 (12,3)	0,1 (0,3)
Total	$13,8 \pm 4,8a$ (100,0)	$12,8 \pm 5,2a$ (100,0)

C.V. = 37,7%

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste F.

Tabela 5. Efeito do fotoperíodo na colonização de *Neozygites* sp. em *Mononychellus tanajoa*, a partir do segundo dia do início da exposição aos conídios produzidos por dois ácaros mumificados ($n = 5$, $24 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ umidade relativa).

Dias	Múmias obtidas por múmia utilizada (% do total de mumificação)	
	24 h de fotofase	14 h de fotofase
1	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
2	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
3	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
4	0,0 (0,0)	8,0 (80,0)
5	3,2 (37,2)	1,4 (14,0)
6	3,2 (37,2)	0,2 (2,0)
7	1,4 (16,3)	0,2 (2,0)
8	0,8 (9,3)	0,2 (2,0)
Total	$8,6 \pm 2,4a$ (100,0)	$10,0 \pm 2,3a$ (100,0)

C.V. = 28,7%.

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste F.

O efeito do fotoperíodo também foi observado por HAJEK *et al.* (1990) que constataram que 50% dos conídios de *E. maimaiga* em *L. dispar* foram produzidos após 3,4 horas no escuro a 20°C, sendo entretanto necessárias 9 horas para a mesma produção sob luz contínua. Não foi observado na literatura relatos do efeito do uso de 24 horas de fotofase no período de desenvolvimento “*in vivo*” de patógenos. O uso de 6, 10 e 14 horas de fotofase não afetou o desenvolvimento deste patógeno em *M. tanajoa* segundo ODUOR (1995).

Se por um lado a utilização de 14 horas de luz nesta fase permite uma produção concentrada de múmias no quarto e quinto dia, podendo a coleta das múmias ser realizada diariamente de forma concentrada nestes dias, por outro lado, o uso de luz contínua permite que a coleta das múmias não necessite ser realizada diariamente, podendo ser concentrada nos últimos dias, pois as múmias não iniciam a conidiogênese nestas condições. Desta forma, embora a utilização de luz contínua na fase de desenvolvimento e mumificação do patógeno não tenha afetado a quantidade total de múmias produzidas, sua utilização permite evitar a conidiogênese do fungo nas múmias, fato desejável no processo de produção do fungo.

Viabilidade de *Neozygites* sp. produzido em laboratório

A produção de conídios a partir de ácaros mumificados produzidos em laboratório não diferiu estatisticamente da produção a partir de ácaros coletados em campo (Tabela 6). Foram obtidos em média, respectivamente, 436,0 e 350,3 conídios por ácaro mumificado, durante 16 horas de conidiogênese. Observou-se uma grande variação na quantidade de conídios produzidos, demonstrado pelo elevado coeficiente de variação (116,3%). A maior quantidade de conídios produzidos por uma única múmia foi de 1669 para múmias produzidas em laboratório e 1900 para múmias coletadas em campo. Uma menor proporção de múmias coletadas em campo (47%) produziram conídios, comparado às múmias produzidas em laboratório (74%). Pelo menos em parte, a maior

variação no período entre a mumificação e a coleta para armazenamento deve ser responsável pela menor viabilidade destas. Valores próximos foram obtidos por MORAES & DELALIBERA (1992), que verificaram a produção média de 639 (256-991) conídios por múmia coletadas em Piritiba - Bahia. SMITLEY *et al.*, (1986a) citaram a produção de 1558 conídios primários de *N. floridana* por múmia de *T. urticae* a 26,7°C e 100% de umidade relativa durante 5 dias. BROWN & HASIBUAN (1995) obtiveram cerca de 1000 conídios de *N. floridana* por cadáver de *T. urticae* durante 48 horas de conidiogênese a 21°C e 100% umidade relativa.

Tabela 6. Número de conídios primários produzidos por *Neozygites* sp. para *Mononychellus tanajoa* infectados em laboratório (n = 70) e coletados em campo (n = 50) ($24 \pm 1^\circ\text{C}$, 100% de umidade relativa e 0 horas de fotofase durante 16 horas).

Procedência dos ácaros mumificados	Conídios primários por múmia ($\pm$ desvio padrão)	% de múmias que produziram conídios
Produzidos em laboratório	436,0 $\pm$ 395,1 a	74
Coletados em campo	350,3 $\pm$ 483,9 a	47

C.V.= 116,3%

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste F.

Produção de múmias em laboratório

Em 100 unidades de multiplicação avaliadas, obteve-se uma média de 15,0 ácaros mumificados para cada ácaro infectado (Tabela 7). O surgimento das múmias ocorreu do quarto ao oitavo dia.

Embora níveis de infecção superiores a 90% possam ser obtidos em laboratório (ver item sobre efeito da umidade relativa na germinação dos conídios), apenas 60,1% dos ácaros colocados em contato com os conídios completaram a mumificação neste

estudo. Outros 5,7% dos ácaros completaram parcialmente a mumificação ou se tomaram de coloração negra. Observações preliminares indicam entretanto que estes também produzem conídios viáveis. É possível que estes ácaros possam ter sido infectados por outros organismos e tenha ocorrido uma septicemia antes do completo desenvolvimento de *Neozygites* sp. Apenas 4,4% permaneceram vivos até o último dia de avaliação. O restante dos ácaros, 29,8%, morreram na água ou durante o manuseio na transferência para novos discos, ou por outros fatores.

Tabela 7. Produção diária de *Neozygites* sp. em cada unidade de multiplicação contendo inicialmente um *Mononychellus tanajoa* mumificado e 25 fêmeas adultas sadias (n= 100).

Dias	<i>M. tanajoa</i> mumificados/dia ± desvio padrão
1	0,0±0,0
2	0,0±0,0
3	0,0±0,0
4	5,5±3,9
5	1,2±3,5
6	2,3±2,0
7	4,7±3,3
8	1,3±1,4
Total	15,0±2,8

Os resultados obtidos permitem a indicação de um método de produção “in vivo” apresentado na figura 3. O método consiste da utilização de unidades de multiplicação de discos de folhas de mandioca de 1,7cm de diâmetro, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro sobre espuma de poliuretano umedecida. Um ácaro mumificado é colocado no centro de cada disco, sendo a unidade mantida a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 100% de umidade relativa por 16 horas no escuro para proporcionar a conidiogênese do fungo. Posteriormente, 25 fêmeas adultas de *M. tanajoa* são colocadas nas bordas de cada disco, fora da região onde os conídios estão distribuídos, permanecendo no disco durante três dias às mesmas

Figura 3. Esquema do método de produção "in vivo" de *Neozygites* sp. em *Mononychellus tanajoa*.

condições de temperatura, a $70 \pm 10\%$ de umidade relativa durante 12 horas de fotofase e 100% de umidade (placa de Petri fechada) durante a escotofase. No quarto dia, os discos de folha contendo os ácaros são colocados individualmente sobre novos discos de 2,1 cm de diâmetro, onde permanecem durante cinco horas. Após este período, os ácaros remanescentes sobre os discos velhos são transferidos com pincel para os discos novos. Do quarto ao oitavo dia, as unidades permanecem ininterruptamente a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 24 horas de fotofase, para não permitir que as múmias geradas iniciem a conidiogênese. As múmias produzidas são então coletadas e armazenadas.

O método estabelecido neste estudo para produção “in vivo” de *Neozygites* sp. em unidades de discos de folha de mandioca, pode ser utilizado satisfatoriamente para multiplicação de isolados do patógeno ou outras avaliações científicas que não demandem grandes quantidades de inóculo, tendo já sido utilizado nos trabalhos conduzidos com *M. tanajoa* no projeto PROFISMA.

4.2.2. Isolamento e produção "in vitro"

Crescimento e multiplicação de *Neozygites* sp. foi observado nos meios de Grace + 0,35g/l de NaHCO_3 e meio 199 (com sais de Hank) + 26,68g/l de sacarose + 2,2g/l de NaHCO_3 , ambos enriquecidos com soro fetal bovino, às proporções de 5 ou 8% do volume total. No meio 199 (com sais de Earle) observou-se pequeno crescimento inicial dos corpos hifais. Este crescimento porém, não resultou em multiplicação, ocorrendo lise das células após algumas semanas.

O crescimento de *Neozygites* foi obtido tanto a partir de ácaros expostos ao fungo por dois quanto por três dias. Poucos minutos após a inoculação dos corpos hifais nos meios, observou-se uma agregação destes, geralmente no centro da gota (Figura 4A). Seis horas após a inoculação, foi possível visualizar o início do crescimento a partir das extremidades dos corpos hifais no meio de Grace e 199 (Figura 4B). O crescimento foi caracterizado por uma lenta formação de protoplastos.

A cultura de *Neozygites* sp. foi caracterizada por duas formas de crescimento. A principal forma observada foi pela formação de estruturas filamentosas (Figura 4C) e as vezes amebóides (Figura 4D). A outra forma corresponde a protoplastos com formato de “bastonetes” de tamanhos variados, semelhantes a corpos hifais, porém maiores e sem parede celular definida, às vezes com grandes vacúolos (Figura 5A), com divisão por bipartição através da formação de um septo ao meio seguido de fissão (Figura 5B). Em nenhuma destas formas de crescimento foi observada formação de corpos hifais a partir dos protoplastos (regeneração).

Em algumas tentativas de isolamento, foi observado um pequeno crescimento protoplástico do fungo com posterior formação de conídios primários (Figura 5C) e conídios adesivos na gota de meio (5D). Constatou-se também a formação de vários capilares (Figura 5D) a partir de um único conídio primário, com a produção de capiloconídios bastante pequenos. Entretanto, quando este material foi repicado para volumes maiores de meio, não resultou em novas formações de conídios.

Figura 4. Crescimento “in vitro” de *Neozygites* sp.. A - Início do crescimento dos corpos hifais, com diferentes tamanhos. B - Corpos hifais após 6 horas em meio de cultura. C - Aglomerado de corpos hifais em crescimento. D - Forma amebóide de crescimento.

Figura 5. Crescimento “in vitro” de *Neozygites* sp. . A - Formação de vacúolo na região central de um protoplasto em desenvolvimento. B - Divisão do protoplasto. C - Formação de conídio primário. D - Conídio primário formando vários capilares e capiloconídios.

Um dos fatores que poderiam estar associado à produção de conídios na gota de meio e não em tubos de ensaio é a maior oxigenação devido a maior área superficial em contato com o ar. crescimento do fungo na gota de meio deve exaurir rapidamente os nutrientes do meio tornando-o inapropriado para seu desenvolvimento, possivelmente estimulando a indução da formação de conídios.

A esterilização superficial dos ácaros com 2,5% de hipoclorito de sódio e a adição de 100mg/l de estreptomicina ao meio foram satisfatórias para evitar contaminações com microorganismos, sem afetar *Neozygites* sp.

Alguns aspectos do crescimento de *Neozygites* sp. coincidem com observações de outros autores. O fenômeno da agregação dos corpos hifais no meio de cultura é discutido por DUNPHY & NOLAN (1977). Para uma espécie não identificada de *Neozygites*, divisão celular semelhante foi obtido por BUTT & HEATH (1988). Diferentes formas de crescimento vegetativo foram observadas por BEAUVAIS & LATGÉ (1988); SOPER et al. (1988) e FUNK et al. (1990), para três espécies de *Entomophaga*. Segundo estes autores, as variações nas formas dos protoplastos numa mesma espécie podem ser devidas aos diferentes estágios de desenvolvimento, à composição dos nutrientes do meio de cultura e diferentes strains estudados. Várias formas de protoplastos tem sido reportada em diferentes espécies de Entomophthorales, incluindo amebóide, esférica, elíptica e fusiforme (FUNK et al., 1990; DUNPHY & NOLAN, 1976, 1977; TU, 1990; DUNPHY et al., 1985). Provavelmente, a variação na forma das estruturas produzidas nos meios de cultura não se deva à diferença de biótipos do fungo, tendo em vista que todo o estudo foi conduzido com *Neozygites* sp. coletado em uma única região em Cruz das Almas. Estudos complementares serão necessários para elucidar as variações nas formas de desenvolvimento dos protoplastos.

Embora não tenha sido possível cumprir os postulados de Kock para se confirmar que o fungo isolado se trate de *Neozygites* sp., foi estabelecido um método para obter indicações seguras quanto a identidade do material. Primeiramente, a utilização de ácaros infectados a partir de um único conídio de *Neozygites* sp. (“isolamento monospórico”) reduz a possibilidade de estar envolvido mais de um

isolado ou espécie de patógenos em cada isolamento. A metodologia desenvolvida para acompanhamento periódico do crescimento a partir de poucos corpos hifais no meio de cultura permitiu uma caracterização das formas de crescimento do patógeno.

Este é o primeiro relato de crescimento “in vitro” de um strain de *Neozygites* sp. patogênico a *M. tanajoa*. Estas constatações preliminares sobre a habilidade de *Neozygites* sp. crescer em meio líquido não são suficientes para demonstrar o potencial de produção em larga escala. Entretanto, poderá facilitar a realização de vários trabalhos, como caracterização genética dos isolados e/ou strains, elucidação de problemas taxonômicos com o gênero *Neozygites*, avaliação da eficiência de strains promissores e avaliação do impacto ambiental deste agente de controle biológico.

4.3. Epizootiologia.

4.3.1. Variabilidade temporal da incidência inicial de *Neozygites* sp. em campos de mandioca

Nos estudos realizados em campo *Neozygites* sp. foi constatado inicialmente em algumas coletas esporádicas no mês de março nos campos 1, 3, 4, 6 e 8. Entretanto, menos de 1% dos ácaros continham capiloconídios aderidos ao corpo, não se constatando ácaros com corpos hifais (Figuras 6 e 7). Durante o mês de abril e as três primeiras semanas de maio, não foram observados ácaros infectados em nenhum dos campos. Epizootias causadas pelo patógeno, caracterizadas por elevadas e periódicas mortalidades do hospedeiro (BARR, 1979), só se tornaram evidentes a partir de 24 de maio. Aumentos consideráveis no nível de infecção foram observados nos campos 7 e 8 a partir de 24 de maio, nos campos 4, 5 e 6 a partir de 31 de maio, nos campos 1 e 2 a partir de 9 de junho, sendo somente observado no campo 3 a partir de 16 de junho. Desta forma, a defasagem entre a constatação do início da fase epizoótica em um dos campos, até sua constatação em todos os campos foi de 23 dias.

Os níveis de infecção foram bastante variáveis entre os campos. Nas figuras 6 e 7 são apresentados os níveis de infecção expressos pela porcentagem média de ácaros com capiloconídios aderidos ao corpo e com corpos hifais nas folhas apicais e medianas. Em 5 campos foram observados níveis de infecção superiores a 50%. Nos campos 1 e 4, os níveis de infecção atingiram 100%. Menores níveis de infecção ocorreram nos campos 5 e 8, sendo que nestes campos as maiores taxas de infecção constatadas foram de 36,5 e 39,5%, respectivamente. Em cinco campos foram observados mais de 39,5% dos ácaros infectados em menos de 17 dias a partir das primeiras observações de ácaros infectados em cada campo. O período necessário para a porcentagem de infecção passar de 0 a 58% no campo 3 e de 5 a 43% no campo 6 foi de apenas 9 dias.

Figura. 6 Dinâmica populacional de *Mononychellus tanajoa* e fitoseídeos e níveis de infecção por *Neozygites* sp. nos campos 1 a 4 em Piritiba - Bahia, 1994 (densidade 1 = 1 a 24, 2 = 25 a 200 e 3 = >200 ácaros por folha).

Figura. 7 Dinâmica populacional de *Mononychellus tanajoa* e fitoseídeos e níveis de infecção por *Neozygites* sp. nos campos 5 a 8 em Piritiba - Bahia, 1994 (densidade 1 = 1 a 24, 2 = 25 a 200 e 3 = >200 ácaros por folha).

Por outro lado, foram transcorridos 36 e 45 dias da primeira observação de ácaros infectados até que se atingisse o pico máximo da curva epizootica nos campos 1 e 4. No campo 4 foram constatados níveis de infecção elevados por um período mais prolongado que os demais; de 25 de junho a 15 de julho os níveis de infecção permaneceram acima de 65,5%. Ácaros infectados foram observados até o dia 6 de setembro (campo 5), porém em quantidades muito reduzidas a partir de 10 de agosto em todos os campos.

A localização dos primeiros ácaros infectados na copa da planta foi variável entre os campos (Tabela 8). Nos campos 5 e 6 os primeiros ácaros infectados foram observados exclusivamente nas folhas apicais e nos campos 1 e 4 exclusivamente nas medianas. Nos campos 2, 3, 7 e 8, embora os primeiros ácaros infectados tenham sido encontrados simultaneamente nas folhas apicais e medianas, os níveis de infecção foram sempre mais elevados nos ácaros localizados nas apicais.

Tabela 8. Níveis de infecção de *Neozygites* sp. em *Mononychellus tanajoa* localizados nas folhas apicais e medianas na primeira amostragem onde o patógeno foi constatado em 8 campos de mandioca em Piritiba - Bahia, 1994.

Campo	Início da epizootia	% de Infecção	
		Apicais	Medianas
1	9/06	0	2
2	9/06	12,8	1
3	16/06	17	7
4	9/06	0	2
5	31/05	19	0
6	31/05	10	0
7	24/05	2	1
8	24/05	8,5	1

Influência da posição geográfica dos campos e dos fatores climáticos na variabilidade da ocorrência de *Neozygites* sp.

Os campos 7 e 8, onde o patógeno foi primeiramente constatado, são os mais distantes do campo 3 onde o surgimento foi o mais retardado. A constatação de ácaros infectados ocorreu inicialmente nos campos a noroeste, com uma aparente progressão em direção aos campos localizados a sudeste.

A época do ano em que *Neozygites* sp. foi observado foi caracterizada por umidades relativamente altas e baixas temperaturas. Independentemente das oscilações de umidade e temperatura no ambiente neste período (Figura 8), o desenvolvimento da epizootia foi desencadeado com um rápido incremento na taxa de infecção, em todos os campos, embora em datas diferentes. No período de 28 de abril a 11 de maio, que precedeu o início das epizootias, foram observados elevados níveis de umidade relativa (médias diárias acima de 83%) e temperaturas moderadas (23,1 a 23,4°C). Durante a fase epizootica, final de maio a final de julho, a umidade média se manteve entre 70 e 79% e a temperatura entre 21,1 e 24,3°C. Apesar do pequeno aumento de temperatura e redução da umidade ocorrida neste período, a epizootia persistiu. Talvez este seja um dos motivos pelos quais os picos de infecção nos campos 6, 7 e 8, por exemplo, ocorridos num dos períodos de menor umidade durante a epizootia (71%), tenham sido consideravelmente mais baixos que aqueles ocorridos nos campos 1 e 4. Após 26 de julho, quando se observou uma drástica redução na densidade de *M. tanajoa* e no nível de infecção por *Neozygites* sp., fase pós-epizootica, ocorreu uma redução na umidade do ar para níveis abaixo de 70% e elevação na temperatura ambiente acima de 24°C.

A elevação da umidade, a redução da temperatura e as consideráveis precipitações ocorridas após 13 de abril não desencadearam de imediato o aparecimento da epizootia. Algumas hipóteses são levantadas sobre os motivos pelos quais neste ano o patógeno somente tenha causado altos níveis de infecção a partir do início do mês de junho.

Figura 8. Precipitação total e umidade relativa e temperatura médias entre cada amostragem e a amostragem anterior em Piritiba - Bahia, 1994.

Talvez, a principal razão de não se ter detectado a incidência de *Neozygites* sp. em níveis consideráveis até o início de junho se deva aos níveis relativamente baixos de *M. tanajoa* em todos os campos até aquela época. Outra razão também possível se refere à redução da disponibilidade de inóculo no ambiente, responsáveis pelos focos iniciais da doença, devido à seca intensa que assolou a região em 1992 e 1993. HAJEK et al. (1993) observaram que as infecções primárias, originárias da germinação dos esporos de resistência, são importantes para a produção de um adequado nível de inóculo secundário para o desenvolvimento das epizootias de *E. maimaiga* em *L. dispar*. Uma terceira possibilidade é de que parâmetros abióticos como período de orvalho, umidade relativa e temperatura ao nível da superfície foliar e/ou do solo (onde possíveis formas de resistência do fungo

possam ser encontradas), não mensurados neste estudo, tenham sido possivelmente inadequados para o patógeno até o mês de maio deste ano. O período de orvalho tem sido relatado como fator importante no desenvolvimento de epizootias. O desenvolvimento de epizootias de *Z. radicans* em *E. kraemeri*, na região central do Brasil, parece ser inibido quando a folhagem das plantas de feijão ficam molhadas por menos de 9 horas diárias (GALAINI-WRAIGHT et al., 1991).

O efeito da umidade relativa, temperatura e precipitação com o desenvolvimento das epizootias de *Neozygites* sp. ainda não são bem conhecidos. É possível também, que a variabilidade na ocorrência inicial de *Neozygites* sp. nos diferentes campos estudados, tenha sido decorrente do volume do inóculo inicial, tamanho da população de *M. tanajoa*, e/ou do período até a chegada da forma infectiva do patógeno até as folhas onde os ácaros se encontravam. Estudando o efeito das condições ambientais em *E. muscae* em Nebraska, Estados Unidos, WATSON & PETERSEN (1993) constataram que condições abióticas em campo não foram estritamente correlacionadas com o incremento na prevalência do patógeno em *Musca domestica* L (Diptera: Muscidae). Ensaio realizados em laboratório por estes autores indicaram que a temperatura teve efeito muito mais drástico na produção de conídios de *E. muscae* do que níveis de umidade relativa entre 23 e 97%. Entretanto, muitos relatos de epizootias de Entomophthorales em sistemas agrícolas consideram a umidade relativa como o fator mais crítico ao desenvolvimento e manutenção de epizootias (VACANTE et al., 1994).

Vários autores têm correlacionado níveis de infecção de artrópodos por patógenos com precipitação (SELHIME & MUMA, 1966; CARNER & CANERDAY, 1968; MUMA, 1969), porém outros estudos têm demonstrado que as precipitações aparentemente tem pouco impacto direto nas epizootias (SMITLEY et al., 1986b; KLUBERTANZ et al., 1991). Acredita-se que as chuvas apresentem um efeito indireto nas epizootias pela melhoria do estado vegetativo da cultura e o consequente incremento na densidade populacional de *M. tanajoa*. Por outro lado, as chuvas podem ter um efeito direto no transporte do inóculo inicial, provavelmente do solo ou da cobertura vegetal morta, até as folhas ou hastes onde se encontram os ácaros, através dos respingos que ocorrem com o

impacto das gotas d'água no solo. Entretanto, chuvas muito intensas e contínuas durante a ocorrência dos focos primários das doenças (fase pré-epizoótica) prejudicam a disseminação do patógeno e o desenvolvimento da epizootia (ALVES, 1986). Segundo este autor constatou-se para *Nomuraea rileyi* que a alternância de períodos chuvosos e períodos secos com ventos, durante a ocorrência da doença e principalmente na fase pré-epizoótica, é uma condição necessária e importante para que a doença atinja níveis epizoóticos.

A variabilidade temporal da incidência inicial de *Neozygites* sp. indica a viabilidade técnica de estudos para inoculação do patógeno de um campo a outro numa mesma região, objetivando antecipar as epizootias. Esforços devem ser envidados em estudos que objetivem conhecer os mecanismos de dispersão do patógeno e evidenciar a existência de uma progressão geográfica no surgimento da doença, para aumentar a eficiência de eventuais liberações em campo.

Influência da densidade de *M. tanajoa* na variabilidade inicial de *Neozygites* sp.

Em todos os campos o surgimento do patógeno ocorreu quando a densidade populacional de *M. tanajoa* era moderada a alta (1,76 a 2,44) (Figuras 6 e 7). O campo 8 foi o único onde a população de *M. tanajoa* era relativamente baixa (0,74) quando *Neozygites* sp. foi inicialmente observado. De 15 de julho até o final da epizootia o patógeno persistiu sob densidades muito baixas do hospedeiro. REMAUDIÈRE et al. (1981) relatam que várias espécies de Entomophthorales atuam como um bom fator regulador das populações de afídeos na França, embora epizootias somente ocorram em altas densidades populacionais destes insetos. Experimentos com modelos matemáticos e observações de campo têm demonstrado resultados consistentes relatando a existência de uma densidade mínima de hospedeiros de *Nosema pyrausta*, *E. maimaiga*, *N. parvispora* e outros, abaixo da qual o rápido incremento na infecção, característico das epizootias, não ocorre ou o patógeno não persiste (ONSTAD et al., 1990; ONSTAD & CARRUTHERS, 1990; HAJEK et al., 1993; VACANTE et al., 1994).

Efeito da precipitação e inimigos naturais na dinâmica de *M. tanajoa*

M. tanajoa apresentou pelo menos dois picos populacionais em cada campo. O primeiro pico populacional de *M. tanajoa* foi observado em 8 de março no campo 1, em 30 de março nos campos 2 a 7 e em 13 de abril no campo 8. A elevação da densidade do ácaro verde até aquelas datas ocorreu após o início do período chuvoso. Exceto nos campos 7 e 8, incrementos significativos na densidade de *M. tanajoa* foram observados entre as coletas de 2 e 8 de março, período em que foi registrada a precipitação de 138 mm. A redução na infestação de *M. tanajoa* após 30 de março em todos os campos coincidiram com um incremento no número de ácaros fitoseídeos e consideráveis precipitações até 28 de abril. Em todos os campos, acima de 70% das folhas continham fitoseídeos em pelo menos algumas das coletas realizadas neste período. Maiores porcentagens de folhas com fitoseídeos foram observadas no campo 8, nas coletas de 13 e 20 de abril quando fitoseídeos foram detectados em 100% das folhas. Embora neste estudo não se tenha identificado as espécies de fitoseídeos nos campos no decorrer do ano, outro estudo realizado nos campos 1, 2 e 8, durante o mesmo período, revelou que mais de 95% dos espécimes coletados eram *A. idaeus*.

A densidade de *M. tanajoa* permaneceu em níveis relativamente baixos entre 28 de abril e 11 de maio. Neste período foram registrados 102 mm de precipitação mas o nível populacional de fitoseídeos foi reduzido.

A partir de 11 de maio ocorreu novo incremento na densidade de *M. tanajoa*, culminando com o segundo pico populacional entre 24 de maio e 25 de junho em todos os campos. Em seis campos a densidade populacional de *M. tanajoa* no segundo pico populacional foi superior à densidade do primeiro pico. A redução da densidade populacional de *M. tanajoa* após este segundo pico, coincidiu com o incremento nos níveis de infecção por *Neozygites* sp. em junho. Durante os meses de junho e julho, período em que ocorreram os maiores níveis de infecção por *Neozygites* sp., foram registradas reduzidas precipitações e um pequeno número de ácaros fitoseídeos, exceto nos campos 6 e 7. Nestes

dois campos, o incremento e posterior decréscimo na densidade dos fitoseídeos também ocorreu concomitantemente à elevação e decréscimo na densidade de *M. tanajoa*.

Segundo YANINEK (1989a), no início do período chuvoso ocorre um acréscimo na população de *M. tanajoa* devido à melhoria do estado nutricional das folhas novas que aparecem com as chuvas. Utilizando modelos matemáticos de simulação, GUTIERREZ et al. (1988) e YANINEK et al. (1989a) relataram que as chuvas induzem a mortalidade e reduzem as populações de *M. tanajoa* durante a estação úmida.

A redução de populações de *M. tanajoa* não pode ser atribuída apenas ao efeito direto da precipitação. Os resultados obtidos indicam um efeito significativo de *Neozygites* sp. sobre o ácaro. Assim, apesar dos níveis relativamente altos de precipitações no início de maio, a população de *M. tanajoa* apresentou elevados índices de crescimento nas avaliações subsequentes. Independente dos baixos níveis de precipitação no restante do período de observação, a população de *M. tanajoa* passou a reduzir significativamente a partir do final de maio nos campos 6, 7 e 8 e a partir da segunda quinzena de junho nos campos 1 a 5, coincidindo com a época de maior ocorrência de *Neozygites* sp..

O efeito de ácaros predadores da família Phytoseiidae na redução populacional de *M. tanajoa*, também foi relatado por BRAUN et al. (1989).

Influência da posição da folha e do parâmetro de avaliação no nível de infecção de *M. tanajoa* por *Neozygites* sp..

Ácaros infectados foram observados em maior proporção nas folhas apicais quando comparados às folhas da parte mediana das plantas, exceto no campo 7 (Tabela 9). O nível de infecção nas folhas apicais foi 1,37 e 1,11 vez maior que o nível de infecção nas medianas quando determinado pela presença de capiloconídios aderidos aos ácaros e pela presença de corpos hifais na hemolinfa, respectivamente.

A média das notas atribuídas a densidade populacional de *M. tanajoa* nos levantamentos em que se observou a presença de *Neozygites* sp. foi de 1,4 nas folhas apicais

e 1,3 vez nas folhas medianas. Embora não tenha sido mensurado neste estudo, a área das folhas da parte apical da planta é menor que a da parte mediana. Desta forma, a densidade de ácaros por cm^2 foi maior nas folhas apicais. A maior incidência de *Neozygites* sp. nas folhas apicais deve ser devido à maior densidade populacional de *M. tanajoa* por unidade de área nestas folhas. A maior densidade deve ter facilitado a dispersão da doença.

A porcentagem de ácaros infectados estimada a partir do número de ácaros com capiloconídios aderidos foi maior que a porcentagem estimada a partir do número de ácaros com corpos hifais em 51,1%, igual em 36,2% e inferior em 12,7% das amostragens ($n = 94$ avaliações em folhas apicais e medianas). O número de ácaros contendo apenas capiloconídios em todos os levantamentos foi cerca de 1,56 e 1,26 vez maior que o número de ácaros contendo corpos hifais nas folhas apicais e medianas, respectivamente (Tabela 9). Existe uma relação positiva entre os parâmetros capiloconídios aderidos ao ácaro e presença de corpos hifais na hemolinfa, significativa a 0,1% de probabilidade, expressa pela equação $y = 5,54 + 0,42x$ e $y = 1,78 + 0,7x$ (y = conídios e x = corpos hifais) para folhas apicais e folhas medianas respectivamente. Embora não tenha sido observado elevados coeficientes de determinação entre estes dois métodos de avaliação (r^2 ajustado= 0,38 e 0,72 para folhas apicais e medianas respectivamente), a utilização da porcentagem de ácaros com conídios aderidos ao corpo pode ser útil para determinação do nível de infecção em estudos de dinâmica em campo. A determinação do número de ácaros com capiloconídios é substancialmente mais rápida e segura, podendo ser realizada em qualquer microscópio óptico, facilitando a avaliação em estudos de campo que exijam observações constantes. Os níveis de infecção medidos pelo número de ácaros com corpos hifais são provavelmente subestimados devido a dificuldade de visualização da fase inicial de infecção de *Neozygites* sp.. Por outro lado, a presença de capiloconídio de *Neozygites* sp. no corpo de *M. tanajoa* certamente indica o potencial para infecção, durante as épocas de prevalência do fungo, considerando-se que somente um conídio é suficiente para provocar a doença e morte do ácaro, segundo ODUOR (1995). KLUBERTANZ et al. (1991) mostraram uma estreita relação entre o número de capiloconídios de *N. floridana* por ácaro e o número de ácaros com corpos hifais.

Tabela 9. Infecção de *Neozygites* sp. e densidade (médias $\pm$ desvios padrão) de *Mononychellus tanajoa* durante uma epizootia do patógeno em 8 campos de mandioca na região de Piritiba - Bahia, 1994.

Campo	N	Folhas apicais			Folhas medianas		
		% de Infecção		M. <i>tanajoa</i> *	% de Infecção		M. <i>tanajoa</i> *
		Conídios	Corpos hifais		Conídios	Corpos hifais	
1	8	16,6	16,1	1,0	10,3	8,5	0,9
2	5	28,7	23,4	1,6	18,6	20,6	1,4
3	6	23,0	20,7	1,3	21,3	20,7	1,2
4	7	35,5	21,2	1,6	26,9	24,0	1,6
5	5	31,6	19,6	1,2	26,4	16,0	1,4
6	6	25,7	7,6	1,3	14,0	7,0	1,2
7	4	24,5	7,5	2,1	28,0	20,5	2,0
8	6	19,8	11,6	1,2	7,3	3,3	1,0
Média $\pm$ s		25,3 $\pm$ 26,8	16,2 $\pm$ 18,1	1,4 $\pm$ 0,8	18,4 $\pm$ 24,1	14,6 $\pm$ 19,8	1,3 $\pm$ 0,8

* densidade 1 = 1 a 24, 2 = 25 a 200 e 3 = >200 ácaros por folha.

Formação de esporos de resistência

Esporos de resistência de *Neozygites* sp. foram observados nos campos estudados entre 9 de junho e 20 de julho, período em que ocorreram os maiores níveis de infecção (Figura 9). Níveis muito baixos de ácaros com esporos de resistência ocorreram no início da epizootia. Um aumento repentino no nível de ácaros com esporos de resistência ocorreu com a evolução da epizootia. A maior quantidade de ácaros com esporos de resistência foi observada pouco antes da ocorrência do pico da proporção de ácaros infectados. Entretanto, a maior proporção relativa de ácaros infectados que apresentavam esporos de resistência foi observada logo após a ocorrência do pico da proporção de ácaros infectados, quando a densidade de *M. tanajoa* era muito reduzida nos campos.

As maiores porcentagens de ácaros com esporos de resistência foram observadas em períodos precedidos por grandes variações de temperaturas. Em 25 de junho, 3,75% dos ácaros vivos ou 13,6% dos ácaros infectados (em 800 ácaros coletados nos 8 campos), apresentavam formação de esporos de resistência. Foram registradas temperaturas elevadas e uma diferença de 8°C entre a média das temperaturas máximas e mínimas no período de 24 a 96 horas anterior a esta amostragem. Os ácaros, nos quais foi observada a formação de esporos de resistência, devem ter sido infectados durante este período, tendo em vista a dificuldade de se detectar o fungo em ácaros infectados a menos de 24 horas, e o fato de que a maior parte dos ácaros deve morrer antes de 96 horas após a infecção (ODUOR, 1995). Supõem-se então, que o efeito dos fatores climáticos no desenvolvimento do patógeno que induzirá a formação de esporos de resistência ou a formação de conídios seja mais relevante durante este período. Embora ainda não se conheça quais os fatores bióticos e/ou abióticos que induzem a formação deste tipo de esporo, é possível que a elevação da temperatura que precede o período de seca seja um destes fatores.

Ácaros vivos contendo esporos de resistência em formação observados neste estudo apresentavam sintomas semelhantes aos dos ácaros que somente apresentavam corpos hifais, ou seja, coloração amarelo-avermelhada e brilhante, com aumento do volume do corpo e redução dos movimentos. A formação de esporos de resistência foi observada mesmo antes dos corpos hifais terem preenchido todo o conteúdo interno do corpo dos ácaros. Estes esporos apresentavam-se inicialmente hialinos e com parede celular de coloração clara. Ácaros mortos contendo esporos de resistência apresentam cor preta. Os esporos no interior destes apresentavam então coloração escura (de marrom a preto) com parede celular espessa.

Segundo BEN-ZE'EV et al. (1990), aproximadamente dez espécies de Entomophthorales têm sido estudadas com relação ao mecanismo endógeno de dormência dos esporos de resistência que permite ao patógeno sobreviver ao período de inverno, principalmente em climas temperados.

Figura 9. Níveis de *Mononychellus tanajoa* com esporos de resistência de *Neozygites* sp. em oito campos de mandioca e umidade relativa e temperatura entre 24 a 96 horas antes de cada amostragem em Piritiba - Bahia, 1994 (densidade 1 = 1 a 24, 2 = 25 a 200 e 3 = >200 ácaros por folha).

A sobrevivência em períodos secos tem sido atribuída a hifas ou corpos hifais viáveis confinados dentro do corpo de insetos (KENNETH et al., 1972; WILDING, 1973; TYRRELL, 1988; PELL & WILDING, 1992).

Estas são as primeiras observações de esporos de resistência em estudos de dinâmica de *M. tanajoa* e *Neozygites* sp. Ocorrência deste tipo de esporo nesta espécie, haviam sido observada raramente por DELALIBERA et al. (1992) em coletas esporádicas na região Nordeste. Em regiões tropicais, principalmente nas regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro, os patógenos necessitam de um mecanismo eficiente de resistência para transpor os prolongados períodos de seca, que coincidem com temperaturas elevadas. É possível que os esporos de resistência sejam a principal forma de sobrevivência do patógeno durante estes períodos.

Esporos de resistência de *E. grylli* são formados predominantemente após a morte de *Melanoplus differentialis* (Thomas) (Orthoptera: Acrididae) (TILLOTSON & MARGOLIES, 1990). Se a maior produção de esporos de resistência em *Neozygites* sp. também ocorrer após a morte em *M. tanajoa*, é possível que este tipo de esporo seja muito mais frequente no ambiente do que o observado, já que nestes estudos a determinação do nível de infecção somente foi realizada em ácaros vivos.

4.3.2 - Disseminação de *Neozygites* sp. dentro do campo de mandioca.

Ácaros infectados foram observados pela primeira vez no campo 7 em 21 de maio. Nesta ocasião, ácaros infectados foram encontrados em 56% da área total estudada (Figura 10a). Quatro dias mais tarde, 96% da área apresentava ácaros infectados, encerrando-se então as avaliações neste campo. No campo 9, os primeiros ácaros infectados foram encontrados em 13 de junho, tendo estes sido encontrados em 14% da área total estudada. A disseminação do patógeno foi mais lenta neste campo, passando de 14 a 100% em 14 dias. No campo 9, os primeiros ácaros infectados foram observados pela primeira vez 23 dias após as primeiras constatações no campo 7.

As primeiras constatações de *Neozygites* sp. ocorreram após uma elevação na densidade populacional de *M. tanajoa* em ambos campos (Figura 10b). Entretanto, *M. tanajoa* atingiu elevados níveis populacionais mais rapidamente no campo 7, onde o patógeno foi constatado primeiro. A média das notas atribuídas à densidade de *M. tanajoa* quando *Neozygites* sp. foi constatado inicialmente era de 2,3 no campo 7 e 1,6 no campo 9.

As principais diferenças entre estes dois campos, que poderiam estar associadas à defasagem na ocorrência inicial e à diferença na velocidade da disseminação do patógeno dentro da área, foram aparentemente a densidade do hospedeiro e a idade e tamanho das plantas. A idade do plantio do campo 7 nesta época era de 1 ano e 5 meses, e do campo 9, 3 meses. O efeito da idade do plantio no desenvolvimento da epizootia ainda é um assunto pouco explorado. Entretanto, imagina-se que o surgimento mais rápido do patógeno no cultivo mais velho possa estar associado à maior área foliar, maior contato entre plantas e consequentemente maior densidade de ácaros por área de plantio. Isto proporciona uma maior probabilidade de contato dos ácaros com os focos iniciais de infecção.

Figura 10. Disseminação de *Neozygites* sp. a) porcentagem da área com o patógeno a cada amostragem). b) densidade populacional de *Mononychellus tanajoa* nos campos 7 e 9 em Piritiba, Bahia - 1994 (densidade 1 = 1 a 24, 2 = 25 a 200 e 3 = >200 ácaros por folha).

Os primeiros ácaros infectados por *Neozygites* sp. foram observados em pontos esparsos em cada um dos campos (Figuras 11 e 12). Os ventos predominantes durante o período de surgimento dos ácaros infectados eram do nordeste. A disseminação de *Neozygites* sp. ocorreu também de forma regular em toda a área, não sendo observada nenhuma tendência quanto à direção dos ventos predominantes ou posição das bordas do campo. É possível que o vento seja um fator importante no transporte dos inóculos iniciais a partir de outros campos, assim como na dispersão da doença dentro do campo. Entretanto, é possível que tal possibilidade não poderia ter sido demonstrada neste estudo devido às dimensões relativamente reduzidas da área de estudo. Por outro lado, os resultados encontrados podem sugerir que *Neozygites* sp. sobreviva de um ciclo para outro da cultura, no próprio campo. Os dois campos estudados têm sido cultivados continuamente com mandioca. Desta forma, a fonte de inóculo poderia já estar distribuída por quase todo o campo.

O patógeno sempre foi detectado em maior proporção nas parcelas com os níveis mais altos de *M. tanajoa* (Figura 13). Apesar disto, a frequência de 100% de parcelas infectadas ocorreu no mesmo dia (27 de junho) em todos os níveis populacionais de *M. tanajoa*. O aumento da velocidade de novas constatações em parcelas com baixos níveis de *M. tanajoa* provavelmente ocorreu pelo incremento de inóculo no ambiente, devido à dispersão relativamente rápida do patógeno a partir das parcelas com maior densidade de hospedeiros.

Estas observações indicam que *Neozygites* sp. dispersa-se rapidamente por todo o campo de mandioca quando a densidade de *M. tanajoa* é elevada. Estudos futuros devem identificar de onde surgem os focos iniciais da doença e qual o principal mecanismo de dispersão do fungo. HAJEK & LEGER (1994) sugerem que a dispersão aérea de esporos de Entomophthorales não é incomum, embora poucas espécies tenham sido estudadas. Abundante quantidade de esporos no ar e aparente dispersão a longas distâncias de *E. maimaiga* foram observadas por ELKINTON et al. (1991). É possível que além da dispersão aérea de conídios também seja importante a dispersão pelo vento de ácaros infectados, principalmente quando a densidade populacional é elevada.

Figura 11. Disseminação de *Neozygites* sp. no campo 7 em Piritiba - Bahia, 1994.

Campo 9

Figura 12. Disseminação de *Neozygites* sp. no campo 9 em Piritiba - Bahia, 1994.

Figura 13 - Frequência acumulada da constatação de *Neozygites* sp. em parcelas com diferentes densidades de *Mononychellus tanajoa* no campo 9 em Piritiba - Bahia, 1994.

5. CONCLUSÕES

O patógeno *Neozygites* sp. é um importante inimigo natural de *M. tanajoa* e ocorre nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe.

Crescimento de protoplastos de *Neozygites* sp. pode ser obtido em meio de Grace + 0,35g/l de NaHCO₃ e no meio 199 (com sais de Hank) + 26,68g/l de sacarose + 2,2g/l de NaHCO₃, enriquecidos com soro fetal bovino, às proporções de 5 ou 8% do volume total.

A formação de esporos de resistência no mês de junho indica que esta seja uma forma do patógeno transpor os período de seca no Nordeste do Brasil.

Maiores níveis de *Neozygites* sp. ocorrem nas folhas apicais da planta.

A disseminação de *Neozygites* sp. dentro do campo ocorre mais rapidamente nas áreas com maiores densidades de *M. tanajoa*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUDELO-SILVA, P. A species of *Triplosporium* (Zygomycetes: Entomophthorales) infecting *Mononychellus progressivus* (Acari: Tetranychidae) in Venezuela. **Florida Entomologist**, Winter Haven, **69**: 444-6, 1986.

ALVAREZ AFANADOR, J.M. Estudios de patogenicidad de un hongo asociado con *Tetranychus urticae* Koch y *Mononychellus tanajoa* (Bondar), acaros plaga de la yuca *Manihot esculenta* Crantz. Bogota, 1990. 113p. (Undergrad. thesis-Facultad de Agronomia/Universidad Nacional de Bogota, Colombia)

ALVES, S.B. Patologia geral. In: ALVES, S.B., coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo, Manole, 1986. p.3-70.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1991, Rio de Janeiro, v.52, p.514-20, 1991.

ARAUJO, W.F.; MORAES G.J. de; DELALIBERA Jr. I; ALENCAR, J.A. de; MERGULHÃO, S.M.R.; WENZEL NETO, F. Seletividade de agroquímicos a *Mononychellus tanajoa* e *Amblyseius idaeus* (Acari: Tetranychidae e Phytoseiidae). **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, **10**(1/2): 27-30, 1991.

BAHIA. Secretaria do Planejamento, Ciência e Tecnologia. Centro de Estatística e Informação. Informações básicas dos municípios baianos: região nordeste. Salvador, 1994a. p.6, 2v.

BAHIA. Secretaria do Planejamento, Ciência e Tecnologia. Centro de Estatística e Informação. Informações básicas dos municípios baianos: região paraguaçu. Salvador, 1994b. p.361-401.

BARR, R. Epidemiological concepts for entomologists. **Bulletin of Entomological Society of America**, Lanham, **29**(2): 129-30, 1979.

BARTKOWSKI, J.; ODINDO, M.O.; OTIENO, W.A. Some fungal pathogens of the cassava green spider mites *Mononychellus* spp. (Tetranychidae) in Kenya. **Insect Science and its Application**, Kenya, **9**(4): 457-9, 1988

BEAUVAIS, A. & LATGÉ, J.P. A simple medium for growing Entomophthoralean protoplasts. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **51**(2): 175-8, 1988.

BELLOTTI, A.C.; HERSHEY, C.H.; VARGAS, O. Recent advances in resistance to insect and mite pests of cassava. Cassava Breeding: A multidisciplinary review. In: HERSHEY, C.H. (Ed.) Workshop in the Philippines, 1985. **Proceedings**, Cali, 1987a., 117-46.

BELLOTTI, A.C.; MESA, R.; SERRANO, M.; GUERRERO, J.M.; HERRERA, C.J. Taxonomic inventory and survey activity for natural enemies of cassava green mites in the Americas. **Insect Science and Its Application**, Kenya, **8**(6): 845-9, 1987b.

- BEN-ZE'EV, I.S.; BITTON, S.; KENNETH, R.G. Induction and inhibition of germination in *Neozygites fresenii* (Entomophthorales: Neozygitaceae) zygospores by various time-temperature stimuli. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **55**: 1-10, 1990.
- BRANDENBURG, R.L. Impact of *Erynia phytonomi* (Zygomycetes: Entomophthorales), a fungal pathogen, on alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae) populations in Missouri. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, **78**(2): 460-2, 1985.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normais Climatológicas** (1961-1990). Brasília: EMBRAPA, 1992. 84p.
- BRAUN, A.R.; BELLOTTI, A.C.; GUERRERO, J.M.; WILSON, L.T. Effect of predator exclusion on cassava infested with tetranychid mites (Acari: Tetranychidae). **Environmental Entomology**, College Park, **18**(4): 711-4, 1989.
- 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**, New York, **65**: 10-6, 1995.
- BUTT, T.M. & HEATH, I.B. The changing distribution of actin and nuclear behavior during the cell cycle of the mite-pathogenic fungus *Neozygites* sp.. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, **46**: 499-505, 1988.

- BUTT, T.M. & HUMBER, R.A. An immunofluorescence study of mitosis in a mite-pathogen, *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales). **Protoplasma**, New York, **151**: 115-23, 1989.
- BUTT, T.M.; HAJEK, A.E.; HUMBER, R.A. The effect of temperature on growth and survival of protoplasts of the gypsy moth pathogen *Entomophaga maimaiga*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **64**:(1) 74-5, 1994.
- BYRNE, D.H.; GUERRERO, J.M.; BELLOTTI, A.C.; GRACEN, V.E. Yield and plant growth responses of *Mononychellus* mite resistant and susceptible cassava cultivars under protected vs. infested conditions. **Crop Science**, Madison, **22**: 486-90, 1982.
- CARNER, G.R. & CANERDAY, T.D. Field and laboratory investigations with *Entomophthora fresenii* a pathogen of *Tetranychus* spp. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, **61**(4): 956-8, 1968.
- CARRUTHERS, R.I. & HAYNES, D.L. Laboratory transmission and in vivo incubation of *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in the onion fly, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **45**: 282-7, 1985.
- 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**, College Park, **15**: 1156-60, 1986.

- DELALIBERA Jr., I. & MORAES, G.J. de Efeito de *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) e de ácaros predadores na dinâmica populacional de *Mononychellus tanajoa* (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae) In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3, Águas de Lindóia, 1992. **Anais. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA**, 1992. p.184.
- DELALIBERA Jr., I.; SOSA GOMEZ, D.R.; MORAES, G.J. de; ALENCAR, J.A. de; ARAUJO, W.F. Epizootiologia de *Neozygites* sp. (ZYGOMYCETES: ENTOMOPHTHORALES) sobre o ácaro verde, *Mononychellus tanajoa* (Bondar), e dinâmica populacional de ácaros predadores (ACARI: PHYTOSEIIDAE) na Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13., Recife, 1991. **Resumos. Recife, SEB**, 1991. p.288.
- DELALIBERA Jr., I.; SOSA GOMEZ, D.R.; MORAES, G.J. de; ALENCAR, J.A. de; ARAUJO, W.F. Infection of *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) by the fungus *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in Northeastern Brazil. **Florida Entomologist**, Winter Haven, **75**(1): 145-7, 1992.
- DUNPHY, G.B. & CHADWICK, J.M. Strains of protoplasts of *Entomophthora egressa* in spruce budworm larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **45**: 255-9, 1985.
- DUNPHY, G.B. & NOLAN, R.A. Regeneration of protoplasts of *Entomophthora egressa*, a fungal pathogen of the eastern hemlock looper. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **55**: 107-13, 1976.
- DUNPHY, G.B. & NOLAN, R.A. Morphogenesis of protoplasts of *Entomophthora egressa* in simplified culture media. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **55**: 3046-53, 1977.

- DUNPHY, G.B.; CHADWICK, J.M.; NOLAN, R.A. Influence of physical factors and selected media on the growth of *Entomophthora egressa* protoplasts isolated from spruce budworm larvae. **Mycologia**, New York, **77**(6): 887-93, 1985
- DUNPHY, G.B.; NOLAN, R.A.; MacLEOD, D.M. Comparative growth and development of two protoplast isolates of *Entomophthora egressa*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **31**(2): 267-9, 1978.
- ELKINTON, J.S.; HAJEK, A.E.; BOETTNER, G.H.; SIMONS, E.E. Distribution and apparent spread of *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) populations in North America. **Environmental Entomology**, College Park, **20**: 1601-5, 1991.
- FAO PRODUCTION YEARBOOK - 1993, Rome, v.47, p. 93, 1994.
- FLECHTMANN, C.H.W. Ácaros das principais culturas. In: FLECHTMANN, C.H.W. **Ácaros de importância agrícola**. São Paulo, Nobel, 1989, p. 115-6.
- FRANCO, A.; RIVAS, L.; MONSALVE, A.; CORREA, C.; MARÍN, N. Statistical Appendices In: HENRY, G., ed. **Trends in CIAT commodities 1993**. Cali, (CIAT working Document, 128). 1993. 221p.
- FUNK, C.J.; RAMOSKA, W.A.; BECHTEL, D.B. Light and electron microscopic studies of protoplast development during *Entomophaga grylli* pathotype 2 infections in *Melanoplus differentialis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **55**: 207-14, 1990.

- GALAINI-WRAIGHT, S.; WRAIGHT, S.P.; CARRUTHERS, R.I.; ROBERTS, D.W. Temperature-dependent germination and host penetration of the entomophthoralean fungus *Zoophthora radicans* on the leafhopper *Empoasca Kraemeri*. **Mycological Research**, Cambridge, **96**(1): 38-48, 1992.
- GALAINI-WRAIGHT, S.; WRAIGHT, S.P.; CARRUTHERS, R.I.; MAGALHÃES, B.P.; ROBERTS, D.W. Description of a *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthoraceae) epizootic in a population of *Empoasca Kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae) on beans in central Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **58**: 311-26, 1991.
- GEDEN, C.J.; STEINKRAUS, D.C.; RUTZ, D.A. Evaluation of two methods for release of *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) to infect house flies (Diptera: Muscidae) on dairy farms. **Environmental Entomology**, College Park, **20**(5): 1201-8, 1993.
- GLARE, T.R.; MILNER, R.J.; CHILVERS, G.A. The effect of environmental factors on the production, discharge, and germination of primary conidia of *Zoophthora phalloides* Batko. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **48**, 275-83, 1986.
- GONDIM Jr., M.G.C. Efeito da vegetação nativa no controle biológico de *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae), na zona da mata de Pernambuco e biologia de *Neoseiulus anonyms* (Chant & Baker) (Acari: Phytoseiidae). Recife, 1992. 143p. (Mestrado - Universidade Federal Rural de Pernambuco).

- GUTIERREZ, A.P.; YANINEK, J.S.; WERMELINGER, B.; HERREN, H.R.; ELLIS, C.K. Analysis of biological control of cassava pests in Africa. III. Cassava green mite *Mononychellus tanajoa*. **Journal of Applied Ecology**, Osney Mead, **25**: 941-50, 1988.
- HAJEK, A.E. & LEGER, R.J.St. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. In: MITTLER, T.E.; RADOVSKY, F.J.; RESH, V.H. ed. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, **39**: 293-322, 1994.
- HAJEK, A.E. & WHEELER, M.M. Application of techniques for quantification of soil-borne Entomophthoralean resting spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **64**: 71-3, 1994.
- 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**, College Park, **19**(1): 85-90, 1990.
- HAJEK, A.E.; LARKIN, T.S.; CARRUTHERS, R.I.; SOPER, R.S. Modeling the dynamics of *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) epizootics in Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) populations. **Environmental Entomology**, College Park, **22**(5): 1172-87, 1993.
- HAMM, J.J. Epizootics of *Entomophthora aulicae* in lepidopterous pests of Sorghum. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **36**: 60-3, 1980.

- HELLE, W & OVERMEER, W.P.J. Rearing techniques. In: HELLE, W & SABELIS, M.W., ed. **Spider mites; their biology, natural enemies and control**. Amsterdam, Elsevier, 1985. v. 1A, p.331-5.
- HUMBER, R.A. The identity of *Entomophaga* species (Entomophthorales: Entomophthoraceae) attacking lepidoptera. **Mycotaxon**, Ithaca, **21**: 265-72, 1984.
- HUMBER, R.A., MORAES, G.J. de; SANTOS, M. dos. Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by *Triplosporium* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in northeastern Brazil. **Entomophaga**, Paris, **26**: 421-5, 1981.
- JONES, W.O. **Manioc in Africa**. California, Stanford Univ. Press, 1959. 315p.
- KENNETH, R.G.; WALLIS, G.; GERSON, U.; PLAUT, H.N. Observations and experiments on *Triplosporium floridanum* (Entomophthorales) attacking spider mites in Israel. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **19**: 366-9, 1972.
- KLUBERTANZ, T.H.; PEDIGO, L.R.; CARLSON, R.E. Impact of fungal epizootics on the biology and management of the twospotted spider mite (Acari Tetranychidae) in soybean. **Environmental Entomology**, College Park, **20**(2): 731-5, 1991.
- LATGÉ, J.P.; REMAUDIÈRE, G.; SOPER, R.S.; MADORE, C.D.; DIAQUIN, M. Growth and sporulation of *Entomophthora virulenta* on semidefined media in liquid culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **31**(2): 225-33, 1978.

- LE RÜ, B. & IZIQUEL, Y. Nouvelles données sur le déroulement de la mycose à *Neozygites fumosa* sur la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti*. **Entomophaga**, Paris, **35**(2): 173-83, 1990.
- LE RÜ, B.; IZIQUEL, Y.; BASSANGAMA, A.; KIYINDOU, A. Variations d'abondance et facteurs de régulation de la cochenille du manioc *Phenacoccus manihoti* (Hom.: Pseudococcidae) cinq ans après l'introduction d'*Epidinocarsis lopezi* (Hym.: Encyrtidae) parasitoïde Néotropical au Congo en 1982. **Entomophaga**, Paris, **36**(4): 499-511, 1991.
- LENIS, J.I.; BRAUN, A.R.; MESA C., N.C ; DUQUE, M.C. Uso de escalas para la estimación de poblaciones de ácaros Tetranychidae y muestreo de presencia-ausencia para Phytoseiidae en cultivo de Yuca. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, **19**(3): 81-90, 1993.
- LI, Z.; SOPER, R.S.; HAJEK, A.E. A method for recovering resting spores of Entomophthorales (Zygomycetes) from soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **52**: 18-26, 1988.
- McGUIRE, M.R.; MADDUX, J.V.; ARMBRUST, E.J. Effect of temperature on distribution and success of introduction of an *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) isolate of *Erynia radicans* (Zygomycetes: Entomophthoraceae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **50**: 291-301, 1987a.
- McGUIRE, M.R.; MORRIS, M.J.; ARMBRUST, E.J.; MADDUX, J.V. An epizootic caused by *Erynia radicans* (Zygomycetes: Entomophthoraceae) in Illinois *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) population. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **50**: 78-80, 1987b.

- MEGEVAND, B.; YANINEK, J.S.; FRIESE, D.D. Classical biological control of the cassava green mite. **Insect Science and its Application, Kenya**, **8**(6): 871-4, 1987.
- MILLSTEIN, J.A.; BROWN, G.C.; NORDIN, G.L. Microclimatic moisture and conidial production in *Erynia* sp. (Entomophthorales: Entomophthoraceae): In vivo moisture balance and conidiation phenology. **Environmental Entomology**, College Park, **12**: 1339-43, 1983.
- MILNER, R.J. & SOPER, R.S. Bioassay of *Entomophthora* against the Spotted Alfalfa Aphid *Therioaphis trifolii* f. *maculata*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **37**(2): 168-73, 1981.
- MORAES, G.J. de & DELALIBERA Jr., I. Specificity of a strain of *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) to *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, **14**: 89-94, 1992.
- MORAES, G.J. de; MESA, N.C.; BRAUN, A. Some phytoseiid mites of Latin America (Acari: Phytoseiidae). **International Journal of Acarology**, Oak Park, **17**(2): 117-139, 1991.
- MORAES, G.J. de; ALENCAR, J.A. de; WENZEL NETO, F.; MERGULHÃO, S.M.R. Explorations for natural enemies of the cassava green mite in Brazil. IN: HOWELER, R.H.(ed.) Symposium of the International Society of Tropical Root Crops, 8., Bangkok, 1988. **Proceedings**. Bangkok, 1990. p.351-353

- MULLENS, B.A. Cross-transmission of *Entomophthora muscae* (Zygomycetes: Entomophthorales) among naturally infected muscoid fly (Diptera: Muscidae) hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **53**(2): 272-5, 1989.
- MUMA, M.H. Coincidence and incidence of *Entomophthora floridana* in *Eutetranychus banksi* in Florida citrus grooves. **Florida Entomologist**, Winter Haven, **52**: 107-122. 1969.
- NEWMAN, G.G. & CARNER, G.R. Environmental factors affecting conidial sporulation and germination of *Entomophthora gammae*. **Environmental Entomology**, College Park, **4**(4): 615-8, 1975.
- ODUOR, G.I. Abiotic factors and the epizootiology of *Neozygites* cf. *floridana*, a fungus pathogenic to the cassava green mite. Amsterdam. 1995. 100p. (PhD. University of Amsterdam)
- ONSTAD, D.W. & CARRUTHERS, R.I. Epizootiological models of insect diseases. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, **35**: 399-419, 1990.
- ONSTAD, D.W.; MADDOX, J.V.; COX, D.J.; KORNKVEN, E.A. Spatial and temporal dynamics of animals and the host-density threshold in epizootiology. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **55**: 76-84, 1990.
- PELL, J.K. & WILDING, N. The survival of *Zoophtora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales) isolates as hyphal bodies in mummified larvae of *Plutella xylostella* (Lep.: Yponomeutidae). **Entomophaga**, Paris, **37**(4): 649-54, 1992.

- PERRY, D.F. & LATGÉ, J.P. Chemically defined media for Growth and sporulation of *Entomophthora virulenta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **35**(1): 43-8, 1980.
- REMAUDIÈRE, G.; LATGÉ, J.P.; MARIE-FRANCE, M. Écologie comparée des entomophthoracées pathogènes de pucerons en France littorale et continentale. **Entomophaga**, Paris, **26**(2): 157-78, 1981.
- SELHIME, A.G. & MUMA, M.H. Biology of *Entomophthora floridana* attacking *Eutetranychus banksi*. **Florida Entomologist**, Winter Haven, **49**: 161-8, 1966.
- SMITLEY, D.R.; BROOKS, W.M.; KENNEDY, G.G. Environmental effects on production of primary and secondary conidia, infection, and pathogenesis of *Neozygites floridana*, a pathogen of the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **47**: 325-32, 1986a.
- SMITLEY, D.R.; BROOKS, W.M.; KENNEDY, G.G. Role of the entomogenous fungus, *Neozygites floridana*, in the population declines of the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*, on field corn. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, **41**: 255-64, 1986b.
- SOPER, R.S.; SHIMAZU, M.; HUMBER, R.A.; RAMOS, M.E.; HAJEK, A.E. Isolation and characterization of *Entomophaga maimaiga* sp. nov., a fungal pathogen of Gypsy moth, *Lymantria dispar*, from Japan. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **51**(3): 229-41, 1988.

- STEINKRAUS, D.C. & SLAYMAKER Effect of temperature and humidity on formation, germination and infectivity of conidia of *Neozygites fresenii* (Zygomycetes: Neozygicetaceae) from *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **64**: 130-7, 1994.
- TILLOTSON, D.K. & MARGOLIES, D.C. Effects of cadaver age on production of infective stages of *Entomophaga grylli* pathotype 2 in infected *Melanoplus differentialis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **55**: 202-6, 1990
- TU, C.M. In vitro isolation of *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) from infected seed corn Maggot *Delia platura* (Diptera: Anthomyiidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **55**: 289-90, 1990.
- TYRRELL, D. Survival of *Entomophaga aulicae* in dried insect larvae. **Journal of Invertebrate pathology**, New York, **52**: 187-8, 1988.
- URBANCZYK, M.J.; ZABZA, A.; BALAZY, S.; CZOCH, W.P. Laboratory culture media and enzyme activity of some entomopathogenic fungi of *Zoopthora* (Zygomycetes: Entomophthorales). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, **59**: 250-7, 1992.
- VACANTE, V.; CACCIOLA, S.O.; PENNISI, A.M. Epizootiological study of *Neozygites parvispora* (Zygomycota: Entomophthoraceae) in a population of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on pepper in Sicily. **Entomophaga**, Paris, **39**(2): 123-30, 1994.

- VEIGA, A.F.S.L. Aspectos bioecológicos e alternativas de controle do ácaro verde da mandioca *Mononychellus tanajoa* (Bondar, 1938)(Acarina: Tetranychidae) no Estado de Pernambuco. Piracicaba. 1985. 137p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- WATSON, D.W. & PETERSEN, J.J. Seasonal activity of *Entomophthora muscae* (Zygomycetes: Entomophthorales) in *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) with reference to temperature and relative humidity. **Biological Control**, Orlando, 3: 182-90, 1993.
- WESELOH, R.M. & ANDREADIS, T.G. Epizootiology of the fungus *Entomophaga maimaiga*, and its impact on Gypsy moth populations. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 59: 133-41, 1992.
- WILDING, N. The survival of *Entomophthora* spp. in mummified aphids at different temperatures and humidities. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 21: 309-11, 1973.
- WILDING, N. Entomophthorales in pest control - Recent developments. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL 5., Adelaide, 1990. **Proceedings and abstracts**. Adelaide, 1990. p.138-42.
- YANINEK, J.S. & HERREN, H.P. Introduction and spread of the cassava green mite, *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Acari: Tetranychidae), an exotic pest in Africa and the search for appropriate control methods: a review. **Bulletin of Entomological Research**, Wallingford, 78: 1-13, 1988.

- YANINEK, J.S. & SCHULTHESS, F. Developing an environmentally sound plant protection for cassava in Africa. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, 46: 305-24, 1993.
- YANINEK, J.S.; GUTIERREZ, A.P.; HERREN, H.R. Dynamics of *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) in Africa: Experimental evidence of temperature and host plant effects on population growth rates. **Environmental Entomology**, College Park, 18(4): 633-40, 1989a.
- YANINEK, J.S.; GUTIERREZ, A.P.; HERREN, H.R. Dynamics of *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) in Africa: Effects on dry matter production and allocation in cassava. **Environmental Entomology**, College Park, 19(6): 1767-72, 1990.
- YANINEK, J.S.; MORAES, G.J. de; MARKHAM, R.H. **Handbook on the cassava green mite (*Mononychellus tanajoa*) in Africa**. Rome, Ed. Alphabyte, 1989b. 140p.
- YANINEK, J.S.; SAIZONOU, S.; ONZO, A.; ZANNOU, I.; GNANVOSSOU, D. Seasonal and habitat variability in the fungal pathogens, *Neozygites* sp. and *Hirsutella* sp., found associated with cassava mites in Benin, west Africa. **Biocontrol Science and Technology**. No prelo.
- YENDOL, W.G. Factors affecting germination of *Entomophthora* conidia **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 10: 116-21, 1968.

7 - APÊNDICE

Localização dos campos amostrados para avaliação da distribuição de *Neozygites* sp.
em *Mononychellus tanajoa*.

UF	Município	Latitude (S)	Longitude (W)	<i>M. t</i> ¹	Neoz ²	Data de coleta
BA	Conceição do Almeida	12°48'	39°12'		+	27/04/93
BA	Biritinga	11°36'	38°47'		+	29/04/93
BA	Gov. Mangabeira	12°39'	39°02'	1	-	12/08/93
BA	Gov. Mangabeira	12°31'	39°00'	1	-	12/08/93
BA	Feira de Santana	12°17'	38°58'	1	-	12/08/93
BA	Piritiba (Sumaré)	11°43'	40°35'	2	+	12/08/93
BA	Conceição de Feira	12°33'	39°05'		-	27/08/93
BA	Santa Barbara	10°51'	39°03'		-	27/08/93
BA	Serrinha	11°39'	39°00'		-	27/08/93
BA	Piritiba (Sumaré)	11°42'	40°35'		+	27/08/93
BA	Capim Grosso	11°06'	40°07'		-	27/08/93
BA	Capim Grosso	11°43'	39°40'	1	-	27/08/93
BA	Ipirá	12°09'	39°44'		+	27/08/93
BA	Gov. Mangabeira	12°32'	38°59'	1	-	30/08/93
BA	Itaberaba	12°23'	40°15'	3	-	13/09/93
BA	Itaberaba	12°24'	40°14'	3	-	13/09/93
BA	Itaberaba	12°26'	40°12'	3	-	13/09/93
BA	Itaberaba	12°47'	40°18'	3	-	13/09/93
BA	Piritiba (Sumaré)	11°43'	40°35'	2	+	14/09/93
BA	Mundo Novo	11°49'	40°31'	3	+	14/09/93
BA	Baixa Grande	11°55'	40°11'	3	+	14/09/93
BA	Macajuba	11°55'	40°20'	2	+	14/09/93
BA	Macajuba	11°56'	40°19'	2	+	14/09/93
BA	Feira de Santana	12°18'	38°57'	0	-	14/09/93
MA	Caxias	04°41'	43°27'	1	-	22/09/93
MA	Caxias	04°33'	43°34'	1	-	22/09/93
MA	Caxias	04°36'	43°39'	2	-	22/09/93
MA	Peritoró	04°30'	44°15'	1	-	22/09/93
MA	Peritoro	04°25'	44°18'	1	-	22/09/93
MA	Caxuba	04°12'	44°28'	1	-	22/09/93
MA	Bacabal	04°14'	44°35'	1	-	22/09/93
PI	José de Freitas	04°57'	42°33'	1	-	23/09/93
PI	José de Freitas	04°40'	42°35'	1	-	23/09/93
PI	Barras	04°19'	42°18'	1	-	23/09/93
PI	Teresina	05°05'	42°48'	2	-	24/09/93
PI	Capitão de Campos	04°27'	41°53'	0	-	26/09/93
PI	Piripiri	04°12'	41°46'	0	-	26/09/93
CE	Tianguá	03°43'	40°59'	0	-	26/09/93
CE	Tianguá	03°39'	41°09'	1	-	26/09/93

UF	Município	Latitude (S)	Longitude (W)	$M.t^1$	Neoz ²	Data de coleta
CE	Tianguá	03°37'	41°11'	1	-	26/09/93
CE	Viçosa do Ceará	03°35'	41°14'	0	-	26/09/93
CE	Tianguá	03°46'	41°00'	1	-	26/09/93
CE	Ubajara	03°51'	40°56'	1	-	26/09/93
CE	Ubajara	03°53'	40°53'	1	-	26/09/93
BA	Gov. Mangabeira	12°38'	39°01'	1	+	01/11/93
BA	S.Miguel das Matas	13°02'	39°29'	3	+	05/11/93
BA	Cruz das Almas	12°41'	39°06'	3	+	05/11/93
BA	S.Miguel das Matas	13°03'	39°30'	3	+	22/11/93
BA	São Gonçalo	2°26'31"	38°58'58"	0.63	-	01/03/94
BA	Feira de Santana	12°12'50"	39°08'55"	1.83	-	01/03/94
BA	Ipirá	11°41'18"	40°07'50"	1.43	-	01/03/94
BA	Piritiba	11°41'18"	40°36'47"	1.33	-	02/03/94
BA	Jacobina	11°13'14"	40°35'05"	0.60	-	02/03/94
BA	Capim Grosso	11°05'51"	40°04'23"	1.06	-	02/03/94
PE	Araripina	07°29'55"	40°27'32"	1.43	-	03/03/94
PE	Serrolândia	07°27'55"	40°13'58"	1.86	-	03/03/94
CE	Juazeiro do Norte	07°17'50"	39°18'54"	0.93	-	04/03/94
CE	Milagres	07°20'10"	38°55'53"	1.73	-	04/03/94
CE	Juá	07°08'11"	39°25'12"	0.86	-	04/03/94
CE	Crato	07°12'28"	39°33'12"	2,23	-	05/03/94
CE	Catolé	06°40'04"	40°06'15"	1.53	-	05/03/94
CE	Ipu	04°18'30"	40°44'11"	1.20	-	06/03/94
CE	Inhuçu	04°06'33"	40°53'15"	1.70	-	07/03/94
CE	Viçosa do Ceará	03°35'07"	41°05'56"	0.46	-	07/03/94
CE	Tianguá	04°06'33"	40°53'15"		+	08/03/94
PI	Piripiri	04°13'31"	41°41'41"	0.23	+	08/03/94
PI	Altos	05°02'23"	42°28'56"	0.20	+	08/03/94
PI	Monsenhor Gil	05°32'24"	42°37'35"	0.43	+	09/03/94
PI	Inhuma	06°40'27"	41°43'05"	0.03	-	09/03/94
PE	Belém S. Francisco	08°37'39"	39°14'31"	0.56	-	10/03/94
PE	Mirandiba	08°00'36"	38°46'14"	0.63	-	10/03/94
PE	Calumbi	08°02'24"	38°02'60"	0.10	-	11/03/94
PE	Arcoverde	08°24'54"	36°56'12"	1.63	-	11/03/94
PE	S. Caetano	08°16'30"	36°07'20"	1.43	-	12/03/94
PE	Lagedo	08°39'38"	36°20'19"	2.53	-	12/03/94
PE	Garanhuns	08°52'32"	36°33'07"	1.43	-	12/03/94
AL	Palmeira dos Índios	09°25'30"	36°39'33"	1.46	-	12/03/94
AL	Arapiraca	09°44'26"	36°38'29"	0.66	-	12/03/94
AL	São Sebastião	09°59'40"	36°35'53"	2.00	-	13/03/94
SE	Propriá	10°17'59"	36°53'08"	1.40	-	13/03/94

UF	Município	Latitude (S)	Longitude (W)	M. t ¹	Neoz ²	Data de coleta
SE	Nova Conquista	10°56'57"	37°12'38"	1,06	-	13/03/94
SE	Santa Luzia	11°18'30"	37°30'34"	1,53	-	14/03/94
BA	Rio Real	11°32'9"	37°49'35"	1,26	+	14/03/94
BA	Alagoinhas	12°09'3"	38°30'23"	0,53	-	14/03/94
BA	Alagoinhas	12°07'08"	38°23'19"	0,46	+	13/06/94
SE	Cristinápolis	11°29'38"	37°46'49"	0,43	+	13/06/94
SE	Estância	11°09'44"	37°23'55"	0,00	-	13/06/94
SE	Maurim	10°44'13"	37°05'22"	0,00	-	13/06/94
AL	P. Real do Colégio	10°07'13"	36°43'56"	0,80	+	14/06/94
AL	Teotônio Vilela	09°53'12"	36°23'16"	0,80	+	14/06/94
PE	Vitória de Sto. Antônio	09°45'16"	36°04'03"	0,53	+	14/06/94
AL	Messias	09°17'24"	35°48'35"	0,33	-	14/06/94
PE	Palmares	08°39'50"	35°34'13"	0,33	-	14/06/94
PE	Escada	08°21'18"	35°12'52"	0,00	-	14/06/94
PE	Jaboatão	08°05'47"	35°03'12"	0,03	-	15/06/94
PE	Gravata	08°11'01"	35°29'26"	0,96	+	15/06/94
PE	Caruaru	08°12'29"	35°58'06"	0,60	+	15/06/94
PB	Ingá	07°15'20"	35°41'43"	0,26	+	16/06/94
PB	S. Miguel de Itaipu	07°12'04"	35°09'33"	0,03	-	16/06/94
PB	Mamanguape	06°50'15"	35°08'11"	0,26	-	16/06/94
CE	Aracati	04°36'30"	37°39'38 "	0,20	+	17/06/94
CE	Sucatinga	04°30'39"	38°20'58"	0,07	+	17/06/94
CE	Croatá	03°40'14"	39°04'47"	0,73	+	18/06/94
CE	Itapajé	03°41'25"	39°35'54"	0,53	+	18/06/94
CE	Viçosa do Ceará	03°37'59"	41°06'52"	0,03	+	18/06/94
CE	Ubajara	03°52'58"	40°54'40"	0,40	+	18/06/94
CE	Guaraciaba do Norte	04°10'29"	40°45'07"	0,40	+	19/06/94
CE	Ipu	04°21'56"	40°42'03"	0,03	-	19/06/94
PI	Piripiri	04°13'26"	41°41'39"	0,00	-	20/06/94
PI	Pedro II	04°25'41"	41°29'38"	0,00	-	20/06/94
PI	Campo Maior	04°37'36"	42°00'55"	0,00	-	20/06/94
PI	Altos	04°58'11"	42°22'27"	0,00	-	20/06/94
MA	Caxias	05°01'43"	42°57'04"	0,03	-	21/06/94
MA	Codó	04°41'57"	43°47'26"	0,03	-	21/06/94
MA	Peritoró	04°25'29"	44°19'27"	0,00	-	21/06/94
MA	Bacabal	04°13'21"	44°45'34"	0,23	-	21/06/94
PI	Teresina	05°17'25"	42°42'58"	0,00	-	22/06/94
PI	Agua Branca	05°49'09"	42°37'20"	0,00	-	22/06/94
PI	Amarante	06°14'42"	42°46'39"	0,10	-	22/06/94
PI	Floriano	06°38'28"	42°52'14"	1,33	+	22/06/94
PI	Nazaré do Piauí	06°58'15"	52°40'15"	0,56	-	22/06/94

UF	Município	Latitude (S)	Longitude (W)	<i>M. t</i> ¹	Neoz ²	Data de coleta
PI	Oeiras	06°56'24"	41°55'42"	0,53	-	22/06/94
PE	Araripina	07°30'03"	40°27'42"	1,20	+	23/06/94
PE	Exú	07°25'51"	39°59'07"	0,66	+	23/06/94
CE	Crato	07°12'52"	W 39°27'26"	0,00	-	23/06/94
PE	Bodocó	07°49'50"	W 40°00'47"	1,70	+	23/06/94
PE	Lagoa	08°18'34"	W 40°20'59"	0,16	-	24/06/94
BA	Jaguarari	10°14'00"	W 40°12'17"	0,93	+	27/06/94
BA	Sr. do Bonfim	10°53'19"	W 40°06'36"	0,96	+	27/06/94
BA	Itaberaba	12°23'48"	W 40°15'00"		+	29/06/94

¹Escala de notas para *M. tanajoa*: 1 = 1 a 24, 2 = 25 a 200 e 3 = >200 ácaros por folha.

²*Neozygites*: (+) presença e (-) ausência