

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

**Avaliação do potencial de *Neozygites floridana* (Entomophthorales:
Neozygitaceae) para o controle biológico clássico de *Tetranychus evansi* (Acari:
Tetranychidae) na África**

Vitalis Wafula Wekesa

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

**Piracicaba
2008**

Vitalis Wafula Wekesa
Biólogo

Avaliação do potencial de *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Neozygiteaceae) para o controle biológico clássico de *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) na África

Orientador:
Prof. Dr. ITALO DELALIBERA JR.

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

**Piracicaba
2008**

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

Wekesa, Vitalis Wafula

Avaliação do potencial de *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Neozygitaceae) para o controle biológico clássico de *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) na África / Vitalis Wafula Wekesa. - - Piracicaba, 2008.
114 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Ácaros 2. Controle biológico 3. Fungos entomopatogênicos 4. Insetos predadores 5. Solanaceae 6. Tomate I. Título

CDD 635.641
W431a

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

DEDICATÓRIA

Para meu filho

FABIAN

PARA MINHA ESPOSA JOKASTAH, PELO SEU AMÁVEL SUPORTE EM MINHAS DECISÕES
DIFÍCEIS

*Dedico especialmente a todos os meus professores pela sabedoria e
seus inestimáveis conhecimentos transmitidos*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido principalmente no Setor de Zoologia agrícola do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP). Uma parte foi conduzida no Laboratório de Resistência de Insetos a Inseticidas e Controle Microbiano de Insetos, sob a orientação dos Prof. Celso Omoto e Sergio Batista Alves, respectivamente. O financiamento foi concedido pela Academia de Ciências para o Mundo em Desenvolvimento (TWAS) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Fico muito grato a estas instituições por terem colaborado para a realização do meu sonho. Agradeço pela oportunidade de fazer meu Doutorado na reconhecida Universidade de São Paulo.

Os meus mais sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Italo Delalibera Jr. pela orientação, conselho e confiança que fizeram possível a realização desta pesquisa. O Dr. Delalibera não foi só o meu mentor na área acadêmica como foi meu apoio pessoal. Fui muito afortunado de ter sido seu primeiro orientado de doutorado. Também agradeço a sua esposa, Dra. Ane Medeiros pela consideração.

Agradece profundamente o Prof. Dr. Gilberto José de Moraes, que foi meu orientador inicial, pelo imenso apoio, fazendo com que aprendesse mais sobre Acarologia e cuja experiência me ajudou a concluir este trabalho no tempo certo. Sua contribuição fez com que o tempo fosse agradável e proveitoso. Particularmente pela liberdade, apoio e sabedoria que me proporcionou, eu não terei como retribuí-las.

Esta pesquisa não teria sido possível sem a ajuda de muitas pessoas. Agradeço ao ex-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ, Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, pelas muitas cartas que ajudaram na minha participação no programa assim como seu constante apoio. Ao Prof. Dr. Celso Omoto, atual coordenador do Programa de Pós-Graduação em entomologia da ESALQ, pela contínua ajuda e estímulo. Aos professores José Djair Vendramin, Chefe do Departamento de Entomologia, José Roberto Postali Parra, Roberto

Antonio Zucchi, Sérgio Batista Alves, Fernando Luis Cònsoli, José Maurício Simões Bento e Sinval Silveira Neto, pelo apoio intelectual.

Ao Prof. Dr. Evoneo Berti Filho, que me motivou para fazer as disciplinas entomológicas em português, Ao Prof. Carlos H. W. Flechtmann pelo continuado apoio e à Sumara Tondati, por ter me introduzido às bases do português e pelo ajuda durante meus primeiros dias em Piracicaba.

Gostaria também de agradecer a Silvia Maria Zinsly, Eliana Maria Garcia, Lurdes F. Gandra, Iara Maria de Oliveira Ismael e Josué Reinaldo Mota pela ajuda na formatação e submissão de minha tese. À Vilma A. Sarto do COMUT da ESALQ especialmente pela rápida entrega de artigos científicos emprestados por outras bibliotecas.

Agradeço o apoio de outras pessoas que me ajudaram em vários aspectos. Ao Dr. Markus Knapp pelo apoio nos diversos aspectos do meu estudo e pela paciência. A todos meus colegas do Setor de Zoologia pela cooperação e apoio moral. Especialmente, lembro com muita gratidão de Alberto Guanilo, Aníbal Oliveira, Daiane Nunes, Eliane Grisoto, Erika Britto, Eveline Calderan, Fábio Aquino, Fernando Silva, Gabriel Mascarin, Guilherme Micai, Ignace Zannou, Imelda Furtado, John Jairo, Juan Humberto, Marcos Bellini, Monica Mayumi, Nora Mesa, Rafael Castilho, Ralf Araújo, Renata Freire, Renata Simões, Samuel Roggia, Sheila Spongowski, Sigrid Rouam, Thiago Castro e muitos outros que não foram mencionados pelo espaço limitado.

Eu não poderia ter finalizado minha tese nem a pesquisa sem a amizade, dedicação e benevolência da Sonia Moraes. Ela foi a minha segunda mãe aqui no Brasil e suas inúmeras visitas e apoio serviram para continuar estudando após do nascimento de Fabian, meu filho; nunca esquecerei.

Sou muito grato aos professores e funcionários da Universidade de São Paulo (USP-ESALQ) pelo apoio e amizade durante estes anos. Especialmente ao Josenilton Mandro, José Luiz Piedade, Lásaro Silva, Vera Durrer e Maria Marta Colletti.

Conheci muitas pessoas ao longo do tempo que se tornaram não só em meus “pares” na parte acadêmica e profissional, como também bons amigos. Quero agradecer em especial e afetosamente à Cristiane Nardi, Edmilson da Silva, Geraldo Nascimento, Katherine Pérez, Maria Fernanda Penaflor, Nádia Casarin, Nancy Barreto, Ohana Rodrigues, Raquel Araújo, Regiane Cristina Oliveira e Tatiane Castro, por terem sido amigos excepcionais durante o período de estudo. Agradeço também à Ana Elizabete Ribeiro, Stefania Vidal, Vanessa Duarte e Renan Almeida que me ajudaram a ser melhor cientista através do seu apoio e conselho, se tornando meus melhores amigos.

Agradeço ao Dr. Klingen Ingerbog (Bioforsk) e aos outros revisores, pelas sugestões nos manuscritos resultantes de minha tese. Também aos professores Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias e Prof. Dr. Edwin Ortega pelo apoio nas análises estatísticas dos dados obtidos neste trabalho.

Aos membros da minha família, obrigado pela paciência, inspiração e apoio não só durante o doutorado como também durante toda a minha vida acadêmica e profissional. Por fim, quero agradecer à minha esposa Jokastah e ao meu filho Fabian por terem compreendido e proporcionado uma convivência agradável para realizar meus estudos. Ter feito o doutorado no Brasil representou uma grande dificuldade financeira para minha família e para mim, mas me deu experiência inestimável.

*I will not say I failed 1000 times, I will say that I
discovered there are 1000 ways that can cause
failure.....*

THOMAS EDISON

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
Referências	20
2 Interação de dois inimigos naturais de <i>Tetranychus evansi</i> , o fungo patogênico <i>Neozygites floridana</i> (Zygomycetes: Entomophthorales) e o ácaro predador, <i>Phytoseiulus longipes</i> (Acari: Phytoseiidae)	27
Resumo	27
Abstract.....	27
2.1 Introdução.....	28
2.2 Material e Métodos	29
2.2.1 Colônias de ácaros	30
2.2.2 Cultura do fungo.....	30
2.3 Métodos experimentais.....	30
2.3.1 Efeito da presa infectada pelo fungo na oviposição de <i>P. longipes</i>	30
2.3.2 Comportamento de auto-limpeza de Capiloconídios.....	31
2.3.3 Capacidade de predação em folhas com capiloconídios	32
2.3.4 Teste de preferência: predação em áreas da folha com e sem capiloconídio	32
2.3.5 Análise estatística	33
2.4 Resultados.....	33
2.4.1 Efeito da presa infectada pelo fungo na oviposição de <i>P. longipes</i>	33
2.4.2 Remoção de capiloconídios.....	34
2.4.3 Capacidade de predação em folhas com capiloconídios	36
2.4.4 Teste de preferência: predação em áreas da folha com e sem capiloconídios.....	37
2.5 Discussão	37
Referências	40
3 Efeitos de pesticidas no ciclo de vida do fungo patogênico a ácaros <i>Neozygites floridana</i>	43
Resumo	43
Abstract.....	43
3.1 Introdução.....	44
3.2 Material e Métodos	45
3.2.1 Produção do fungo.....	45
3.2.2 Pesticidas utilizados.....	46
3.3 Aspectos gerais da instalação dos experimentos	47
3.3.1 Efeito de pesticidas na esporulação.....	47
3.3.2 Efeito dos pesticidas na germinação de conídios primários	48
3.3.3 Efeito dos pesticidas na infectividade de capiloconídios	49
3.3.4 Efeito de pesticidas na mortalidade de <i>T. evansi</i> inoculado com <i>N. floridana</i>	49
3.3.5 Análise de dados.....	50

3.4 Resultados.....	50
3.4.1 Efeito de pesticidas na esporulação de <i>N. floridana</i>	50
3.4.1.1 Tratamento de cadáveres	50
3.4.1.2 Tratamento de folhas	52
3.4.2 Efeito dos pesticidas na germinação dos conídios primários	54
3.4.3 Efeito dos pesticidas na infectividade dos capoliconídios.....	56
3.4.4 Efeito dos pesticidas na mortalidade de <i>T. evansi</i> inoculado com <i>N. floridana</i>	59
3.5 Discussão	59
Referências	62
4 Influência das plantas hospedeiras no desempenho do fungo patogênico, <i>Neozygites floridana</i> contra ácaros tetraniquídeos	64
Resumo	64
Abstract.....	65
4.1 Introdução.....	66
4.2 Materiais e métodos.....	68
4.2.1 Ácaros.....	68
4.2.2 Cultura do fungo.....	69
4.3 Bioensaios e métodos experimentais.....	69
4.3.1 Criação dos ácaros	69
4.3.2 Efeito das plantas hospedeiras na mortalidade e mumificação por isolados do fungo	70
4.3.3 Efeito da mudança das plantas hospedeiras na infecção de <i>T. evansi</i>	70
4.3.4 Efeito da qualidade nutricional da planta hospedeira na reprodução dos ácaros	71
4.3.6 Análise estatística	72
4.4 Resultados.....	72
4.4.1 Efeitos das plantas hospedeiras sobre <i>N. floridana</i>	72
4.4.2 Efeito da mudança da planta hospedeira sobre a infecção de <i>T. evansi</i>	75
4.4.4 Efeito das plantas hospedeiras na esporulação de cadáveres	77
4.5 Discussões	79
Referências	84
5 Efeito da temperatura sobre a produção de conídios e a virulência de isolados de <i>Neozygites floridana</i> sobre <i>Tetranychus evansi</i>	90
Resumo	90
Abstract.....	90
5.1 Introdução.....	92
5.2 Material e métodos	94
5.2.1 Isolados do fungo	94
5.2.2 Ácaros.....	94
5.2.3 Efeito da temperatura na esporulação e germinação	95
5.2.4 Efeito da temperatura constante na virulência de isolados de <i>Neozygites floridana</i>	95
5.2.5 Efeito da temperatura alternada sobre a virulência de isolados de <i>Neozygites floridana</i>	96
5.2.6 Análise estatística	96
5.3 Resultados.....	97
5.3.1 Efeito da temperatura na esporulação e germinação	97
5.3.2 Efeito da temperatura constante na virulência de <i>Neozygites floridana</i>	98
5.4 Discussão	106
Referências	111

RESUMO

O ácaro-vermelho do tomateiro, *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard, tornou-se a praga mais importante do tomateiro, e de outras solanáceas na África, após a sua introdução naquele continente. Não se conhece nenhum inimigo natural nativo efetivo em associação com a praga na África, tornando necessária a busca de inimigos naturais em sua região de origem. *T. evansi* não é uma importante praga em grande parte da América do Sul, sugerindo que este ácaro provavelmente tenha se originado nesta região. Buscas por inimigos naturais realizadas nesta região resultaram na coleta de diversos isolados de *Neozygites floridana* Weiser e Muma e do ácaro predador *Phytoseiulus longipes* Evans com potencial para introdução na África. Como parte das etapas preliminares, para introdução deste fungo patogênico na África, estudos foram conduzidos para determinar a compatibilidade de *N. floridana* com *P. longipes*, pois é desejável que estes dois inimigos naturais se complementem. Foi demonstrado que o fungo não é patogênico a *P. longipes*. O único efeito do fungo observado em *P. longipes* foi o incremento do comportamento de auto-limpeza (grooming) para remoção de capiloconídios do fungo aderidos ao corpo do ácaro. Alguns agrotóxicos empregados na produção de tomate foram testados quanto aos seus efeitos sobre *N. floridana*, a fim de determinar a seletividade e a adequação destes para uso em programas de MIP em tomateiro. Dois inseticidas, dois acaricidas e dois fungicidas foram testados em duas concentrações: a dosagem comercial recomendada (TC) e metade da dosagem comercial (TC / 2). Os fungicidas captana and mancozebe afetaram a esporulação e a germinação de *N. floridana* em ambas as concentrações, enquanto propargito não teve efeito sobre a esporulação, mas afetou a germinação dos conídios primários. Metomil e abamectina foram os produtos com menores efeitos sobre *N. floridana*. Adicionalmente, o efeito de plantas hospedeiras de *T. evansi* sobre *N. floridana* foi determinado em relação à contaminação, infecção, mortalidade e mumificação. A oviposição de *T. evansi* foi usada para determinar a adequação dos ácaros às plantas hospedeiras e esta foi correlacionada com a suscetibilidade dos ácaros ao fungo e subsequente mumificação. O efeito dos aleloquímicos acumulados pelos ácaros sobre o fungo foi avaliado acompanhando-se o desenvolvimento da doença em ácaros que haviam sido criados nas diferentes plantas hospedeiras, mas que foram infectados e mantidos até a morte em tomate. Houve uma associação direta entre a oviposição, adequação de *T. evansi* às plantas hospedeiras medido pela taxa de oviposição e os parâmetros de desempenho avaliados do fungo, exceto para *T. evansi* sobre maria-preta e *T. urticae* sobre pimenta e algodão. A oviposição foi baixa onde, também, a esporulação foi baixa, sugerindo que a antibiose da planta pode afetar tanto a reprodução do ácaro como a atividade do fungo. A mortalidade e a mumificação variaram com a espécie de planta, provavelmente, indicando que estes processos são modulados pela composição química da planta. O efeito da temperatura sobre a esporulação, infecção e mumificação dos ácaros foi comparado entre três isolados de *N. floridana*, dois do Brasil (de Recife e de Piracicaba) e um da Argentina (Vipos-Tucumán) objetivando selecionar isolados potenciais para liberar em diferentes locais na África. Estes parâmetros foram avaliados sob vários regimes de temperatura constantes entre 13°C e 33°C. Também foi avaliado o efeito de seis regimes de temperaturas alternadas, 17-13°C, 21-13°C, 29-13°C, 33-13°C, 33-23°C, 33-29°C, sob fotoperíodo de 12:12h, luz e escuro, respectivamente, sobre a virulência dos três isolados contra *T. evansi*. Os perfis de temperatura em conjunto com os dados de infectividade podem ser úteis na seleção de isolados apropriados para uma determinada região com características térmicas particulares.

Palavras chave: Controle biológico clássico; *Tetranychus evansi*; *Neozygites floridana*; *Lycopersicon esculentum*; Solanaceae

ABSTRACT

The tomato red spider mite, *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard, became one of the most important pests of tomatoes and other solanaceous plants in Africa after its introduction in this continent. No native natural enemies are known to be associated with the pest in Africa making search for natural enemies necessary. *T. evansi* is not an important pest in South America suggesting that this mite probably originated from this region. Searches for natural enemy in this region yielded several isolates of *Neozygites floridana* Weiser and Muma and one potential predatory mite for introduction in Africa. As part of the preliminary steps for introduction of this fungal pathogen in Africa, studies were conducted to determine the compatibility of *N. floridana* with the predatory mite *Phytoseiulus longipes* Evans, because the two natural enemies are expected to complement each other. It was demonstrated that the fungus is not pathogenic to *P. longipes*. However, the presence of fungal capilliconidia on the leaf may alter the behavior of *P. longipes* by increasing grooming. Several pesticides used in tomato production were tested for their effect on *N. floridana* in order to determine their selectivity and adequacy for use in IPM programs for pest management in tomato. Two insecticides, two acaricides, and two fungicides were tested in two concentrations: the mean commercial rate (CR) and 50% of the mean commercial rate (CR/2). The fungicides Captan and Mancozeb affected sporulation and germination at both concentrations while Propargite had no effect on sporulation but affected germination of primary conidia. Methomyl and Abamectin had minimal effects on *N. floridana*. In addition, the effect of host plants of *T. evansi* on *N. floridana* was determined in relation to contamination, infection, mortality and mummification. Oviposition was used to determine host plant suitability to the mites and this was correlated to their susceptibility and subsequent mummification after infection by the fungus. Host-switching was used to determine the *in vivo* effect of accumulated allelochemicals to the fungus. There was a direct association of oviposition, plant suitability and the measured fungal parameters on all host plants with the exception of nightshade and pepper for *T. evansi* and cotton for *T. urticae*. Oviposition was also low on plants where sporulation was low suggesting that antibiosis may affect both mite reproduction and fungal activity. Mortality and mummification varied with plant species probably indicating that these processes are modulated by plant chemistry. The effects of temperature on sporulation, infection and mummification of mites was compared among three isolates of *N. floridana*, two from Brazil (from Recife and Piracicaba) and one from Argentina (Vipos-Tucumán) aiming to select potential isolates for release in different places of Africa. These parameters were measured at various constant temperature regimes from 13°C to 33°C. Six alternating temperature regimes of 17-13°C, 21-13°C, 29-13°C, 33-13°C, 33-23°C, 33-29°C at a photoperiod of 12:12h light and dark, respectively were also used to test their effect on the virulence of the three isolates against *T. evansi*. Temperature profiles in conjunction with infectivity assays can be useful in selecting appropriate isolates for a particular thermal environment.

Keywords: Classical biological control; *Tetranychus evansi*; *Neozygites floridana*; *Lycopersicon esculentum*; Solanaceae

1 INTRODUÇÃO

Tetraniquídeos (Acari: Tetranychidae) são os principais ácaros pragas em cultivos protegidos e de campo, causando danos em hortaliças e ornamentais em todo mundo (HELLE; VAN DE VRIE, 1974; WALTER; PROCTOR, 1999; BOLLAND; GUTIERREZ; FLECHTMANN, 1998; GERSON; SMILEY; OCHOA, 2003). O aumento da população destes ácaros é freqüentemente associado a condições quentes e secas (HUFFACKER; VAN DE VRIE; McMURTRY, 1969). Os danos são causados pela alimentação dos ácaros nas células da planta, perfurando-as com seu par de estiletos em forma de agulha. Sob altas infestações, as folhas perdem a cor verde e freqüentemente caem precocemente, podendo levar as plantas à morte (WALTER; PROCTOR, 1999). Muitas espécies de tetraniquídeos produzem teia que são mais evidentes sob alta densidade populacional dos ácaros. As teias podem dar proteção contra inimigos naturais e estresse ambiental (GERSON, 1985).

A espécie mais conhecida entre os tetraniquídeos é o ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch, que é comum em estufas nas zonas tropicais e temperadas quentes. Este ácaro ocorre em mais de 150 hospedeiros de importância econômica em todo mundo (JEPPSON; KEIFER; BAKER, 1975). À temperatura ambiente, o desenvolvimento de ovo a adulto é de aproximadamente 10 dias e cada fêmea pode depositar até 100 ovos, possibilitando que a população aumente rapidamente (MITCHELL, 1973).

Uma espécie que tornou-se praga importante em algumas culturas comerciais, especialmente na África, é *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard. Esta espécie foi descrita originalmente em 1960 a partir de espécimes coletadas em tomateiro na Ilha do Maurício (BAKER; PRITCHARD, 1960). No entanto, em 1954, ácaros da mesma espécie haviam sido equivocadamente relatadas no Nordeste do Brasil como *Tetranychus marianae* McGregor, infestando tomateiro e espécies silvestres dos gêneros *Solanum* e *Physalis* (SILVA, 1954). Devido a este fato, foi sugerida a hipótese que *T. evansi* poderia ser originário da América do Sul (GUTIERREZ; ETIENNE, 1986).

Ao contrário do polífago ácaro rajado, *T. urticae*, *T. evansi* normalmente infesta apenas solanácea, incluindo tomate, berinjela, batata, pimenta e ervas daninhas como maria-preta (MORAES; McMURTRY; BAKER, 1987; MORAES; FLETCHMANN, 1981; JEPPSON; KEIFER; BAKER, 1975). Este ácaro atinge níveis populacionais elevados sobre tomateiro e maria-preta. *T. evansi* tem sido relatado em plantas de outras famílias, incluindo *Ipomoea batatas*

(L.) Lam., *Arachis hypogea* L., *Rosa* sp. e *Artemisia douglassiana* Bess, mas, alguns desses relatos podem corresponder a identificação equivocada (MORAES; FLETCHMANN, 1981; BLAIR, 1983).

Tetranychus evansi Baker e Pritchard foi encontrada na África no final dos anos setenta, sendo detectado pela primeira vez no Zimbábue, em 1979 (BLAIR, 1983). Posteriormente disseminou-se para o sul e leste do continente africano, incluindo a África do Sul, Namíbia, Moçambique, Zâmbia, Maláui, Quênia, Somália (KNAPP; WAGENER; NAVAJAS, 2003; SMITH MEYER, 1996), Congo (BONATO, 1999), Marrocos (El - JAOUANI, 1988) e Tunísia (BOLLAND; GUTIERREZ; FLECHTMANN, 1998). Também tem sido relatado nas Américas (MORAES; McMURTRY; BAKER, 1987), em alguns países europeus, incluindo a Espanha (FERRAGUT; ESCUDERO, 1999), Portugal (BOLLAND; VALA, 2000), França (MIGEON, 2005) e outros países do Mediterrâneo (EPPO, 2004). Recentemente, foi relatado em Taiwan, na Ásia (HO; WANG; CHIEN, 2004) e ainda esta ampliando sua distribuição geográfica.

O tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill, está entre as culturas hortícolas mais cultivadas. Devido à sua grande importância econômica, os prejuízos causados por tetraniquídeos são considerados uma ameaça para esta cultura em muitos locais. Na África Oriental e Meridional, o tomateiro é a principal hortaliça cultivada, sendo superado apenas por brássicas, em alguns países (GTZ IPM Horticulture, 1994), sendo importante na geração de emprego, renda e contribuindo para a alimentação de um grande número de populações rurais. Embora a produção de tomate seja muitas vezes condicionada por várias outras pragas e doenças, perdas de produtividade de até 90% têm sido associadas à incidência de *T. evansi*, em alguns países na África, tornando esta praga uma das mais importantes para o tomateiro (SARR et al., 2002).

A fim de controlar pragas do tomateiro, incluindo o ácaro-vermelho-do-tomateiro, os pequenos agricultores africanos dependem quase exclusivamente de freqüentes aplicações de grandes quantidades de agrotóxicos sintéticos. A utilização excessiva e inadequada destes acaricidas tem sido relacionada a problemas ecológicos, afetando organismos não-alvo, promovendo o desenvolvimento de resistência a agrotóxicos e trazendo riscos para a saúde dos agricultores e consumidores. Além disso, a utilização de doses mais baixas que a recomendada pelos fabricantes, combinado com a falta de técnicas para aplicação adequada, tem aumentado o problema desta praga (SIBANDA et al. 2000, SAUNYAMA; KNAPP, 2003). Por exemplo, logo após esta espécie ter sido registrada como uma nova praga em fumo no Zimbábue, esta

desenvolveu tolerância ao acaricida trifosfato devido às freqüentes aplicações (BLAIR, 1989). Isto tem deixado muitos agricultores com pouca ou nenhuma alternativa para o controle dessa espécie, principalmente devido à falta de inimigos naturais eficientes.

O desenvolvimento de estratégias alternativas de controle é necessário, por conta da reduzida eficácia dos agrotóxicos e potenciais riscos destes aos humanos e ao ambiente. As tendências atuais indicam que a prática do controle biológico através da introdução de inimigos naturais, conhecido como controle biológico clássico, tende a aumentar a nível mundial, para enfrentar novos problemas com pragas, resultantes da intensificação do comércio agrícola em todo mundo. Os esforços para desenvolver alternativas de controle biológico podem oferecer aos produtores novas opções para serem incorporadas em programas de manejo integrado de pragas (MIP), levando à redução na dependência de acaricidas para o controle de *T. evansi*.

Uma das dificuldades envolvidas no controle biológico de *T. evansi* é que a maioria dos inimigos naturais, especialmente ácaros predadores da família Phytoseiidae utilizados no controle de outros ácaros, tais como *T. urticae* e *Mononychellus tanajoa* Bondar, não são eficientes, especialmente na África, onde esta praga é exótica (MORAES; McMURTRY, 1985, 1986; FIABOE et al., 2007; FURTADO et al., 2006; FURTADO et al., 2007). Várias tentativas para controlar *T. evansi* com o fitoseídeo *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot em Zâmbia e Zimbábue não proporcionaram resultados satisfatórios (JENSEN; MINGOCHI, 1988, SIBANDA, 1995). Na verdade, *T. evansi* é uma presa considerada inadequada para várias espécies de fitoseídeos (MORAES; McMURTRY, 1985; 1986).

No entanto, uma consideração importante que tem atraído grande interesse é que *T. evansi* ocorre na região Neotropical, especialmente no Brasil, mas sua população raramente atinge o nível de dano econômico na maior parte dessa região. Isto sugere que *T. evansi* provavelmente é aí mantido sob controle por inimigos naturais. Isto contrasta com o cenário africano onde *T. evansi* é uma praga de grande importância econômica. A hipótese neste caso é de que populações nativas de inimigos naturais nem sempre propiciam níveis adequados de controle desta praga exótica, podendo ser necessárias libertações de inimigos naturais exóticos para estabelecer, a longo prazo, o controle dessa praga na África.

O sucesso do controle biológico clássico depende da seleção de inimigos naturais eficientes, seguidas por uma adequada tecnologia de criação massal e liberação (HAJEK; DELALIBERA; MCMANUS, 2000). Inimigos naturais eficientes são mais prováveis de serem

encontrados na região de origem da praga. A implementação do controle biológico clássico é a intervenção mais desejada para controlar *T. evansi* na África, porque esta estratégia (liberação de inimigos naturais exóticos para estabelecimento permanente) é simples e pode ser facilmente adotada por pequenos agricultores (NEUENSCHWANDER, 2004). Esta intervenção não exige conhecimentos especiais, nem aporte financeiro por parte dos produtores, podendo ter como resultado a auto-regulação permanente (ELLIOT et al., 2000). A introdução de ácaros predadores e *Neozygites tanajoae* Delalibera Jr., Humber e Hajek para o controle do ácaro-verde-da-mandioca (AVM), na África Ocidental é um exemplo contemporâneo de um eficiente e elaborado programa de controle biológico clássico, planejado e executado com êxito (HOUNTONDI et al., 2002; YANINEK; HANNA, 2003). Estratégias semelhantes têm sido adotadas para implementar o controle de *T. evansi*.

Uma das primeiras medidas foi a busca por inimigos naturais nativos na África que se associaram a *T. evansi* após sua introdução e a avaliação dos seus efeitos sobre essa praga. Nos levantamentos de campo realizadas no Quênia, Zâmbia e Zimbábue por pesquisadores do “African Insect Science for Food and Health (ICIPE)”, o único predador encontrado em número elevado em associação com *T. evansi* foi *Oligota fageli* Williams (Staphylinidae). Este predador foi inicialmente proposto para regular a população de *T. evansi*, porém, observou-se posteriormente que este era encontrado apenas quando a praga apresentava altas densidades populacionais, levando à conclusão que o seu efeito sobre a praga não era expressivo. McMurtry e Moraes (1986) haviam relatado anteriormente *Stethorus* sp., *Eriopis connexa* (Germar) e *Feltiella curtistylus* Gagne em associação com *T. evansi* no Nordeste do Brasil, mas também apenas quando a praga atingiu elevados níveis populacionais. Esses predadores, portanto, não são adequados como agentes de controle biológico dessa praga.

A procura por inimigos naturais promissores de *T. evansi* foi, então, iniciada na América do Sul, a possível região de origem dessa praga, em 2002, em um projeto coordenado pelo ICIPE, com a colaboração de duas instituições de ensino superior brasileiras: a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo (ESALQ / USP) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Inicialmente, foram determinadas as áreas prioritárias a serem explorados com base nas condições climáticas em que *T. evansi* foi encontrado na África (FIABOE et al., 2006). Levantamentos no Brasil, Argentina, Paraguai e Peru revelaram a presença de ácaros predadores e de um fungo patogênico com potencial para uso no controle de

T. evansi. Entre os ácaros predadores encontrados em associação com *T. evansi*, *Phytoseiulus longipes* Evans coletado em Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil, revelou-se como um candidato promissor para a introdução na África (FURTADO et al., 2006; 2007). Em 2006, este ácaro foi enviado para o Quênia para libertações experimentais.

A utilização de patógenos como agentes de controle biológico de ácaros fitófagos tem se tornando cada vez mais importante, pois muitas vezes estes patógenos são específicos de um determinado hospedeiro, sendo insignificante o seu impacto sobre outros inimigos naturais, especialmente predadores (CHANDLER et al., 2000; JACOBSON et al., 2001). Outra propriedade importante dos agentes patogênicos é que muitas espécies apresentam um grande potencial para inclusão no manejo integrado de pragas (MIP) devido a sua compatibilidade com agrotóxicos (SAMSON; ROMBACH, 1985).

Alguns agentes patogênicos têm potencial para a regulação natural das populações de tetraniquídeos (VAN DER GEEST et al., 2000). Duas espécies de fungos patogênicos, específicas de ácaros, *Hirsutella thompsonii* Fisher e *Neozygites floridana* Weiser e Muma, são importantes reguladores naturais de ácaros eriofídeos e tetraniquídeos, respectivamente (CHANDLER et al., 2000). Doenças virais são conhecidas em apenas alguns tetraniquídeos, o ácaro-vermelho-dos-citros, *Panonychus citri* McGregor, e o ácaro-vermelho-europeu, *Panonychus ulmi* Koch (VAN DER GEEST et al., 2000). Devido à forma de alimentação dos ácaros, estes não parecem ser muito sensíveis a bactérias patogênicas, embora tenha sido demonstrado que toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner são tóxicas para *T. urticae* (ROYALTY; HALL; TAYLOR, 1990; GUO et al., 1993).

Entre os patógenos, os fungos são os únicos capazes de penetrar diretamente na cutícula do seu hospedeiro tornando a ingestão desnecessária; assim, estes são ideais para o controle de pragas com hábito alimentar como dos ácaros (HALL; PAPIEROCK, 1982). Além disso, a maioria dos fungos patogênicos são saprofíticos, podendo sobreviver quando a população do hospedeiro está baixa ou ausente. Assim, seu estilo de vida saprofítico aumenta sua persistência e sobrevivência. Por exemplo, vários isolados de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, foram relatados como patogênicos a vários ácaros (MWANGI; KAAYA; ESSUMAN, 1995; ALVES et al., 2002). No entanto, não se encontrou nenhum tetraniquídeo infectado por estes fungos em condições naturais. Recentes estudos com *T. evansi* têm demonstrado que alguns isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

podem ser eficientes contra *T. evansi* em laboratório e têm potencial para a utilização na estratégia de liberações inundativas, como biopesticidas (WEKESA et al., 2005; 2006).

Neozygites é o gênero mais comum entre os fungos, na ordem Entomophthorales que naturalmente ocorre em tetraniquídeos. O primeiro registro de uma espécie de *Neozygites* infectando tetraniquídeo foi feita por Fisher (1951). Espécies deste gênero foram posteriormente observadas em várias outras populações de ácaros. Weiser e Muma (1966) descreveram *N. floridana* como um patógeno do ácaro texano, *Eutetranychus banksi* McGregor, enquanto Weiser (1968) descreveu *N. tetranychii* a partir de exemplares de *T. urticae* infectados em um pomar no Sul da Bohemia, República Tcheca. *N. floridana* foi, posteriormente, observado em várias espécies de tetraniquídeos, e em diversas culturas agrícolas. Foi relatado em *Tetranychus tumidus* Banks sobre algodão na Flórida (SABA, 1971), sobre *Tetranychus ludeni* Zacher em feijão na Índia (RAMESESHIAH, 1971), em *T. evansi* em tomateiro no Brasil (HUMBER; MORAES; DOS SANTOS, 1981), em *Oligonychus hondoensis* Ehara em cedro no Japão (BRANDEBURGO; KENNEDY, 1982) e em *M. tanajoa*, na Venezuela (AGUDELLA-SILVA, 1986), no Quênia (BARTKOWSKI; ODINDO; OTIENDE, 1988) e no Brasil (DELALIBERA et al., 1992).

A epizootia causada por *N. floridana* foi primeiramente relatada em *T. evansi* no Nordeste do Brasil (HUMBER; MORAES; DOS SANTOS, 1981). Este fungo é um importante inimigo natural de *T. evansi*, causando redução drástica da população do seu hospedeiro em condições quente e úmida. Isolados deste fungo têm sido coletados no Nordeste (Pernambuco) e Sudeste (São Paulo) do Brasil, indicando que as epizootias podem ocorrer em diferentes condições climáticas. Em Piracicaba, São Paulo, a prevalência deste patógeno varia ao longo do ano, mas a infecção parece estar quase sempre presente.

A aparente existência de biótipos de *N. floridana* com diferentes características biológicas é de grande importância para o controle biológico clássico. A seleção de isolados que têm a capacidade para se desenvolver em diferentes condições abióticas encontradas em campo, após serem introduzidos em um novo ambiente é de grande interesse (YEO et al., 2003), uma vez que os fatores abióticos afetam a virulência e a capacidade de colonização dos fungos patogênicos nos hospedeiros (ODUOR et al., 1995; BENZ, 1987). Conseqüentemente, a exploração de biótipos de *N. floridana* em diferentes zonas agroecológicas na América do Sul tem potencial para tornar o controle biológico clássico de ácaros mais sustentável. Assim, para aumentar as

chances de sucesso de um programa de controle biológico clássico de *T. evansi* na África, uma detalhada caracterização dos biótipos de *N. floridana* no Brasil faz-se necessária.

Esta tese teve o objetivo de investigar vários aspectos de *N. floridana* e seu potencial para o controle biológico clássico de *T. evansi*, como parte de etapas preliminares para a sua introdução na África. Os estudos concentraram-se em quatro áreas: 1) compatibilidade de *N. floridana* com o ácaro predador *P. longipes*; 2) efeito de agrotóxicos e das plantas hospedeiras, na eficiência do fungo; 3) atividade biológica de isolados do fungo de regiões ecologicamente distintas, quando submetidos a diferentes temperaturas.

Vários testes foram realizados, a fim de determinar a compatibilidade e possível impacto de *N. floridana* sobre o desempenho do ácaro predador, *P. longipes*. Tanto o ácaro predador como o fungo patogênico são bons candidatos para a introdução na África, devido à eficácia e especificidade destes inimigos naturais (FURTADO et al., 2007; WEKESA et al., 2007). A utilização de *P. longipes* juntamente *N. floridana* pode oferecer melhores perspectivas para o manejo de *T. evansi* porque estes poderiam complementar-se, de acordo com as condições abióticas prevalentes. O predador pode conseguir controlar o tetraniquídeo quando as condições ambientais se tornam desfavoráveis para *N. floridana* (por exemplo, baixa umidade relativa ou altas temperaturas).

A seleção de isolados eficientes é o primeiro passo no desenvolvimento de um programa de controle microbiano. Uma estratégia é se basear nas condições climáticas do local onde um determinado isolado foi coletado no Brasil e selecionar regiões similares na África onde este isolado deva ser liberado. Outra estratégia é caracterizar as exigências de umidade e temperatura dos isolados de *N. floridana* em laboratório e com base nestes dados, identificar as regiões africanas que apresentem as condições climáticas favoráveis. Alta umidade é importante para a esporulação de *Neozygites* spp. e estudos têm indicado que a exigência de umidade parece não variar significativamente entre os isolados de *N. tanajoae*, um fungo próximo a *N. floridana* (ODUOR et al., 1995). O efeito da temperatura na esporulação, infecções e mumificação dos ácaros foi comparado entre três isolados de *N. floridana*, dois do Brasil e uma da Argentina. Assim, esporulação de múmias a partir dos três isolados foi testada em diferentes regimes de temperatura durante o dia e a noite, variando entre 13°C a 33°C. A mortalidade dos ácaros foi utilizada para comparar a eficiência na germinação, taxa de crescimento e de infecção, mumificação e tempo até a morte.

Além disso, o efeito das plantas hospedeiras para *N. floridana* foi determinado. Vários estudos têm determinado que as plantas hospedeiras podem alterar a susceptibilidade dos artrópodes pragas a patógenos resultando na variação da eficácia do patógeno utilizado no seu controle (HARE; ANDREADIS, 1983; BENZ, 1987). No presente estudo, a influência da espécie da planta hospedeira na contaminação, infecção, mortalidade e mumificação de *T. evansi* e *T. urticae* com *N. floridana* foi avaliado. *T. urticae* foi utilizado para fins de comparação, por ser considerada uma praga polífaga e com a capacidade de tolerar diferentes tipos de alcalóides, ao contrário de *T. evansi*, que se especializou em solanáceas (MORAES, McMURTRY, BAKER, 1987). A oviposição foi utilizada para determinar a adequação da planta hospedeira aos ácaros e este foi correlacionado à sua susceptibilidade e posterior mumificação após a infecção pelo fungo. Os ácaros foram criados em diferentes plantas hospedeiras e posteriormente foram transferidos para discos de folha de tomate contendo conídios de *N. floridana* e isto foi utilizado para determinar o efeito *in vivo* no fungo do acúmulo de aleloquímicos em seu hospedeiro.

A utilização de agrotóxicos no controle de pragas agrícolas é uma das mais importantes práticas que deve ser considerada na realização de bioensaios com patógenos. Por este motivo, vários agrotóxicos utilizados na produção de tomate foram avaliados quanto a seus efeitos sobre *N. floridana*, a fim de determinar sua seletividade e adequação do uso deste fungo em programas de MIP em tomateiro. Dois inseticidas, dois acaricidas e dois fungicidas foram testados em duas concentrações: a média da dose comercial recomendada (TC) e 50% da média da dose comercial (TC / 2). Ácaros mortos pelo fungo ou os substratos utilizados para esporulação (discos foliares e lamínulas) foram imersos ou pulverizadas com os pesticidas antes de testar os seus efeitos na esporulação, germinação de conídios primários e infectividade de *N. floridana*.

Referências

AGUDELO-SILVA, P.A. species of *Triplosporium* (Zygomycetes: Entomophthorales) infecting *Mononychellus progressivus* (Acari: Tetranychidae) in Venezuela. **Florida Entomologist**. Gainesville. v. 69, p. 444-446, 1986

ALVES, S.B; ROSSI, L.S; LOPES, R.B; TAMAI, M.A; PERERA, R.M. *Beauveria bassiana* yeast on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. New York. v. 81, p. 70–77, 2002

BAKER, E.W; PRITCHARD, A.E. The tetranychid mites of Africa. **Hilgardia**. California, v. 29, p. 455-474, 1960

BARTKOWSKI, J; ODINDO, M.O; OTIENDE, W. A. Some fungal pathogens of the cassava green spider mite *Mononychellus* spp. (Tetranychidae) in Kenya. **Insect Science Application**. Nairobi, v. 9, p.457-459, 1988

BENZ, G. Environment. In: FUXA JR AND TANADA Y.(Ed.). **Epizootiology of insect diseases**. New York: John Wiley , 1987. p.177-214.

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

BLAIR, B.W. Laboratory screening of acaricides against *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard. **Crop Protection**, Guildford, v. 8 n. 3, p. 212-216, 1989

BOLLAND, H. R; VALA, F. First record of the spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) from Portugal. **Entomologische Berichten**. Amsterdam. v. 60, p. 180, 2000

BOLLAND, H.R; GUTIERREZ, J; FLECHTMANN, C.H.W. **World catalogue of the spider mite family**. (Acari: Tetranychidae). Leiden: Brill Academic Publishers, 1998. 392p.

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

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

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

DELALIBERA, I. Jr; SOSA GOMEZ, D.R; MORAES, G.J; ALENCAR, J.A; FRAIAS ARAUJO, N. Infection of *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) by the fungus *Neozygites* sp. (Entomophthorales) in Northern Brazil. **Florida Entomologist**. Gainesville. v. 75, p. 145-147, 1992

EL JAOUANI, N. **Contribution ala connaissance des acariens phytophagues au maroc et etude bio-ecologique de *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard (Acari: Tetranychidae).** Memoire Diplome d'Ingenieur en Agronomie. Rabat, Morocco: Inst. Agron. Et Veterin. Hassan II, , 1988. 230p.

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

EPPO. Introduction of *Tetranychus evansi* in some Mediterranean countries: Addition to the EPPO Alert List. **EPPO Reporting Service**, Paris. v. 5, p.80, 2004.

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

FIABOE, K.K.M.; GONDIM, M.G.C. Jr; MORAES, G.J.; OGOL, C.K.P.O.; KNAPP, M. Surveys for natural enemies of the tomato red spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in northeastern and southeastern Brazil. **Zootaxa**, Auckland, v. 1395, p.33-58, 2007.

FIABOE, K.K.M.; FONSECA, R.L.; MORAES, G.J.; OGOL, C.K.P.O.; KNAPP, M. Identification of priority areas in South America for exploration of natural enemies for classical biological control of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in Africa. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 373-379, 2006.

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

FURTADO, I. P; MORAES, G. J; KREITER, S. TIXIER, M.-S. KNAPP, M. Potential of a Brazilian population of the predatory mite *Phytoseiulus longipes* as a biological control agent of *Tetranychus evansi* (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). **Biological Control**. Orlando, v. 42, p.139–147, 2007

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

GERSON, U. Webbing. In: Helle, W, Sabelis M.W (eds) **Spider mites: their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 223–232.

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

GTZ IPM Horticulture. **Report on planning and working for priority- setting for horticultural research in Eastern and Southern Africa held at Nyeri**, Kenya April. 25-29th, 1994.

GUO, Y.L; ZUO, G.S; ZHAO, J.H; WANG, N.Y; JIANG, J.W. A laboratory test of thuringiensin to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). **Chinese Journal of Biological Control**, Beijing, v. 9, p. 151-155, 1993

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

HAJEK, A.E; DELALIBERA Jr.I; McMANUS, M.L. Introduction of exotic pathogens and documentation of their establishment and impact. In: LACEY, L.A ; KAYA, H.K, (Ed.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2000. p. 339-369

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

HARE, J.D; ANDREADIS, T.G. Variation in the susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) when reared on different host plants to the fungal pathogen *Beauveria bassiana* in the field and laboratory. **Environmental Entomology**. College Park, v. 12, p. 1891–1896, 1983

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

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

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

HUFFAKER, C; VAN DE VRIE, B. M; McMURTRY, J. A. The ecology of tetranychid mites and their natural control. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 14, p. 125-174, 1969

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

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

JENSEN, A.; MINGOCHI, D.S. Chemical control of red spider mites (*Tetranychus urticae* Koch) on tomatoes in Zambia. **Acta Horticulture**, Leuven, n. 218, p. 275-280, 1988

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

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

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

MITCHELL, R. Growth and population dynamics of a spider mite (*Tetranychus Urticae* K., Acarina: Tetranychidae). **Ecology**. Ithaca. v. 54, n. 6, p. 1349-1355, 1973

MORAES, G.J; McMURTRY, J.A. Suitability of the spider mite *Tetranychus evansi* as prey for *Phytoseiulus persimilis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 40, p. 109-115, 1986

MORAES, G.J; McMURTRY, J.A. Comparison of *T. evansi* and *T. urticae* (Acari: Tetranychidae) as prey for eight species of phytoseiid mites. **Entomophaga**. Paris, v. 30, p. 393-397, 1985

MORAES, G.J; FLECHTMANN, C.H.W. Acaros fitófagos do nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. Brasília, v. 16, p. 177-186, 1981

MORAES, G.J; McMURTRY, J.A. Suitability of the spider mite *Tetranychus evansi* as prey for *Phytoseiulus persimilis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 40, p. 109-115, 1986.

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

MWANGI, E.N., KAAYA, G.P; ESSUMAN, S. Experimental infections of the tick *Rhipicephalus appentculatus* with pathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and natural infections of some ticks with bacteria and fungi. **Journal of African Zoology**, Scottsville, v. 109, p. 151-160, 1995

NEUENSCHWANDER, P. Harnessing nature in Africa: Biological pest control can benefit the pocket, health and the environment. **Nature**, London, v. 432, p. 801-802, 2004.

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

RAMASESHIAH, G. Occurrence of an *Entomophthora* on tetranychid mites in India. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 24, p. 218-223, 1971

ROYALTY, R.N; HALL, F.R; TAYLOR, R.A. J. Effects of thuringiensin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) mortality, fecundity and feeding. **Journal Economic Entomology**. Lanham, v. 83, p. 792-798, 1990.

SABA, F. Population dynamics of tetranychids in subtropical Florida. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ACARALOGY, 3., 1971. The Hague. **Proceedings...**Prague: Junk, The Hague. 1971. p. 237-240

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

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

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

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

SIBANDA, Z. **Compilation of tomato research results in Zimbabwe from 1980-1995**. Consultancy report, Nairobi, Kenya: GTZ IPM Horticulture, 1995.(Consultancy report)

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

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

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

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

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

WEISER, J. *Triplosporium tetranychii* sp. n. (Phycomycetes; Entomophthoraceae), a fungus infecting the red spider, *Tetranychus althaeae* Hanst. **Folia Parasitology**, Prague, v. 15, p. 115-122, 1968.

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

WEKESA, V.W; MANIANIA, N.K; KNAPP, M; BOGA, H.I. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 36, p. 41-50, 2005

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

YANINEK, S; HANNA, R. Cassava green mite in Africa – a unique example of successful classical biological control of a mite pest on a continental scale. In: NEUENSCHWANDER, P.; BORGEMEISTER, C.; LANGEWALD, J. Biological control in IPM systems in Africa. Wallingford : CABI Publishing. p. 61-75.

YEO, H; PELL, J.K; ALDERSON, P.G; CLARK, S.J; PYE, B.J. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. **Pest Management Science**, Sussex. v. 59, p. 156-165, 2003.

2 Interação de dois inimigos naturais de *Tetranychus evansi*, o fungo patogênico *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) e o ácaro predador, *Phytoseiulus longipes* (Acari: Phytoseiidae)

Resumo

Tetranychus evansi Baker e Pritchard é uma praga exótica de solanáceas cultivadas na África. Este ácaro foi encontrado pela primeira vez na África no Zimbábue em 1979. Dois inimigos naturais, o ácaro predador *Phytoseiulus longipes* e o fungo patogênico *Neozygites floridana*, são importantes causas de mortalidade em populações de *T. evansi* no Brasil. A primeira parte deste estudo avaliou o efeito de *N. floridana* sobre a predação e oviposição de *P. longipes* alimentado com *T. evansi* e *T. urticae* infectados por *N. floridana*. Nenhum corpo hifal de *N. floridana* foi encontrado em *P. longipes* depois da alimentação, demonstrando que *N. floridana* não é patogênico ao predador e não afeta sua oviposição. A segunda parte do estudo investigou o tempo gasto pelo predador na procura e no consumo de ovos de sua presa em discos de folha com e sem capiloconídios de *N. floridana*. Ambos os tempos de forrageamento e alimentação sobre o primeiro ovo foram similares em discos de folhas com e sem capiloconídio. Quando foi permitido a *P. longipes* poder escolher entre se alimentar em áreas de folhas com e áreas sem capiloconídio, o número de ovos consumidos nas duas áreas foram semelhantes. Os únicos efeitos de *N. floridana* observado sobre *P. longipes* foram a redução da predação de ovos e o aumento no tempo gasto durante a auto-limpeza (grooming) em discos de folhas com capiloconídios. *P. longipes* foi eficiente na remoção da maioria dos capiloconídios aderidos ao seu corpo pelo comportamento de auto-limpeza. Isto sugere que embora o predador não evite áreas com capiloconídios, ele detecta e remove a maioria dos capiloconídios aderidos ao corpo. O aumento da auto-limpeza pode ser responsável pelas menores taxas de predação.

Palavras chave. *Tetranychus evansi*; *Phytoseiulus longipes*; *Neozygites floridana*; Capiloconídio; Corpos hifais; Controle Biológico Clássico

Abstract

Tetranychus evansi Baker and Pritchard is an exotic pest of Solanaceous crops in Africa discovered in Zimbabwe in 1979. Two natural enemies, the predatory mite *Phytoseiulus longipes* and the fungal pathogen *Neozygites floridana* are important causes of mortality in *T. evansi* populations in Brazil. The first part of this study assessed the effects of *N. floridana* on predation and oviposition of *P. longipes* fed on *N. floridana* infected *T. evansi* and *T. urticae*. No *N. floridana* hyphal bodies were found in *P. longipes* after this feeding, demonstrating that *N. floridana* is not pathogenic to *P. longipes* and does not affect its oviposition. The second part of the study investigated the time spent on searching for and consuming of eggs on leaf discs with and without *N. floridana* capilliconidia. Both the searching and the feeding time on the first egg were similar on leaf discs with and without capilliconidia. When *P. longipes* was offered the choice of feeding on eggs on leaf discs with or without capilliconidia, the numbers of eggs consumed were not different. The only *N. floridana* effect observed on *P. longipes* was reduced

egg predation. In addition, increased time spent grooming on leaf discs with capilliconidia was observed. *P. longipes* was efficient in removing most capilliconidia attached to the body through self-grooming behavior. This suggests that although the predator did not avoid areas with capilliconidia, it detected and removed most capilliconidia attached to the body. Increased grooming may account for the lower egg predation rates.

Keywords: *Tetranychus evansi*; *Phytoseiulus longipes*; *Neozygites floridana*; Hyphal bodies; Capilliconidia; Classical biological control

2.1 Introdução

Tetranychus evansi Baker e Pritchard foi encontrado pela primeira vez no Zimbábue em 1979 sobre *Nicotiana tabacum* L. (BLAIR, 1983; KNAPP, WAGENER, NAVAJAS 2003) e tornou-se uma importante praga de tomate em muitas partes da África (SAUNYAMA, KNAPP, 2003). Mais tarde, este ácaro foi encontrado no sudeste da África (SMITH MEYER, 1996), Congo (BONATO, 1999), Marrocos (EL-JAOUANI, 1988), Quênia (KNAPP, WAGENER, NAVAJAS 2003) e Tunísia (BOLLAND, GUTIERREZ, FLECHTMANN, 1998). Também foi relatado em outras partes do mundo, incluindo Brasil, Porto Rico, EUA (MORAES, McMURTRY, BAKER, 1987), Espanha (FERRAGUT, ESCUDERO, 1999), Portugal (BOLLAND, VALA, 2000), França (MIGEON, 2005) e outros países do Mediterrâneo (EPPO, 2004). A ausência de inimigos naturais efetivos contribuiu para o seu condição de praga na África (BLAIR, 1989; SIBANDA et al., 2000).

Uma proposta de controle potencial para reduzir o impacto causado por um artrópode praga exótico seria a introdução intencional de inimigos naturais exóticos para estabelecimento permanente e controle da praga a longo prazo (EILENBERG, HAJEK, LOMER, 2001). Esta proposta de controle tem como base a premissa de que a praga invasora será controlada na nova área, assim que seja reunida com os inimigos naturais que regulam suas populações nas áreas onde é endêmica (KEANE, CRAWLEY, 2002). O lugar de origem de *T. evansi* não é conhecido, mas no Brasil este ácaro não alcança normalmente níveis de dano econômico. Uma doença de ácaro causada pelo fungo *Neozygites floridana* Weiser e Muma foi associada com declínio acentuado de populações de *T. evansi* no Brasil por Humber et al. (1981). Mais recentemente, a procura por inimigos naturais de *T. evansi* na América do Sul revelou que o ácaro predador *Phytoseiulus longipes* Evans é um potencial candidato para introdução na África (FURTADO, 2006).

Neozygites floridana é um patógeno obrigatório de ácaros tetraniquídeos. Este fungo cresce vegetativamente como corpos hifais dentro dos ácaros, os quais tornam-se múmias depois de serem mortos pelo fungo. Sobre condições favoráveis, como exemplo, em umidade relativa acima de 95% (DELALIBERA et al., 2006, ODUOR et al., 1996), os corpos hifais transformam-se em conidióforos não ramificados, cada qual lança violentamente um conídio primário próximo ao cadáver. O conídio primário eventualmente desenvolve um tubo capilar com um capiloconídio na porção distal. Como tal, *Neozygites* spp. apresenta uma estratégia de emboscada, 'sit and wait', através do capiloconídio, que é a única fase infectiva deste fungo responsável pela transmissão durante a fase assexuada do ciclo de vida (CARNER, 1976, SMITLEY, BROOKS, KENNEDY, 1986). Este conídio permanece nas folhas e se prende a qualquer animal pequeno que entra em contato com ele.

A população brasileira de *P. longipes* tem sido relatada como um predador potencialmente eficiente de *T. evansi* (FURTADO, 2006), diferentemente da observação feita por Moraes e McMurtry (1985, 1986) em relação a uma população daquela mesma espécie da África do Sul. Este predador já foi exportado para o Quênia e liberações em campo estão planejadas. O uso de ambos, predador e patógeno, podem oferecer melhores perspectivas para manejo de *T. evansi* do que a utilização de apenas um daqueles agentes. Entretanto, a compatibilidade de *N. floridana* e *P. longipes* não foi investigada.

A falta de informações dos possíveis impactos de patógenos sobre populações de predador dificulta a utilização combinada em programas de controle biológico clássico. No entanto, *N. floridana* provavelmente não seja capaz de infectar *P. longipes*, a adesão de um número excessivo de capiloconídios pode afetar o comportamento de ácaros fitoseídeos, promovendo a sua auto-limpeza (uso de pernas para limpar o corpo) e reduzindo sua atividade de forrageamento (TAKANO-LEE, HODDLE, 2002). O efeito de infecção pelo fungo na fisiologia do hospedeiro e seu efeito indireto sobre fitoseídeos também é desconhecido. O objetivo deste estudo foi determinar se *N. floridana* afeta a predação de *T. evansi* por *P. longipes*. Estas informações aumentarão nossa compreensão sobre as interações entre estes dois inimigos naturais e podem ajudar a determinar a viabilidade do uso concomitante de ambas às espécies em um programa de controle biológico clássico.

2.2 Material e Métodos

O estudo consistiu na determinação dos efeitos do fungo no comportamento, predação e oviposição do ácaro predador.

2.2.1 Colônias de ácaros

Ambas as espécies de ácaros fitófagos foram coletadas em Piracicaba, São Paulo, Brasil e criadas sobre plantas mantidas em casa-de-vegetação. *T. evansi* foi colocado em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) var. Santa Cruz, enquanto *T. urticae* foi criado sobre plantas de feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis* (L) (DeCandolle). A colônia estoque de *P. longipes* foi iniciada com indivíduos coletados durante 2004 em Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil. As colônias foram mantidas em plantas de feijão-de-porco infestadas com *T. urticae* em casa-de-vegetação no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil. Apenas fêmeas jovens de *P. longipes* foram utilizadas nos experimentos. Estas foram obtidas mantendo grupos de fêmeas de *P. longipes* sobre folhas de feijão-de-porco e tomate infestados com *T. urticae* e *T. evansi*, respectivamente, por 24 h; posteriormente as fêmeas foram removidas das folhas e os ovos obtidos foram mantidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Seis dias depois da eclosão das larvas, as fêmeas foram coletadas daquelas folhas para uso no experimento.

2.2.2 Cultura do fungo

Neozygites floridana foi coletado como cadáveres de *T. evansi* mumificados em uma casa-de-vegetação da ESALQ-USP durante uma epizootia em setembro de 2004 e armazenado em sílica gel a -10°C . Dez meses depois, as múmias foram descongeladas e usadas no experimento.

2.3 Métodos experimentais

2.3.1 Efeito da presa infectada pelo fungo na oviposição de *P. longipes*

Para infectar *T. evansi* e *T. urticae* com *N. floridana*, múmias foram colocadas individualmente em 10 discos de folhas de tomate e feijão-de-porco (1,2 cm de diâmetro). Os discos de folhas com as múmias foram colocados sobre algodão úmido ou sobre uma esponja saturada com água destilada dentro de placas de Petri (9 cm diâmetro). Estas placas foram

mantidas fechadas por 12 h no escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ para a esporulação. A esporulação foi confirmada utilizando-se um microscópio óptico antes de introduzir 10 fêmeas de *T. evansi* ou *T. urticae* por disco de folha de tomate ou de feijão de porco, respectivamente. Os ácaros foram mantidos nestes discos por 24h e então transferidos junto com uma fêmea de *P. longipes* para discos de folha novos e maiores (2,5 cm em diâmetro) colocados em placas de Petri (3 x 1,5 cm, diâmetro x altura) e coberto com filme plástico. Os discos de folhas foram trocados a cada quatro dias, adicionando-se 10 novas fêmeas infectadas de *T. evansi* ou *T. urticae*. Ácaros não infectados foram oferecidos a *P. longipes* no tratamento controle. A oviposição de *P. longipes* alimentado com presa infectada ou não-infectada foi registrada diariamente durante sete dias. Os predadores ao morrerem foram montados em médio de Hoyer, colocados em estufa a 32°C para clareamento e verificação em microscópio óptico da presença de conídios ou corpos hifais de *N. floridana*. Para confirmar os níveis de infecção de *T. evansi* e *T. urticae* por *N. floridana*, pelo menos dois ácaros foram coletados aleatoriamente de cada disco de folha contendo ácaros infectados oferecidos ao predador, e estes ácaros foram transferidos para um novo disco de folha sobre o qual os ácaros foram mantidos durante quatro dias antes de serem montados em meio azul de algodão. Dez repetições foram feitas em cada tratamento e o experimento foi repetido três vezes.

Devido ao fato de que no experimento descrito acima, *P. longipes* teve a chance de predação fêmeas infectadas e os ovos ovipositados por estas fêmeas, outro experimento foi realizado utilizando apenas machos adultos de *T. evansi* como presa, de forma que o predador não teria chance de se alimentar dos ovos. Este experimento não pôde ser feito com machos de *T. urticae* porque a infecção causada por *N. floridana* sobre estes ácaros foi muito baixa.

2.3.2 Comportamento de auto-limpeza de Capiloconídios

Cinco discos de folhas com cadáveres esporulados e 30 ovos de *T. evansi* ou *T. urticae* foram preparados como descrito no item anterior. O controle consistiu de discos de folhas com o mesmo número de ovos, mas sem a presença de cadáveres esporulados. Um predador mantido sem alimentado por 12h foi introduzido sobre um disco de folha com ou sem fungo contendo ovos. Seis discos com capiloconídios e seis sem capiloconídios foram usados. As observações foram feitas uma vez nos diferentes dias. Os tempos acumulativo gasto na auto-limpeza durante os primeiros 15 minutos; para iniciar alimentação sobre o primeiro ovo e gasto alimentando-se

daquele ovo foram determinados. Paralelamente, cinco discos de folha com cadáveres esporulados foram usados para avaliar a eficiência do comportamento de limpeza do predador. Para tanto, os predadores foram montados em meio de Hoyer e com auxílio de microscópio realizou-se a contagem dos capiloconídios aderidos ao corpo do ácaro depois de 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 6 h e 24 h. O experimento foi repetido duas vezes.

2.3.3 Capacidade de predação em folhas com capiloconídios

Grupos de 10 fêmeas de *T. evansi* foram transferidos individualmente para discos de folhas de tomate (2,5 cm de diâmetro) em placas de Petri (3 x 1,5 cm, diâmetro x altura) permitindo-se a oviposição por 12 horas. Todas as fêmeas e ovos em excesso foram retirados deixando apenas 30 ovos em cada disco. Um cadáver mumificado de *T. evansi* foi transferido para cada disco e mantido a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ no escuro, para induzir a esporulação. O controle consistiu de discos de folhas com ovos e sem cadáver mumificado de *T. evansi*. O predador mantido sem alimento por 12 horas foi adicionado a cada disco de folha e estes foram vedados com filme plástico. Foram utilizadas cinco repetições por cada tratamento. O número de ovos consumidos foi determinado depois de 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h sob microscópio de dissecação. O experimento foi repetido três vezes.

2.3.4 Teste de preferência: predação em áreas da folha com e sem capiloconídio

O teste de escolha foi conduzido para avaliar a preferência de *P. longipes* por substrato com ou sem capiloconídio. Dez fêmeas adultas de *T. evansi* foram colocadas em cada um dos 12 discos de folha de tomate (2,5 cm de diâmetro), permitindo-se um período de 12 h para estas ovipositarem. Cada disco foi separado simetricamente em duas partes utilizando-se uma lâmina cortante. Os ovos em excesso foram removidos, deixando-se 15 ovos em cada metade do disco. Uma múmia de *T. evansi* foi adicionada a uma das metades de cada disco. Todas as metades dos discos foram mantidos sob as condições previamente descritas. Depois que a esporulação foi confirmada utilizando-se um microscópio óptico, cada metade de disco de folha contendo esporos foi unido a outra metade de disco complementar correspondente sem esporos, de forma que cada disco de folha contenha ovos de *T. evansi* e capiloconídios de *N. floridana* em uma das metades e apenas ovos na outra. Uma fêmea adulta de *P. longipes* privada de alimento por 12 horas foi

introduzida ao centro de cada disco e o número de ovos consumidos pelo predador em cada parte foi registrado depois de 1, 2, 3, e 24h. O experimento foi repetido duas vezes.

2.3.5 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa SAS (SAS Institute Inc., 1999). A porcentagem de infecção de ácaros oferecidos como presa foi analisada por Análise de variância (ANOVA) depois da transformação dos dados por Arco seno. As taxas de oviposição de *P. longipes* alimentados com presas infectadas ou não-infectadas e o número de ovos consumidos em discos de folha com ou sem capiloconídios foram analisados por ANOVA, depois dos dados terem sido transformados. Quando efeitos significativos foram encontrados, comparações usando o teste Tukey HSD foram conduzidas para avaliar diferenças entre as médias ($p < 0,05$). Dados sobre observações de comportamento (tempo total de auto-limpeza, tempo para atacar o primeiro ovo, tempo de alimentação e resultados no teste de preferência) também foram comparados por ANOVA.

2.4 Resultados

2.4.1 Efeito da presa infectada pelo fungo na oviposição de *P. longipes*

A infecção média de fêmeas e machos de *T. evansi* e fêmeas de *T. urticae* oferecidas a *P. longipes* para predação foi de 88%, 76% e 18%, respectivamente. A oviposição de *P. longipes* foi significativamente menor quando alimentados somente com machos quando comparado com aos predadores alimentados com fêmeas e ovos de *T. evansi*, independentemente da infecção de *N. floridana* ($F = 95,37$; $gl = 1, 58$; $p = 0,0001$) (Tabela 2.1). Não foram observadas diferenças significativas entre as taxas de oviposição quando *P. longipes* alimentou-se de fêmeas, infectadas ou não infectadas, de qualquer espécie. O mesmo resultado foi observado quando foram oferecidos machos de *T. evansi* como presa. A oviposição foi maior sobre fêmeas infectadas de *T. evansi* do que *T. urticae* ($F = 26,35$; $gl = 1, 58$ $p = 0,0001$).

Tabela 2.1 - Taxa de oviposição (número médio de ovos por fêmea pelo período de 7 dias \pm Erro padrão) de *Phytoseiulus longipes* alimentados com *Tetranychus evansi* ou *T. urticae* infectado ou não infectado por *Neozygites floridana* (n = 10; 3 repetições)

Tratamentos	<i>Tetranychus evansi</i>		<i>Tetranychus urticae</i>
	Fêmea + Ovos	Machos	Fêmea + Ovos
Infectado	22,9 \pm 0,1	11,6 \pm 0,6	17,4 \pm 0,8
Não-infectado	23,6 \pm 0,6	11,8 \pm 0,6	18,4 \pm 0,8
ANOVA, gl = 1, 58 F = 0,32, p = 0,57 F = 0,06, P = ,80 F = 1, 41, p = 0,24			
<i>p</i> > 0,05 indica que as médias não diferiram significativamente			

2.4.2 Remoção de capiloconídios

O tempo dispendido pelo predador realizando a auto-limpeza foi significativamente maior em discos de folha com capiloconídios do fungo do que em discos de folha sem capiloconídios (Tabela 2.2). Durante os primeiros 15 minutos, *P. longipes* usou 13,3% do tempo fazendo auto-limpeza em folhas com capiloconídios e apenas 4,0% em folhas sem capiloconídio. Entretanto, o tempo usado para procura por presa antes de atacar o primeiro ovo e o tempo gasto na alimentação do primeiro ovo não foram significativamente diferentes. Os predadores montados que permaneceram sobre os discos de folha com cadáveres esporulados durante os primeiros cinco minutos apresentaram $1,6 \pm 0,4$ capiloconídios aderidos ao corpo (Figura 2.1). Em geral, observou-se que os capiloconídios aderiam-se nas pernas, gnatossoma, partes dorsais e ventrais do corpo do predador. No período de uma a 24 h, os números de capiloconídios aderidos por ácaro variaram de $0,4 \pm 0,2$ a $0,3 \pm 0,1$; foram observados alguns capiloconídios aderidos na parte de distal das pernas e a maioria deles estava na parte dorsal do corpo do ácaro. Nos ácaros montados não observou-se penetração do tubo germinativo ou formação de corpos hifais.

Tabela 2.2 - Aspectos comportamentais de *Phytoseiulus longipes* em discos de folhas de tomate com e sem capiloconídio de *Neozygites floridana* (média \pm Erro padrão) (n = 12; 3 repetições)

Tratamentos	Tempo de auto-limpeza (Min)	Tempo de forrageamento (Min)	Tempo de alimentação (Min)
Com capiloconídios	2,0 \pm 0,1	17,3 \pm 1,4	2,3 \pm 0,1
Sem capiloconídios	0,6 \pm 0,1	15,8 \pm 1,7	2,4 \pm 0,1

ANOVA, gl = 1, 22 F = 83,93; p = 0,0001 F = 0,44; p = 0,51 F = 0,20; p = 0,66

Auto-limpeza foi medido nos primeiros 15 minutos. O tempo de forrageamento foi medido até o ataque ao primeiro ovo e o de alimentação refere-se ao tempo gasto sobre o primeiro ovo de *Tetranychus evansi*. $p > 0,05$ indica que as médias não foram diferentes significativamente

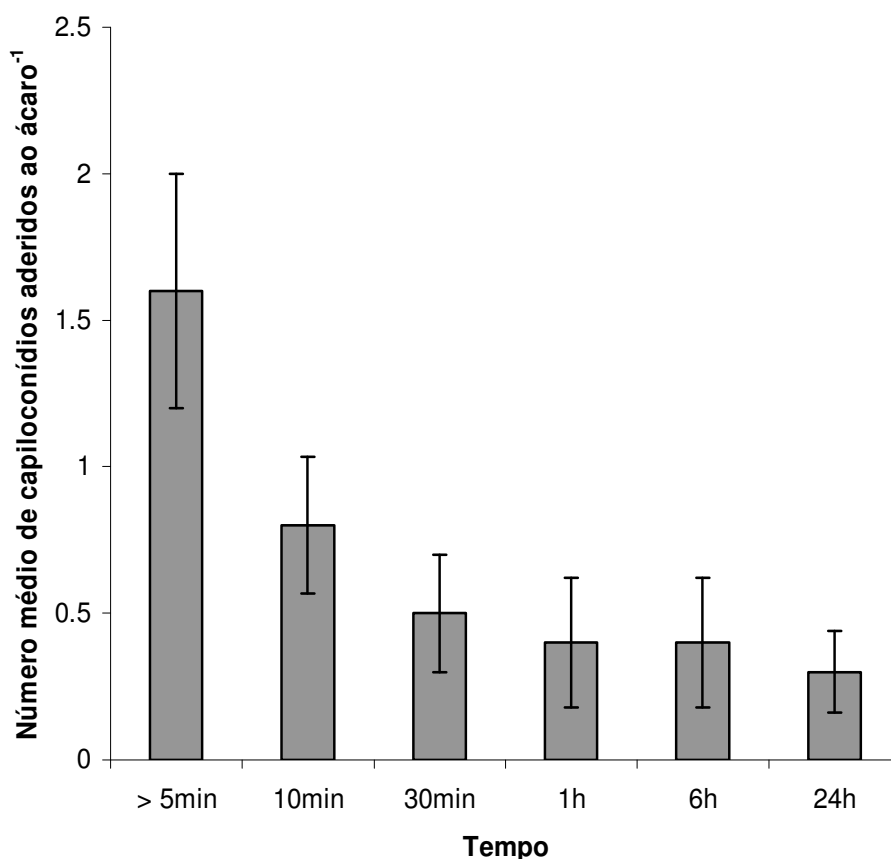


Figura 2.1 - Eficiência de auto-limpeza de *Phytoseiulus longipes* expresso pelo número de capiloconídios aderidos ao corpo do ácaro em períodos após *P. longipes* ter sido colocado em discos de folhas com capiloconídios (n = 10; 3 repetições)

2.4.3 Capacidade de predação em folhas com capiloconídios

Considerando todos os ensaios, nenhum corpo hifal de *N. floridana* foi encontrado dentro de *P. longipes* alimentados com ácaros em folhas com capiloconídios de *N. floridana*, nem em predadores colocados em contato com capiloconídios sugerindo que este fungo não é patogênico ao predador. A predação de ovos de *T. evansi* por *P. longipes* foi significativamente menor em discos de folha com capiloconídios (Figura 2.2) do que em discos de folha sem capiloconídios depois de 0,5 h ($F = 35,28$; $gl = 1, 28$; $p = 0,0001$), 1 h ($F = 19,17$; $gl = 1, 28$; $p = 0,0002$), 3 h ($F = 20,47$; $gl = 1, 28$; $p = 0,0001$), 6 h ($F = 42,97$; $gl = 1, 28$; $p = 0,0001$) e 24 h ($F = 10,14$; $gl = 1, 28$; $p = 0,0035$), mas não às 12 h ($F = 2,36$; $gl = 1, 28$; $p = 0,1357$). A taxa predação de ovos foi 2,8 vezes maior em discos de folha sem capiloconídios do que em discos de folha com capiloconídios, dentro dos primeiros 30 min. As diferenças nas taxas de predação diminuíram com o passar do tempo e foi apenas 1,6; 1,4 e 1,2 vezes maior depois da 1, 3 e 24 h, respectivamente (Figura 2.2). Cada *P. longipes* consumiu em média 0,9 e 2,6 ovos nos primeiros 30 min e 0,5 e 0,6 ovos nas últimas 12 horas em discos de folha com e sem capiloconídio, respectivamente.

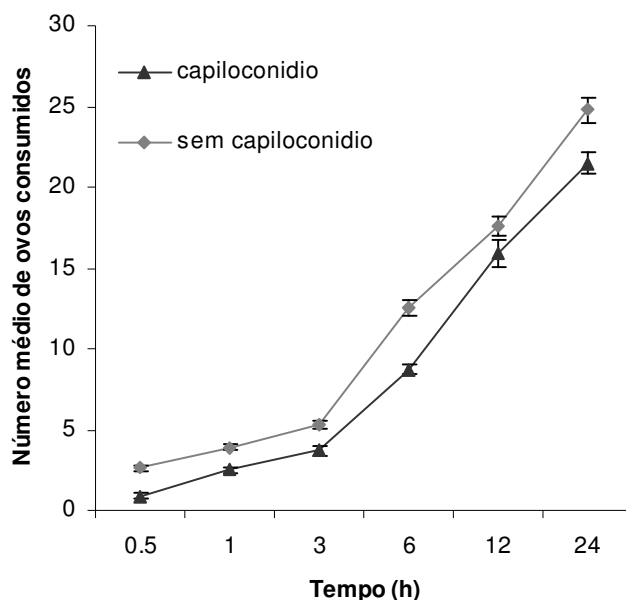


Figura 2.2 - Predação de ovos de *Tetranychus evansi* por *Phytoseiulus longipes* em discos de folhas com e sem capiloconídios de *Neozygites floridana* em diferentes intervalos de tempo ($n = 15$; 3 repetições)

2.4.4 Teste de preferência: predação em áreas da folha com e sem capiloconídios

Depois que os predadores foram colocados nas folhas, estes moveram-se erratically em ambas as áreas da folha com e sem capiloconídios de *N. floridana*. Nenhuma diferença significativa foi observada entre taxas de predação em áreas de disco de folha com ou sem capiloconídios em qualquer intervalo de tempo (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Número (média \pm Erro padrão) de ovos de *Tetranychus evansi* consumidos por *Phytoseiulus longipes* em áreas de discos de folhas com ou sem capiloconídios de *Neozygites floridana* (n = 12; 3 repetições) em um teste de preferência

Intervalo de tempo (h)	Discos de folha com capiloconídios	Discos de folha sem capiloconídios	ANOVA; gl = 1,22
0 - 1	2,4 \pm 0,4	1,9 \pm 0,3	F = 1,04; p = 0,32
1 - 2	0,8 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3	F = 0,69; p = 0,42
2 - 3	1,8 \pm 0,5	1,6 \pm 0,4	F = 0,14; p = 0,71
3 - 24	7,3 \pm 0,5	7,3 \pm 0,4	F = 0,02; p = 0,90

Os valores médios representam o número de ovos consumidos em cada intervalo de tempo especificado. $p > 0,05$ indica que as médias não foram diferentes significativamente

2.5 Discussão

Apesar de *N. floridana* se aderir a *P. longipes*, este fungo não consegue infectar o ácaro predador. Entretanto, o fungo parece interferir no comportamento do predador como resultado da adesão dos capiloconídios em seu corpo. Embora esta mudança no comportamento não afete a habilidade de forrageamento do predador para encontrar as presas ou se alimentar dos ovos da presa, parece provável que afete outras características do comportamento com o passar do tempo, é esperado que um custo energético maior associado ao aumento da atividade de auto-limpeza para remover os capiloconídios. Esta poderia ter sido a razão principal para a capacidade de predação reduzida de *P. longipes* em áreas com capiloconídios. Entretanto, devido ao movimento dos ácaros nos discos de folha, isto gera a quebra de tubos capilares que resulta na remoção de capiloconídios na folha; a redução do número de capiloconídios na folha deve estar associada a diminuição progressiva da atividade de limpeza. Isto foi indicado pelo um aumento na taxa de

predação em áreas com capiloconídios comparado com áreas sem capiloconídios depois de seis horas e pela diminuição nos números de capiloconídios aderidos aos ácaros com o passar do tempo. Porém, para uma afirmação mais precisa dos efeitos deste fenômeno se faz necessário um experimento mais longo.

Uma das funções da auto-limpeza em artrópodes é a remoção de corpos estranhos como fungos ou ácaros parasitas (FARISH, 1972). Em cupins entretanto, a limpeza por companheiros ajuda propagação da infecção do indivíduo infectado para o indivíduo saudável da mesma colônia (KRAMM, WEST, ROCKENBACH, 1982). Portanto, o comportamento de limpeza também poderia conduzir a um aumento da transmissão de patógenos. Este não é o caso de *N. floridana* porque quando um capiloconídio é removido durante a limpeza ele não mais contaminará outro hospedeiro saudável. O capiloconídio precisa estar no final do tubo capilar com a extremidade adesiva intacta para grudar no hospedeiro suscetível. Por esta razão, a quebra dos capiloconídios pode ser um impacto negativo do predador sobre o fungo.

Se o fungo é prejudicial ao predador alterando seu comportamento, com isso poderia ser esperado que o último tivesse desenvolvido a habilidade para detectar a presença e evitar lugares onde o fungo estivesse presente. A grande maioria dos ácaros da ordem Mesostigmata (a qual *P. longipes* pertence) não parece possuir fotorreceptores especializados. Isto indica que a detecção do fungo por *P. longipes* teria que ser possivelmente através de quimiorreceptores e / ou seta tátil. Entretanto, o estudo relatado aqui não mostrou qualquer evidência de comportamento do predador para evitar áreas onde o fungo estivesse presente. Este resultado conflita com o que seria esperado. Poderia haver várias explicações para o aparente conflito. Devido à especificidade de *N. floridana* a ácaros tetraniquídeos, o patógeno deveria ser encontrado onde seu hospedeiro estivesse presente; assim, a presença do fungo poderia sinalizar ao predador a presença de presa. Então, se o efeito prejudicial do fungo não é muito grave, ficar onde a presa está poderia ser preferível para o predador e não seria tão estranho que o predador não evitasse áreas com a presença do fungo. Nesta consideração, a qualidade da presa parece não ter sido significativamente afetada pela infecção do fungo, assim como a oviposição pareceu ser a mesma quando se alimentou de presas infectadas e não infectadas. Este comportamento de não evitar o local onde se tem a presença do fungo seria esperado particularmente em situações onde o alimento se encontra escasso, e neste estudo os ácaros permaneceram por 12 horas sem alimento antes do começo do teste. Outra possibilidade é que *P. longipes* naturalmente não tenha

convivido com *N. floridana*, portanto as duas espécies não tenham co-evoluído naturalmente. Isto poderia explicar o porquê do predador ainda não conseguir detectar a presença de um organismo desfavorável.

As maiores oviposições foram observadas quando o predador foi alimentado com fêmeas de *T. evansi* do que *T. urticae*, demonstrando que *T. evansi* é uma presa mais adequada para *P. longipes*. Isto foi demonstrado recentemente por Furtado (2006). A baixa oviposição observada quando utilizou-se machos de *T. evansi* indica que eles são presas menos adequadas para o predador do que as fêmeas. Os machos normalmente são muito pequenos comparados com as fêmeas da mesma espécie, mas os predadores receberam uma quantidade excessiva de presas neste estudo e a limitação de alimento poderia não ter sido um fator importante.

Baixos níveis de infecção de *T. urticae* foram atribuídos à especificidade deste fungo ao seu hospedeiro, porque o isolado utilizado foi proveniente de *T. evansi*. Estes resultados corroboram com estudos prévios de especificidade de *N. floridana* ao ácaro. Embora pelo menos uma espécie, *Neozygites acaricida* (Petch), seja patogênica ao ácaro fitoseídeo, *Euseius citrifolius* Denmark e Muma (FURTADO, MORAES, KELLER, 1996), não há nenhum outro relato de uma única espécie de *Neozygites* ser patogênica a ambos, ácaros tetraníquídeos e fitoseídeos. *N. floridana* foi testado contra duas espécies de fitoseídeos e vários insetos não-alvo (MORAES, DELALIBERA, 1992; HOUNTONDJI et al., 2002); nenhum deles foram suscetível a este fungo.

Efeitos sub-letais de patógenos sobre ácaros predadores raramente são estudados. Entretanto, Shaw, Moffit e Scriven, (1967) demonstraram que a fecundidade dos ácaros fitoseídeos *Euseius* (= *Amblyseius*) *hibisci* Chant, *Amblydromalus* (= *Amblyseius*) *limonicus* Garman e McGregor e *Galendromus* (= *Typhlodromus*) *occidentalis* Nesbitt não é afetada pela alimentação do ácaro vermelho do citros, *Panonychus citri* (McGregor), infectado com vírus. Semelhantemente a *N. floridana*, as viroses não produzem toxinas e, portanto efeitos diretos não são prováveis sem o desenvolvimento vegetativo do fungo dentro do predador.

Patógenos e outros inimigos naturais (predadores e parasitóides) competem pelo mesmo hospedeiro e sempre há o risco que eles possam afetar negativamente outros organismos não-alvo quando introduzidos em novos habitats. Porém, nós esperamos que a presença de *N. floridana* não reduza a atividade benéfica de *P. longipes* contra o ácaro vermelho do tomateiro. A ausência de efeitos sub-letais de *N. floridana* em *P. longipes* é importante porque ambos, patógeno e

predador estão sendo considerados para serem usados como agente de controle biológico de *T. evansi* na África.

Referências

- BLAIR, B.W. *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard (Acari: Tetranychidae): A new pest of tobacco in Zimbabwe. CORESTA Phytopathology and Agronomy Study Group, Bergerac, France, 1983. p. 1-6.
- BLAIR, B.W. Laboratory screening of acaricides against *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard. **Crop Protection**, Guildford, v. 8, n. 3, p. 212-216, 1989
- BOLLAND, H.R.; VALA, F. First record of the spider mite *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) from Portugal. **Entomologische Berichten**, Amsterdam, v. 60, p. 180, 2000.
- BOLLAND, H.R.; GUTIERREZ, J.; FLECHTMANN, C.H.W. **World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae)**. Leiden, Brill, 1998. 392p.
- BONATO, O. The effect of temperature on the life history parameters of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 23, p. 11-19, 1999.
- CARNER, G.R. A description of the life cycle of *Entomophthora* sp. in the two-spotted spider mite. **Journal Invertebrate Pathology**, New York, v. 28, p. 245-254, 1976.
- DELALIBERA, Jr, I.; DEMÉTRIO, C.G.B.; MANLY, B.F.J.; HAJEK, A. Effect of relative humidity and origin of isolates of *Neozygites tanajoae* (Zygomycetes: Entomophthorales) on production of conidia from cassava green mite, *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) cadavers. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 489-496, 2006.
- EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, Dordrecht, v. 46, p.387-400, 2001.
- EI-JAOUANI, N. **Contribution à la connaissance des acariens phytophages au Maroc et étude bio-écologique de *Tetranychus evansi* Baker et Pritchard (Acarina: Tetranychidae)**. 230p. 1988. Thesis - Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II, Rabat, Morocco, 1988.
- EPPO. Introduction of *Tetranychus evansi* in some Mediterranean countries: Addition to the EPPO Alert List. **EPPO Reporting Service**, Paris, v. 5, p. 80, 2004.
- FARISH, D.J. The evolutionary implications of qualitative variation in the grooming behaviour of the Hymenoptera (Insecta). **Animal Behavior**, London, v. 20, p.662 – 676, 1972.

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

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

FURTADO, I.P, MORAES, G.J., KELLER, S. Infection of *Euseius citrifolius* (Acari: Phytoseiidae) by an entomophthoralean fungus in Brazil. **Ecossistema**. Espirito Santo Do Pinhal, v. 21, p.85–86, 1996.

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

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

KEANE, R.M.; CRAWLEY, M.J. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. **Trends in Ecology Evolution**. Amsterdam. v. 17, 164-170, 2002.

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

KRAMM, K.R.; WEST, D.F.; ROCKENBACH, P.G. Termite pathogens: Transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 40, p.1- 6, 1982.

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

MORAES, G.J, DELALIBERA, Jr, I. Specificity of a strain of *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) to *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 14, p. 89-94, 1992.

MORAES, G.J.; McMURTRY, J.A. Comparison of *T. evansi* and *T. urticae* (Acari: Tetranychidae) as prey for eight species of phytoseiid mites. **Entomophaga**. Paris. v. 30, 393-397, 1985.

MORAES, G.J.; McMURTRY, J.A. Suitability of the spider mite *Tetranychus evansi* as prey for *Phytoseiulus persimilis*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 40, p.109-115, 1986.

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

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

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

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

SHAW, J.G.; MOFFIT, C.; SCRIVEN, T. Biotic potential of phytoseiid mites fed on virus-infected citrus red mites. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v. 60, p.1751-1752, 1967.

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

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

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 two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 47, p.325-332, 1986.

TAKANO-LEE, M.; HODDLE, M. Predatory behaviors of *Neoseiulus californicus* and *Galendromus helveolus* (Acari: Phytoseiidae) attacking *Oligonychus perseae* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 26, p.13-26, 2002.

3 Efeitos de pesticidas no ciclo de vida do fungo patogênico a ácaros *Neozygites floridana*

Resumo

O ácaro vermelho do tomateiro, *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard, é uma espécie invasora na África causando danos consideráveis em plantações de solanáceas. Isolados do fungo patogênico *Neozygites floridana* Weiser e Muma coletados no Brasil são candidatos potenciais para a introdução na África para o controle de *T. evansi*. Para ser incorporado ao sistema de produção, *N. floridana* deve ser compatível com os pesticidas utilizados para o controle de outras pragas e doenças. Pesticidas usados em tomate que podem afetar o fungo, foram portanto avaliados utilizando-se diferentes métodos. Dois inseticidas, lambda-cialotrina e metomil; dois acaricidas, propargito e abamectina; e dois fungicidas, captana e mancozebe foram testados em duas diferentes concentrações, a dose média recomendada do produto (TC) e a metade da dose recomendada (TC / 2). Cadáveres de ácaros mortos pelo fungo ou o substrato usado para esporulação (discos de folha e lamínulas) foram imersos ou pulverizados com os pesticidas antes de testar os efeitos deles na esporulação, germinação dos conídios primários e na infectividade de *N. floridana*. A imersão direta de cadáveres, lamínulas ou discos de folha nos pesticidas afetou a esporulação e a germinação mais do que o método de pulverização em Torre de Potter, embora a infectividade dos capiloconídios não foi afetada pelo método de aplicação nem pela concentração dos pesticidas. Os fungicidas captana e mancozebe resultaram em uma alta redução da esporulação e germinação em ambas as concentrações. Propargito não inibiu a esporulação mas afetou a germinação dos conídios primários. Metomil e abamectina resultaram em menos efeitos em *N. floridana*.

Palavras chave: *Neozygites floridana*; Toxicidade; Tomate; *Tetranychus evansi*; Seletividade

Abstract

The tomato red spider mite, *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard, is an invasive species in Africa causing considerable damage to Solanaceous crops. The fungal pathogen *Neozygites floridana* Weiser and Muma from Brazil has been considered a potential candidate for introduction into Africa for the control of *T. evansi*. To be incorporated in the tomato production system, *N. floridana* has to be compatible with the pesticides used for the control of other pests and diseases. Pesticides used in tomatoes that might affect the fungus were therefore studied by the use of different methods. Two insecticides, Lambda-cyhalothrin and Methomyl; two acaricides, Propargite and Abamectin; and two fungicides, Captan and Mancozeb were tested in two different concentrations, the mean commercial rate (CR) and 50% of the mean commercial rate (CR/2). Fungus-killed mite cadavers or the substrates used for sporulation (leaf discs and coverslips) were either immersed or sprayed with the pesticides before testing their effects on sporulation, germination of primary conidia and infectivity of *N. floridana*. Direct immersion of cadavers, coverslips or leaf discs into pesticides affected sporulation and germination stronger than the spray tower method, although infectivity of capilliconidia was neither affected by the method of application nor the concentration of the pesticides. The fungicides Captan and Mancozeb resulted in a high reduction in sporulation and germination at both concentrations.

Propargite did not inhibit sporulation but affected germination of primary conidia. Methomyl and Abamectin resulted in less effects on *N. floridana*.

Keywords: *Neozygites floridana*; Toxicity; Tomato; *Tetranychus evansi*; Side-effects

3.1 Introdução

O ácaro vermelho do tomateiro, *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard, é uma espécie invasora no continente africano causando consideráveis danos em cultivos de solanáceas (SAUNYAMA, KNAPP, 2003). Em tomate, *T. evansi* é freqüentemente controlado por intensiva aplicação de acaricidas (BLAIR, 1989). Insetos praga pertencentes à ordem Lepidóptera e doenças fúngicas em tomate como *Phytophthora infestans* (Mont.), são controlados pelo uso de inseticidas e fungicidas, respectivamente.

Em vários países, epizootias causadas por *Neozygites floridana* Weiser e Muma (Zygomycetes: Entomophthorales) estão associadas ao declínio rápido de populações de ácaros fitófagos (BOYKIN, CAMPBELL, BEUTE, 1984; SMITH, FURR, 1975; CARNER, CANERDAY, 1970), incluindo *T. evansi* em tomate (HUMBER, MORAES, DOS SANTOS, 1981). A importância aparente deste fungo como agente de controle natural em agroecossistemas sugere que se pode utilizar este fungo em conjunto com outras estratégias no programa Manejo Integrado de Pragas (MIP) para um controle sustentável de pragas. *N. floridana* coletado no Brasil é considerado como um candidato potencial para o controle biológico clássico de *T. evansi* na África. Para maximizar o potencial de *N. floridana* no controle de *T. evansi* em tomate, se faz necessário a utilização de pesticidas seletivos para o manejo de outras pragas de tomate para reduzir o efeito negativo sobre *N. floridana*.

O efeito direto que os fungicidas têm sobre epizootias naturais de fungos entomopatogênicos são demonstrados para diversas espécies. Por exemplo, a aplicação de fungicidas implica na redução de incidência de *Neozygites* spp. em campo, resultando no aumento da densidade populacional de seus hospedeiros, principalmente de afídeos e ácaros fitófagos (BRANDENBURG, KENNEDY, 1983; BOYKIN, CAMPBELL, BEUTE, 1984; BOWER, BERKETT, COSTANTE, 1995; KLINGEN, WESTRUM, 2007).

Embora seja aconselhável realizar experimentos de campo para determinar o efeito de pesticidas sobre a dinâmica de doenças causadas por fungos entomopatogênicos, experimentos de

campo são caros, consomem tempo e muitas vezes, não são apropriados para identificar fatores específicos que afetam os fungos entomopatogênicos. Para identificar a compatibilidade de pesticidas com entomopatógenos, bioensaios de laboratório são habitualmente o primeiro passo na seleção de pesticidas para uso no Manejo Integrado de Pragas (MORJAN, PEDIGO, LEWIS, 2002).

Estudos conduzidos para determinar o efeito inibitório de pesticidas em outras espécies de fungos Entomophthorales comumente enfocam o impacto destes sobre a germinação de conídios e crescimento micelial em meio de cultura contendo cada pesticida (BOYKIN, CAMPBELL, BEUTE, 1984; YENDOL, 1968; JAQUES, PATTERSON, 1962; HALL, DUNN, 1959). Estudos do efeito de pesticidas sobre *N. floridana* têm recebido pouca atenção, principalmente por causa das dificuldades associadas com o estabelecimento do cultivo *in vitro* deste patógeno (MORJAN, PEDIGO, LEWIS, 2002).

Neozygites floridana produz três tipos de esporos e apresenta um ciclo de vida mais complexo que a fase anamorfa de Ascomycota, da ordem Hypocreales ("fungos imperfeitos" formalmente em Deuteromycota). Conídios primários de *N. floridana* são projetados ativamente a partir de conidióforos de ácaros hospedeiros mumificados, chamado de cadáveres. Um conídio primário cai na superfície da folha e germina para formar um tipo secundário de conídio, o capiloconídio infectivo (DELALIBERA, DEMÉTRIO, MANLY, HAJEK, 2006; ODUOR, YANINEK, VAN DER GEEST, MORAES, 1996; SMITLEY, BROOKS, KENNEDY, 1986). O hospedeiro precisa entrar em contato com o capiloconídio para ser infectado. *Neozygites floridana* também produz esporos de resistência para sobrevivência no longo prazo, provavelmente quando as condições estão desfavoráveis. Então, existem muitas fases do ciclo de vida que podem ser afetados pela aplicação de pesticidas.

A proposta deste estudo foi testar o efeito de fungicidas, acaricidas e inseticidas utilizados na produção comercial de tomate sobre a esporulação, germinação, infectividade e mortalidade de *T. evansi* pelo fungo *N. floridana* e descrever métodos de laboratório que possam ser usados em testes de toxicidade sem a necessidade de se cultivar o fungo em meios artificiais.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Produção do fungo

O isolado de *N. floridana* (LQ2) utilizado neste experimento foi inicialmente coletado na forma de ácaros mumificados de *T. evansi*, em casa de vegetação, na Universidade de São Paulo em Piracicaba, São Paulo, Brasil, durante uma epizootia em Setembro de 2004. Este material foi armazenado por um ano em potes plásticos fechados hermeticamente contendo sílica gel a temperatura de -10°C , antes de ser utilizado no estudo. Novas mummies foram produzidos pela exposição de fêmeas de *T. evansi* saudáveis a mummies esporuladas da cultura estoque. A esporulação foi obtida colocando-se mummies de *T. evansi* a 25°C , no escuro, em discos de folhas de tomate (1,2 cm de diâmetro), colocadas sobre espuma umedecidas com água destilada em placas de Petri fechadas (9 cm de diâmetro), a 100% UR por 16 horas. Os ácaros expostos a mummies esporuladas foram mantidos a 25°C e 50% UR sob fotofase de 12 horas, as novas mummies foram coletadas de três a sete dias após, para serem utilizadas no bioensaio. O efeito dos pesticidas foi avaliado pela aplicação direta dos produtos somente sobre mummies recém formadas (não sobre mummies armazenadas) e sobre os conídios liberados por eles.

3.2.2 Pesticidas utilizados

Informações sobre nomes comerciais, ingredientes ativos, tipos de pesticidas, formulações, grupos químicos e concentrações recomendadas dos pesticidas são apresentadas na Tabela 3.1. Dois inseticidas, Karate Zeon® 50 CS (Syngenta) e Lannate® BR (Dupont), dois acaricidas, Omite® 720 EC (Crompton) e Abamex® (Bequisa), e dois fungicidas, Orthocide® 500 (Arysta Lifescience) e Dithane NT (Dow Agrosiences), foram escolhidos pelo seu uso frequente por agricultores em plantios de tomate. Os pesticidas foram utilizados em duas concentrações: a dosagem comercial recomendada (TC), que é a concentração média indicada para aplicação em tomate, e metade da dosagem comercial recomendada ($\text{TC} / 2$). Todos os pesticidas foram diluídos em água destilada, contendo 0,05% de Tween 80 como um surfactante.

Tabela 3.1 - Pesticidas usados nos estudos de seletividade com *Neozygites floridana*

Ingrediente ativo	Nome comercial	Tipo de pesticida	Formulação	Grupo químico	Concentração média (CM)
propargito	Omite	Acaricida	CE	Sulfito de alquila	50ml/100L
abamectina	Abamex	Acaricida	CE	Avermectina	75ml/100L
captana	Orthocide	Fungicida	WP	Dicarboximida	240g/100L
mancozebe	Dithane	Fungicida/ Acaricida	WP	Aquilenobis Ditiocarbamato	300g/100L
metomil	Lannate	Inseticida	SL	Carbamato	100ml/100L
lambda-cialotrina	Karate	Inseticida	SC	Piretróide	40ml/100L

MR = Concentração média recomendada do produto formulado para aplicação em 100L de água/ha

CE = Concentrado emulsionável, WP = Pó molhável, SL = Concentrado solúvel, SC = Suspensão de encapsulada

3.3 Aspectos gerais da instalação dos experimentos

O efeito de pesticidas sobre *N. floridana* foi testado utilizando-se dois métodos de contaminação: imersão e pulverização. Múmias, discos de folhas ou lamínulas usados no bioensaios foram imersos ou pulverizados com os pesticidas. Diferentes bioensaios foram realizados para determinar o efeito de pesticidas sobre a esporulação, germinação dos conídios primários e desenvolvimento do fungo no ácaro. Todos os experimentos foram repetidos três vezes.

3.3.1 Efeito de pesticidas na esporulação

A ação dos pesticidas na esporulação foi estudada pela avaliação dos seus efeitos diretos e indiretos. O efeito direto foi avaliado imergindo-se as múmias nos pesticidas (tratamento de cadáveres). O efeito indireto foi avaliado imergindo-se discos de folha nos pesticidas (tratamento de folha) antes de transferir os cadáveres para estes discos. Similarmente, os efeitos diretos e indiretos foram testados pela pulverização de cadáveres colocados sobre discos de folha ou pela pulverização de discos de folha antes de os cadáveres serem transferidos.

Tratamento de cadáveres: Dez cadáveres foram colocados dentro de tubos de microcentrífuga e em cada tubo foram adicionados 0,5 ml de cada pesticida, nas duas concentrações (TR ou TC / 2), e 0,05% de Tween 80, e estes então foram agitados por 2 min. O

conteúdo de cada tubo foi vertido sobre papel de filtro para drenar o excesso de pesticida. Os cadáveres controle receberam os mesmos tratamentos, como descrito acima, porém com adição de água destilada com 0,05% de Tween 80. Depois das 2 h, os cadáveres tratados foram colocados individualmente sobre discos de tomate não tratados (1,2 cm de diâmetro), e estes sobre uma esponja úmida dentro de uma placa de Petri (9 cm de diâmetro). As placas foram fechadas para alcançar 100% UR, aproximadamente, e incubadas a 25°C no escuro por 16 h. O número de conídios produzidos por cada múmia foi estimado pela observação direta dos discos foliares sob um microscópio óptico composto e o número de conídios foi contabilizado de acordo com uma escala categórica (0 = nenhuma esporulação, 1 = 1-100, 2 = 101-500 e 3 => 501 conídios).

Em um experimento paralelo, dez cadáveres foram colocados sobre um papel filtro e pulverizados com 2 ml de cada pesticida nas duas concentrações, utilizando-se uma Torre de Potter (Potter Precision Laboratory Spray Tower; Burkard Manufacturing Co. Ltd, Rickmansworth, Herts, England), calibrada para 68,95 kPa com média de deposição de 1,5 mg de suspensão/cm². Os cadáveres pulverizados foram secos ao ar por 2 h e foram transferidos individualmente sobre discos foliares de tomate, não pulverizados, e processados como descrito acima.

Tratamento de folhas: Dez discos de folha foram imersos individualmente em cada pesticida nas duas concentrações (TC e TC / 2) por 2 min e foram secos ao ar por 2 h. De forma semelhante, dez discos de folha foram pulverizados com 2 ml de cada suspensão de pesticida. Cadáveres obtidos da cultura estoque foram colocados no centro de cada disco, sobre esponja úmida dentro de uma placa de Petri fechada e estes foram incubados a 25°C, no escuro, por 16h, posteriormente foi avaliada a esporulação, como descrito acima. Discos foliares usados como controle foram imersos ou pulverizados com água destilada contendo 0,05% de Tween 80 e todos os outros procedimentos experimentais foram semelhantes aos descritos acima.

3.3.2 Efeito dos pesticidas na germinação de conídios primários

Três lamínulas (23 × 23 mm) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pa.), quadriculadas e com campos com identificação alfanumérica, foram imersas ou pulverizadas com a concentração (TC) de cada pesticida e secas ao ar por 2 h, posteriormente foram adicionados dois cadáveres no centro de cada lamínula. As lamínulas controle foram imersas em água destilada contendo 0,05%

de Tween 80. As lamínulas com os cadáveres foram então colocadas sobre uma esponja saturada com água destilada em uma placa de Petri fechada, estas foram incubadas a 25°C, no escuro, por 16h. A germinação de conídios foi observada usando um microscópio composto e o número conídios germinados e não-germinados, contidos em cinco quadrados selecionados arbitrariamente, dentro do campo visual, foi registrado usando um contador manual. A contagem do total de conídios germinados incluiu os conídios que estavam em processo de formação ou já tinha formado conídio secundário ou capiloconídio. A porcentagem de germinação foi calculada dividindo-se o número de conídios germinados pelo número total de conídios contados em cada campo e multiplicando-se o quociente por 100.

3.3.3 Efeito dos pesticidas na infectividade de capiloconídios

Discos de folhas com cadáveres esporulados – provenientes do estudo do efeito dos pesticidas sobre a esporulação pela imersão e pulverização, foram utilizados para testar a infectividade dos capiloconídios produzidos. Somente os discos foliares com elevado números de conídios (categoria 3) foram selecionados para este estudo. Quinze fêmeas de *T. evansi* foram colocadas sobre cada um dos 10 discos foliares que continham os esporos e estes permaneceram a 25°C em câmara de incubação. A mortalidade destes ácaros foi conferida diariamente durante sete dias.

3.3.4 Efeito de pesticidas na mortalidade de *T. evansi* inoculado com *N. floridana*

Somente captana e metomil foram usados neste estudo, porque eles foram os únicos que não mataram os ácaros expostos aos discos de folhas tratados com estes pesticidas. Dez discos de folha foram imersos em cada pesticida em uma única concentração (TC) e os discos foram secos ao ar por 2 h. Quinze fêmeas de *T. evansi* foram transferidas para discos foliares tratados. Após 48 h de alimentação nos discos foliares tratados, os ácaros foram transferidos para novos discos foliares, cada um contendo um cadáver de *N. floridana* esporulado. Estes ácaros permaneceram por 24 h nestes discos foliares para contaminação e foram então transferidos para discos foliares novos e maiores, e nestes foi observada diariamente, por 7 dias, a infecção e mortalidade de ácaros. Discos foliares controle foram imersos em água destilada contendo 0,05% de Tween 80 e todos os outros procedimentos experimentais foram como os descritos para os tratamentos com

pesticidas. Os discos foliares foram trocados depois do quarto dia. Os ácaros mortos foram montados e observados sob microscópio, sendo a presença de corpos hifais usada para confirmava que a causa de morte foi devida a *N. floridana*.

3.3.5 Análise de dados

Os efeitos dos pesticidas na esporulação, germinação e infectividade foram comparadas usando análise de variância (ANOVA) em esquema bifatorial, com tratamento, concentração e métodos de aplicação como fatores (PROC GLM, SAS Institute 1998). Os dados de porcentagem de germinação e mortalidade, antes de serem submetidos à análise, foram transformados por arco seno, para homogeneizar as variâncias. As médias foram comparadas pelo Teste de Duncan (Duncan Multiple Range Test-DMRT) ($P < 0,05$). Uma comparação pré-planejada entre tratamentos foi executada separadamente, para cada grupo de pesticida, para determinar os efeitos do tratamento dentro do grupo.

3.4 Resultados

3.4.1 Efeito de pesticidas na esporulação de *N. floridana*

3.4.1.1 Tratamento de cadáveres

O efeito negativo dos pesticidas sobre a esporulação de *N. floridana* foi maior quando os cadáveres foram imersos nos pesticidas do quando pulverizados ($F = 11,66$; $gl = 35, 324$; $p = 0,0001$) (Tabela 3.2). Quando cadáveres foram imersos nos pesticidas, lambda-cialotrina, metomil, abamectina e propargito não tiveram nenhum efeito sobre a esporulação na concentração de TC / 2, mas a esporulação foi menor na concentração de TC. Captana e mancozebe reduziram significativamente a esporulação em ambas as concentrações, TC / 2 e TC. Quando os cadáveres foram pulverizados com os pesticidas, metomil, lambda-cialotrina, propargito e abamectina não houve efeito sobre a esporulação em nenhuma das concentrações. Cadáveres pulverizados com mancozebe e captana esporularam menos em ambas as concentrações, TC / 2 e TC.

Tabela 3.2 - Esporulação de *Neozygites floridana* a partir de múmias de fêmeas de *Tetranychus evansi* após imersão ou pulverização com a concentração média recomendada (TC) ou a metade da concentração (TC / 2) dos pesticidas. Os números de conídios (Média ± Erro padrão) foram estimados baseado em uma escala por categoria, sendo nota 0 = 0, 1 = 1-100, 2 = 101-500 e 3 = > 501 conídios/ácaro mumificado

Pesticida	Cadáveres imersos			Cadáveres pulverizados		
	TC / 2	TC	Controle	TC / 2	TC	Controle
metomil	1,7 ± 0,2bc	1,4 ± 0,2c	2,3 ± 0,2ab	2,6 ± 0,2a	2,3 ± 0,3ab	2,3 ± 0,1ab
lambda-cialotrina	1,8 ± 0,2bc	1,5 ± 0,2c	2,2 ± 0,2ab	2,3 ± 0,3ab	2,3 ± 0,3ab	2,7 ± 0,2a
propargito	2,5 ± 0,2b	0,3 ± 0,2d	2,5 ± 0,2ab	1,9 ± 0,4bc	1,9 ± 0,4bc	2,5 ± 0,2ab
abamectina	3,0 ± 0,0a	1,3 ± 0,4c	2,8 ± 0,1a	1,8 ± 0,4bc	1,6 ± 0,4bc	2,4 ± 0,2ab
captana	0,6 ± 0,2c	0,3 ± 0,2cd	2,1 ± 0,2ab	0,5 ± 0,2c	0,4 ± 0,2cd	2,4 ± 0,3a
mancozebe	0,0 ± 0,0e	0,0 ± 0,0e	1,6 ± 0,2b	0,3 ± 0,2cd	0,1 ± 0,1cd	2,4 ± 0,2a

Médias na mesma coluna seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes (DMRT, P = 0,05)

3.4.1.2 Tratamento de folhas

Cadáveres colocados sobre discos foliares que foram imersos em lambda-cialotrina esporularam e produziu tantos conídios quanto o controle sem pesticida (Tabela 3.3). A concentração TC / 2 de metomil, propargito e abamectina não afetaram a esporulação, mas na concentração TC estas pesticidas afetaram a esporulação. mancozebe e captana afetaram significativamente a esporulação em ambas concentrações, TC / 2 e TC. Quando propargito foi pulverizado sobre discos foliares a esporulação não foi afetada na menor concentração (TC / 2), mas a alta concentração (TC) afetou a esporulação. Discos foliares pulverizados com as concentrações TC / 2 ou TC de metomil, lambda-cialotrina, abamectina e captana não resultaram em diferenças na esporulação. mancozebe, no entanto, inibiu a esporulação em ambas as concentrações, TC / 2 e TC, quando discos foliares foram pulverizados com este pesticida. Em geral, para mancozebe e captana, a esporulação foi significativamente maior quando discos foliares foram pulverizados do que quando imersos nestes pesticidas ($F = 11,78$; $gl = 11, 108$; $p = 0,0001$).

Tabela 3.3 - Esporulação de *Neozygites floridana* de fêmeas mumificadas de *Tetranychus evansi* em discos de folhas imersos ou pulverizados com a concentração média recomendada (TC) ou a metade da concentração recomendada (CR/2) dos pesticidas. Número de conídios (Média ± Erro padrão) foram estimados baseado em uma escala por categorias, sendo 0 = 0, 1 = 1-100, 2 = 101-500 e 3 = > 501 conídios/ácaro mumificado

Pesticida	Discos de folha tratados por imersão			Discos de folhas pulverizados		
	CR/2	CR	Controle	CR/2	CR	Controle
metomil	2,0 ± 0,2b	1,4 ± 0,2d	2,2 ± 0,2b	2,9 ± 0,1a	2,9 ± 0,1a	2,9 ± 0,1a
lambda-cialotrina	1,9 ± 0,2bc	1,7 ± 0,2bc	2,0 ± 0,3bc	2,5 ± 0,3abc	2,1 ± 0,4bcd	2,7 ± 0,2ab
propargito	3,0 ± 0,0a	1,8 ± 0,4bc	3,0 ± 0,0a	2,1 ± 0,4bc	1,9 ± 0,3cd	2,7 ± 0,2ab
abamectina	2,9 ± 0,1a	1,9 ± 0,4bc	3,0 ± 0,0a	2,5 ± 0,3abc	2,3 ± 0,3abc	2,3 ± 0,2abc
captana	0,7 ± 0,3e	0,4 ± 0,2ef	2,2 ± 0,2b	1,7 ± 0,5abc	1,4 ± 0,4cde	2,5 ± 0,2abc
mancozebe	0,0 ± 0,0g	0,0 ± 0,0g	1,9 ± 0,2bcd	1,0 ± 0,3de	0,7 ± 0,4de	2,5 ± 0,2abc

Médias na mesma coluna seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes (DMRT, P = 0,05)

3.4.2 Efeito dos pesticidas na germinação dos conídios primários

A germinação do conídio primário foi afetada significativamente pelos pesticidas e também pelo método de aplicação dos pesticidas: imersão e pulverização de lamínula (Tabela 3.4). Propargito e mancozebe inibiram totalmente a germinação de conídios após a imersão da lamínula. Quando as lamínulas foram pulverizadas com os pesticidas, a germinação foi totalmente inibida por mancozebe e apenas $7,0 \pm 2,0\%$ dos conídios primários germinaram nas lamínulas pulverizadas com propargito. Lambda-cialotrina e captana também reduziram a germinação em ambos os métodos de aplicação. Metomil foi o único pesticida que não afetou a germinação quando as lâminas foram imersas ou pulverizadas. Em geral, a germinação dos conídios primários foi significativamente maior nas lamínulas em que se pulverizou os pesticidas do que nas lamínulas imersas nos pesticidas ($F = 22,51$; $gl = 29, 60$; $p = 0,0001$).

Tabela 3.4 - Efeito dos pesticidas na germinação dos conídios primários de *Neozygites floridana* quando cadáveres foram colocados para esporular em superfícies que foram imersas ou pulverizadas com a concentração média recomendada (TC) dos pesticidas. Dados da porcentagem média de germinação \pm Erro padrão

Pesticida	Lamínulas tratadas por imersão		Lamínulas pulverizadas	
	TC	Controle	TC	Controle
metomil	78,2 \pm 5,8abc	70,2 \pm 5,8abc	84,7 \pm 2,0a	78,1 \pm 7,6a
lambda-cialotrina	42,8 \pm 21,7d	70,2 \pm 5,8abc	61,3 \pm 4,8bc	78,1 \pm 7,6a
abamectina	54,9 \pm 11,2cd	56,6 \pm 9,0cd	57,1 \pm 4,2cd	82,5 \pm 4,0a
propargito	0,0 \pm 0,0e	56,6 \pm 9,0cd	7,0 \pm 2,0e	82,5 \pm 4,0a
captana	21,4 \pm 1,4e	59,4 \pm 9,5bcd	66,8 \pm 4,1bc	77,7 \pm 0,7a
mancozebe	0,0 \pm 0,0e	59,4 \pm 9,5bcd	0,0 \pm 0,0e	77,7 \pm 0,7a

Médias na mesma coluna seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes (DMRT, P = 0,05)

3.4.3 Efeito dos pesticidas na infectividade dos capoliconídios

A infectividade dos conídios após a aplicação dos pesticidas foi avaliada em função da mortalidade dos ácaros expostos. A maioria dos ácaros transferidos para discos de folhas tratados com propargito, abamectina, mancozebe e lambda-cialotrina morreram depois de um dia, o que indica um efeito direto dos produtos nos ácaros e portanto estes produtos não foram utilizados no teste de infectividade (Tabela 3.5). metomil e captana foram os únicos pesticidas que se testou infectividade onde os discos de folhas foram imersos ou foram pulverizados. Foram observadas menores mortalidades de ácaros inoculados com o fungo quando os discos de folhas foram imersos quando comparado com os que foram pulverizados com metomil e captana ($F = 10,22$; $gl = 9, 39$; $p = 0,0001$) independente da concentração usada, indicando um efeito do método de aplicação do pesticida. Nem metomil, nem captana afetaram a infectividade quando discos de folhas foram pulverizados com os pesticidas. Infectividade reduzida foi, entretanto, observada em discos de folha imersos em pesticidas com a concentração TC. Quando cadáveres foram imersos ou pulverizados, todos os pesticidas exceto mancozebe (não testado devido a esporulação insuficiente) foram usados para testar patogenicidade do fungo esporulados. Nenhum dos pesticidas reduziu a porcentagem de ácaros mortos por *N. floridana* comparado aos controles. Porém, a mortalidade de ácaros foi mais alta quando os cadáveres foram pulverizados do que quando imersos nos pesticidas ($F = 4,30$; $gl = 25, 97$; $p = 0,0001$) (Tabela 3.6). Para todos os pesticidas, a mortalidade não diferiu entre as concentrações TC / 2 ou TC quando os cadáveres foram imersos ($F = 0,16$; $gl = 1, 8$; $p = 0,70$) ou pulverizados ($F = 0,20$; $gl = 1, 8$; $p = 0,6653$). A imersão de cadáveres em metomil resultou em menor mortalidade de ácaros quando comparado aos cadáveres que foram somente pulverizados com os pesticidas a concentração de TC ($F = 18,17$; $gl = 1, 8$; $p = 0,0028$).

Tabela 3.5 - Efeito dos pesticidas na infectividade dos capiloconídios de *Neozygites floridana* para *Tetranychus evansi* quando discos de folhas foram imersos ou pulverizados com a concentração média (TC) ou a metade da concentração média (TC/2) dos pesticidas. Dados representam a porcentagem de mortalidade (média \pm Erro padrão) de *T. evansi* sete dias após a inoculação

Pesticida	Discos de folhas tratados por imersão			Discos de folhas pulverizadas		
	TC/2	TC	Controle	TC / 2	TC	Controle
metomil	47,3 \pm 7,4cd	41,8 \pm 4,4d	61,3 \pm 6,1bc	76,9 \pm 6,4ab	82,6 \pm 1,4a	76,9 \pm 2,4ab
captana	48,2 \pm 4,9cd	39,5 \pm 3,0d	61,3 \pm 6,1bc	77,5 \pm 6,7ab	77,1 \pm 6,0b	76,9 \pm 2,4ab

Médias na mesma coluna seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes (DMRT, P = 0,05)

Tabela 3.6 - Efeito dos pesticidas na infectividade dos capiloconídios de *Neozygites floridana* para *Tetranychus evansi* quando os ácaros mumificados foram imersos ou pulverizados com a concentração média recomendada (TC) ou a metade da concentração média recomendada (TC / 2) dos pesticidas. Dados representam a porcentagem de mortalidade (média \pm Erro padrão) de *T. evansi* sete dias após a inoculação

Pesticida	Cadáveres tratados por imersão			Cadáveres pulverizados		
	TC/2	TC	Controle	TC / 2	TC	Controle
metomil	56,0 \pm 4,0cdef	53,3 \pm 3,4cdef	61,3 \pm 6,1bcde	70,5 \pm 5,8abcd	82,8 \pm 5,1a	72,9 \pm 3,4abc
lambda-cialotrina	55,6 \pm 4,8cdef	53,0 \pm 4,6def	61,3 \pm 6,1bcde	73,7 \pm 7,1abc	77,7 \pm 6,1ab	72,9 \pm 3,4abc
captana	40,4 \pm 4,7f	46,7 \pm 6,7ef	52,0 \pm 5,6def	70,4 \pm 4,4abcd	77,8 \pm 6,2ab	79,0 \pm 4,7ab
abamectina	54,9 \pm 6,7cdef	51,3 \pm 5,7def	60,3 \pm 3,8bcde	76,0 \pm 3,4ab	75,3 \pm 6,7ab	78,0 \pm 5,4ab
propargito	63,3 \pm 4,9bcde	53,3 \pm 3,9def	60,3 \pm 3,8bcde	68,6 \pm 8,9abcd	75,1 \pm 7,2ab	78,0 \pm 5,4ab

Médias na mesma coluna seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes (DMRT, P = 0,05)

3.4.4 Efeito dos pesticidas na mortalidade de *T. evansi* inoculado com *N. floridana*

Nem metomil nem captana afetaram a mortalidade por *N. floridana* em *T. evansi* ($F = 0,18$; $gl = 2, 27$; $p = 0,838$). A porcentagem de mortalidade de ácaros que foram colocados sobre discos de folha contaminados com metomil, captana e água (controle) antes de transferir para os discos de folhas com cadáveres esporulados de *N. floridana* foi $73,2 \pm 4,1$; $76,5 \pm 5,0$ e $73,2 \pm 4,4$, respectivamente.

3.5 Discussão

Os efeitos prejudiciais, de pesticidas usados para controlar insetos, ácaros e doenças fúngicas na produção comercial de tomate, sobre a esporulação, germinação e infectividade de *N. floridana* variaram com o método de contaminação empregado, natureza química e concentração. Os fungicidas mancozebe e captana, que resultaram nos efeitos mais negativos na esporulação e germinação de *N. floridana*, devem reduzir a transmissão da doença e o desenvolvimento de epizootias. Boykin, Campbell e Beute (1984) demonstram que a aplicação de benomil e mancozebe (Dithane) reduz a incidência e eficiência de *N. floridana* em *Tetranychus urticae* Koch em campos de amendoim. Brandenburg e Kennedy (1983) também descreveram uma menor incidência de *N. floridana* em *T. urticae* depois da aplicação dos fungicidas benomil e clorotalonil e associado a este efeito estaria a inibição da germinação de conídios por estes fungicidas.

Acaricidas como propargito, que não inibem a esporulação, mas afetam a germinação do conídio primário, podem ter um efeito moderado sobre o fungo no campo comparado a esses pesticidas que inibem a esporulação, porque o período de vida de um conídio primário é muito mais curto do que o período de sobrevivência do fungo na forma de ácaros mumificados. Entretanto, qualquer pesticida que iniba a formação do capilioconídio, o único esporo infectivo de *N. floridana*, pode ter um impacto no controle de ácaros como um todo. O impacto de propargito sobre *N. floridana* pode ser determinado de forma conclusiva apenas com resultados de experimentos de campo.

Nenhum efeito sobre a infectividade do capilioconídio foi observado pela exposição aos pesticidas. Aparentemente, alguns pesticidas inibem a esporulação ou germinação do conídio

primário, mas os capiloconídios produzidos quando expostos aos pesticidas mantêm o potencial para infectar os seus hospedeiros. A viabilidade do conídio é muito importante porque o poder que o fungo possui para matar seus hospedeiros depende deste fator, pois somente o conídio viável tem capacidade para germinar e aderir aos hospedeiros saudáveis.

O resultado esperado era que, uma vez o ácaro tivesse se alimentado em folhas contaminadas com os pesticidas, eles poderiam ingerir e acumular os pesticidas, e desta forma o crescimento vegetativo do fungo poderia ser inibido e reduzindo a mortalidade de ácaros devido a infecção. Considerando que os ácaros do controle não foram expostos aos discos de folha contaminados com os pesticidas, esperava-se uma mortalidade mais alta devido ao fungo. Porém, a mortalidade em tratamentos com o inseticida metomil e o fungicida captana foram semelhantes à mortalidade no controle, sugerindo que os pesticidas não afetam o desenvolvimento do fungo.

O efeito dos pesticidas sobre *N. floridana* foi maior quando tratamentos por imersão do que quando pulverizados, isto está associado, provavelmente, a quantidade do produto a que o fungo foi exposto, apesar de ter sido usada a mesma concentração. As diferenças entre os tratamentos controle, no experimento de germinação, foram atribuídas a incubação de cada tratamento controle muito próximo ao seu respectivo tratamento com pesticida. É possível também que Tween 80, o surfactante usado nos dois controles, poderia ter sido a causa da germinação diferencial, pois mais produto poderia ter ficado retido a superfície da lamínula quando esta foram imersas que quando pulverizadas.

Embora o método da torre de Potter possa dar resultados comparáveis a aplicação de campo de pesticidas, o equipamento pode não estar prontamente disponível para muitos laboratórios, como resultado, sua utilização para testes de pesticidas pode ser limitado. Porém, o efeito da imersão direta de discos de folha ou cadáveres na suspensão de pesticida é mais intenso e pode não refletir uma situação natural de campo, mas representa um método rápido para avaliar ambos efeitos, diretos e indiretos, destes pesticidas sobre o fungo e podem ajudar a tomar decisões rápidas quanto aos pesticidas que podem ser aplicados durante o ataque da praga. Também, se um produto for considerado compatível com o patógeno neste método de laboratório (máxima exposição) pode-se assumir que também será seletivo no campo. A mesma linha de pensamento se aplica a diferenças observadas entre as maiores concentrações e metade das concentrações recomendadas para aplicação em campo. Uma concentração mais alta no

laboratório que não afeta os fungos tem maior chance de não ser tóxica no campo, do que uma baixa concentração que é tóxica em condições de laboratório.

Uma consideração importante sobre o uso de métodos de laboratório é a determinação da precisão deles em representar condições de campo. No entanto, é improvável que pesticidas que afetam o fungo em baixas concentrações, em testes *in vitro*, não produzam efeitos em concentrações indicadas para campo. Mesmo que a alta toxicidade de produtos químicos em experimentos de laboratório nem sempre correspondam a alta toxicidade em campo, os testes de laboratório são úteis e indicam a possibilidade de prever os efeitos que podem acontecer no campo (ALVES, MOINO, ALMEIDA, 1998). Aplicações de campo de pesticidas, normalmente, alcançam cobertura menos que perfeita, possivelmente, promovendo refúgio espacial para fungos entomopatogênicos. Além da presença de refúgios, a heterogeneidade de espaço, a fotodegradação e a lavagem pela chuva são eventos que poderiam reduzir a exposição do fungo a compostos tóxicos, e esta poderia ser a razão pela qual estudos *in vitro* e em campo nem sempre produzem resultados similares (JAROS-SU, GRODEN, ZHANG, 1999).

O efeito de pesticidas sobre *Neozygites* spp. foi estudado principalmente em campo (WELLS, McPHERSON, RUBERSON, HERZOG, 2000; BOYKIN, CAMPBELL, BEUTE, 1984). Normalmente, os estudos de campo são limitados a um número pequeno de produtos e demandam muito tempo para revelar qualquer diferença nos níveis de infecção ou na densidade de propágulos no solo. Por esta razão, há necessidade da geração de dados de laboratório, a cerca do efeito de pesticidas sobre aspectos específicos do fungo como, esporulação, germinação e viabilidade. No entanto, isto não foi possível por falta de um protocolo definido para testar este fungo sem o seu cultivo em meios artificiais. Os testes de laboratório descritos aqui simulam uma situação *in vivo* e permite a flexibilidade de dosar um pesticida sobre condições controladas. Estes testes também são uma alternativa para contornar o falta de culturas de *N. floridana* em meios artificiais. Os resultados obtidos usando estes métodos indicam que o inseticida metomil, e o acaricida abamectina produziram efeitos variados, sobre *N. floridana*, sendo que ambos inibiram a esporulação, na dosagem máxima (TC), quando os discos de folhas foram imersos, mas não quando estes foram pulverizados. Metomil também reduziu a infectividade quando discos foliares foram imersos e não quando pulverizados. Assim, estes pesticidas podem não afetar o potencial de inóculo de *N. floridana* em campo e podem ser compatíveis com estratégias de conservação para o controle de pragas. Lambda-cialotrina tem um efeito moderado na

germinação do conídio de *N. floridana* quando as lamínulas são imersas e este efeito é reduzido substancialmente quando elas são pulverizadas. O acaricida propargito afeta fortemente a germinação, da mesma forma que os fungicidas mancozebe e captana, ambos os quais afetam a esporulação e não devem ser compatíveis com *N. floridana*.

Referências

- ALVES, S.B, MOINO, Jr. A, ALMEIDA, J. E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos, 38. In: ALVES, S.B.(Org.). **Controle microbiano de insetos FEALQ**. Piracicaba. 1998. p. 217-236.
- BLAIR, B.W. Laboratory screening of acaricides against *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard. **Crop Protection**, Guildford, v. 8, p. 212-216, 1989.
- BOWER, K. N, BERKETT, L. P, COSTANTE, J. F. Non-target effect of a fungicide spray program on phytophagous and predacious mite populations in scab-resistant apple orchard. **Environmental Entomology**, College Park MD, v. 24, p. 423-430, 1995.
- BOYKIN, L. S, CAMPBELL, W.V, BEUTE, M. K. Effect of pesticides on *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) and arthropod predators attacking the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) in North Carolina peanut fields. **Journal of Economic Entomology**. Lanham MD, v. 77, p. 969-975, 1984.
- BRANDERBURG, R. L, KENNEDY, G. G. Interactive effects of selected pesticides on the twospotted spider mite and its fungal pathogen *Neozygites floridana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Paris, v. 34, p. 240-244, 1983.
- CARNER, G.R, CANERDAY, T. D. *Entomophthora* sp. as a factor in the regulation of the twospotted spider mite in cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham MD, v. 63, p. 638-640, 1970.
- DELALIBERA, Jr I; DEMÉTRIO, C. G. B, MANLY, B. F. J; HAJEK, A. E. Effect of relative humidity and origin of isolates of *Neozygites tanajoae* (Zygomycetes: Entomophthorales) on production of conidia from cassava green mite, *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) cadavers. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 489-496, 2006.
- HALL, I. M, DUNN, P. H. The effect of certain insecticides and fungicides on the fungi pathogenic to alfalfa aphid. **Journal of Economic Entomology**, Lanham MD, v. 52, p. 28-29, 1959.
- HUMBER, R.A; MORAES, G. J; DOS SANTOS, J.M. Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by a *Triplosporium* spp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in Northeastern Brazil. **Entomophaga**, Paris, v. 26, p. 421-425, 1981.

JAKUES, R.P.; PATTERSON, N.A. Control of the apple sucker, *Psylla mali* Scmidb, by the fungus *Entomophthora sphaerosprema* (Fresenius). **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 94, p. 818-825, 1962.

JAROS-SU, J, GRODEN, E, ZHANG, J. Effects of selected fungicides and the timing of fungicide application on *Beauveria bassiana*-induced mortality of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Biological Control**, Orlando, v. 15, p. 259-269, 1999.

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

MORJAN, W.E, PEDIGO, L.P, LEWIS, L.C. Fungicidal effects of Glyphosate and Glyphosate formulations on four species of entomopathogenic fungi. **Environmental Entomology**, College Park MD, v. 31, p. 1206-1212, 2002.

ODUOR, G. I; YANINEK, J. S, VAN DER GEEST, L. P. S, MORAES, G. J. Germination and viability of capilliconidia of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) under constant temperature, humidity, and light conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**. San Diego, v. 67, p. 267-278, 1996.

SAS Institute . **User's Manual**. Version 7.0. SAS Institute, Cary, NC. 1998

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

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

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 two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 47. p. 325-332, 1986.

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

YENDOL, W.G. Factors affecting germination of *Entomophthora* conidia. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.10, p. 116-121, 1968.

4 Influência das plantas hospedeiras no desempenho do fungo patogênico, *Neozygites floridana* contra ácaros tetraniquídeos

Resumo

Objetivou-se verificar o efeito de plantas hospedeiras em dois isolados do fungo *Neozygites floridana* Weiser e Muma patogênico ao ácaro vermelho do tomate, *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard e ao ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch. O desempenho do fungo foi avaliado como sendo uma função da porcentagem de mortalidade, mumificação e esporulação em *T. evansi* criado em tomate, tomate cereja, berinjela, maria-preta e pimenta, enquanto que *T. urticae* foi criado em morango, feijão-de-porco, algodão e Gérbera. A taxa de oviposição dos ácaros nas plantas foi determinada para avaliar a susceptibilidade da planta hospedeira. Ácaros foram criados nas respectivas plantas e depois infectados e acompanhados em tomate para determinar a antibiose na atividade do fungo. Houve uma associação direta entre a oviposição e os parâmetros do fungo medidos, com exceção para *T. evansi* em maria-preta e *T. urticae* em pimenta e algodão. Na Maria-preta, embora a oviposição (30 ovos/fêmea) e a infecção (81,3%) tenham sido altas, somente 24,7% dos ácaros infectados se tornaram mumificados. A oviposição de *T. evansi* em pimenta foi muito baixa (5 ovos/fêmea) e embora a infecção e mumificação tenham sido relativamente altas, a esporulação foi a mais baixa, sugerindo que a antibiose da planta pode ter afetado a reprodução e a atividade do fungo. A mortalidade e a mumificação variaram com a espécie da planta, mas a troca de plantas hospedeiras em *T. urticae* mostrou que a mumificação foi alta em tomate (63%), berinjela (61%), tomate cereja (52,3%) e baixa em maria-preta (45,5%) e pimenta (35%), confirmando a hipótese de que os baixos valores de mumificação e esporulação podem ser modulados pela química da planta. A mortalidade e a mumificação de *T. urticae* também variaram com a planta hospedeira. A mortalidade foi alta em morango (59,7%) e não diferiu estatisticamente de feijão-de-porco e Gérbera, mas a mais baixa foi em algodão (38,1%). Similarmente, a mumificação foi a mais alta em morango (75,5%) e a mais baixa em Gérbera (50,7%) embora morango e feijão-de-porco não diferiram como Gérbera e algodão. A esporulação do fungo a partir de múmias de *T. evansi* foi baixa em tomate cereja, maria-preta e pimenta enquanto que a esporulação a partir de múmias de *T. urticae* foi semelhante nas diferentes plantas, indicando que as plantas hospedeiras onde os cadáveres mumificam e esporulam podem regular o desenvolvimento das epizootias. Com relação às diferenças na porcentagem de mortalidade, o tempo decorrido entre a infecção e a morte de *T. evansi* e *T. urticae* criados em diferentes plantas hospedeiras não variou. Este estudo mostra que a eficiência de *N. floridana* no controle de ácaros tetraniquídeos pode variar com a planta hospedeira e enfatiza a necessidade de selecionar plantas/culturas hospedeiras adequadas para a produção deste fungo em laboratório e em campo para a liberação.

Palavras-chave: *Tetranychus evansi*; *T. urticae*; Planta hospedeira; Interações tritróficas

Abstract

The effect of host plants on two isolates of the entomopathogenic fungus *Neozygites floridana* Weiser and Muma pathogenic to the tomato red spider mite, *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard and the two spotted spider mites *Tetranychus urticae* Koch was investigated. Fungal performance was evaluated as a function of mite percent mortality, mummification and sporulation for *T. evansi* reared on tomato, cherry tomato, eggplant, nightshade, and pepper while *T. urticae* was reared on strawberry, jack bean, cotton and the ornamental *Gerbera*. Oviposition rate of the mites on each plant was determined to infer host plant suitability while host-switching determined antibiosis effect on fungal activity. There was a direct association of oviposition and the measured fungal parameters, except for nightshade and pepper for *T. evansi* and cotton for *T. urticae*. On nightshade, although oviposition (30 eggs / female) and infection (81.3%) were high, only 24.7% of the infected mites became mummified. Oviposition of *T. evansi* on pepper was very low (5 eggs / female) and although infection/mummification was relatively high, sporulation was the lowest suggesting that plant antibiosis may affect both mite reproduction and fungal activity. Mortality and mummification varied with plant species but host-switching in *T. evansi* showed that mummification and sporulation was high in tomato (63%), eggplant (61%), cherry tomato (52.3) and low in nightshade (45.5%) and pepper (35%) supporting the hypothesis that poor mummification and sporulation may be modulated by plant chemistry. Mortality and mummification of *T. urticae* also varied with host plant. Mortality was high in strawberry (59.7%) and not statistically different from jack bean and *Gerbera* but lowest in cotton (38.1%). Similarly, mummification was highest on strawberry (75.5%) and lowest on *Gerbera* (50.7%) although strawberry and jack bean were not different just like *Gerbera* and cotton. Fungal sporulation from cadavers of *T. evansi* were low on cherry tomato, nightshade and pepper while those of *T. urticae* sporulated equally indicating that host plants where cadavers mummify and sporulates most may regulate epizootic development and vice versa. Time to death for infected *T. evansi* and *T. urticae* reared on different host plants did not vary despite differences in percent mortality. This study shows that efficiency of *N. floridana* in the control of spider mites may vary with the host plant and emphasize the need to select suitable host plants/crops for production of this fungus both for laboratory use and field release.

Keywords: *Tetranychus evansi*; *T. urticae*; Host plants; Tritrophic interactions

4.1 Introdução

Os ácaros tetraniquídeos são as principais pragas de culturas comerciais e geralmente, requerem medidas de controle caras. O ácaro-rajado, *Tetranychus urticae* Koch, é uma praga de diversas culturas com distribuição mundial, e o ácaro-vermelho-do-tomateiro, *T. evansi* Baker and Pritchard é uma praga oligófago que ataca algumas espécies de plantas pertencentes à família Solanaceae (HUFFAKER, VAN DE VRIE, McMURTRY, 1969; MORAES, McMURTRY, BAKER, 1987; KNAPP, WAGENER, NAVAJAS, 2003; JEPSON, KEIFER, BAKER, 1975). Devido às dificuldades associadas ao controle destes ácaros e às grandes perdas econômicas resultantes dos danos dos mesmos, há muito interesse em pesquisar medidas alternativas de controle, especialmente formas de controle biológico.

Muito esforço tem sido direcionado para a procura de inimigos naturais de *T. evansi* pelo fato de que esta praga foi acidentalmente introduzida na África e na Europa e dispersou-se para vários países destes continentes. Além disso, a maioria dos predadores da família Phytoseiidae usados no controle de ácaros tetraniquídeos, como *T. urticae*, não são muito efetivos (MORAES, McMURTRY, 1985, 1986; FIABOE et al., 2006; FURTADO et al., 2006; FURTADO et al., 2007) contra *T. evansi*.

O interesse no uso de fungos para o controle de ácaros tetraniquídeos tem aumentado recentemente (CHANDLER et al., 2000; VAN DER GEEST et al., 2000, WEKESA et al., 2005). Entretanto, estes ácaros se desenvolvem diferentemente nas diversas espécies de plantas hospedeiras no que se refere a sobrevivência e a fecundidade (AGRAWAL, 2000) e isso tem levado a realização de estudos de interações multi-tróficas envolvendo plantas hospedeiras, tetraniquídeos e fungos patogênicos na tentativa de esclarecer alguns fatores bióticos que podem influenciar a eficiência de fungos patogênicos contra estas pragas.

Geralmente, a maioria dos artrópodes herbívoros são capazes de se alimentarem em poucas famílias de plantas e acredita-se que esta limitação ao hospedeiro é devido em parte a adaptação do herbívoro aos compostos de defesa da planta. Um custo adaptativo está geralmente associado à habilidade diferencial em detoxificar aleloquímicos tóxicos e o benefício resultante destes compostos químicos (GOULD, 1979). Por causa destes fatores, as plantas hospedeiras podem afetar a relação entre os ácaros tetraniquídeos e seus inimigos naturais usados no controle biológico, incluindo fungos patógenos.

As epizootias dos fungos Entomophthorales influenciam severamente a dinâmica populacional de ácaros tetraniquídeos que atacam diferentes culturas, incluindo milho (SMITLEY, KENNEDY, BROOKS, 1986), amendoim (BOYKIN, CAMPBELL, BEUTE, 1984), soja (KLUBERTANZ, PEDIGO, CARLSON, 1991), feijão (BRANDENBURG, KENNEDY, 1983), algodão (CARNER, CARNERDAY, 1968) e tomate (HUMBER, MORAES, DOS SANTOS, 1981). O desenvolvimento destas epizootias sob diferentes condições bióticas e agrícolas é pouco entendido, mas condições ambientais tais como a umidade relativa, temperatura, precipitação e radiação solar são consideradas determinantes de epizootia do fungo devido a ocorrência do mesmo em certas condições (KLUBERTANZ, PEDIGO, CARLSON, 1991; HAJEK, 1997). Embora vários fatores influenciem a susceptibilidade dos ácaros tetraniquídeos ao fungo patogênico, o papel das plantas hospedeiras e seus impactos no desenvolvimento de epizootias são amplamente desconhecidos.

Hare (1992) sugeriu que estratégias de controle que procurem diminuir a susceptibilidade de culturas ao crescimento e desenvolvimento de artrópodes herbívoros deveriam assegurar a compatibilidade com entomopatógenos, assim as duas estratégias de controle de pragas deveriam ser aditivas ou sinérgicas. As diferenças bioquímicas entre as plantas hospedeiras podem determinar a susceptibilidade destas aos artrópodes herbívoros e em geral, com o aumento da susceptibilidade aos entomopatógenos ocorre uma diminuição da adequação da planta hospedeira (FELTON, DAHLMAN, 1984; RICHTER, FUXA, ABDEL-FATTAH, 1987; HARE, 1992).

Os fungos entomopatogênicos usualmente infectam seus hospedeiros pela penetração através da cutícula e a interação entre as plantas hospedeiras e os fungos patogênicos pode ocorrer após a infecção quando o fungo cresce dentro dos tecidos dos seus hospedeiros. Vários estudos têm estabelecido que as plantas hospedeiras podem alterar a susceptibilidade de artrópodes pragas aos patógenos microbianos e como resultado tem-se uma variação na eficácia dos patógenos usados para o controle (HARE, ANDREADIS, 1983; RAMOSKA, TODD, 1985; BENZ, 1987; COSTA, GAUGLER, 1989a). No entanto, outros estudos têm mostrado que não há efeitos das plantas hospedeiras na susceptibilidade do inseto pelo fungo patogênico (COSTA, GAUGLER, 1989a; VIDAL et al., 1998). Estes estudos foram conduzidos com os fungos patogênicos mais comuns usados para o controle biológico, Hypocreales anamórfico, por exemplo, *Beauveria bassiana*. Os efeitos das plantas hospedeiras na performance do patógeno de tetraniquídeo, *N. floridana*, nunca foi estudado. Devido à produção de diferentes tipos de esporos

na superfície da folha, é esperado que além dos fitoquímicos, a arquitetura da planta como a morfologia da folha, densidade e formas dos tricomas e presença de ceras podem influenciar a contaminação do fungo.

Neozygites floridana é extremamente específico aos hospedeiros. Por exemplo, os isolado de *T. urticae* e *T. evansi* usados neste estudo são específicos aos hospedeiros das quais foram originalmente isolados, causando baixa mortalidade em outras espécies de tetraniquídeos. Considerando que *T. evansi* quase que exclusivamente se alimenta de plantas solanáceas, objetivou-se verificar se a atividade fúngica varia em função da planta hospedeira. Isolado de *T. urticae* foi utilizado em testes porque o hospedeiro da qual o mesmo foi retirado é polífago e a propensão de se alimentar de vários hospedeiros foi comparado com *T. evansi*. A hipótese científica estabelecida era de que os efeitos das plantas hospedeiras sobre o isolado de *T. evansi* seriam maiores do que os efeitos no isolado de *T. urticae* porque *T. evansi* é oligófago. *T. urticae* é generalista, então, espera-se que este ácaro pode tolerar a maioria dos compostos de defesa de plantas e desta forma, o seu patógeno também teria co-evoluído com estes compostos. Entretanto, espera-se que a arquitetura da planta tenha efeitos similares em ambos isolados.

O objetivo deste estudo foi determinar se as espécies de plantas hospedeiras utilizada pelas duas espécies de tetraniquídeos influenciam a contaminação, infecção, mortalidade e mumificação. A oviposição foi utilizada para inferir sobre a adequação das plantas a *T. urticae* e *T. evansi* e este parâmetro foi correlacionado a susceptibilidade e a mumificação pelos fungos. Também é discutido o efeito da planta hospedeira na esporulação de múmias e contaminação de *T. evansi* e a influência destes parâmetros no desenvolvimento e frequência de epizootias quando as condições são favoráveis.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Ácaros

Os ácaros das espécies, *Tetranychus urticae* Koch e *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard foram utilizados neste estudo. *T. urticae* foi coletado em algodão na fazenda da Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil em fevereiro de 2007 e a colônia foi mantida em plantas de feijão de porco, *Canavalia ensiformis* (L) (DeCandolle). *T. evansi* foi coletado neste mesmo período em

maria-preta, *Solanum americanum* Mill em casa-de-vegetação nesta mesma fazenda e a colônia foi mantida em plantas de tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill.

4.2.2 Cultura do fungo

Dois isolados de *N. floridana* foram utilizados neste trabalho. Os isolados denominados LQ1 e LQ2 foram coletados em cadáveres dos ácaros *T. urticae* e *T. evansi* em feijão-de-porco e tomate, respectivamente. Ambos isolados foram armazenados a -10°C na forma de cadáveres em recipientes contendo uma camada de sílica gel, sobre esta uma camada de algodão e por último foi adicionado os cadáveres do ácaro. Posteriormente os cadáveres dos dois isolados foram descongelados e utilizados na produção de novos cadáveres. Os cadáveres usados no experimento foram produzidos pela exposição de fêmea sadias de *T. urticae* e *T. evansi* a cadáveres esporulados da cultura estoque de LQ1 e LQ2, respectivamente. A esporulação foi obtida mantendo-se cadáveres a 25°C em escotofase total em discos de folhas (1,2 cm diâmetro) colocadas sobre uma esponja saturada com água destilada em uma placa de Petri fechada (9 cm diâmetro) a 100% UR por 24 h. Depois, os ácaros foram adicionados a estes discos e mantidos a 25°C e 50% UR sobre luz natural (12D:12N) e os cadáveres foram coletados de 3 a 7 dias depois, seguindo o método descrito por Delalibera e Hajek (2004). Os cadáveres coletados foram armazenados como anteriormente descrito e em todos os experimentos, cadáveres foram estocados não mais do que quatro semanas antes de serem utilizados. Devido às dificuldades associadas ao cultivo *in vitro* de *N. floridana*, não foi possível a realização de experimentos de forma direta, sobre o efeito de alcalóides sobre a germinação e multiplicação dos corpos hifais de fungo e por esta razão, foram utilizados para o experimento o cultivo *in vivo*.

4.3 Bioensaios e métodos experimentais

4.3.1 Criação dos ácaros

O ácaro-rajado, *T. urticae* originalmente mantido em plantas de feijão-de-porco foi transferido para as quatro plantas testadas morango (*Fragaria* sp), feijão-de-porco, algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e a planta ornamental, *Gérbera jamesonii* L. O ácaro vermelho do tomateiro, *T. evansi* foi originalmente mantido em plantas de tomate e depois transferidos para cinco espécies

de solanáceas incluindo tomate var. Santa Cruz, tomate cereja (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*), beringela var. 'Natu Nobilis' (*Solanum melongena* L.), maria-preta e pimenta (*Capsicum* sp). Todas as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação em potes plásticos com a utilização de fertilizantes e irrigação. Ácaros foram mantidos nas plantas teste por mais de duas semanas antes de serem usados no experimento.

4.3.2 Efeito das plantas hospedeiras na mortalidade e mumificação por isolados do fungo

Para obter *T. urticae* e *T. evansi* infectados com *N. floridana* criados em diferentes plantas hospedeiras, cadáveres obtidos de cultura estoque foram colocados individualmente em discos de folhas (1,2 cm de diâmetro) recortadas de cada planta teste utilizada. Discos de folhas com cadáveres foram colocados sobre esponja embebida em água destilada em placas de Petri (9 cm de diâmetro). Estes foram colocados em escotofase por 24 horas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ para esporular. A esporulação foi confirmada utilizando microscópio ótico antes de introduzir 20 fêmeas de *T. evansi* ou *T. urticae* por disco de cada planta, respectivamente. Os ácaros foram mantidos nestes discos por 24 horas para maximizar a contaminação pelos conídios do fungo e eles foram transferidos para novos e maiores discos de folhas (2,5 cm de diâmetro) colocados em placas de Petri (3 × 1,5 cm, diâmetro × altura) e coberto com plástico parafilm. Discos de folhas foram trocados após o quarto dia e a estimativa da mortalidade e mumificação foi avaliada diariamente por oito dias. Dez discos de folhas foram usados de cada planta hospedeira em cada experimento envolvendo *T. evansi* ao mesmo tempo em que cinco discos de folhas foram usados para cada planta hospedeira de *T. urticae* e os experimentos foram repetidos três e quatro vezes, respectivamente.

4.3.3 Efeito da mudança das plantas hospedeiras na infecção de *T. evansi*

Para fazer inferências sobre o acúmulo de compostos químicos da planta afetando a atividade do fungo *in vivo* um teste indireto (host-switching) foi realizado para determinar a influencia da variação de alcalóides (ex. solanina e tomatina) de plantas hospedeiras Solanaceas. *T. evansi* foi criado em cinco diferentes plantas hospedeiras, mas os testes foram realizados em tomate designado como a melhor planta hospedeira por apresentar alta mumificação em experimentos anteriores. Diferenças na atividade do fungo (infecção, mortalidade e mumificação) puderam ser

atribuídas à planta hospedeira de onde os ácaros foram originalmente criados. Isso não foi possível para os ácaros criados em pimenta, pois os ácaros não se multiplicaram nesta planta, mas os ácaros foram mantidos nestas plantas por duas semanas antes de serem usados no experimento. Este experimento não foi realizado para plantas hospedeiras de *T. urticae*.

4.3.4 Efeito da qualidade nutricional da planta hospedeira na reprodução dos ácaros

A qualidade nutricional das plantas hospedeiras foi determinada pela oviposição de *T. evansi* e *T. urticae* criados nestas plantas. A idade das fêmeas do experimento para as duas espécies foi padronizada pela seleção de fêmeas de idades desconhecidas de uma colônia estoque e foi permitido a estas ovipositarem em tomate ou feijão de porco por 12 horas antes de remover as fêmeas adultas, semelhante ao método descrito por Wekesa et al (2007). As larvas eclodiram e foram mantidas em tomate ou feijão-de-porco para padronizar a razão de crescimento porque os ensaios preliminares indicaram que a razão de crescimento difere com a planta hospedeira. Quando os ácaros alcançaram o estágio de deutoninfa, eles foram sexados e as fêmeas foram transferidas individualmente para arenas contendo discos de folhas de tomate, tomate cereja, maria-preta, pimenta, berinjela no caso de *T. evansi*. Fêmeas de *T. urticae* foram criadas em feijão de porco, morango, algodão e *Gérbera* e a oviposição foi avaliada diariamente por 18 dias. Oito fêmeas foram usadas para cada planta hospedeira e o experimento foi repetido três vezes.

4.3.5 Efeito da planta hospedeira na esporulação de cadáveres

Cadáveres mumificados de *T. evansi* e *T. urticae* coletados em cada planta hospedeira foi colocado sob condições apropriadas para estimular a esporulação e o número de conídios produzidos foi contado para se determinar o efeito da planta hospedeira na esporulação. Os cadáveres foram individualizados em discos de folhas de tomate limpos (1,2 cm de diâmetro) colocados sobre esponja inserida em placa de Petri (9 cm diâmetro). As placas foram fechadas para manter a umidade aproximadamente 100% e incubado a 25°C em escotofase total por 24 horas. O número de conídios liberados pelo cadáver foi estimado diretamente sob microscópio ótico utilizando categorias de escala (0 = indica que não houve esporulação, 1 = 1-100, 2 = 101-500 e 3 = > 501 conídios).

4.3.6 Análise estatística

Para avaliar a atividade do fungo sobre ácaros criados em diferentes plantas hospedeiras, várias variáveis dependentes foram mensuradas. A porcentagem de contaminação foi determinada a partir do número total de ácaros com conídios aderidos ao corpo, causando infecção, mortalidade e mumificação. A porcentagem de infecção foi calculada baseando-se em ambos, ácaros vivos e mortos que apresentavam corpos hifais dentro do corpo. A porcentagem de mortalidade confirmada foi somente considerada quando o fungo foi verificado como o causador da morte do ácaro. A porcentagem de mortalidade foi corrigida usando a fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925). Um ácaro mumificado é caracterizado pelo sintoma típico de quando o ácaro morre pelo fungo ficando inchado e de coloração marrom. A mumificação foi calculada pela proporção do número de múmias de ácaros formadas em relação ao número total de ácaros usados no experimento. As diferenças na contaminação, infecção, mortalidade e mumificação de ácaros criados em diferentes plantas hospedeiras foram analisadas por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas usando o teste Duncan Multiple Range Test (DMRT) depois da transformação com arcoseno. Esta análise foi feita tanto para os experimentos em que ácaros foram criados e testados em suas respectivas plantas hospedeiras ou nos experimentos onde os ácaros foram criados em diferentes plantas hospedeiras e testado em tomate. A taxa de oviposição de ambos *T. evansi* e *T. urticae* criados em suas respectivas plantas hospedeiras foi também comparada com ANOVA para determinar a suscetibilidade da planta hospedeira. A esporulação de cadáveres foi comparada com ANOVA em relação a influência da planta hospedeira sobre ácaros infectados e as médias foram separadas usando DRMT. O tempo para morte de *T. urticae* e *T. evansi* infectados criados em diferentes plantas hospedeiras foi testada para cada espécie individualmente usando análise de variância unifatorial seguido por teste Bonferroni (Dunn).

4.4 Resultados

4.4.1 Efeitos das plantas hospedeiras sobre *N. floridana*

Efeitos significativos das plantas hospedeiras de *T. evansi* (Solanaceae) foram observados quanto a porcentagem de contaminação, infecção, mortalidade e mumificação (Tabela 4.1). A contaminação variou significativamente com a planta hospedeira ($F = 30,37$; $gl = 4, 145$, $p = 0,0001$) e foi superior em pimenta, maria-preta e tomate ($> 89\%$) e menor em tomate cereja

(70,2%). Também foram observadas diferenças para a infecção ($F = 26,51$; $gl = 4, 145$, $p = 0,0001$), mortalidade ($F = 25,85$; $gl = 4, 145$, $p = 0,0001$) e mumificação ($F = 40,98$; $gl = 4, 145$, $P = 0,0001$) entre as plantas hospedeiras. A mumificação de *T. evansi* criados em tomate foram três vezes maiores do que quando criados sobre maria-preta. Os parâmetros do isolado (LQ1 também foram significativamente afetados pelas plantas hospedeiras de *T. urticae* (Tabela 4.2). A contaminação diferiu entre as plantas hospedeiras e variou de 76,9% para algodão a 93,1% no caso do morango ($F = 5,29$, $gl = 3, 63$; $p = 0,0026$). A contaminação não foi diferente em ácaros criados em morango, feijão-de-porco e *Gérbera*. A infecção também variou com a planta hospedeira e foi alta em morango (90,8%) e menor em algodão (66,2%), sendo somente algodão diferiu estatisticamente das outras plantas hospedeiras, ($F = 6,76$, $gl = 3, 63$; $p = 0,0005$). A mortalidade causada pelo fungo foi menor em algodão (38,1%) e maior em morango (59,7%), feijão-de-porco e *Gérbera* ($F = 2,91$, $gl = 3, 63$; $p = 0,0413$). A mumificação também foi menor em *Gérbera* (50,7%) e mais elevada em feijão-de-porco (76,1%) e morango ($F = 6,49$, $gl = 3, 63$; $p = 0,0007$).

Tabela 4.1 - Efeitos de plantas hospedeiras na atividade do fungo *N. floridana* sobre *T. evansi* em maria-preta, berinjela, pimenta, tomate e tomate cereja. Os dados correspondem as médias (\pm Erro padrão) de 30 repetições

Planta hospedeira	Contaminação	Infecção	Mortalidade corrigida	Mumificação
Maria-preta	92,2 \pm 0,9a	81,3 \pm 1,4a	80,3 \pm 1,4a	20,1 \pm 2,1e
Beringela	76,8 \pm 2,0b	66,7 \pm 2,5b	64,8 \pm 2,7b	45,5 \pm 2,7c
Pimenta	95,1 \pm 1,1a	84,5 \pm 1,7a	83,2 \pm 1,9a	52,8 \pm 2,5b
Tomate	89,8 \pm 1,2a	78,5 \pm 1,5a	77,4 \pm 1,5a	61,7 \pm 2,4a
Tomate cereja	70,2 \pm 3,4c	57,2 \pm 3,4c	54,6 \pm 3,6c	33,2 \pm 2,9d

Médias seguidas por letras diferentes dentro de uma mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Duncan multiple range.

Tabela 4.2 - Efeitos de plantas hospedeiras na atividade do fungo *N. floridana* sobre *T. urticae* em morango, feijão-de-porco, *Gérbera* e algodão. Os dados correspondem as médias (\pm Erro padrão) de 20 repetições

Planta hospedeira	Contaminação	Infecção	Mortalidade corrigida	Mumificação
Morango	93,1 \pm 2,1a	90,8 \pm 2,2a	59,7 \pm 4,8a	75,5 \pm 4,5a
Feijão-de-porco	92,4 \pm 2,4a	83,8 \pm 4,4ab	55,6 \pm 3,7a	76,1 \pm 5,2a
<i>Gérbera</i>	83,4 \pm 3,5ab	76,4 \pm 4,3bc	53,8 \pm 5,9a	50,7 \pm 6,8b
Algodão	76,9 \pm 5,2b	66,2 \pm 4,7c	38,1 \pm 6,7b	52,5 \pm 5,0b

Médias seguidas por letras diferentes dentro de uma mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Duncan multiple range.

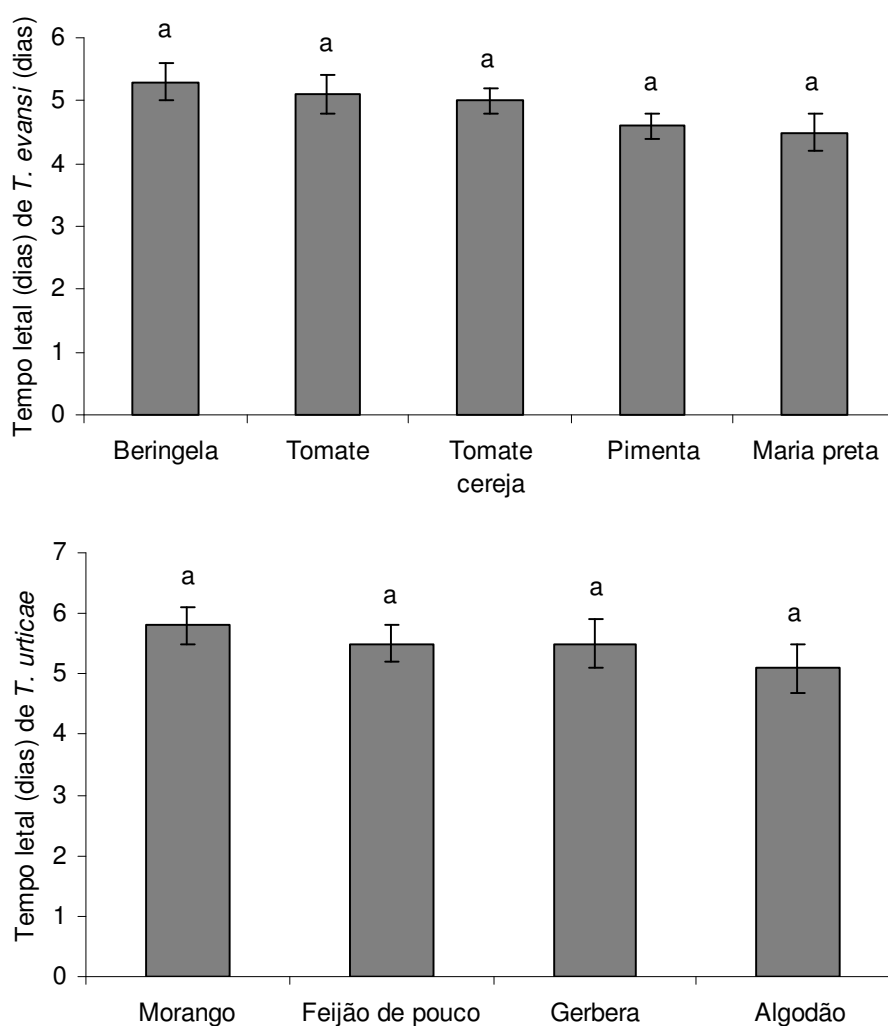


Figura 4.1 - Tempo letal (dias) de *T. evansi* e *T. urticae* criados em diferentes plantas hospedeiras e infectados com conídios de *Neozygites floridana*

4.4.2 Efeito da mudança da planta hospedeira sobre a infecção de *T. evansi*

Quando *T. evansi* foram criados em diferentes plantas hospedeiras e, em seguida, transferidos para discos foliares de tomate contendo conídios de *N. floridana*, as contaminações não foram significativamente diferentes ($F = 1,11$; $gl = 4, 95$; $p = 0,3571$) como o esperado (Tabela 4.3). No entanto, a mortalidade, infecção e mumificação foram afetadas pela adaptação dos ácaros às plantas hospedeiras antes da contaminação. As taxas de infecção foram menores em ácaros inicialmente mantidos em tomate cereja do que sobre maria-preta (Tabela 4.3). Da mesma forma, a mortalidade de *T. evansi* somente foi significativamente diferente entre tomate cereja $67,4 \pm 4,1$

e maria-preta ($78,5 \pm 2,2$) ($F = 5,72$, $gl = 1, 38$; $p = 0,0218$) apresentando valores intermediários e não significativos entre as outras plantas hospedeiras ($F = 1,38$; $gl = 4, 95$; $p = 0,2470$). A mumificação diferiu entre as plantas hospedeiras ($F = 7,82$, $gl = 4, 95$; $P = 0,0001$) e foi significativamente mais elevada do que quando os ácaros foram criados e testados nas mesmas plantas. A mumificação foi mais baixa em pimenta (35,0%), diferente de quando os ácaros foram criados e testados em suas respectivas plantas hospedeiras, e mais alta em tomate ($63,3 \pm 4,4$ %) e Berinjela ($61,8 \pm 4,0$ %)

Tabela 4.3 - Efeito de plantas hospedeiras sobre a atividade de *N. floridana* sobre *T. evansi* quando os ácaros foram criados em diferentes plantas hospedeiras e então transferidos para o tomate. Dados correspondem a médias (\pm Erro padrão) de 30 repetições

Planta hospedeira	Contaminação	Infecção	Mortalidade corrigida	Mumificação
Maria-preta	$81,0 \pm 2,3a$	$79,5 \pm 2,1a$	$78,5 \pm 2,2a$	$45,5 \pm 3,8bc$
Beringela	$80,5 \pm 2,6a$	$75,5 \pm 3,3ab$	$73,6 \pm 3,8ab$	$61,8 \pm 4,0 a$
Pimenta	$77,3 \pm 2,6a$	$76,3 \pm 2,7ab$	$74,6 \pm 3,0ab$	$35,0 \pm 3,5 c$
Tomate	$74,3 \pm 3,6a$	$74,0 \pm 3,5ab$	$72,8 \pm 3,6ab$	$63,3 \pm 4,4a$
Tomate cereja	$74,3 \pm 4,1a$	$69,0 \pm 3,9b$	$67,4 \pm 4,1b$	$52,3 \pm 5,2ab$

Médias seguidas por letras diferentes dentro de uma mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o Teste de Duncan multiple range.

4.4.3 Efeito da qualidade nutricional da planta hospedeira sobre a reprodução dos ácaros

A oviposição de *T. evansi* criados sobre pimenta foi muito baixa, sendo maior quando criados em berinjela, tomate e maria-preta ($F = 13,20$; $gl = 4, 81$; $p = 0,0001$) (Figura 4.2). O número médio de ovos por fêmea durante todo o período de avaliação variou de 2,9 ovos (pimenta) a 36,8 ovos (berinjela). A oviposição de fêmeas de *T. urticae* criadas em feijão-de-porco, morango, algodão e *Gérbera* também foram significativamente diferentes ($F = 52,74$; $gl = 3, 73$; $p = 0,0001$). A oviposição foi menor em *Gérbera* e algodão e mais alta em feijão-de-porco (Figura 4.3). O número médio de ovos por fêmea de *T. urticae* variou de 14,8 (*Gérbera*) a 66,4 (feijão-de-porco).

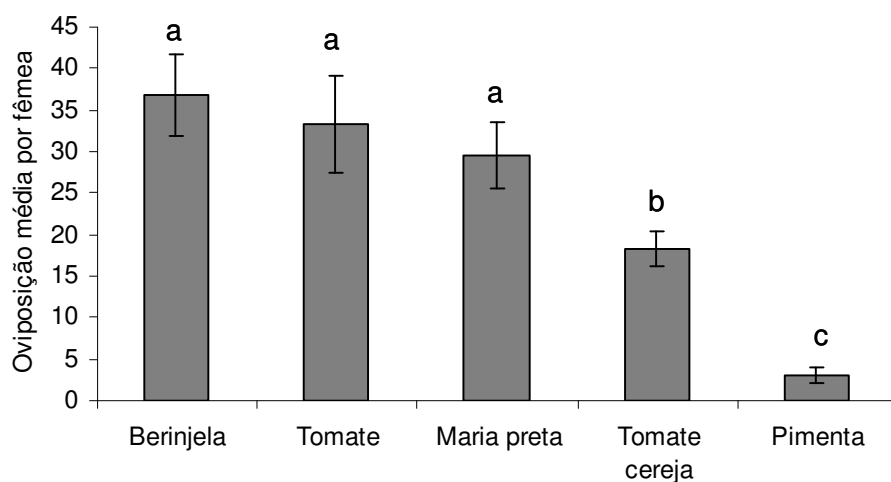


Figura 4.2 - Oviposição de *T. evansi* criados em 5 plantas hospedeiras diferentes durante 18 dias

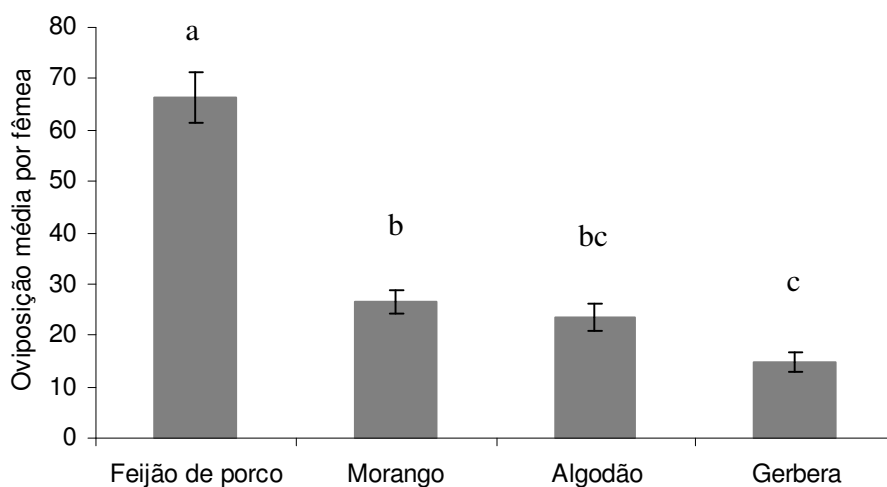


Figura 4.3 - Oviposição de *T. urticae* criados em 4 plantas hospedeiras diferentes durante 18 dias

4.4.4 Efeito das plantas hospedeiras na esporulação de cadáveres

O número de conídios produzidos por cadáveres de *T. evansi* variou significativamente com as em função da espécie de planta hospedeira sobre a qual eles foram formados ($F = 17,42$; $gl = 4$, 70 ; $p = 0,001$). Cadáveres formados em berinjela (2,6) e tomate (2,5) geraram numericamente mais esporos do que aqueles formados em tomate cereja (2), maria-preta (1,7) e pimenta (0,9),

mas a esporulação não variou entre tomate e berinjela, nem entre tomate cereja e maria-preta, mas todos diferiram da esporulação em pimenta (Figura 4.4). No entanto, a esporulação do fungo a partir de cadáveres de *T. urticae* não diferiu significativamente em função da planta hospedeira na qual esse foi gerado ($F = 0,04$, $gl = 3$, 60 ; $p = 0,9895$) (Figura 4.4).

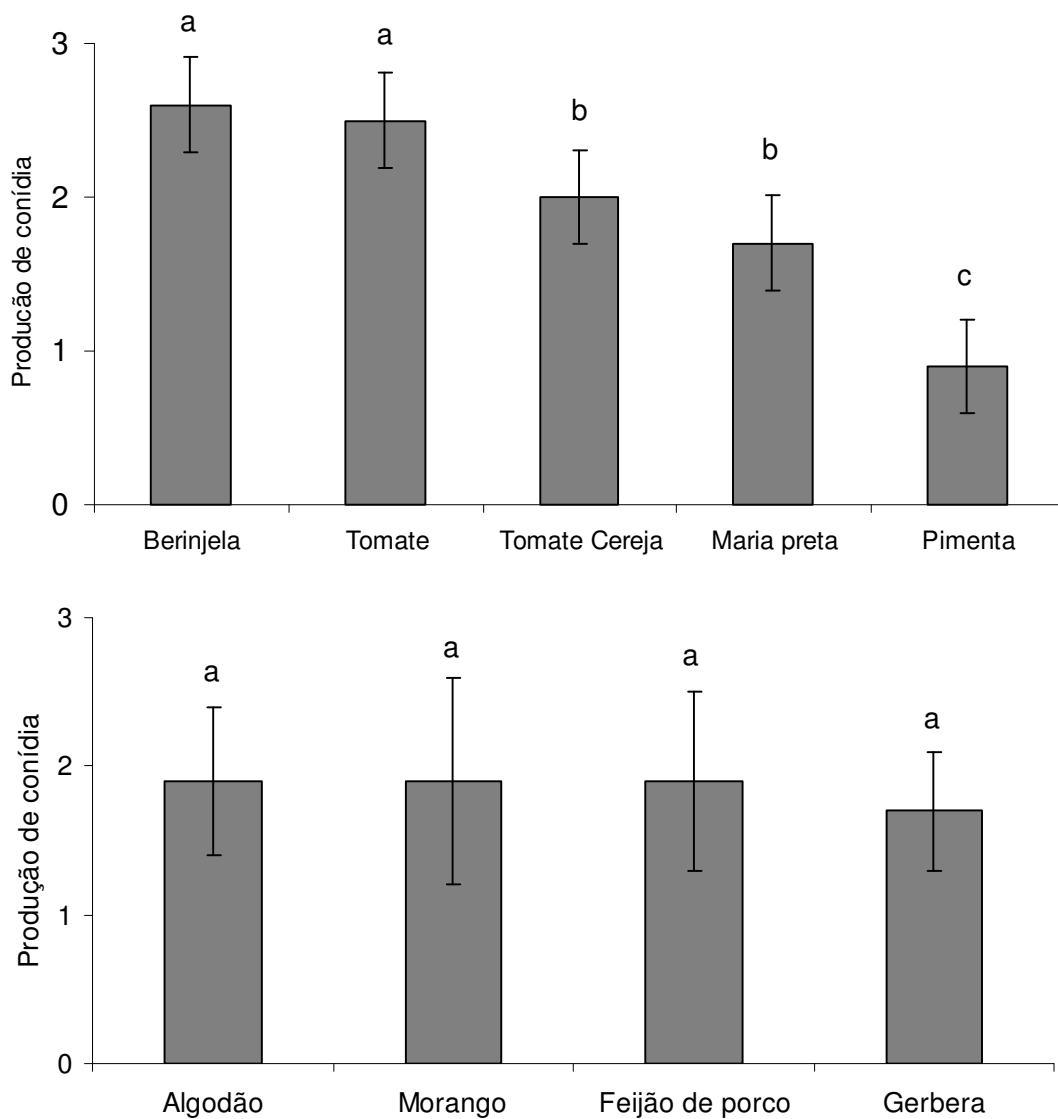


Figura 4.4 - Estimativa da produção de conídios de cadáveres de *T. evansi* e *T. urticae* criados em diferentes plantas hospedeiras e infectados com *N. floridana*. A esporulação foi estimada de acordo com uma escala de notas por categorias sendo 0 = sem esporulação, 1 = 1-100, 2 = 101-500 e 3 = > 501 conídios

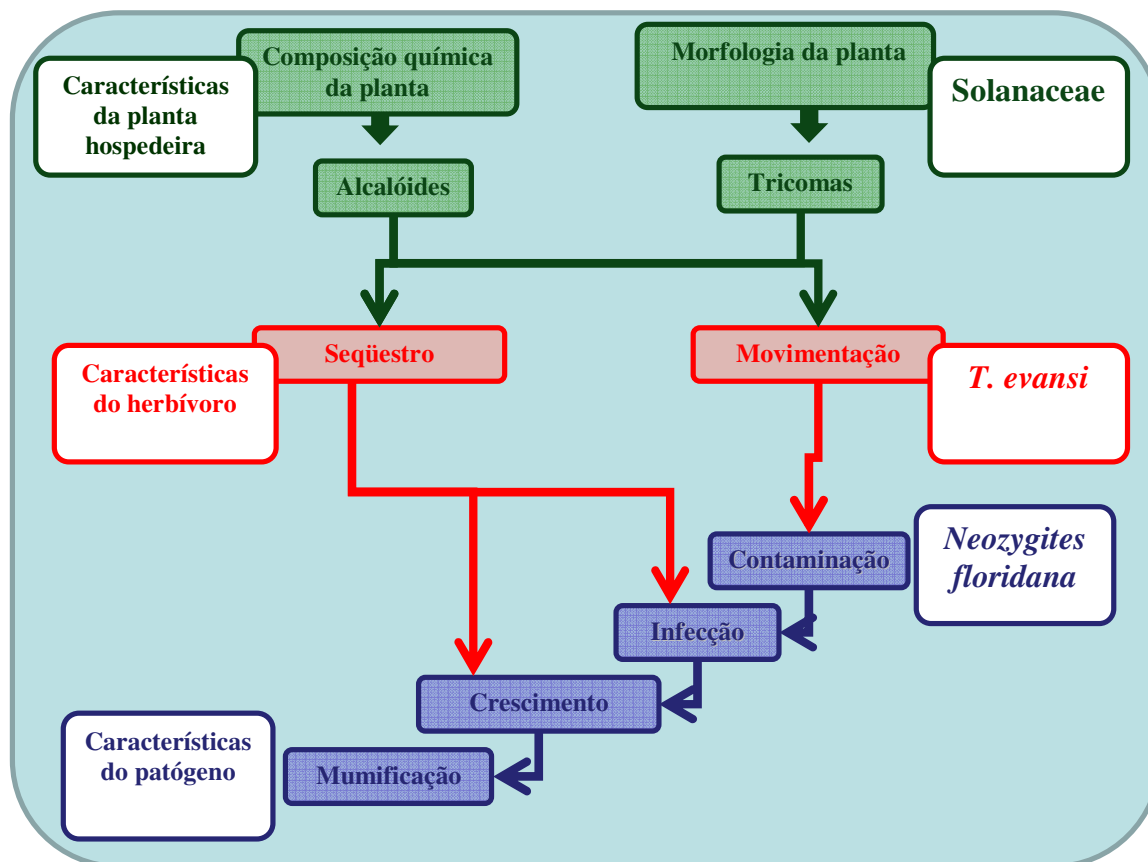


Figura 4.5 - Representação teórica de interações diretas e indiretas entre plantas hospedeiras de *T. evansi* e seu patógeno, *N. floridana*. As setas indicam características químicas ou morfológicas, atividades e processos envolvidos nas interações. O ácaro tem seu desempenho afetado pela qualidade química ou pela morfologia vegetal, podendo aumentar ou diminuir sua susceptibilidade ao fungo. Existem os efeitos das plantas hospedeiras sobre o fungo (infectividade, viabilidade), quer sejam morfológicos (tricomas) ou químicos (alcalóides), mas esses efeitos sobre o fungo só podem ser reconhecidos através dos efeitos indiretos nos ácaros (redução na população devido a uma infecção, mortalidade). Os tricomas podem interferir na movimentação dos ácaros, afetando assim a contaminação pelos fungos. Os aleloquímicos ou alcalóides adquiridos das plantas pelo ácaro podem oferecer proteção através de efeitos sobre a infecção e crescimento vegetativo do fungo. Resultados ruins do crescimento vegetativo resultam em baixa mumificação e esporulação, que por sua vez afetam o desenvolvimento da epizootia. Os três níveis tróficos, portanto, interagem de uma forma complexa onde o resultado de cada nível depende do seu custo

4.5 Discussões

Os resultados demonstraram que as plantas hospedeiras afetaram os níveis de contaminação, infecção e esporulação do fungo patogênico, *N. floridana* e a mortalidade, mumificação, e tempo letal de *T. evansi*. As diferenças entre as plantas hospedeiras testadas podem ser atribuídas às características morfológicas ou químicas. Embora as diferenças morfológicas possam ter pouco impacto sobre a fisiologia dos fungos patogênicos, compostos

químicos de plantas podem inibir ou matar os fungos (HARBORNE, 1986). Aleloquímicos estão frequentemente presentes nas plantas em concentrações que possibilitam a defesa das plantas contra herbívoros e patógenos de plantas (PRICE et al., 1980; BARBOSA, SAUNDERS, 1985) e podem direta ou indiretamente afetar a atividade dos agentes patogênicos, incluindo os fungos entomopatogênicos.

A influência de plantas hospedeiras sobre a contaminação dos tetraníquideos com capiloconídio parece estar fortemente relacionada com a morfologia foliar e química (cera). Dentre as plantas hospedeiras da família Solanaceae, pimenta e maria-preta têm poucos ou nenhum tricomas, e tiveram alta contaminação. Tomate, tomate cereja e berinjela são caracterizados pela presença de tricomas, que variam em tamanho e intensidade, podendo interferir na movimentação dos tetraníquideos, o que resulta em baixa contaminação pelos conídios. Isto foi verificado durante o experimento onde os ácaros foram criados em diferentes plantas hospedeiras e testados em discos foliares morfológicamente idênticos de tomate. Ao contrário das plantas hospedeiras solanáceas utilizadas em *T. evansi*, na maior parte das plantas hospedeiras utilizadas por *T. urticae* havia tricomas, com exceção de feijão-de-porco, sendo que as variações na intensidade e tamanho dos tricomas podem ter causado baixa contaminação em algodão, mas com a alta contaminação em feijão-de-porco, morango e *Gérbera*, que não diferiram entre si. Contudo, a contaminação não foi diretamente proporcional à infecção e à mortalidade nas duas espécies de ácaros.

O grau de pilosidade da planta hospedeira é frequentemente considerado uma característica importante, que influencia na colonização e infestação das pragas, e faz parte dos mecanismos de defesa das plantas contra herbívoros. Os tricomas glandulares e não-glandulares podem também afetar negativamente a ação dos inimigos naturais dos herbívoros que junto com a antibiose da planta também auxiliam na defesa das plantas (WILSON, GEORGE, 1986; POPRAWSKI, JONES, 2000). Em tetraníquideos, padrões semelhantes são verificados no que diz respeito ao comportamento de busca dos predadores e na eficiência da predação em diversas plantas hospedeiras (KRIPS et al., 1999). Como *N. floridana*, não procura ativamente seu hospedeiro, mas depende de atividades desse hospedeiro, como sua movimentação, a redução da movimentação do ácaro devido aos tricomas, o afeta negativamente, devido ao seu modo de contaminação “sit and wait strategy”.

Várias diferenças observadas na infecção e mortalidade de tetraniquídeos em diferentes plantas hospedeiras podem ser atribuídas a diferenças na quantidade de glicoalcalóides e outros aleloquímicos dessas plantas. A maioria das espécies de solanáceas contém altas concentrações de glicoalcalóides, especialmente solanina e tomatina, que demonstraram ter efeito considerável em fungos entomopatogênicos e outros inimigos naturais (GALLARDO et al., 1990; LACEY, MERCADIER, 1998; POPRAWSKI, JONES, 2000). O processo de infecção pode ser afetado pela ação de aleloquímicos, contribuindo para um fraco desenvolvimento dos fungos através de efeitos sobre a colonização e crescimento de hifas, com conseqüente variação na mortalidade e mumificação. No entanto, os dados do presente estudo em tomate e berinjela são inconsistentes com estudos anteriores, que indicam que tomatina e solanina afetam alguns fungos entomopatogênicos (ARNESON, DURBIN, 1968; COSTA, GAUGLER, 1989b), pois verificou-se uma alta mumificação sobre estas plantas, indicando que o fungo se desenvolve bem nos ácaros infectados. Além da solanina e tomatina das solanáceas, o algodão também é conhecido por apresentar alta concentração de gossipol, cujo efeito sobre o fungo patogênico *N. floridana* nunca foi investigado, embora o potencial de incompatibilidade de antibiose da planta envolvendo este composto com fungos entomopatogênicos já ter sido relatada (POPRAWSKI, JONES, 2000). Outros compostos desconhecidos, como cumarinas encontrados em *Gérbera*, podem também afetar a atividade fúngica. Outras formas que as plantas hospedeiras podem mediar as interações incluem os efeitos nas taxas de crescimento e o estado de saúde do hospedeiro ou os efeitos de compostos secundários da planta nos fungos patogênicos (HAJEK, 1997).

Presumia-se que a relação entre as diferentes plantas hospedeiras e a oviposição das fêmeas de *T. evansi* e *T. urticae* poderia explicar as diferenças na mumificação. Isto estava baseado na hipótese de que a oviposição seria maior em uma planta considerada uma hospedeira adequada (DABROWSKI, BIELAK, 1978). Além disso, uma praga pode ficar vulnerável a um agente patogênico, se sua alimentação for de baixa qualidade nutricional em um determinado hospedeiro (MAYER et al., 2002). Por isso, tentou-se associar a adequabilidade do hospedeiro com a variabilidade da mumificação nas plantas hospedeiras dos ácaros. No entanto, nossos resultados não confirmam a hipótese de que a taxa de oviposição pode ser correlacionado com a mumificação, porque essa relação foi variável e inconsistente. Por exemplo, a oviposição de *T. evansi* criados em maria-preta foi semelhante à de berinjela e tomate, mas a mumificação sobre esta planta foi 2 e 3 vezes menor do que em berinjela e tomate, respectivamente. A pimenta foi a

única planta em que a oviposição foi muito baixa, mas teve uma alta mumificação. Nesta situação, o estresse do ácaro poderia facilitar a atividade fúngica, pois é esperado de uma praga sadia uma maior resistência em um hospedeiro adequado, onde esta pode melhor se defender dos inimigos naturais e vice-versa.

Teoricamente, uma maior contaminação resultariam em maior mortalidade que levaria a uma maior mumificação e maior esporulação, o que caracterizaria uma planta hospedeira favorável ao desenvolvimento do fungo. Em tomate obteve-se uma combinação de alta infecção, mortalidade e mumificação, indicando que esta seja uma ótima planta hospedeira para o ácaro e para o fungo. Em maria-preta embora tenha sido observado uma alta mortalidade e infecção, a mumificação e esporulação foram relativamente menores, indicando que o fungo não deva ser um ótimo agente nas planta hospedeira, exceto sobre altas densidades da presa. É possível que *T. evansi* ao se alimentar de maria-preta, seqüestre compostos de resistência da planta e estes compostos interfiram no desenvolvimento do fungo que não consegue completar o seu desenvolvimento antes da morte do hospedeiro. Por outro lado, o algodão apresentou baixa infecção, mortalidade e mumificação quando comparado às outras plantas hospedeiras de *T. urticae* testadas. Embora a elevada oviposição de *T. urticae* em feijão-de-porco esteja positivamente associada com a alta mumificação sobre esta planta hospedeira, essa mesma relação não foi encontrada com as outras plantas hospedeiras, demonstrando que a mumificação não pode ser correlacionada com a adequabilidade da planta hospedeira.

Os ácaros mumificados gerados em tomate e berinjela produziram um maior número de esporos provavelmente indicando que o fungo se reproduz melhor em ácaros que se alimentam sobre estas plantas, em comparação com tomate cereja, maria-preta e pimenta. Um crescimento menos vigoroso de fungos em hospedeiros que se alimentaram em plantas hospedeiras com baixo valor nutricional foi sugerido interferir na esporulação de *Nomurea rileyi* (Farlow) Samson em cadáveres de *Helicoverpa armigera* Hübner (GOPALAKRISHNAN, NARAYANAN, 1989) e *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu et Soper em *Lymantria dispar* (L .) (HAJEK, RENWICK, ROBERTS, 1995). Inesperadamente, descobrimos que os cadáveres produzidos em pimenta tiveram uma esporulação baixa, e também mumificaram menos do que outros hospedeiros. Neste caso, ficou demonstrado que pimenta não é um hospedeiro adequado ao ácaro por inibir quase totalmente a oviposição e a planta também afetou o fungo negativamente,

apoiando a hipótese de que o crescimento em hospedeiros ruins é prejudicial à reprodução do patógeno (MILNER, SOPER, 1981).

Enquanto alguns metabólitos secundários de plantas podem proteger os herbívoros contra uma ampla gama de agentes patogênicos, outros podem modificar a fisiologia do herbívoro tornando-o mais susceptível a infecção por um patógeno (BAVERSTOCK, ALDERSON, PELL, 2005). Estudos que foram feitos para determinar se os ácaros eram capazes de seqüestrar compostos de plantas que afetariam o fungo. Os ácaros foram criando-se em diferentes solanáceas e depois foram transferidos e infectados em tomate, que foi a planta onde se obteve os melhores parâmetros do fungo. Os resultados mostram que ocorreu uma maior mumificação quando os ácaros foram condicionados a diferentes plantas hospedeiras antes de serem infectados, comparado a quando os ácaros provenientes das diversas espécies de plantas foram infectados em tomate, com exceção de pimenta. Isto poderia indicar que os compostos da planta ingeridos pelos ácaros e tóxicos ao fungo tenham sido reduzidos gradativamente após os ácaros terem sido transferidos para tomate e isto deu uma condição de melhor desenvolvimento do fungo. Nenhuma tentativa foi realizada para determinar por que razão na pimenta ocorreu uma menor mumificação após a mudança de hospedeiro, mas é possível que a mistura de aleloquímicos seqüestrados pelos ácaros em sua alimentação nos seus dois hospedeiros devido a troca desses hospedeiros poderia ter contribuído para o resultado.

Apesar dos resultados no laboratório não mostrarem nenhuma diferença significativa na adequabilidade do hospedeiro entre maria-preta e tomate, observações de campo freqüentemente mostram que *T. evansi* ocorre mais comumente em maria-preta do que em tomate. Estes resultados podem ter implicações evolucionárias que indicam que *T. evansi* provavelmente co-evoluiu com maria-preta e poderia ter se associado a outras plantas hospedeiras muito recentemente. Por outro lado, as plantas podem favorecer entomopatógenos e utilizar da proteção provida por estes para o seu benefício (ELLIOT et al., 2000; CORY, HOOVER, 2006), indicando a complexidade das interações tróficas que podem estar envolvidas.

Conseqüentemente, herbívoros invertebrados que podem tolerar altas concentrações de aleloquímicos podem também utilizar estes aleloquímicos como proteção contra certos agentes patogênicos (VEGA et al., 1997). O ácaro *T. urticae* é polífago e é capaz de tolerar diferentes concentrações de aleloquímicos associados com as suas plantas hospedeiras, sem interferir em seu crescimento e desenvolvimento. É de se esperar que o patógeno deste ácaro também tenha

co-evoluído com o hospedeiro e isso poderia provavelmente explicar o por que da mumificação ter sido bastante elevada nas diferentes plantas testadas..

Diferenças na mumificação e esporulação podem ter várias implicações sobre a eficiência do fungo no controle de ácaros, quando estes se alimentam em diferentes plantas hospedeiras. Isso acontece porque a qualidade dos cadáveres mumificados determina a esporulação, que por sua vez influencia na transmissão horizontal. Portanto, ácaros mortos, infectados com fungos, que mumificam rapidamente em uma determinada planta hospedeira, criam um potencial para mais ciclos de multiplicação do fungo. Uma alta mumificação e esporulação de cadáveres de ácaros em tomate e berinjela ou em morango e feijão-de-porco favoreceria o rápido desenvolvimento das epizootias, enquanto uma alta mumificação em pimenta acompanhada de uma má esporulação leva a uma diminuição das taxas de transmissão como em maria-preta e tomate cereja, que teve uma mumificação e esporulação baixa. A diminuição das taxas de transmissão a longo prazo resulta em um lento desenvolvimento do fungo e uma baixa capacidade do fungo em controlar os ácaros. Os resultados da esporulação e mumificação também são muito importantes para se saber em que planta ou cultura as múmias podem ser produzidas, tanto para o uso em laboratório quanto para liberação em campo. Estes resultados sugerem que maria-preta não seja uma planta adequada para produção e também que o fungo provavelmente não seja eficiente como única forma de controle de *T. evansi* nesta planta.

Referências

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, MD, v. 18, p. 265–267, 1925.

AGRAWAL, A.A. Host-range evolution: adaptation and trade-offs in fitness of mites on alternative hosts. **Ecology**, Durham, v. 81, p. 500–508, 2000.

ARNESON, P.A.; DURBIN, R.D. Studies on the mode of action of tomatine as a fungitoxic agent. **Plant Physiology**, Washington, v. 43, p. 683-686, 1968.

BARBOSA, P.; SAUNDERS, J.A. Plant allelochemicals. Linkages between herbivores and their natural enemies. In: COOPER-DRIVER, G. A, SWAIN, T, CONN, E. E, (Ed.). **Chemically mediated interactions between plants and other organisms**. New York:Plenum, 1985. p.107-137.

BAVERSTOCK, J.; ALDERSON, P.G.; PELL, J.K. *Pandora neoaphidis* transmission and aphid foraging behaviour. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 90, p. 73-76, 2005.

BENZ, G. Environment. In: FUXA, J. R ; TANADA, Y (Ed.). **Epizootiology of insect diseases**. New York:Wiley, 1987. 177-214 p.

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

BRANDENBURG, R.L.; KENNEDY, G.G. Interactive effects of selected pesticides on the twospotted spider mite and its fungal pathogen, *Neozygites floridana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dortrecht, v. 34, p. 240-244, 1983.

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

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

CORY, J.S; HOOVER, K. Plant-mediated effects in insect-pathogen interactions. **Trends in Ecology and Evolution**, London , v. 21, p. 278-286, 2000.

COSTA, S.D.; GAUGLER, R. Influence of *Solanum* host plants on Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) susceptibility to the entomopathogen *Beauveria bassiana*. **Environmental Entomology**, College Park, Md, v. 18, p. 531–536, 1989a

COSTA, S.D.; GAUGLER, R. Sensitivity of *Beauveria bassiana* to solanine and tomatine: plant defensive chemicals inhibit an insect pathogen. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 15, p. 697–706, 1989b.

DABROWSKI, Z.T.; BIELAK, B. Effect of some plant chemical compounds on the behaviour and reproduction of spider mites (Acarina: Tetranychidae). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dortrecht, v. 24, p. 117–126, 1978.

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

ELLIOT, S.L.; SABELIS, M.W.; JANSSEN, A.; VAN DER GEEST, L.P.S.; BEERLING, E.A.M.; FRANSEN, J. Can plants use entomopathogens as bodyguards? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, p.228-235, 2000.

FELTON, G.W.; DAHLMAN. Allelochemical induced stress: effects of L-canavanine on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* in *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 44, p. 187-191, 1984.

FIABOE, K.K.M.; FONSECA, R.L.; MORAES, G.J.; OGOL, C.K.P.O.; KNAPP, M. Identification of priority areas in South America for exploration of natural enemies for classical biological control of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in Africa. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 373-379, 2006

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

FURTADO, I.P.; TOLEDO, S.; MORAES, G.J.; KREITER, S.; KNAPP, M. Search for effective natural enemies of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in northwest Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 43, p. 121-127, 2007.

GALLARDO, F.D.; BOETHEL, D.S.; FUXA, F.R.; RICHTER, A. Susceptibility of *Heliothis zea* (Boddie) larvae to *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson: Effects of alpha-tomatine on the third trophic level. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 1751–1759, 1990.

GOPALAKRISHNAN, C.; NARAYANAN, K. Epizootiology of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in field populations of *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *armigera* (Hübner) in relation to three host plants. **Biological Control**, Orlando, v. 3, p. 50-52, 1989.

GOULD, F. Rapid host range evolution in a population of the phytophagous mite, *Tetranychus urticae* Koch. **Evolution**, Lancaster, v. 33, p. 791–802, 1979.

HAJEK, A.E.; RENWICK, J. A. A, ROBERTS, D.W. Effect of larval host plant on the Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) fungal pathogen, *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). **Environmental Entomology**, College Park, v. 24, p. 1307-1314, 1995.

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

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

HARE, J.D. Effect of plant variation on herbivore-natural enemy interactions. In: FRITZ, R.S.; SIMS, E.L (Ed.). **Plant resistance to herbivores and pathogens: Ecology, Evolution, and Genetics**. Chicago:Univ. Chicago press, 1992. p.278-298.

HARE, J.D.; ANDREADIS, T.G. Variation in the susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) when reared on different host plants to the fungal pathogen *Beauveria bassiana* in the field and laboratory. **Environmental Entomology**, College Park, v. 12, p. 1891–1896, 1983 .

- HUFFAKER, C.; VAN DE VRIE, B.M.; McMURTRY, J.A. The ecology of tetranychid mites and their natural control. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.14, p. 125-174, 1969.
- HUMBER, R.A.; MORAES, G.J.; DOS SANTOS, J. M. Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by a *Triplosporium* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in Northeastern Brazil. **Entomophaga**, Paris, v. 26, p. 421-425, 1981.
- JEPSON, L.R.; KEIFER, H.H.; BAKER, E.W. Mites injurious to economic plants. Berkeley: University of California Press, 1975. 614p.
- KLUBERTANZ, T.H.; PEDIGO, L.P.; CARLSON, R.E. Impact of fungal epizootics on the biology and management of the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) in soybean. **Environmental Entomology**, College Park, v. 20. p. 731-735, 1991.
- KNAPP, M.; WAGENER, B.; NAVAJAS, M. Molecular discrimination between the spider mite *Tetranychus evansi* Baker & Pritchard, an important pest of tomatoes in southern Africa, and the closely related species *T. urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). **African Entomology**, Pretoria, v. 11, p. 300-304, 2003.
- KRIPS, O.E.; KLEIJIN, P.W.; WILLEMS, P.E.L.; GOLDS, G.J.Z.; DICKE, M. Leaf hairs influence searching efficiency and predation rate of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental Applied Acarology**, Amsterdam, v. 23, p. 119-131, 1999.
- LACEY, L.A.; MERCADIER, G. The effect of selected allelochemicals on germination of conidia and blastospores and mycelial growth of the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Mycopathologia**. Den Haag, v. 142, p. 17-25, 1998.
- MAYER, R.T.; INBAR, M.; MCKENZIE, C.L.; SHATTERS, R.; BOROWICZ, V.; ALBRECHT, U.; POWELL, C.A.; DOOSTDAR, H. Multitrophic interactions of the silverleaf whitefly, host plants, competing herbivores, and phytopathogens. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 51, p. 151-169, 2002.
- MILNER, R.J.; SOPER, R.S. Bioassay of *Entomophthora* against the spotted alfalfa aphid *Therioaphis trifoli f. maculata*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 37, p. 168-173, 1981.
- MORAES, G.J.; McMURTRY, J.A.; BAKER, E.W. Redistribution and distributions of the spider mites *Tetranychus evansi* and *T. marianae*. **Acarologia**, Paris, v. 28, p. 333-343, 1987.
- MORAES, G.J.; McMURTRY, J.A. Comparison of *T. evansi* and *T. urticae* (Acari: Tetranychidae) as prey for eight species of phytoseiid mites. **Entomophaga**, Paris, v. 30, p. 393-397, 1985.
- MORAES, G.J.; McMURTRY, J. A. Suitability of the spider mite *Tetranychus evansi* as prey for *Phytoseiulus persimilis*. **Experimental Applied Acarology**, Amsterdam, v. 40, p. 109-115, 1986.

- POPRAWSKI, T.J.; JONES, W.J. Host plant effects on activity of the mitosporic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against two populations of *Bemisia* whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). **Mycopathologia**, Den Haag, v. 151, p. 11-20, 2000.
- PRICE, P.W.; BOUTON, C.E.; GROSS, P.; McPHERON, B.A.; THOMPSON, J.N.; WEIS, A.E. Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. **Annual Review of Ecology and Systematics**. Palo Alto, v. 11, p. 42-65, 1980.
- RAMOSKA, W.A.; TODD, T. Variation in efficacy and viability of *Beauveria bassiana* in the chinch bug (Hemiptera: Lygaeidae) as a result of feeding activity on selected host plants. **Environmental Entomology**, College Park, v. 14, p. 146-148, 1985.
- RICHTER, A.R.; FUXA, J.R.; ABDEL-FATTAH, M. Effect of host-plant on the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to nuclear polyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, College Park, v. 16, p. 1004-1006, 1987.
- SMITLEY, D.R.; KENNEDY, G.G.; BROOKS, W.M. Role of the entomogenous fungus, *Neozygites floridana*, in population declines of twospotted spider mite. *Tetranychus urticae*, on field corn. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 41, p. 255-264, 1986.
- VAN DER GEEST, L.P.S.; ELLIOT, S.L.; BREEUWER, J.A.J.; BEERLING, E.A.M. Diseases of mites. **Experimental Applied Acarology**. Amsterdam, v. 24, p. 497-560, 2000.
- VEGA, F.E.; DOWD, P.F.; MCGUIRE, M.R.; JACKSON, M. A.; NELSEN, T. In vitro effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Invertebrate Pathology**. San Diego, v. 70, p. 209-213, 1997.
- VIDAL, C.; OSBORNE, L.S.; LACEY, L.A.; FRAGUES, J. Effect of host plant on the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for controlling the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) in greenhouses. **Biological Control**. Orlando, v. 12, p. 191-199, 1998.
- WEKESA V.W.; MANIANIA.; N.K, KNAPP, M.; BOGA, H.I. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. **Experimental Applied Acarology**, Amsterdam, v. 36, p. 41-50, 2005.
- WEKESA, V.W.; MORAES, G.J.; KNAPP, M.; DELALIBERA, Jr. I. Interactions of two natural enemies of *Tetranychus evansi*, the fungal pathogen *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) and the predatory mite, *Phytoseiulus longipes* (Acari: Phytoseiidae). **Biological Control**, Orlando, v. 41, p. 408-414, 2007.
- WEKESA, V.W.; DELALIBERA, Jr. I. Long-term preservation of *Neozygites tanajoae* (Entomophthorales: Neozygitaceae) in cadavers of *Mononychellus tanajoae* (Acari: Tetranychidae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, p. 621-627, 2008.

WILSON, F.D.; GEORGE, B.W. Smooth leaf and hirsute cottons: response to insect pests and yield in Arizona. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 79, p. 229–232, 1986.

5 Efeito da temperatura sobre a produção de conídios e a virulência de isolados de *Neozygites floridana* sobre *Tetranychus evansi*

Resumo

Para que possam ser eficientes, os fungos patogênicos devem estar adaptados às condições ambientais na área em que serão utilizados. A temperatura é um dos mais importantes fatores ambientais que podem afetar sua sobrevivência e capacidade de infectar seus hospedeiros. Este estudo determinou o efeito da temperatura sobre a esporulação, germinação e virulência de três isolados de *Neozygites floridana* Weiser e Muma coletados de *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard em três regiões com climas diferentes, Recife/ Pernambuco e Piracicaba/ São Paulo, no Brasil, e Vipos/Tucumán, na Argentina. Este fungo é um candidato potencial à introdução na África para o controle biológico clássico de *T. evansi*. Os três isolados foram multiplicados em laboratório antes da utilização nos bioensaios. Foram consideradas seis temperaturas constantes, 13°C, 17°C, 21°C, 25°C, 29°C e 33°C, para verificar o efeito da capacidade dos três isolados de esporular, germinar e matar os ácaros. Também foram utilizados seis regimes de temperaturas alternadas para simular o dia e a noite (12:12 h), 17-13°C, 21-13°C, 29-13°C, 33-13°C, 33-23°C e 33-28°C, para testar os seus efeitos sobre a virulência dos três isolados sobre *T. evansi*. O isolado de Vipos produziu mais conídios do que outros isolados em todas as temperaturas, embora a esporulação tenha sido altamente dependente da temperatura. Taxas ótimas de esporulação foram observadas a 25°C. A germinação foi menos variável entre os isolados, mas foi também dependente da temperatura. A temperatura ótima de germinação foi 25°C; a esta temperatura, mais de 80% dos conídios primários germinaram para formar capiloconídios. A mortalidade dos ácaros aumentou com o aumento das temperaturas, dependendo do isolado utilizado. A 29°C, o menor tempo letal médio (TL₅₀) de *T. evansi* (3,16 dias, 95%, IC 3,05-3,27) foi observado para o isolado de Vipos, enquanto o maior TL₅₀ (3,47 dias, 95%, IC 3,34-3,59) foi observado para o isolado de Piracicaba. A mortalidade dos ácaros inoculados com os três isolados do fungo em temperaturas alternadas foi maior com o aumento da amplitude térmica (a diferença entre a temperatura máxima e a mínima combinadas) aumentando de 8 °C (21-13 °C), para 10 °C (33-23°C), para 16°C (29-13°C). Porém, nas menores e maiores amplitudes de temperatura de 4°C (17-13°C) e 20°C (33-13°C) foram obtidas baixas mortalidades. Os resultados do presente estudo indicam que de maneira geral, o desempenho do isolado de Vipos foi melhor que aquele de outros isolados. O efeito de outros fatores variáveis do ambiente em cada isolado ainda não foi estudado. O estudo de fatores como luz e umidade em cada isolado seriam fundamental para permitir a seleção do isolado mais conveniente a ser introduzido na África.

Palavras chave: *Neozygites floridana*; *Tetranychus evansi*; Temperatura; Esporulação; Germinação

Abstract

For successful development as microbial control agents, pathogenic fungi must be adapted to the environmental conditions in the area in which they are to be employed. Temperature is one of the most important environmental factors that can affect the survival and ability of those

organisms to infect their hosts. This study determined the effect of temperature on sporulation, germination and virulence of three isolates of *Neozygites floridana* Weiser e Muma collected from *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard in three climatically distinct regions of Recife/ Pernambuco and Piracicaba/ São Paulo, in Brazil, and Vipos/ Tucumán, in Argentina. This fungus is a candidate for introduction into Africa for the classical biological control of *T. evansi*. The three isolates were multiplied in the laboratory before use in the bioassays. Six constant temperatures of 13°C, 17°C, 21°C, 25°C, 29°C and 33°C were tested for their effect on the ability of the three fungal isolates to sporulate, germinate and kill the mites. Six alternating-temperature regimes simulating day and night (12:12h) temperatures of 17-13°C, 21-13°C, 29-13°C, 33-13°C, 33-23°C, 33-28°C were also tested to verify the virulence of the three isolates against *T. evansi*. The isolate from Vipos discharged more conidia than other isolates at all temperatures although sporulation was strongly dependent on temperature. Optimal sporulation rates were observed at 25°C. Germination was less variable among isolates, but it was also dependent on temperature. Optimal germination rates were observed at 25°C and 29°C. The optimum temperature for germination was 25°C; at this temperature more than 80% of the primary conidia germinated to form capilliconidia. Mite mortality increased with the increase of temperatures depending on the isolate used. At 29°C, the shortest mean lethal time (LT₅₀) of *T. evansi* (3.16 days, 95% CI of 3.05-3.27) was observed for the isolate from Vipos, while the longest LT₅₀ (3.47 days, 95% CI 3.34-3.59) was observed for the isolate from Piracicaba. Mortality of mites inoculated with the three fungal isolates at alternating temperatures increased as the temperature amplitude (the difference between low and high temperature combinations) increased from 8°C (21-13°C), to 10°C (33-23°C), to 16°C (29-13°C), with smallest and highest temperature amplitudes of 4°C (17-13°C) and 20°C (33-13°C) producing low mortality. The results suggest that overall Vipos performed better than other isolates in the present study. The effect of other variable environmental factors on each isolate has not been studied. The study of factors as light and humidity would be warranted to allow the selection of the most convenient isolate to be introduced to Africa.

Keywords: *Neozygites floridana*; *Tetranychus evansi*; Temperature; Sporulation; Germination

5.1 Introdução

O ácaro vermelho do tomateiro, *Tetranychus evansi* Baker e Pritchard é um dos mais importantes artrópodes pragas desta cultura (*Lycopersicon esculentum* Mill) e de outras solanáceas na África e em países de outros continentes. Esta praga foi detectada pela primeira vez na África em Zimbabwe em 1979, e atualmente possui uma distribuição continental (BLAIR, 1983; SAUNYAMA; KNAPP, 2003; SMITH MEYER, 1996). *Tetranychus evansi* tornou-se uma das pragas mais economicamente importantes do tomateiro na África (SARR et al, 2002). Como a maioria das espécies de Tetranychidae, *T. evansi* é favorecido por condições de clima quente e seco (HUFFACKER; VAN DE VRIE; McMURTRY, 1969).

Os danos econômicos mais significativos ocorrem na região leste e sul do continente africano, onde o uso regular e extensivo de pesticidas tem ocasionado uma resistência generalizada da praga a estes (BLAIR, 1989; SIBANDA et al, 2000). Em tais circunstâncias, estratégias alternativas de controle para os agricultores tornam-se necessárias para evitar maiores perdas. Algumas destas estratégias envolvem a implantação de programas de manejo integrado de pragas, principalmente com o uso de inimigos naturais, tais como ácaros predadores, insetos e fungos patogênicos, incluindo a liberação inoculativa de inimigos naturais exóticos para o estabelecimento e controle a longo prazo.

O uso de fungos patogênicos no controle biológico de ácaros praga aumentou nos últimos anos (CHANDLER et al. 2000). Avanços significativos têm ocorrido no desenvolvimento de acaricidas microbianos contendo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (TAMAI et al., 2003; WEKESA et al., 2005; CHANDLER, DAVIDSON, JACOBSON, 2005). No entanto, estes fungos nunca foram isolados naturalmente de ácaros e é improvável que causem epizootias em populações naturais destes. Por isso, recomenda-se sua utilização apenas em liberações inundativas.

Um dos poucos fungos patogênicos que tem sido freqüentemente relatado em ácaros provocando mortalidade natural é *Neozygites floridana* Weiser e Muma (Entomophthorales). Este é um fungo entomopatogênico virulento que provoca epizootias regulares em populações de ácaros tetraníquideos em diversas culturas (HUMBER, MORAES, DOS SANTOS, 1981, BRANDENBURG, KENNEDY, 1983; CARNER, CANERDAY, 1970) e seu potencial para controlar esses ácaros já foi relatado (BRANDEBURG, KENNEDY, 1982; WEKESA et al., 2007). Os isolados deste fungo podem ser coletados de ácaros mumificadas durante epizootias e

utilizados como inóculos primários para a produção de novos cadáveres em condições de laboratório para testes ou para armazenamento a longo prazo (ODUOR et al., 1995). Dificuldades na produção *in vitro* deste fungo têm prejudicado sua utilização comercial, mas liberações inoculativas têm o potencial de reduzir substancialmente o status tetraníquideos como pragas. Esta utilização requer a liberação de isolados eficientes no campo em momentos apropriados.

Neozygites floridana tem sido estudado para a liberação inoculativa contra *T. evansi* na África (WEKESA et al. 2007). O primeiro passo do presente trabalho foi selecionar isolados que possam ser eficientes em diferentes condições ambientais. A temperatura e umidade relativa são fatores importantes que afetam a eficácia deste patógeno. A maioria dos fungos entomopatogênicos geralmente necessitam de uma umidade próxima da saturação para sua esporulação, germinação e invasão ao hospedeiro. No entanto, este fator nem sempre é limitante, pois a esporulação e a germinação de *N. floridana* ocorrem durante a noite, próximo à superfície das folhas, onde a umidade relativa é alta. Um dos fatores mais críticos que podem afetar a atividade das pragas e seus inimigos naturais é a temperatura (FARGUES et al., 1997; FILOTAS, HAJEK, 2007). Esta tem um efeito direto sobre a capacidade do patógeno de infectar o hospedeiro, influenciando sua taxa de crescimento dentro dos hospedeiros (FENG et al., 1999; THOMAS, JENKINS, 1997; CARRUTHERS et al., 1992). Algumas evidências sugerem que a temperatura também pode afetar os níveis de susceptibilidade de artrópodes a seus inimigos naturais (STACEY, FELLOWES, 2002).

Embora numerosos estudos de laboratório tenham demonstrado a eficácia de *N. floridana* contra tetraníquideos, a velocidade para matar pode ser altamente variável dependendo de fatores como o local de origem do fungo, a espécie de ácaro e a temperatura. A compreensão desses fatores é fundamental para utilização dos fungos patogênicos no controle de pragas.

A África é um continente com ampla variedade de climas e não se espera que uma única linhagem de *N. floridana* se adapte a todas as regiões. Portanto, para aumentar as chances de sucesso de um programa de controle biológico clássico de *T. evansi* na África, o conhecimento das exigências térmicas de isolados de *N. floridana* é considerado uma das primeiras etapas para a seleção dos isolados que poderão ser utilizados em regiões com climas diferentes. Assim, os efeitos da temperatura constante e alternada sobre a esporulação, germinação, infectividade e virulência dos três isolados de *N. floridana* provenientes de diferentes localizações da região

Neotropical foram determinados, a fim de encontrar isolados eficientes em diferentes faixas de temperatura.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Isolados do fungo

Três isolados de *N. floridana* usados neste estudo foram coletados em regiões geograficamente distintas, LQ2 de Piracicaba, Estado de São Paulo e LQ4 de Recife, Estado de Pernambuco, nas regiões sudeste e nordeste do Brasil, respectivamente e LQ6 de Vipos, província de Tucumán, nordeste da Argentina. Ambos LQ2 e LQ4 foram inicialmente coletados de cadáveres de *T. evansi* mortos pelo fungo em tomateiro em setembro 2004 e 2006, respectivamente. LQ6 foi coletado em maio de 2007 em plantas de beringela (*Solanum melongena* L). Os isolados foram armazenados em cadáveres de ácaros postos em recipientes contendo sílica gel e uma camada de algodão onde foram colocados os ácaros a -10°C . Os cadáveres armazenados foram utilizados para a produção de novos cadáveres utilizados no experimento. A esporulação foi obtida colocando-se os cadáveres de cada isolado a 25°C em escotofase total em discos de folhas (1,2 cm diâmetro) colocados sobre esponja saturada em água destilada em placas de Petri fechadas (9 cm diâmetro) a 100% de umidade relativa por 24 h. Depois da confirmação da esporulação sob microscópio, os novos cadáveres foram produzidos pela exposição de fêmeas de *T. evansi* aos cadáveres esporulados dos isolados de Piracicaba, Recife e Vipos. Ácaros contaminados foram mantidos a 25°C e 50% de umidade relativa, sobre luz natural (12D:12L) e os cadáveres foram coletados diariamente de 3 a 7 dias após adicionar os ácaros adultos seguindo a metodologia descrita por Delalibera e Hajek (2004). Os cadáveres produzidos em laboratório foram armazenados como anteriormente descrito.

5.2.2 Ácaros

O ácaro vermelho do tomateiro foi originalmente coletado em casa-de-vegetação, no campus da Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. Os ácaros foram mantidos em folhas de tomateiro

em bandejas plásticas (90 cm × 60 cm) para manter a colônia livre de contaminação pelo fungo. Fêmeas desta colônia foram utilizadas no experimento.

5.2.3 Efeito da temperatura na esporulação e germinação

Para determinar o efeito da temperatura na esporulação, cadáveres de *T. evansi* infectados pelo fungo recém produzidas dos três isolados foram colocados em lâminas apresentando quadrados (23 × 23 mm) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pa.) identificados com códigos numéricos. Para cada isolado foram utilizadas quatro lâminas colocando um cadáver no centro destas lâminas e as lâminas foram colocadas todas sobre uma esponja saturada com água destilada em uma placa de Petri fechada. Cada placa de Petri foi submetida a uma das seguintes temperaturas por 16 h, em escotofase total: 13°C, 17°C, 21°C, 25°C, 29°C e 33°C. Cada cadáver de cada isolado foi usado e o experimento foi repetido uma vez. A esporulação do fungo de cada cadáver foi determinada utilizando um microscópio óptico para contagem dos conídios que estavam dentro dos quadrados. Conídios que estavam no processo de formação ou já haviam formado conídios secundários ou capiloconídios foram considerados germinados. A proporção de germinação foi calculada pela divisão do número de conídios germinados pelo número total de conídios produzidos por cadáver.

5.2.4 Efeito da temperatura constante na virulência de isolados de *Neozygites floridana*

Os novos cadáveres produzidos dos isolados de Piracicaba, Recife e Vipos foram colocados individualmente em 20 discos de folhas de tomateiro (1,2 cm de diâmetro) para cada isolado. Discos de folhas contendo cadáveres foram colocados em esponja saturada de água destilada no interior de placas de Petri (9 cm diâmetro), que foram mantidas fechadas por 12 h, em escotofase total, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ para promover a esporulação. Esta foi confirmada sob microscópio óptico antes de introduzir 15 fêmeas de *T. evansi* por disco de tomate. Os ácaros foram mantidos nestes discos por 24 h e depois transferidos para discos de folhas novos e maiores (2,5 cm de diâmetro) colocados em placas de Petri (3 × 1,5 cm, diâmetro × altura) fechadas com parafilme e identificadas de acordo com cada isolado. As placas de Petri foram mantidas dentro de caixas plásticas. Dez discos de folhas de tomateiro com cada um dos três isolados foram postos em uma caixa plástica submetida a uma das seguintes temperaturas: 13°C, 17°C, 21°C, 25°C, 29°C e

33°C. A temperatura ambiente foi programada dentro de um intervalo de $\pm 1^\circ\text{C}$ em todas as câmaras de ambiente controlado. A mortalidade foi avaliada diariamente por sete dias e os discos de folhas foram trocados após quatro dias. O experimento foi repetido uma vez, constituído de 150 ácaros para cada tratamento. Ácaros mortos foram armazenados diariamente em tubos tipo eppendorf após a avaliação e classificação em dois grupos: sem sinais aparentes do fungo e mumificados pelo fungo. Ácaros mortos sem sinal do fungo foram montados em meio azul algodão e examinados em microscópio óptico para a confirmação da infecção por *N. floridana*, para calcular o número de ácaros que haviam morrido pela ação do fungo.

5.2. 5 Efeito da temperatura alternada sobre a virulência de isolados de *Neozygites floridana*

Um processo de criação de ácaro e de contaminação pelo fungo semelhante ao utilizado para testar o efeito de temperaturas constantes foi também utilizado neste bioensaio, exceto pelo fato de que os testes foram realizados sob temperaturas flutuantes, para simular as condições naturais. As seis combinações de temperatura utilizadas foram: 17-13°C, 21-13°C, 29-13°C, 33-13°C, 33-23°C e 33-28°C para as fases claras e escuras, respectivamente. As combinações foram escolhidas com base na possibilidade das temperaturas médias de noite e de dia estarem associadas a algumas regiões geográficas onde os ácaros são importantes pragas. O número de repetições, número de ácaros por repetição, o número de dias de observação e determinação das causas de mortalidade foram os mesmos descritos no item anterior.

5.2.6 Análise estatística

Os dados de esporulação e germinação foram log-transformados e arcoseno-transformados respectivamente, antes da análise por modelo linear generalizado (GLM ANOVA); as médias foram separadas pelo teste de Tukey HSD. O tempo letal médio de ácaros infectados submetidos a temperaturas constantes ou alternadas foi analisado utilizando a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier no SPSS (v. 15.0.0, 2006), com comparações log-rank (Mantel - Cox) para $p < 0,05$. Foram analisadas as respostas das diferentes temperaturas em cada isolado do fungo e a resposta entre cada temperatura nos diferentes isolados. A porcentagem de germinação em diferentes temperaturas foi analisada utilizando análise de variância (ANOVA unifatorial) e a relação entre germinação e temperatura foi comparada através de uma análise de regressão.

5.3 Resultados

5.3.1 Efeito da temperatura na esporulação e germinação

A esporulação variou entre os isolados de *N. floridana* de diferentes locais expostos às diferentes temperaturas. Tanto as baixas quanto altas temperaturas afetaram negativamente a esporulação do fungo (Figura 5.1). A interação entre isolado e temperatura foi significativa ($F = 4,88$; $gl = 17, 126$; $p = 0,0001$). A esporulação sob temperatura constante do isolado de Vipos foi significativamente maior do que de Piracicaba e Recife em todas as temperaturas de exposição, exceto a 13°C ($F = 2,16$; $gl = 2, 21$; $p = 0,1408$). A 33°C , poucos esporos foram produzidos pelos cadáveres do isolado de Vipos e não foi observada esporulação dos isolados de Piracicaba e Recife. Embora o fungo tenha esporulado a 13°C , a germinação foi suprimida nesta temperatura. Taxas de esporulação e germinação do conídio para os três isolados foram mais altas a 25°C e 29°C do que a 13°C . A germinação dos conídios de diferentes isolados aumentou significativamente com o aumento da temperatura de 13 a 29°C , sendo linear a relação entre temperatura e germinação dos três isolados ($r^2 = 0,87, 0,83$ e $0,87$). Para os isolados de Recife e Piracicaba, a taxa de germinação aumentou equitativamente com o aumento da temperatura, mas não à mesma taxa que o isolado de Vipos, que teve maior taxa de germinação em todas as temperaturas (Figura 5.1).

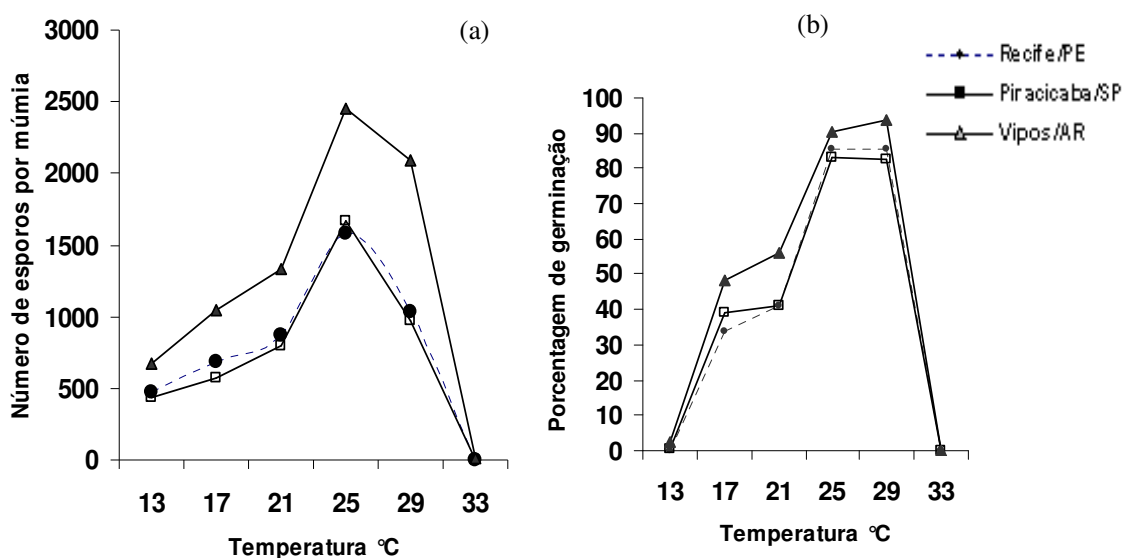


Figura 5.1 - Influência da temperatura sobre *Neozygites floridana* de Recife-Brasil, Piracicaba-Brasil e Vipos-Argentina, infectando *Tetranychus evansi*: (a) Número médio de conídios liberados por cadáver infectado; (b) porcentagem média da germinação do conídio primário influenciada por temperaturas constantes.

5.3.2 Efeito da temperatura constante na virulência de *Neozygites floridana*

A mortalidade de *T. evansi* foi mais rápida nas temperaturas entre 25°C e 29°C para todos os isolados (Figuras 5.2, 5.3 e 5.4). As menores mortalidades foram aos 13 e 17°C, enquanto a mortalidade média foi a 21°C e 33°C. Mortalidade superior a 96% foi registrada quando os ácaros foram infectados com os isolados de Recife e Vipos, a 25°C e 29°C, enquanto a mortalidade foi superior a 90 e 96 % para o isolado de Piracicaba. Mortalidade mais alta foi observada a 21 do que a 33°C para os isolados de Recife (Figura 5.2) e Vipos (Figura 5.4), mas a mortalidade causada pelo isolado de Piracicaba foi similar em ambas as temperaturas (Figura 5.3). Tempo médio letal foi computado separadamente para cada isolado indicando que o isolado de Vipos foi geralmente mais virulento que os isolados de Recife e Piracicaba a 29°C. A 21°C, o isolado de Recife foi mais virulento que os isolados de Piracicaba e Vipos, enquanto a 25°C, o isolado de Recife foi mais virulento que o de Piracicaba, mas apresentou a mesma virulência que o de Vipos (Tabela 5.1). Ácaros infectados com o isolado de Vipos apresentaram menor tempo letal médio (LT_{50}) (3,16 dias; 95% IC 3,05-3,27) a 29°C, enquanto o isolado de Piracicaba apresentou o mais longo tempo letal médio (LT_{50}) (3,47 dias; 95% IC 3,34-3,59) à mesma temperatura (Tabela 5.1). O tempo letal médio para o isolado de Vipos foi significativamente

maior que o de Piracicaba pela comparação dupla (pairwise) de log rank (Mantel-Cox) ($p < 0,0001$), mas não diferiu significativamente do de Recife ($p > 0,367$).

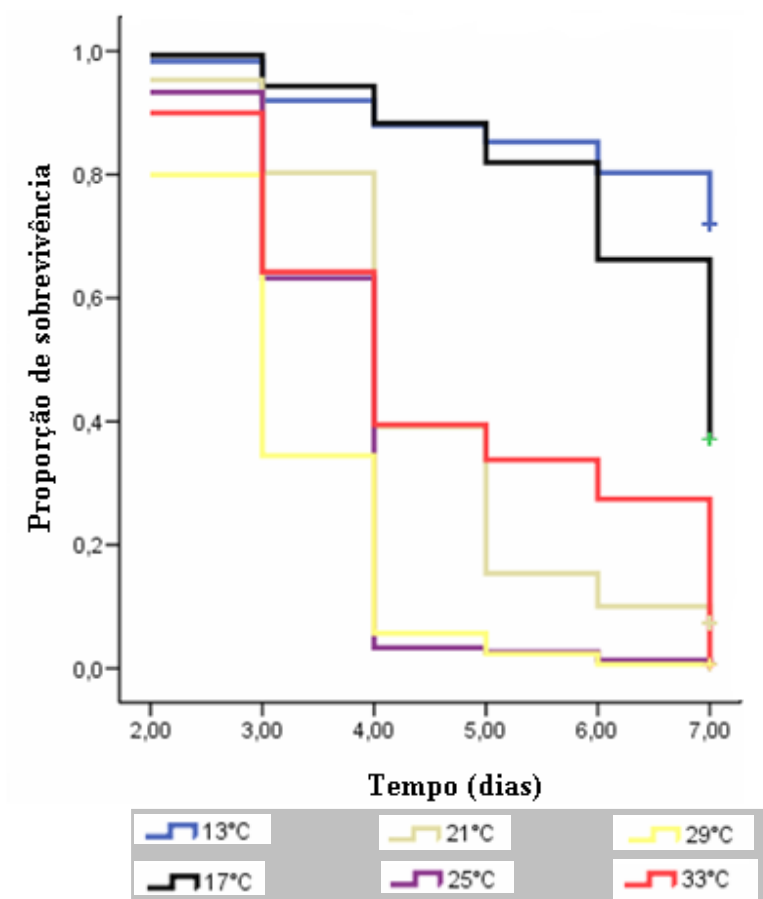


Figura 5.2 - Curvas de sobrevivência de *Tetranychus evansi* ($n = 300$ ácaros; 20 repetições de 15 ácaros) inoculados com um isolado de *Neozygites floridana* de Recife-Brasil e incubado a temperaturas constantes.

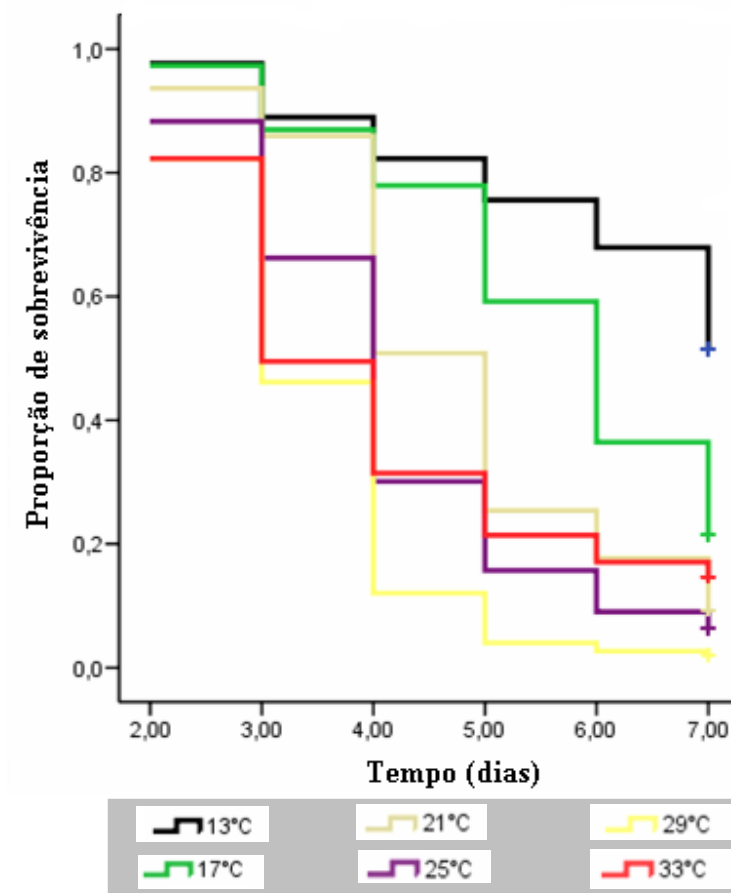


Figura 5.3 - Curvas de sobrevivência de *Tetranychus evansi* ($n = 300$ ácaros; 20 repetições de 15 ácaros) inoculados com um isolado de *Neozygites floridana* de Piracicaba-Brasil e incubado a temperaturas constantes

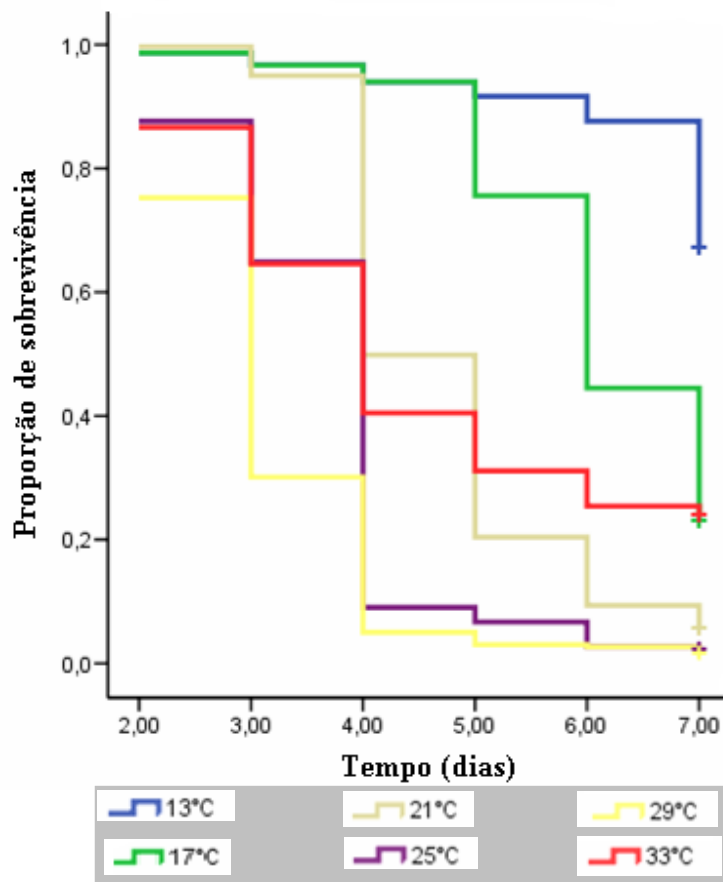


Figura 5.4 - Curvas de sobrevivência de *Tetranychus evansi* ($n = 300$ ácaros; 20 repetições de 15 ácaros) inoculados com um isolado de *Neozygites floridana* de Vipos-Argentina e incubado a temperaturas constantes.

Tabela 5.1 - Tempo letal médio (\pm Erro padrão) de *Tetranychus evansi* infectado com três isolados de *Neozygites floridana* (Recife-Brasil, Piracicaba-Brasil e Vipos-Argentina) e submetido a seis temperaturas constantes. Os valores entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança (IC) a 95%.

Local	Tempo letal médio (Dias)					
	13°C	17°C	21°C	25°C	29°C	33°C
Recife/BR	6,44 \pm 0,07 (6,29-6,58)	6,30 \pm 0,07 (6,17-6,44)	4,40 \pm 0,07 (4,26-4,54)	3,64 \pm 0,05 (3,55-3,73)	3,23 \pm 0,05 (3,13-3,33)	4,55 \pm 0,10 (4,35-4,75)
Piracicaba/BR	6,12 \pm 0,09 (5,96-6,29)	5,58 \pm 0,08 (5,41-5,74)	4,74 \pm 0,08 (4,58-4,89)	4,09 \pm 0,08 (3,94-4,25)	3,47 \pm 0,06 (3,34-3,59)	4,02 \pm 0,10 (3,83-4,21)
Vipos/AR	6,69 \pm 0,06 (6,57-6,80)	6,09 \pm 0,06 (5,97-6,21)	4,74 \pm 0,06 (4,62-4,86)	3,71 \pm 0,06 (3,59-3,82)	3,16 \pm 0,06 (3,05-3,27)	4,48 \pm 0,10 (4,28-4,68)

5.3.3 Efeito de temperaturas flutuantes na virulência de isolados de *Neozygites floridana*

Como o aumento da amplitude das temperaturas flutuantes de 10°C (33-23°C), a 16°C (29-13°C) e a 20°C (33-13°C), o tempo letal médio aumentou em ácaros inoculados com os três isolados (Tabela 5.2). Nestes três tratamentos, a maior diferença foi na temperatura diurna, considerando que a temperatura de noite foi a mesma e as temperaturas médias foram semelhantes. Não houve diferença entre os isolados na combinação de temperatura 17-13°C e 33-28°C, cuja baixa amplitude corresponde a 4°C e 5°C, respectivamente. No entanto, menor mortalidade de todos os isolados foi também observada nos ácaros infectados mantidos a 33-13°C, com a maior amplitude (20°C). Em geral, temperaturas constantes apresentaram tempo letal médio mais curto do que temperaturas alternadas (Tabela 5.1 e 5.2). Em temperaturas alternadas, a distância entre as curvas de sobrevivência foi muito pequena. A diferença nas curvas de sobrevivência entre isolados de Recife, Piracicaba e Vipos sobre diferentes combinações de temperaturas não foi constante. A mortalidade mais alta de ácaros com o isolado de Recife ocorreu a 29-13°C (Figura 5.5) enquanto

para isolados de Piracicaba (Figura 5.6) e Vipos (Figura 5.7), isto se deu a 21-13°C. No entanto, baixa mortalidade foi constantemente observada nas temperaturas de 17-13°C e 33-28°C.

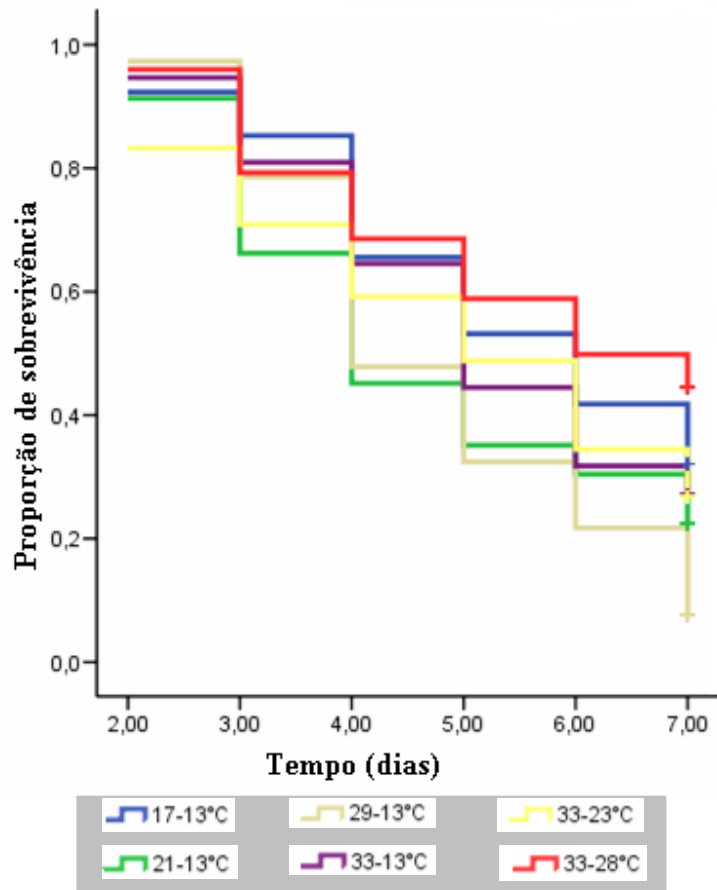


Figure 5.5 - Curvas de sobrevivência de *Tetranychus evansi* ($n = 300$ ácaros; 20 repetições de 15 ácaros) inoculado com o isolado de *Neozygites floridana* de Recife e incubado a diferentes combinações de temperaturas alternadas

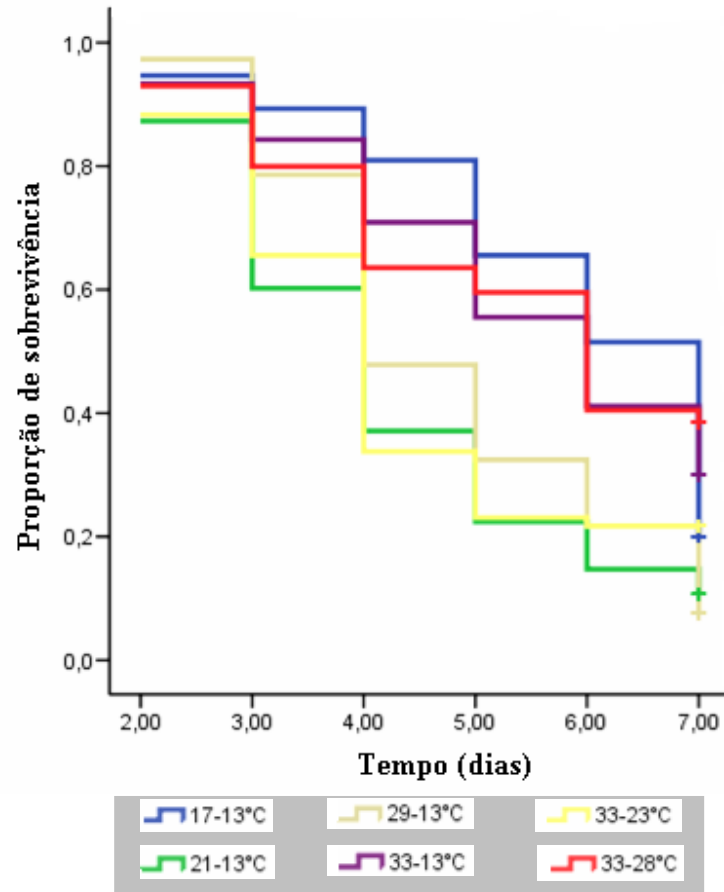


Figura 5.6 - Curvas de sobrevivência de *Tetranychus evansi* ($n = 300$ ácaros; 20 repetições de 15 ácaros) inoculados com o isolado de *Neozygites floridana* de Piracicaba e incubado a diferentes combinações de temperaturas alternadas

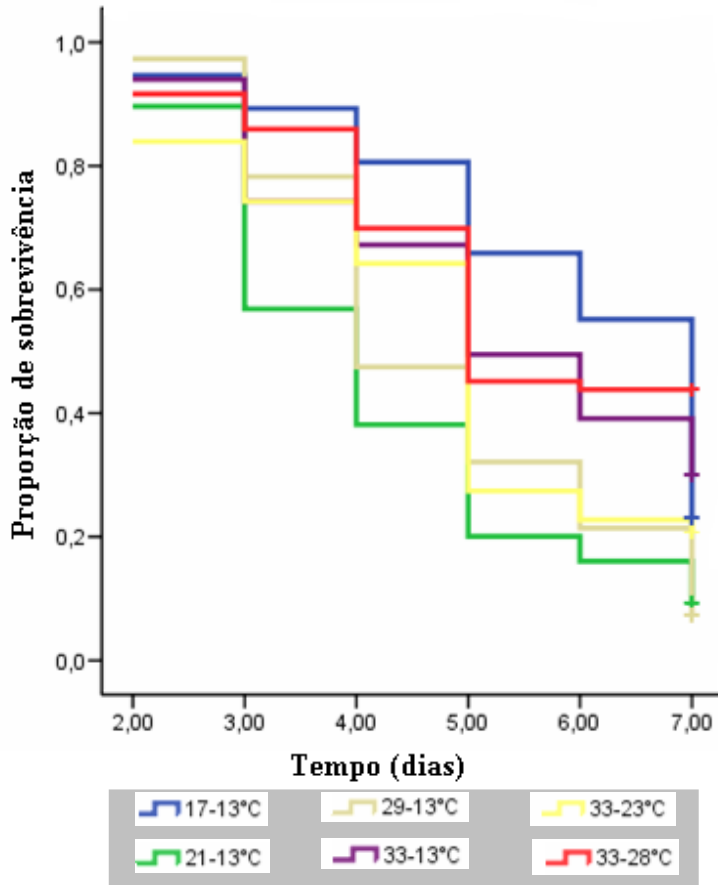


Figura 5.7 - Curvas de sobrevivência de *Tetranychus evansi* ($n = 300$ ácaros; 20 repetições de 15 ácaros) inoculados com o isolado de *Neozygites floridana* de Vipos e incubado a diferentes combinações de temperaturas alternadas

Tabela 5.2 - Tempo letal médio (\pm Erro padrão) de *Tetranychus evansi* infectado com três isolados de *Neozygites floridana* (Recife-Brasil, Piracicaba-Brasil e Vipos-Argentina) e submetidos a diferentes combinações de temperaturas alternadas (dia-noite). Os valores entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança (IC) a 95%.

Tempo letal médio (Dias)						
Temperatura Dia-noite	17-13°C	21-13°C	29-13°C	33-13°C	33-23°C	33-28°C
Amplitude e temperatura média	4°C(15°C)	8°C(17°C)	16°C(21°C)	20°C(23°C)	10°C(28°C)	5°C(31°C)
Isolado						
Recife/Brasil	5,38 \pm 0,10 (5,19-5,57)	4,68 \pm 0,10 (4,48-4,88)	4,78 \pm 0,09 (4,61-4,95)	5,16 \pm 0,09 (4,98-5,35)	4,97 \pm 0,11 (4,75-5,18)	5,53 \pm 0,10 (5,33-5,72)
Piracicaba/ Brasil	5,82 \pm 0,09 (5,65-5,99)	4,22 \pm 0,09 (4,04-4,40)	4,78 \pm 0,09 (4,61-4,95)	5,45 \pm 0,10 (5,27-5,64)	4,32 \pm 0,10 (4,14-4,51)	5,37 \pm 0,10 (5,17-5,56)
Vipos/ Argentina	5,86 \pm 0,09 (5,68-6,03)	4,21 \pm 0,09 (4,03-4,39)	4,77 \pm 0,09 (4,60-4,94)	5,24 \pm 0,10 (5,04-5,44)	4,73 \pm 0,10 (4,54-4,92)	5,37 \pm 0,10 (5,18-5,55)

5.4 Discussão

Baseado na origem dos isolados, levantou-se a hipótese de que o isolado originário de Vipos, região norte da Argentina, apresentaria um desempenho melhor sob baixas temperaturas e o isolado de Recife, região Nordeste do Brasil, seria superior sob altas temperaturas. No entanto, o isolado de Vipos foi superior ao isolado de Recife e ao de Piracicaba em termos de produção de conídios em todas as temperaturas. A produção de conídios primários ou esporulação foi possível em todas as temperaturas testadas, exceto a 33°C. Embora a temperatura mínima para a esporulação de *N. floridana* não tenha sido determinada, acredita-se que é possível que a esporulação ocorra abaixo de 13°C, a temperatura mais baixa testada, por causa do elevado número de esporos produzidos por todos os isolados nesta temperatura. A esporulação aumentou com o aumento da temperatura, observando-se a esporulação máxima a 25°C para os três

isolados, havendo drástico declínio a 29°C, sugerindo que as temperaturas mais altas que estas podem afetar negativamente o desenvolvimento do *N. floridana*.

A variabilidade intraespecífica para esporulação, dentro das espécies da ordem Entomophthorales foi investigada sobre uma ampla gama de temperaturas. Em muitos estudos, a temperatura que permite a esporulação está dentro da faixa de 5°C a 25°C; temperaturas mais altas que estas são consideradas inibitórias à liberação de conídios, ou seja, à esporulação. Já foi relatada esporulação de *Entomophthora* spp., por exemplo, entre 5°C e 25°C (WILDING, 1971) e de *N. floridana* entre 10°C e 26°C (SMITLEY; BROOKS; KENNEDY et al., 1986). A temperatura ótima de esporulação de 25 e 29 °C, observada no presente trabalho, é próxima à temperatura ótima de 27-30°C relatada por Kenneth et al. (1972) para esta mesma espécie, mas é mais elevada que de 18-23°C, relatada por Oduor et al. (1995). Deve-se considerar, entretanto que estes relatos se referem a diferentes ácaros tetraníquídeos hospedeiros, *Tetranychus urticae* Koch e *Mononychellus tanajoa* Bondar, respectivamente. Uma ampla faixa de temperatura para esporulação poderia permitir a formação de conídios secundários em uma grande parte do ano, embora a temperatura ótima de 25°C possa produzir máxima atividade. Isto pode explicar porque, individualmente, cada espécie de fungo da ordem Entomophthorales causa epizootias em estações específicas e não em todas as estações do ano.

Elevada umidade do ar é geralmente requerida por fungos entomopatogênicos para esporulação e germinação de conídios. A umidade também afeta a persistência e sobrevivência de diversas maneiras. Conseqüentemente, os efeitos da temperatura e da umidade estão intimamente relacionados, porque alguns fungos podem tolerar temperaturas extremas se houver mais umidade no ar, e vice-versa. Neste estudo, a germinação de capiloconídios de *N. floridana* foi afetada pela temperatura, independentemente do isolado, aumentando com o aumento da temperatura. Considerando que todos os isolados foram testados sob condições uniformes de umidade relativa e variando as temperaturas constantes, a habilidade do isolado de Vipos de germinar bem em todas as temperaturas pode estar relacionada com as diferenças climáticas entre estações naquele local de origem, que podem exercer pressão de seleção sobre o fungo. A germinação foi suprimida a 13°C, indicando que este fungo é incapaz de completar seu ciclo de vida nesta baixa temperatura. Entretanto, a germinação foi mais elevada no isolado de Vipos do que naqueles de Recife e Piracicaba em todas as temperaturas, sugerindo que este isolado pode ser melhor adaptado a uma escala mais ampla de variação de temperatura. A habilidade de

germinar sob uma ampla faixa de temperatura pode oferecer vantagens adaptativas, pois os esporos germinados podem garantir transmissão e, ao mesmo tempo, aumentar as possibilidades do estabelecimento do fungo quando introduzidos em novas áreas. Estudos de germinação são importantes, pois podem indicar os extremos de temperatura em que o fungo pode atuar (YEO et al., 2003).

A germinação e esporulação foram semelhantes quando comparados aos isolados brasileiros provenientes de Recife e Piracicaba. Esse resultado pode ter ocorrido devido à pequena variabilidade climática nos dois locais de origem dos isolados brasileiros. As diferenças no potencial de tolerância dos isolados a baixas ou altas temperaturas foram relacionadas através da amplitude das temperaturas dos seus respectivos locais de origem. Adaptações às variações de temperatura do dia e noite ou entre estações do ano podem influenciar potencialmente a atividade biológica dos isolados. Entretanto, um número limitado de isolados, um de cada localidade, foi utilizado; um número maior de isolados de cada região poderia fornecer perfis térmicos conclusivos associados à heterogeneidade climática nos locais de origem. Em outro estudo, a relação entre a tolerância térmica e o local de origem foi demonstrada com isolados de *Conidiobolus coronatus* (Costantin) Batko (PAPIEROK; RAFANOMEZANTSOA-RANDRIAMBOLOLONA; ZIAT, 1993). Aqueles autores verificaram que isolados provenientes de áreas tropicais crescem mais rapidamente entre 26°C e 29°C do que isolados de áreas de clima temperado, indicando que as condições climáticas do local onde estes fungos patogênicos possam ser utilizados para o controle de pragas devem ser semelhantes ao seu local de origem. Em outros casos, estudos envolvendo a relação entre o local de origem do isolado e a tolerância térmica não foram encontrados, levando a crer que o fungo patogênico tem o potencial de agir sob as condições às quais seus hospedeiros estão sujeitos (FARGUES et al., 1997).

Embora o efeito da temperatura sobre *N. floridana* atacando espécies de ácaros tenha já sido relatado (SMITLEY; BROOKS; KENNEDY, 1986), são relativamente poucos os estudos comparando este efeito sobre isolados de fungos patogênicos provenientes de regiões com diferentes características climáticas (FILOTAS; HAJEK, 2007; PAPIEROK; RAFANOMEZANTSOA-RANDRIAMBOLOLONA; ZIAT, 1993). No que se refere às temperaturas flutuantes, estes estudos são importantes porque correspondem mais aproximadamente às condições naturais, melhor indicando o possível desempenho do fungo no campo. Testes sobre o efeito da patogenicidade dos fungos sobre seus hospedeiros invertebrados

em temperaturas constantes provavelmente subestimam ou superestimam seu potencial sob condições naturais.

Dependendo das condições climáticas do local de origem do isolado, a temperatura ótima de mortalidade do ácaro pelo fungo no presente estudo esteve entre 25°C e 29°C. Nesta faixa de temperatura, aparentemente *T. evansi* foi consistentemente mais suscetível e/ ou o fungo foi mais virulento. As temperaturas ideais para esporulação e germinação relatados previamente por alguns autores concordam com o que foi mostrado neste estudo, indicando que as condições ótimas para esporulação também são idéias para germinação (MILNER; LUTTON, 1983; SMITLEY; BROOKS; KENNEDY, 1986). E em geral as temperaturas ideais para o desenvolvimento dos corpos hifais, medidos neste estudo pelo curto tempo letal médio, concordam com as condições ótimas para esporulação e germinação. Os extremos de temperaturas baixas e elevadas reduziram a velocidade de desenvolvimento do fungo, como mostrado pelo longo tempo letal médio (TL₅₀). A identificação da temperatura base para *N. floridana* é por essa razão, necessária para facilitar a compreensão do efeito da temperatura em sua eficácia, sobrevivência e estabelecimento em diversas condições agroecológicas.

Com base nos resultados de sobrevivência, pode-se verificar que baixas temperaturas (13-17°C) podem afetar mais severamente o desenvolvimento do fungo no ácaro hospedeiro do que altas temperaturas (33°C). Isto se tornou evidente pela maior taxa de mortalidade total de ácaros infectados com *N. floridana* a 33°C do que a 13°C ou 17°C. Entretanto, mesmo que altas temperaturas possam acelerar a atividade do fungo, é possível que estas possam também ocasionar a morte prematura do ácaro, antes que o fungo complete o seu desenvolvimento. Isto, entretanto, não foi investigado. Os resultados do presente estudo indicam que o uso dos isolados de *N. floridana* em baixas ou altas temperaturas pode resultar no atraso da supressão das populações da praga devido à baixa taxa de mortalidade dos ácaros resultante do lento desenvolvimento do fungo. Em termos econômicos, isso pode não ser desejável, porque a demora da morte da praga permite a continuidade dos danos às plantas. Por outro lado, temperaturas dentro da faixa considerada adequada (21°C a 29°C) induzem o rápido desenvolvimento do fungo, permitindo a redução mais rápida da população da praga.

Quando se comparou a mortalidade dos ácaros em temperaturas alternadas durante o dia e a noite observou-se que os maiores valores de TL₅₀ foram observados quando o desenvolvimento da doença ocorreu em baixas amplitudes (4°C e 5°C) bem como alta amplitude (20°C) de

temperatura. Entretanto, isto deve estar mais diretamente associado aos valores de temperaturas médias e extremas do que a amplitude de temperatura. Por exemplo, a temperatura média do tratamento a 17-13°C e 33-28°C foi de 15°C e 31°C, respectivamente, sendo que estas médias se mostraram desfavoráveis ao desenvolvimento do fungo nos estudos utilizando-se temperaturas constantes. O aumento da temperatura diurna de 17, 21 29 e 33°C, mantendo-se a temperatura noturna em 13°C não resultou numa tendência de redução da TL₅₀ como previsto. É importante levar em consideração que nas diferentes combinações de temperaturas existem temperaturas fora do limite favorável ao desenvolvimento do fungo, sendo 13°C mais desfavorável do que 33°C. Mohamed; Sikorowski; Bell (1977) relataram que a infecção de *Helicoverpa zea* (Boddie) por *Nomuraea rileyi* Farlow (Sampson) sob temperaturas alternadas de 25-30°C, 20-30°C, e 20-35°C resultou em mortalidades não superiores a 46%, enquanto que foram obtidas mortalidades de 80% e 71% quando a infecção ocorreu em temperaturas constantes de 20°C e 25°C, respectivamente. Nesse caso, os autores sugerem que a flutuação de temperatura afetou negativamente a virulência do fungo ou aumentou a atividade biológica dos insetos, tornando-os menos suscetíveis.

Vidal, Farques; Lacey (1997) sugeriram que taxas elevadas de desenvolvimento de fungos que estão associadas a amplitudes de temperaturas toleráveis, sejam requisitos básicos para o sucesso do uso de isolados em programas de controle biológico. Entretanto, alertam para o fato de que a temperatura considerada afeta não apenas o patógeno, mas também o hospedeiro, e que o efeito esperado de uma dada temperatura no desenvolvimento da doença é resultante da ação daqueles dois efeitos. No presente estudo, os eventos dependentes de temperatura foram estudados sob condições que podem ser encontradas nas diferentes localidades em que o fungo possa ser introduzido. O isolado de Piracicaba demonstrou melhor eficiência sob condições extremas de temperaturas constantes (13°C, 17°C e 33°C), enquanto os de Recife e Vipos foram melhores em outras temperaturas.

Os resultados do presente estudo indicam que de maneira geral, o desempenho do isolado de Vipos foi melhor que aquele de outros isolados. O isolado de Vipos mostrou-se superior aos isolados de Recife e Piracicaba quanto a produção e germinação de conídios. A esporulação ou o número de capiloconídios produzidos é importante para o desenvolvimento da epizootia porque quanto maior for o número de conídios produzidos, maior será a possibilidade de a doença ser transmitida entre os hospedeiros suscetíveis. Este é um aspecto importante a ser considerado

durante a seleção dos isolados. Os efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento dos isolados do fungo no interior dos ácaros hospedeiros foram menores, e na maioria dos casos, a diferença no tempo letal não foi maior que 12 horas. O efeito de outros fatores variáveis do ambiente em cada isolado ainda não foi estudado. O estudo de fatores como luz e umidade em cada isolado seria fundamental para permitir a seleção do isolado mais conveniente a ser introduzido na África.

Referências

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

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

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

BRANDERBURG, R.L.; KENNEDY, G.G. Interactive effects of selected pesticides on the two-spotted spider mite and its fungal pathogen *Neozygites floridana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Paris, v. 34, p. 240-244, 1983.

CARNER, G.R.; CANERDAY, T.D. *Entomophthora* sp. as a factor in the regulation of the twospotted spider mite in cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 63, p. 638-640, 1970.

CARRUTHERS, R.I.; LARKIN, T.S.; FIRSTENCEL, H.; FENG, Z. Influence of thermal ecology on the mycosis of a rangeland grasshopper. **Ecology**, Durham, v. 73, p. 190-204, 1992.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; JACOBSON, R.J. Laboratory and glasshouse evaluation of entomopathogenic fungi against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), on tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 15, p. 37-54, 2005.

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

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

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; ROUGIER, M. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**, v.89, p.383–392, 1997.

FENG, M.G.; POPRAWSKI, T.J.; NOWIERSKI, R.M.; ZENG, Z. Infectivity of *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales) to *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae) in response to varying temperature and photoperiod regimes. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 123, p.29–35, 1999 .

FILOTAS, M.J.; HAJEK, A.E. Variability in thermal responses among *Furia gastropachae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, London, v. 96 ,p.109–117, 2007.

HUFFAKER, C.; VAN DE VRIE, B.M.; McMURTRY, J.A. 1969. The ecology of tetranychid mites and their natural control. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.14, p. 125-174, 2005.

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

KENNETH, R.G.; WALLIS, G.; GERSON, U.; PLAUT, H.N. Observations and experiments on *Triplosporium floridanum* attacking spider mites in Israel. **Journal of Invertebrate Pathology**. New York, v. 19, p. 366-369, 1972.

MILNER, R.J.; LUTTON, G.G. Effect of temperature on *Zoophthora radicans* (Bredfeld) Batko: an introduced microbial control agent of the spotted alfalfa aphid *Therioaphis trifoli* (Monell) f. maculate. **Journal of Australian Entomological Society**, Melbourne, v. 22, p. 167-173, 1983.

MOHAMED, A.K.A.; SIKOROWSKI, P.P.; BELL, J.V. Susceptibility of *Heliothis zea* larvae to *Nomuraea rileyi* at various temperatures. **Journal Invertebrate Pathology**, New York, v. 30, p.414-417, 1977.

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

PAPIEROK, B.; RAFANOMEZANTSOA-RANDRIAMBOLOLONA, B.N.; ZIAT, N.; 1993. Nouvelles données sur l'écologie et le comportement entomopathogène expérimental de l'entomophthorale *Conidiobolus coronatus* (Zygomycetes). **Entomophaga**, Paris, v. 38, p. 299–312.

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

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

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

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

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

STACEY, D.A.; FELLOWES, M.D.E. Influence of temperature on pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) resistance to natural enemy attack. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 92, p.351–357, 2002.

TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; FAION, M. Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, Campinas,v. 69, p. 77-84, 2002.

THOMAS, M.B.; JENKINS, N.E. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 1469–1474, 1997.

VIDAL, C.; FARGUES, J.; LACEY, L.A. Intraspecific Variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of Temperature on Vegetative Growth. **Journal of Invertebrate Pathology**, cidade, v. 70, p. 18-26, 1997.

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

WEKESA V.W.; MANIANIA, N.K.; KNAPP, M.; BOGA H.I. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. **Experimental and Applied Acarology**. Amsterdam, v. 36, p. 41-50, 2005.

WILDING, N. Discharge of conidia of *Entomophthora thaxteriana* Petch from the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* Harris. **Journal of General Microbiology**, London, v. 69, p. 417-422, 1971.

YEO, H.; PELL, J.K.; ALDERSON, P.G.; CLARK, S.J.; PYE, B.J. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, p. 156-165, 2003.