

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

**Calda sulfocálcica em pomares de citros: evolução da resistência em
Brevipalpus phoenicis (Acari: Tenuipalpidae) e impacto sobre *Iphiseiodes
zuluagai* (Acari: Phytoseiidae)**

Nádia Fernanda Bertan Casarin

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

**Piracicaba
2010**

Nádia Fernanda Bertan Casarin
Engenheiro Agrônomo

Calda sulfocálcica em pomares de citros: evolução da resistência em *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) e impacto sobre *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae)

Orientador:
Prof. Dr. **CELSO OMOTO**

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

**Piracicaba
2010**

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

Casarin, Nádya Fernanda Bertan

Calda sulfocálcica em pomares de citros: evolução da resistência em *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) e impacto sobre *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae) / Nádya Fernanda Bertan Casarin. - - Piracicaba, 2010.
94 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Ácaros - Resistência 2. Calda sulfocálcica 3. Controle químico 4. Frutas cítricas
5. Leprose I. Título

CDD 632.6542
C335c

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

À minha querida mãe Maria Elisabeth, ao meu saudoso pai João
e ao meu irmão João Marcelo
pelo afeto, dedicação e incentivo

DEDICO

À minha querida avó Anésia
e ao Eduardo pelo amor

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pelas oportunidades concedidas, confiança, amizade, orientação e ensinamentos transmitidos ao longo desses anos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, pelos conhecimentos e apoio transmitidos.

Aos queridos amigos Everaldo Batista Alves e Cláudio Roberto Franco pelo convívio, companheirismo, amizade, apoio e essenciais auxílios prestados na condução desse trabalho.

Aos estagiários, Felipe Donadeli Fontes Albuquerque, Luciana O. Silva, Maurillo José de Campos Silva, Bruno Chiavelli, Alexander Ryoji Onishi pelo convívio e auxílio técnico durante a execução desse trabalho.

Às queridas amigas e colegas do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP, Karina Cordeiro Albernaz, Beatriz Maria Ferrari, Danielle Thomazoni e Eloisa Salmeron pelo convívio, companheirismo, amizade e colaboração na elaboração desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP, Alex Sandro Poltronieri, Edgar Francisco Gaona Mena, Felipe Antônio Domingues, Fernando Joly Campos, Gislaine O. Campos, Luis Ricardo Sesso, Marcelo Poletti, Oderlei Bernardi, Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva, Patrick Marques Dourado, Roberto Hiroyuki Konno, Samuel Martinelli, Stella Pacheco Lombardi de Carvalho e Vitor Antônio Correa Pavinato pelo convívio, companheirismo e auxílios prestados.

Aos estagiários do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP Bruna Laís Merlin, Guilherme Libardi Miraldo, Larissa Favero de Camargo, Rebeca da Silva Ribeiro, Rodrigo José Sorgatto e Vinícius Durrer pelo convívio.

Às amigas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP, Daiane Heloisa Nunes, Priscila Fortes, Fátima T. Rampelotti, Gerane Celly Dias Bezerra, Monica Silva Santos, Zuzinaide Vidal Bomfim e Patrícia Milano pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Alves Mourão Filho e ao Departamento de Produção Vegetal pela disponibilização de área com citros para coleta de frutos essenciais na condução do presente trabalho.

Ao Marcelo Corrêa Alves da Seção Técnica de Informática da ESALQ/USP pelo auxílio, com extrema dedicação, nas análises estatísticas.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, pelo companheirismo e incentivo.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP pela dedicação aos serviços prestados.

Às bibliotecárias Sílvia M. Zinsly e Eliana M. Garcia, funcionárias da Biblioteca Central da ESALQ/USP, pelo auxílio na formatação deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse projeto e pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse projeto

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
Referências.....	18
2 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE <i>Brevipalpus phoenicis</i> (ACARI: TENUIPALPIDAE) À CALDA SULFOCÁLCICA EM POMARES DE CITROS.....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução.....	22
2.2 Material e Métodos.....	24
2.2.1 Coleta e criação de <i>B. phoenicis</i>	24
2.2.2 Caracterização da linha-básica de suscetibilidade de <i>B. phoenicis</i> à calda sulfocálcica.....	26
2.2.3 Monitoramento da suscetibilidade de <i>B. phoenicis</i> à calda sulfocálcica.....	27
2.2.4 Caracterização da resistência de <i>B. phoenicis</i> à calda sulfocálcica.....	28
2.2.5 Relação de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica.....	28
2.3 Resultados.....	29
2.3.1 Caracterização da resistência de <i>B. phoenicis</i> à calda sulfocálcica.....	29
2.3.2 Monitoramento da suscetibilidade de <i>B. phoenicis</i> à calda sulfocálcica.....	31
2.3.3 Relação de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica.....	33
2.4 Discussão.....	36
2.5 Conclusões.....	39
Referências.....	39
3 IMPACTO DA TOXICIDADE DE CALDA SULFOCÁLCICA NA EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA DE <i>Brevipalpus phoenicis</i> (ACARI: TENUIPALPIDAE).....	43
Resumo.....	43
Abstract.....	43
3.1 Introdução.....	44
3.2 Material e Métodos.....	46

3.2.1 Linhagens e criação de <i>B. phoenicis</i>	46
3.2.2 Determinação de período de avaliação (Δt) para estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) para <i>B. phoenicis</i>	46
3.2.3 Impacto da toxicidade de calda sulfocálcica na demografia de <i>B. phoenicis</i>	47
3.3 Resultados.....	48
3.3.1 Determinação de período de avaliação (Δt) para estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) para <i>B. phoenicis</i>	48
3.3.2 Impacto da toxicidade de calda sulfocálcica na demografia <i>B. phoenicis</i>	49
3.4 Discussão.....	53
3.5 Conclusões.....	56
Referências.....	56
4 ESTABILIDADE DA RESISTÊNCIA DE <i>Brevipalpus phoenicis</i> (ACARI: TENUIPALPIDAE) À CALDA SULFOCÁLCICA EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS.....	61
Resumo.....	61
Abstract.....	61
4.1 Introdução.....	62
4.2 Material e Métodos.....	63
4.2.1 Criação de <i>B. phoenicis</i>	63
4.2.2 Estimativa da frequência de resistência de <i>B. phoenicis</i> à calda sulfocálcica.....	64
4.2.3 Estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) em <i>B. phoenicis</i>	65
4.3 Resultados.....	66
4.3.1 Estimativa da frequência de resistência de <i>B. phoenicis</i> à calda sulfocálcica.....	66
4.3.2 Estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) em <i>B. phoenicis</i>	69
4.4 Discussão.....	69
4.5 Conclusões.....	70
Referências.....	71
5 EFEITO LETAL E SUBLETAL DE CALDA SULFOCÁLCICA SOBRE <i>Iphiseiodes zuluagai</i> (ACARI: PHYTOSEIIDAE).....	75
Resumo.....	75
Abstract.....	75
5.1 Introdução.....	76

5.2 Material e Métodos.....	78
5.2.1 Coleta e criação de <i>I. zuluagai</i>	78
5.2.2 Bioensaio toxicológico.....	78
5.2.3 Caracterização da toxicidade de <i>I. zuluagai</i> à calda sulfocálcica.....	79
5.2.4 Efeito letal e subletal de calda sulfocálcica na taxa instantânea de crescimento (r_i) de <i>I. zuluagai</i>	80
5.2.5 Persistência da atividade biológica da calda sulfocálcica a <i>I. zuluagai</i>	80
5.3 Resultados.....	82
5.3.1 Caracterização da toxicidade de <i>I. zuluagai</i> à calda sulfocálcica.....	82
5.3.2 Efeito letal e subletal de calda sulfocálcica na taxa instantânea de crescimento (r_i) de <i>I. zuluagai</i>	83
5.3.3 Persistência da atividade biológica de calda sulfocálcica a <i>I. zuluagai</i>	84
5.4 Discussão.....	87
5.5 Conclusões.....	90
Referências.....	91

RESUMO

Calda sulfocálcica em pomares de citros: evolução da resistência em *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) e impacto sobre *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae)

A adoção da calda sulfocálcica como um produto alternativo para o controle de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) tem sido intensificada pelos citricultores brasileiros. A calda sulfocálcica é o único produto eficiente no controle de *B. phoenicis* permitido pelas certificadoras de produtos orgânicos, sendo pulverizada em média 11 vezes por ano. Devido à intensificação no uso da calda sulfocálcica, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a evolução da resistência de *B. phoenicis* e o impacto sobre *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma mediante condução de estudos de: (a) detecção e caracterização da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica pelo monitoramento da suscetibilidade de populações originárias do sistema de manejo orgânico e convencional, e avaliação de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica; (b) avaliação da toxicidade de calda sulfocálcica na evolução da resistência de *B. phoenicis* mediante estimativa da demografia de linhagens suscetível (S), e resistentes à calda sulfocálcica (Calda-R) e enxofre (Enxofre-R); (c) avaliação da estabilidade da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica em laboratório, pela estimativa da frequência de resistência ao longo do tempo e da taxa instantânea de crescimento (r_i) das linhagens S e Calda-R; e (d) avaliação do efeito letal e subletal de calda sulfocálcica sobre *I. zuluagai*. Para monitorar a suscetibilidade de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica, concentração diagnóstica de 320 µg de enxofre/ml de água [(ppm) I.A.] foi definida pela caracterização da linhagem S com bioensaio de contato direto e residual. Diferenças significativas na suscetibilidade foram detectadas entre as populações, mas não entre os sistemas de manejo. A população com maior sobrevivência foi selecionada com concentração diagnóstica para a resistência à calda sulfocálcica (R). A CL_{50} estimada para as linhagens S e Calda-R à calda sulfocálcica foram 200,79 e 1.142,75 ppm respectivamente, e razão de resistência de 5,69 vezes. Foi detectada resistência cruzada positiva entre enxofre e calda sulfocálcica em *B. phoenicis*. A avaliação da toxicidade de calda sulfocálcica na evolução da resistência foi baseada na estimativa da r_i . A r_i diminuiu com o aumento das concentrações de calda sulfocálcica. As linhagens Calda-R e Enxofre-R apresentaram crescimento positivo mesmo nas concentrações de calda sulfocálcica de 3.000 e 6.000 ppm, enquanto a linhagem S foi extinta a partir de 3.000 ppm. Discriminação entre as linhagens S, e resistentes Calda-R e Enxofre-R foi verificada a partir das concentrações de 320 e 240 ppm, respectivamente. A resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica em laboratório foi estável. A toxicidade de calda sulfocálcica a *I. zuluagai* foi avaliada com bioensaio de contato direto e residual. A persistência da calda sulfocálcica a *I. zuluagai* foi avaliada em plantas de *Canavalia ensiformis* L. pulverizadas com concentração de 6.000 ppm. A calda sulfocálcica nas concentrações de 3.000 e 6.000 ppm afetou negativamente a demografia de *I. zuluagai*, levando a extinção. A persistência da calda sulfocálcica foi relativamente longa, resíduo com 41 dias de idade afetou significativamente a demografia de *I. zuluagai*. Baseado nos resultados, estratégias de manejo da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica devem ser implementadas para preservar sua vida útil.

Palavras-chave: Ácaro-da-leprose; Controle químico; Manejo da resistência; Citros orgânico; Taxa instantânea de crescimento

ABSTRACT

Lime sulfur in citrus groves: resistance evolution in *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and impact on *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae)

The use of the lime sulfur as an alternative product for controlling *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) has intensified in Brazilian citrus groves. The lime sulfur is the only efficient product used to control *B. phoenicis* and certified by organic producers with an average of 11 sprayings per year. Due to intense use of this product, the major objectives of this research were to understand the evolution of resistance of lime sulfur in *B. phoenicis* and the impact on *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma by conducting studies (a) to detect and characterize *B. phoenicis* resistance to lime sulfur by monitoring susceptibility in populations collected from citrus groves managed organically and conventionally, and by assessing the possible cross-resistance between sulfur and lime sulfur; (b) to understand the impact of lime sulfur toxicity in *B. phoenicis* resistance evolution, by comparing the demography of susceptible (S), lime sulfur-resistant (Lime-R) and sulfur-resistant (Sulfur-R) strains; (c) to evaluate the stability of *B. phoenicis* resistance to lime sulfur under laboratory conditions, by estimating temporal changes in the frequency of resistance and the instantaneous rate of increase (r_i) in S and Lime-R strains; and (d) to evaluate the lethal and sublethal effect of lime sulfur on *I. zuluagai*. To monitor susceptibility of *B. phoenicis* to lime sulfur, a diagnostic concentration of 320 μg of sulfur/ml of water [(ppm) AI] was defined, by characterization of S strain through direct and residual contact bioassays. Significant differences in susceptibility were detected among populations, but not between management systems. A population with the highest survivorship was identified for selecting a resistant strain to lime sulfur (R) with diagnostic concentration. The estimated LC_{50} of lime sulfur for S and R strains were 200.79 and 1,142.75 ppm respectively. Therefore, the resistance ratio was 5.69-fold. Cross-resistance between sulfur and lime sulfur was detected in *B. phoenicis*. The evaluation of the toxicity of lime sulfur on resistance evolution was based on estimation of r_i . The r_i decreased with the increase of lime sulfur concentrations to all strains. The Lime-R and Sulfur-R strains showed positive population growth, even at concentrations of 3,000 and 6,000 ppm, while the S strain was extinct from concentration of 3,000 ppm of lime sulfur. Discrimination between the S and the Lime-R and Sulfur-R was observed from concentrations of 320 and 240 ppm, respectively. The resistance of *B. phoenicis* to lime sulfur was stable under laboratory conditions. The toxicity of lime sulfur in *I. zuluagai* was evaluated with residual and direct contact bioassay. The persistence of lime sulfur to *I. zuluagai* was evaluated on plants of *Canavalia ensiformis* L. sprayed at concentrations up to 6,000 ppm. The lime sulfur at concentrations of 3,000 and 6,000 ppm had negative impact on population growth of *I. zuluagai*, by leading to extinction. The persistence of lime sulfur was relatively high because even 41-day old residues had also negative impact on *I. zuluagai* population growth. Based on results obtained herein, strategies for managing *B. phoenicis* resistance to lime sulfur should be implemented to preserve the lifetime of this product.

Keywords: Flat mite; Chemical control; Resistance management; Organic citrus; Instantaneous rate of increase

1 INTRODUÇÃO

A adoção da calda sulfocálcica como um produto alternativo para o controle do ácaro-da-leprose, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), tem sido intensificada pelos citricultores brasileiros, principalmente, a partir do desenvolvimento da citricultura orgânica nos últimos anos. Segundo Camargo et al. (2006), o Estado de São Paulo é um dos cinco estados brasileiros onde se concentra a produção orgânica nacional, com uma área de 10.234,8 ha, representando 0,14% da área cultivada no Estado. A laranja ocupa uma área de 425,70 ha, o que equivale a 4,16% da área cultivada com produtos orgânicos no Estado, com produção de 13.353,10 toneladas de laranja. Praticamente toda a produção de laranja orgânica encontra-se localizada em apenas três regiões tradicionais de cultivo do Estado, ou seja, São José do Rio Preto (52,1%), Catanduva (28,2%) e Jaboticabal (18,6%) (CAMARGO et al., 2006). A citricultura orgânica coloca o Brasil em posição de destaque no cenário internacional, pois é o maior produtor mundial de suco de laranja orgânico concentrado congelado (FAO, 2003).

A rentabilidade da produção orgânica de citros é maior que da produção convencional (TURRA; GHISI, 2004), no entanto, há dificuldades na produção, principalmente, no controle de doenças e pragas, com destaque para a leprose dos citros, doença causada pelo vírus “Citrus leprosis virus” – CiLV, que é transmitido por *B. phoenicis* (KITAJIMA et al., 1972; KITAJIMA et al., 1995). A leprose dos citros é considerada uma das doenças de maior importância econômica na citricultura, devido aos sérios prejuízos que acarreta na produção, pois leva a queda prematura de folhas e frutos, seca dos ramos e redução da vida útil da planta.

O sistema de manejo orgânico exige a adoção de novas filosofias que visem sustentabilidade. Entretanto, o manejo de pragas ainda é baseado nas decisões tomadas historicamente no sistema convencional, ou seja, com predomínio da tática de controle químico. A preferência pelo controle químico no sistema orgânico é favorecida pelo baixo custo dos agrotóxicos inorgânicos (produtos à base de enxofre). Os riscos e custos sociais associados ao uso intensivo de agrotóxicos também são observados para os produtos inorgânicos (ZEHNDER et al., 2007). Esse fato pode ser evidenciado pela detecção do primeiro caso de resistência de uma praga agrícola a um agrotóxico, que foi registrado para o piolho-de-São José, *Quadraspidotus perniciosus* (Comstock), resistente a um produto à base de enxofre nos EUA (MELANDER, 1914).

O controle químico tem sido a principal estratégia empregada para o controle do ácaro-da-leprose na citricultura (COMENALE NETO et al., 1995; SATO; RAGA, 1998). Estima-se que, anualmente, mais de 90 milhões de dólares são gastos com acaricidas na citricultura brasileira, o que corresponde a aproximadamente 20% do custo de produção de citros. Cerca de 80% deste valor é destinado ao controle do ácaro-da-leprose (SALVO FILHO, 1997; NEVES; DAYOUB; DRAGONE, 2002). Entretanto, na citricultura orgânica, a calda sulfocálcica é o único produto permitido pelas certificadoras de produtos orgânicos que apresenta eficiência no controle do ácaro-da-leprose (PENTEADO, 2004), com média de 11 pulverizações dessa calda por ano. Já na citricultura convencional, a calda sulfocálcica é adotada como uma opção de baixo custo, principalmente, em épocas de baixa rentabilidade da cultura.

Atualmente a calda sulfocálcica é considerada um produto alternativo para o controle do ácaro-da-leprose, mas já foi muito utilizada para o controle de outras pragas e doenças. Foi formulada pela primeira vez por Grison em 1852 e consiste da mistura de sulfetos e polissulfetos de cálcio obtidos a partir do aquecimento de uma suspensão aquosa de cal hidratada e enxofre. Seu baixo custo a tornou um produto muito popular entre 1852 e 1950, perdendo sua importância com o surgimento dos agrotóxicos orgânicos sintéticos (SECOY; SMITH, 1983). Apresenta ação fungicida, acaricida e inseticida, sendo que sua toxicidade deve-se a liberação dos gases tóxicos sulfeto de hidrogênio (H_2S) e dióxido de enxofre (SO_2) (ABBOTT, 1945). O mecanismo de ação da calda sulfocálcica ainda não é bem conhecido, mas seu principal ingrediente ativo é o enxofre, que isolado atua como inibidor da respiração celular (IRAC, 2009).

Na citricultura, a alta pressão de seleção exercida por acaricidas e, principalmente, o modo de reprodução do tipo partenogênese telítoca de *B. phoenicis* são apontados como os principais fatores responsáveis pela rápida evolução da resistência (HELLE et al., 1980; OMOTO, 1998). Casos de evolução da resistência de *B. phoenicis* já foram detectados para os principais acaricidas utilizados na cultura dos citros, tais como dicofol (OMOTO et al., 2000), hexythiazox (CAMPOS; OMOTO, 2002) e propargite (FRANCO et al., 2007).

A resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica pode ser um dos fatores para explicar a perda da eficiência desse produto para o controle desse ácaro em alguns pomares de citros. Além da calda sulfocálcica, o enxofre tem sido bastante utilizado para o controle do ácaro-da-falsa-ferrugem, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead), tanto em pomares de citros com sistema manejo orgânico como convencional, o que poderia favorecer a evolução da resistência de *B. phoenicis* à

calda sulfocálcica, devido à possibilidade de resistência cruzada com enxofre, além de outros acaricidas convencionais que apresentam enxofre na molécula e atuam na respiração celular, tais como propargite. A resistência cruzada entre propargite e enxofre em *B. phoenicis* já foi reportada por Franco et al. (2007).

As dificuldades no controle do ácaro-da-leprose também podem ser resultado da utilização de acaricidas não seletivos, que podem comprometer as populações de ácaros predadores, principalmente, os da família Phytoseiidae, considerados importantes inimigos naturais de *B. phoenicis* nos pomares de citros (GRAVENA, 1990; MORAES; SÁ, 1995). Os principais ácaros fitoseídeos encontrados no Estado de São Paulo associados ao ácaro-da-leprose, são *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma, *Euseius concordis* (Chant), e *Euseius citrifolius* Denmark & Muma (GRAVENA, 1990; CHIAVEGATO, 1991; SATO et al., 1994). A seletividade do agrotóxico pode retardar a evolução da resistência, uma vez que, possibilita a sobrevivência de inimigos naturais, que podem atuar na eliminação dos indivíduos resistentes, além de reduzir o nível populacional da praga e possibilitar a redução de uso dos agrotóxicos e assim da pressão de seleção exercida por eles (ROUSH, 1989).

Estudos conduzidos por Sato et al. (1995) demonstraram que o enxofre foi significativamente prejudicial à população de predadores (Phytoseiidae) em condições de campo até 58 dias após a aplicação. Trabalhos de seletividade realizados por Reis et al. (1998) mostraram que o enxofre é moderadamente nocivo a *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma. Teodoro et al. (2005), utilizando-se de testes ecotoxicológicos baseado em parâmetros demográficos, verificaram que o enxofre compromete drasticamente populações de *I. zuluagai*, levando rapidamente à extinção devido ao baixo potencial reprodutivo desta espécie quando comparada com sua presa, *Oligonychus ilicis* (McGregor). Apesar dos trabalhos que avaliam o impacto de enxofre sobre ácaros fitoseídeos encontrados na literatura, desconhece-se o efeito da calda sulfocálcica sobre os mesmos, pois apesar da calda sulfocálcica apresentar o enxofre como princípio ativo, apresenta também outros componentes que podem alterar a sua toxicidade. Essa interferência em organismos benéficos associada à evolução da resistência pode comprometer o manejo do ácaro-da-leprose nos pomares de citros.

O presente trabalho foi desenvolvido para obter subsídios para o manejo da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica em pomares de citros orgânico e convencional, mediante a condução de estudos para:

- Detectar e caracterizar a resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica;
- Avaliar a toxicidade de calda sulfocálcica na evolução da resistência em *B. phoenicis*;
- Avaliar a estabilidade da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica;
- Avaliar o efeito letal e subletal da calda sulfocálcica sobre *I. zuluagai*.

Referências

ABBOTT, C.E. The toxic gases of lime-sulfur. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.38, p.618-620, 1945.

CAMARGO, A.M.M.P.; CASER, D.V.; CAMARGO FILHO, W.P.; CAMARGO, F.P.; COELHO, P.J. Área cultivada com agricultura orgânica no Estado de São Paulo, 2004. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, n.3, p.33-62, 2006.

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

CHIAVEGATO, L.G. Ácaros da cultura dos citros. In. RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR., J.; AMARO, A. (Eds.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.2, 941 p.

COMENALE NETO, C.; YAMAMOTO, P.T.; GRAVENA, S.; SILVA, B.B. Período de controle do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* por acaricidas em diferentes níveis de infestação. **Laranja**, Cordeirópolis, v.16, n.2, p.251-261, 1995.

FAO. **World markets for organic citrus and citrus juices**. Disponível em: <<http://fao.org/es/ESC/esce/escri/orghorticulture/PDF/organic%20citrus%20markets.pdf>>. Acesso em: 8 Jun. 2003.

FRANCO, C.R., CASARIN, N.F.B.; DOMINGUES, F.A.; OMOTO C. Resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) a acaricidas inibidores da respiração celular em citros: resistência cruzada e custo adaptativo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.36, p.565-576, 2007.

GRAVENA, S. Manejo ecológico de pragas no pomar cítrico. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.205-225, 1990.

HELLE, W.; BOLLAND, H.R.; HEITMANS, W.R.B. Chromosomes and types of parthenogenesis in the fase spider mites (Acari: Tenuipalpidae). **Genetica**, Dordrecht, v.54, n. 1, p.45-50, 1980.

IRAC. **Insecticide Resistance Action Committee**. Avanços na implementação de programas de manejo da resistência de pragas a pesticidas no Brasil. Disponível em: <<http://www.irac-r.org.br/arquivos/avancosimplprog.doc>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

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

KITAJIMA, E.W. et al. Vírus da leprose dos citros. In: OLIVEIRA, C. A. L. de; DONADIO, L. C. (Ed.) **Leprose dos citros**, Jaboticabal: FUNEP, 1995. p.19-24.

MELANDER, A.L. Can insects become resistance to sprays? **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.7, p.167-173, 1914.

MORAES, G.J. de; SÁ, L.A.N. de. Perspectivas do controle do ácaro da leprose em citros. In: OLIVEIRA, C.A.L. de; DONADIO, L.C. (Ed.). **Leprose dos citros**, Jaboticabal: FUNEP, 1995. p.117-128.

NEVES, E.M.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D.S. Demanda por fatores de produção na citricultura: Fertilizantes e defensivos agrícolas. **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, n.1, p.37-56, 2002.

OMOTO, C. Acaricide resistance management of leprosis mite (*Brevipalpus phoenicis*) in brazilian citrus. **Pesticide Science**, Oxford, v.52, p.189-198, 1998.

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

PENTEADO, S.R **Uso da calda sulfocálcica no controle alternativo de ácaros na citricultura**. Disponível em:<<http://www.agroorganica.com.br>>. Acesso em: 3 set. 2004.

REIS, P.R.; CHIAVEGATO, L.G.; MORAES, G.J.; ALVES, E.B.; SOUSA, E.O. Seletividade de agroquímicos ao ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark e Muma (Acari: Phytoseiidae). **Anais da Sociedade Entomologia do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, n.2, p.265-274, 1998.

ROUSH, R.T. Designing resistance management programs: How can you choose? **Pesticide Science**, Oxford, v.26, p.423-441, 1989.

SALVO FILHO, A. Notas sobre o tratamento fitossanitário em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.18, p.155-163, 1997.

SATO, M.E.; RAGA, A.; CERÁVOLO, L.C.; ROSSI, A.C.; POTENZA, M.R. Ácaros predadores em pomares cítricos de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.435-441, 1994.

SATO, M.E. RAGA, A.; CERÁVOLO, A.C.; ROSSI, A.C. Efeito da utilização de acaricidas em citros, sobre a população de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) e ácaros predadores (Phytoseiidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.52, n.2, p.282-286, 1995.

SATO, M.E.; RAGA, A. Ácaro da leprose. **O Biológico**, São Paulo, v.60, n.1, p.61-69, 1998.

SECOY, D.M.; SMITH, A.E.. Lineage of lime sulfur as an insecticide and fungicide. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Washington, v.29, p.18-23, 1983.

TEODORO, A.V.; FADINI, M.A.M.; LEMOS, W.P.; GUEDES, R.N.C.; PALLINI, A. Lethal and sub-lethal selectivity of fenbutatin oxide and sulfur to predator *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae) and its prey, *Oligonychus ilicis* (Acari: Tetranychidae), in Brazilian coffee plantations. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.36, p.61-70, 2005.

TURRA, C.; GHISI, F.A. Produção de laranja orgânica no Brasil: produção, mercado e tendências. **Anais**: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociedade Rural, Cuiabá, 2004.

ZEHNDER, G.; GURR, G.M. ; KUHNE, S.;WADE, M.R. ; WRATTERN, S.D.; WYSS, E. Arthropod pest management in organic crops. **Annual Review of Entomology**, Standfort, v.52, p.57-80, 2007.

2 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Brevipalpus phoenicis* (ACARI: TENUIPALPIDAE) À CALDA SULFOCÁLCICA EM POMARES DE CITROS

Resumo

O desenvolvimento da citricultura orgânica e o alto custo no controle de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) na citricultura convencional têm levado à intensificação do uso de calda sulfocálcica para o controle desse ácaro no Brasil. Associado a esse fato está o uso do enxofre, principal componente da calda sulfocálcica, para o controle de *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) nos pomares de citros. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi detectar e caracterizar a resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica mediante estudos de avaliação da suscetibilidade de populações de *B. phoenicis* coletadas em pomares de citros com sistema manejo orgânico e convencional; e avaliar a possibilidade de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica. Para o monitoramento da suscetibilidade de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica foi definida a concentração diagnóstica de 320 µg de enxofre/ml de água [I.A. (ppm)] a partir da caracterização da suscetibilidade da linhagem suscetível (S) de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica com bioensaio de contato direto e residual. Diferenças significativas na suscetibilidade à calda sulfocálcica foram observadas entre as populações de *B. phoenicis*; mas não foram observadas diferenças entre populações provenientes de pomares de citros com sistemas de manejo orgânico e convencional, com porcentagens de sobrevivência na concentração diagnóstica variando de 0,0 a 18,4% e de 0,5 a 20,1%, respectivamente. A população que apresentou sobrevivência de 20,1% foi submetida à pressão de seleção com calda sulfocálcica na concentração diagnóstica de 320 ppm para a obtenção da linhagem resistente à calda sulfocálcica (Calda-R). Baseado nas curvas de concentração-resposta, as estimativas das CL₅₀ das linhagens S e Calda-R foram de 200,79 e 1.142,75 ppm, respectivamente. Portanto, a razão de resistência (RR) foi de 5,69 vezes. Foi detectada resistência cruzada positiva entre enxofre e calda sulfocálcica em *B. phoenicis*. Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, há possibilidade de evolução da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica e o uso do enxofre pode acelerar essa evolução devido à resistência cruzada. Dessa forma, a calda sulfocálcica, assim como qualquer agrotóxico, deve ser utilizada cautelosamente dentro de um programa de manejo da resistência.

Palavras-chave: Ácaro-da-leprose; Manejo Integrado de Pragas; Controle Químico; Manejo da Resistência; Citros Orgânico

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF *Brevipalpus phoenicis* (ACARI: TENUIPALPIDAE) RESISTANCE TO LIME SULFUR IN CITRUS GROVES

Abstract

With the development of organic citriculture and the high cost of controlling *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) in conventional citriculture, the use of lime sulfur to control this mite has intensified in Brazil. Moreover, sulfur, the main component of lime sulfur, is also used for controlling *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) in citrus groves. Therefore, the objective of this research was to detect and characterize *B. phoenicis* resistance to lime sulfur by conducting

monitoring studies of *B. phoenicis* to lime sulfur in populations collected from citrus groves managed organically and conventionally, and by assessing the possible cross-resistance between sulfur and lime sulfur. To monitor susceptibility of *B. phoenicis* to lime sulfur, a diagnostic concentration of 320 µg of sulfur/ml of water [(ppm) A.I.] was defined, based on the characterization of concentration-response of susceptible strain (S strain) of *B. phoenicis* to lime sulfur through direct and residual contact bioassays. Significant differences in susceptibility to lime sulfur were detected among populations of *B. phoenicis*, but not between organic and conventional management systems, with survival percentages ranging from 0.0 to 18.4% (organic) and 0.5 to 20.1% (conventional). The population with 20.1% survival was identified for selecting a resistant strain to lime sulfur (R strain) with diagnostic concentration of 320 ppm. Based on concentration-response data, the estimated LC₅₀ of lime sulfur for S and R strains were 200.79 and 1,142.75 µg of sulfur/ml of water [(ppm) A.I.] respectively. Therefore, the resistance ratio (RR) was 5.69-fold. Cross-resistance between sulfur and lime sulfur was detected in *B. phoenicis*. Based on results obtained herein, resistance evolution of *B. phoenicis* to lime sulfur is very likely in the field and the use of sulfur can speed the evolution due to cross-resistance. Hence, lime sulfur, as well as any other pesticide, should be used with caution within the framework of a resistance management program.

Keywords: Flat mite; Integrated pest management; Chemical control; Resistance management; Organic citrus

2.1 Introdução

A adoção da calda sulfocálcica para o controle do ácaro-da-leprose, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), tem sido intensificada pelos citricultores brasileiros, principalmente com o desenvolvimento da citricultura orgânica. No sistema de manejo orgânico de citros, a calda sulfocálcica é o único produto permitido pelas certificadoras de produtos orgânicos que apresenta eficiência no controle desse ácaro (PENTEADO, 2004), com uma média de 11 pulverizações por ano. Já na citricultura convencional, a calda sulfocálcica é adotada como uma opção de baixo custo, sendo utilizada principalmente em épocas de baixa rentabilidade da cultura.

O sistema de manejo orgânico exige a adoção de novas filosofias que visem sustentabilidade. Entretanto, o manejo de pragas nesse sistema ainda é baseado nas decisões tomadas historicamente no sistema convencional, ou seja, com predomínio da tática de controle químico. A preferência pelo controle químico no sistema orgânico é ainda favorecida pelo baixo custo dos agrotóxicos inorgânicos, os quais também apresentam os riscos e custos sociais associados ao uso intensivo dos acaricidas convencionais orgânicos sintéticos (ZEHNDER et al., 2007). Dessa forma, produtos alternativos à base de enxofre, como a calda sulfocálcica, não estão

livres dos mesmos problemas que acarretam os agrotóxicos convencionais, tais como a possibilidade de evolução da resistência e o impacto sobre organismos benéficos.

A evolução da resistência é considerada um dos grandes entraves em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (GEORGHIU, 1983; CROFT, 1990). A alta pressão de seleção exercida por acaricidas e, principalmente, o modo de reprodução do tipo partenogênese telítoca de *B. phoenicis* são apontados como os principais fatores responsáveis pela rápida evolução da resistência do ácaro-da-leprose (HELLE et al., 1980; OMOTO, 1998). Casos de evolução da resistência de *B. phoenicis* já foram detectados para os principais acaricidas utilizados na cultura dos citros, tais como dicofol (OMOTO et al., 2000), hexythiazox (CAMPOS; OMOTO, 2002) e propargite (FRANCO et al., 2007).

O intenso uso de calda sulfocálcica no controle de *B. phoenicis* em pomares de citros pode ser um dos fatores determinantes para a evolução da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica e, conseqüentemente, perda da eficiência desse produto. Além disso, o enxofre utilizado para o controle do ácaro-da-falsa-ferrugem, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead), tanto em pomares de citros com sistema de manejo orgânico como convencional, também poderia favorecer a evolução da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica devido à possibilidade de resistência cruzada entre esses produtos, pois o enxofre está presente na composição da calda sulfocálcica. Outros acaricidas convencionais que apresentam enxofre na molécula e atuam na respiração celular, como propargite, poderiam também favorecer a evolução da resistência do ácaro-da-leprose à calda sulfocálcica devido à resistência cruzada. Franco et al. (2007) detectaram resistência cruzada superior a 111 vezes entre propargite e enxofre em *B. phoenicis*. Casarin et al. (2004) detectaram a resistência cruzada entre propargite e calda sulfocálcica de 4,6 vezes.

O presente trabalho foi desenvolvido para avaliar a suscetibilidade à calda sulfocálcica em populações de *B. phoenicis* coletadas em pomares de citros com sistema de manejo orgânico e convencional do Estado de São Paulo. Além disso, foi realizada avaliação de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica para verificar se a evolução da resistência de *B. phoenicis* ao enxofre pode afetar a suscetibilidade desse ácaro à calda sulfocálcica.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Coleta e criação de *B. phoenicis*

A população suscetível de referência (S) de *B. phoenicis* foi obtida em um pomar de citros sem tratamentos fitossanitários localizado em Piracicaba-SP e, mantida em condições de laboratório desde 2000. As populações de *B. phoenicis* coletadas em pomares comerciais com sistemas de manejo orgânico e convencional de citros do Estado de São Paulo, com respectivos históricos de uso de calda sulfocálcica e enxofre no período anterior à coleta, estão listadas nos Quadros 2.1 e 2.2, respectivamente. Os pomares comerciais de citros com sistema de manejo orgânico originaram-se da conversão em 2001 de pomares implantados a partir do sistema de manejo convencional. Para cada população, foram coletados aproximadamente 50 frutos infestados com o ácaro-da-leprose em um determinado talhão de citros.

As populações de *B. phoenicis* foram multiplicadas, em condições laboratoriais, sobre frutos de laranja das variedades Pêra Rio ou Valência livre de resíduos de agrotóxicos. Esses frutos foram lavados em água corrente e após secagem foram parafinados, deixando-se uma arena livre de parafina de aproximadamente 4 cm de diâmetro que foi delimitada com cola (Tanglefoot[®]). Antes da transferência dos ácaros, uma mistura de areia, gesso, farinha de trigo e água destilada na proporção 4:1:1:3 foi pincelada em alguns pontos da arena, com o objetivo de simular os sintomas de verrugose, que favorecem o desenvolvimento deste ácaro (CHIAVEGATO, 1986; NAKANO et al., 1987). Após a transferência dos ácaros para as arenas, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas e mantidos em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. Cada população foi iniciada com aproximadamente 300 ácaros provenientes do campo. Os frutos foram renovados a cada 20 ou 30 dias mediante sobreposição da arena do fruto novo sobre arena do fruto infestado com os ácaros.

População (denominação)	Dados da população			
	Local	Data (mês/ano)	Número médio de pulverizações/ano	
			Calda sulfocálcica	Enxofre
Org1	Bebedouro	06/2005	14,4	0
Org2	Bebedouro	06/2005	15,6	3,6
Org3	Bebedouro	06/2005	12,0	0
Org4	Guapiaçu	12/2004	7,2	0
Org5	Guapiaçu	12/2004	7,2	0
Org6	Altinópolis	06/2005	11,2	3,9
Org7	Altinópolis	06/2005	13,8	2,6
Org8	Santa Cruz do Rio Pardo	06/2006	6,5	0

Quadro 2.1 – Denominação, local, data da coleta e número médio de pulverizações com produtos a base de enxofre (calda sulfocálcica e enxofre) no período anterior à coleta de populações de *B. phoenicis* em pomares de citros com sistema de manejo orgânico do Estado de São Paulo

População (denominação)	Dados da população			
	Local	Data (mês/ano)	Número médio de pulverizações/ano	
			Calda sulfocálcica	Enxofre
Con1	Santa Cruz do Rio Pardo	07/2004	0	0,8
Con2	Santa Cruz do Rio Pardo	06/2005	0	2,0
Con3	Santa Cruz do Rio Pardo	06/2005	0	0
Con4	Itápolis	12/2004	0	5,5
Con5	Gavião Peixoto	12/2004	0	4,4
Con6	Olímpia	06/2005	-- ¹	--
Con7	Onda Verde	06/2005	0,6	4,6
Con8	Onda Verde	06/2006	0,4	3,8
Con9	Onda Verde	05/2009	0	5,0

¹Informação não disponível

Quadro 2.2 – Denominação, local, data da coleta e número médio de pulverizações com produtos a base de enxofre (calda sulfocálcica e enxofre) no período anterior à coleta de populações de *B. phoenicis* em pomares em citros com sistema de manejo convencional do Estado de São Paulo

2.2.2 Caracterização da linha-básica de suscetibilidade à calda sulfocálcica

O método de bioensaio utilizado para a caracterização da suscetibilidade de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica Fertibom[®] (200 g de enxofre/L de produto comercial - Fertibom Indústria Ltda., Catanduva-SP) foi o de contato direto e residual.

Os bioensaios foram realizados em arenas de 2,6 cm de diâmetro confeccionadas com folhas de laranjeira coletadas em um pomar sem aplicação de acaricidas. Os discos de folha foram acondicionados em placas acrílicas de 3,5 cm de diâmetro (Falcon 1008, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, Estados Unidos) contendo 2 ml de uma mistura ainda não geleificada de ágar-água na concentração de 2,0 %. Após a geleificação do substrato no fundo da placa, uma barreira ao redor dos discos de folha foi feita com a mesma mistura de ágar-água para confinamento dos ácaros, seguindo metodologia descrita por Omoto et al. (2000).

Foram transferidas 10 fêmeas adultas de *B. phoenicis* para cada arena de bioensaio. Após a transferência dos ácaros, diferentes concentrações da calda sulfocálcica foram pulverizadas na superfície adaxial dos discos de folhas com auxílio de torre de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, Herts, Reino Unido), calibrada à pressão de 10 psi (68,95 kPa). Foi utilizado um volume de 2 ml de solução na pulverização de cada arena, obtendo-se uma deposição média de resíduo úmido de 1,56 mg/cm² sobre as arenas. Após a pulverização, as arenas foram mantidas em condições ambientais até a secagem do produto. Em seguida, essas arenas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada regulada a 25 ± 1 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. A mortalidade foi avaliada 24 horas após a exposição dos ácaros à calda sulfocálcica. Para a avaliação, os ácaros foram colocados com a face ventral voltada para cima e aqueles que retornaram imediatamente à posição normal e caminharam, foram considerados vivos. As repetições que apresentaram mortalidade superior a 15% na testemunha foram descartadas, assim como aquelas cuja perda de ácaros na barreira de ágar ultrapassou 15%.

Na caracterização da curva de concentração-resposta da linhagem S foram utilizadas seis concentrações de calda sulfocálcica, espaçadas logaritmicamente entre 100 e 320 µg de enxofre/ml de água destilada [I.A. de calda sulfocálcica (ppm)].

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado e cada concentração foi repetida cinco vezes, sendo que cada repetição foi constituída por quatro arenas com dez ácaros cada. Os dados de mortalidade obtidos foram submetidos à análise de Probit, utilizando-se o programa Polo-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). A partir da curva de concentração-resposta para a linhagem S foi estimada a concentração diagnóstica de 320 ppm ($\approx CL_{95}$) para o monitoramento da suscetibilidade de populações de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica.

2.2.3 Monitoramento da suscetibilidade de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica

O monitoramento da suscetibilidade à calda sulfocálcica foi realizado em dezessete populações de *B. phoenicis*, sendo oito populações provenientes de pomares comerciais de citros com sistemas de manejo orgânico denominadas de Org1, Org2, ... e Org8 (Quadro 2.1) e nove populações provenientes de pomares convencionais denominadas de Con1, Con2, ... e Con9 (Quadro 2.2).

Para estimativa da porcentagem de sobrevivência, as populações de *B. phoenicis* foram submetidas à concentração diagnóstica de calda sulfocálcica de 320 µg de enxofre/ml de água

destilada. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado e os bioensaios para cada população foram repetidos cinco vezes, sendo que cada repetição foi constituída por quatro arenas com dez ácaros cada. Os dados de porcentagem de sobrevivência (x) obtidos para cada população foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ e submetidos à análise hierárquica de variância para comparar a porcentagem de sobrevivência das populações de *B. phoenicis* entre e dentro dos sistemas de manejo orgânico e convencional de citros. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2002).

2.2.4 Caracterização da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica

Para a obtenção da linhagem resistente à calda sulfocálcica (Calda-R), a população de *B. phoenicis* denominada Con7 que apresentou uma taxa de sobrevivência de 20,1% no monitoramento da suscetibilidade à calda sulfocálcica foi submetida à pressão de seleção com concentração diagnóstica de calda sulfocálcica de 320 ppm por uma geração em laboratório. Os ácaros sobreviventes à concentração diagnóstica de calda sulfocálcica foram resgatados e transferidos para frutos previamente preparados para multiplicação.

Na caracterização da linhagem Calda-R foram utilizadas oito concentrações de calda sulfocálcica espaçadas logaritmicamente entre 320 e 3.200 μg de enxofre/ml de água destilada.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado e cada concentração foi repetida cinco vezes, sendo que cada repetição foi constituída por quatro arenas com dez ácaros cada. Os dados de mortalidade obtidos para as linhagens S e Calda-R foram submetidos à análise de Probit e teste de paralelismo e igualdade utilizando o programa Polo-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). A partir da curva de concentração resposta para as duas linhagens, foram estimadas as CL_{50} s e seus respectivos intervalos de confiança (I.C. 95%). A razão de resistência foi obtida pela divisão da CL_{50} da linhagem Calda-R pela CL_{50} da linhagem S, e o intervalo de confiança estimado a partir do procedimento descrito por Robertson e Preisler (1992). O nível de significância do teste foi de $\alpha = 0,05$.

2.2.5 Relação de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica

O método de bioensaio utilizado para a caracterização da suscetibilidade de *B. phoenicis* ao enxofre Kumulus DF (800 g/Kg de produto comercial - Basf S.A) foi o de contato residual. Na caracterização da curva de concentração-resposta da linhagem S de *B. phoenicis* ao enxofre

foram testados 1.360 ácaros com sete concentrações de enxofre espaçadas logaritmicamente entre 100 e 320 µg de enxofre/mL de água destilada. A partir dessa caracterização foi estimada a concentração diagnóstica de 320 ppm ($\approx CL_{95}$) para isolamento de uma linhagem de *B. phoenicis* resistente ao enxofre (Enxofre-R).

Para a obtenção da linhagem Enxofre-R, a população de *B. phoenicis* denominada Con7 foi submetida à pressão de seleção com enxofre na concentração diagnóstica por uma geração em laboratório. Os ácaros sobreviventes a concentração diagnóstica de enxofre foram resgatados e transferidos para frutos previamente preparados para multiplicação. Na caracterização da linhagem Enxofre-R ao enxofre foram testados 1.373 ácaros com sete concentrações espaçadas logaritmicamente entre 320 e 4.800 µg de enxofre/ml de água destilada.

Para avaliar a relação de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica, foi conduzida a caracterização da curva de concentração-resposta da linhagem Enxofre-R à calda sulfocálcica, utilizando-se de seis concentrações de calda sulfocálcica espaçadas logaritmicamente entre 320 e 3.200 ppm (I.A).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado e cada concentração foi repetida cinco vezes para cada linhagem e produto, sendo que cada repetição foi constituída por quatro arenas com dez ácaros cada. Os dados de mortalidade das linhagens S e Enxofre-R ao enxofre e das linhagens S e Enxofre-R à calda sulfocálcica foram submetidos à análise de Probit e teste de paralelismo e igualdade utilizando o programa Polo-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). A partir da curva de concentração resposta para as duas linhagens, foram estimadas as CL_{50} s e seus respectivos intervalos de confiança (I.C. 95%) para cada produto. A razão de resistência foi obtida pela divisão da CL_{50} das linhagens Enxofre-R ou Calda-R pela CL_{50} da linhagem S para cada produto, e o intervalo de confiança estimado a partir do procedimento descrito por Robertson e Preisler (1992). O nível de significância do teste foi de $\alpha = 0,05$.

2.3 Resultados

2.3.1 Caracterização da resistência à calda sulfocálcica

A razão de resistência (I.C. 95%) estimada para linhagem Calda-R foi de 5,69 vezes (5,35 – 6,05) (Figura 2.1). A CL_{50} (I.C. 95%) estimada pela análise de Probit para a linhagem S à calda

sulfocálcica foi de 200,79 ppm (I.A.) (182,96 – 218,82), coeficiente angular (\pm desvio padrão) de 5,79 (\pm 0,29), ($\chi^2 = 12,54$; g.l. = 4; $P > 0,05$). A CL_{50} (IC 95%) estimada para a linhagem Calda-R foi de 1.142,75 ppm I.A. de calda sulfocálcica (1.033,52 – 1.268,36), coeficiente angular (\pm erro padrão da média) de 3,88 (\pm 0,15), ($\chi^2 = 16,44$; g.l. = 6; $P > 0,05$). Não foi observada sobreposição dos intervalos de confiança das CL_{50} s, indicando que as curvas de concentração-resposta são distintas, resultado confirmado pelos testes de igualdade e paralelismo, que foram rejeitados ($\chi^2 = 1.162,1$; g.l. = 2; $p < 0,05$) e ($\chi^2 = 34,65$; g.l. = 1; $p < 0,05$), respectivamente. A concentração diagnóstica de 320 ppm I.A. de calda sulfocálcica ($\approx CL_{95}$) foi definida para programas de monitoramento da suscetibilidade de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica.

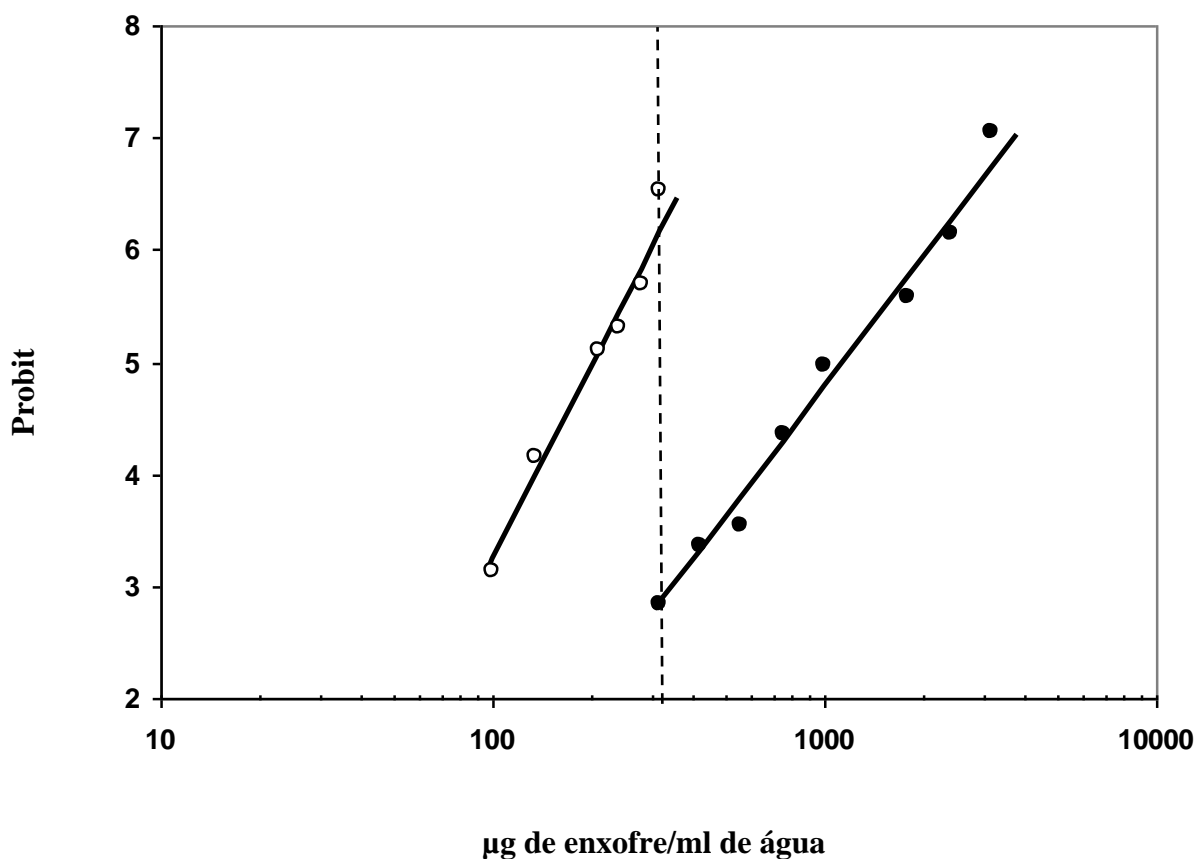


Figura 2.1 - Caracterização toxicológica das linhagens de *B. phoenicis* S (o) e Calda-R (●) à calda sulfocálcica. A linha tracejada indica a concentração diagnóstica de calda sulfocálcica (320 μg de I.A./ml de água). Razão de resistência de 5,69 vezes

2.3.2 Monitoramento da suscetibilidade à calda sulfocálcica

Os resultados do monitoramento da suscetibilidade de populações de *B. phoenicis* revelaram diferenças significativas quanto à suscetibilidade entre as populações de *B. phoenicis* ($F= 3,01$; g.l.= 15, 68; $P<0,05$). Entretanto, não houve diferença significativa na suscetibilidade à calda sulfocálcica entre o sistema de manejo orgânico e convencional de citros ($F= 0,37$; g.l.= 1, 68; $P>0,05$), com taxa de sobrevivência variando entre 0,0 e 18,4% e entre 0,5 e 20,1%, respectivamente. Tanto no sistema de manejo orgânico como no convencional três populações apresentaram taxa de sobrevivência acima de 5%. Sendo as populações Org4, Org6 e Org5 no sistema de manejo orgânico com sobrevivência de 18,4; 9,0 e 7,8%, respectivamente. E as populações Con7, Con9 e Con6 no sistema de manejo convencional com sobrevivência de 20,1; 6,9 e 6,7%, respectivamente (Figura 2.2 e Tabela 2.1).

As populações originárias de pomares de citros com sistema de manejo orgânico apresentam em seu histórico o uso intenso de produtos à base de enxofre, sendo que o número médio de pulverizações com calda sulfocálcica variou de 6,5 a 15,6 por ano, e com enxofre variou de 0 a 3,9 (Quadro 2.1). Já nas populações originárias de pomares com sistema de manejo convencional o uso de calda sulfocálcica no período anterior à coleta das populações foi reduzido, variando de 0 a 0,6 pulverizações por ano, mas as pulverizações com enxofre ainda foram intensas, variando de 0 a 5,5 (Quadro 2.2).

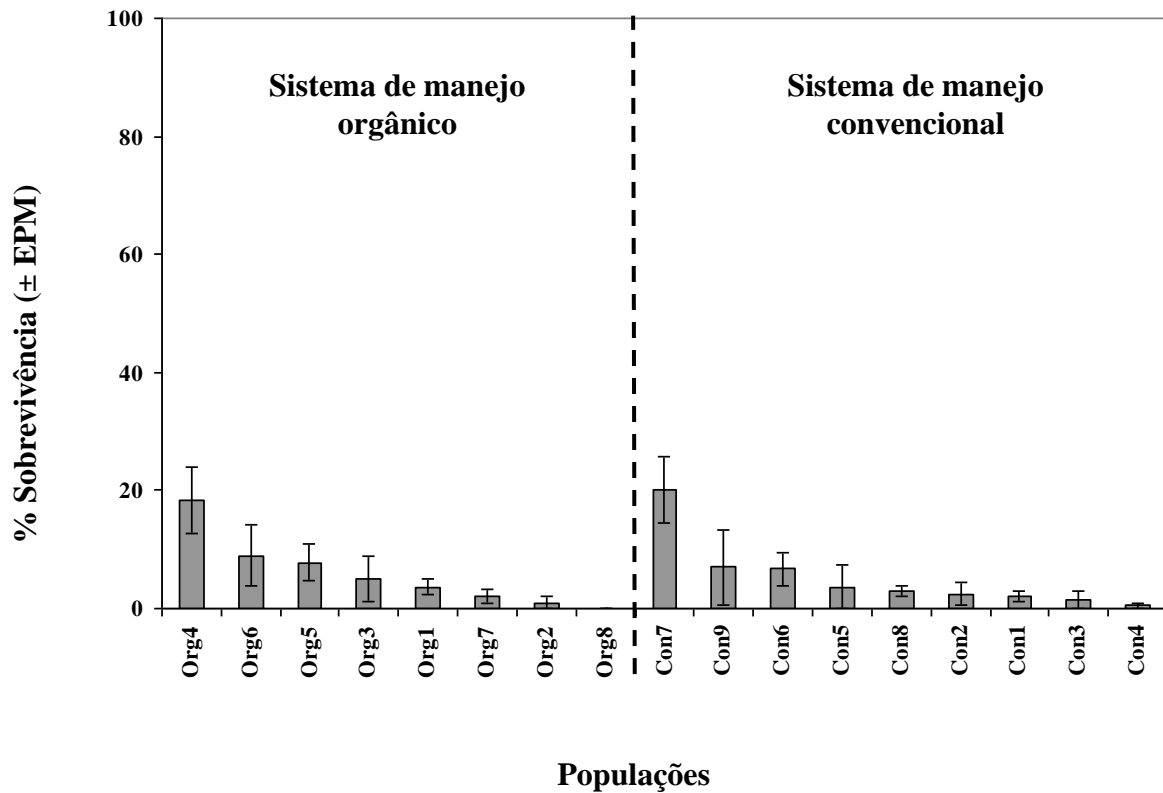


Figura 2.2 - Porcentagem média de sobrevivência (\pm erro padrão da média) de populações de *B. phoenicis* originárias de pomares comerciais com sistema de manejo orgânico e convencional de citros do Estado de São Paulo na concentração diagnóstica de calda sulfocálcica de 320 μg de enxofre/ml de água em bioensaio de contato direto e residual

Tabela 2.1 - Porcentagem média de sobrevivência (\pm erro padrão da média) de populações de *B. phoenicis* coletadas em pomares comerciais com sistema de manejo orgânico e convencional de citros do Estado de São Paulo na concentração diagnóstica de calda sulfocálcica de 320 μg de enxofre/ml de água em bioensaio de contato direto e residual

Sistema	População	n ¹	% Sobrevivência \pm EPM
Orgânico	Org 4	206	18,4 \pm 5,66 a
	Org 6	198	9,0 \pm 5,16 ab
	Org 5	194	7,8 \pm 3,01 ab
	Org 3	197	5,0 \pm 3,79 bc
	Org 1	197	3,6 \pm 1,31 bc
	Org 7	198	2,0 \pm 2,81 bc
	Org 2	199	1,0 \pm 1,00 bc
	Org 8	194	0,0 \pm 0,00 c
Convencional	Con 7	199	20,1 \pm 5,53 a
	Con 9	196	6,9 \pm 6,38 b
	Con 6	193	6,7 \pm 2,75 b
	Con 5	198	3,7 \pm 3,68 b
	Con 8	198	3,0 \pm 0,95 b
	Con 2	198	2,5 \pm 1,94 b
	Con 1	198	2,0 \pm 0,94 b
	Con 3	199	1,5 \pm 1,50 b
Con 4	196	0,5 \pm 0,50 b	

¹Número de ácaros testados

Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada sistema de manejo, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

2.3.3 Relação de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica

A razão de resistência (I.C 95%) estimada para linhagem Enxofre-R foi de 10,77 vezes (10,18 – 11,39) (Figura 2.3). A CL₅₀ (I.C. 95%) estimada a partir da curva de concentração-resposta da linhagem S ao enxofre foi de 170,96 ppm (I.A.) (161,64 – 180, 43), coeficiente angular (\pm desvio padrão) de 7,53 (\pm 0,36), ($\chi^2 = 13,54$; g.l. = 5; $P > 0,05$). A CL₅₀ (IC 95%) estimada para a linhagem Enxofre-R ao enxofre foi de 1.841,23 ppm (I.A.) (1.519,69 – 2.323,06),

coeficiente angular (\pm erro padrão da média) de 1,99 (\pm 0,11), ($\chi^2 = 13,99$; g.l. = 5; $P > 0,05$). Não foi observada sobreposição dos intervalos de confiança das CL_{50} s, indicando que as curvas de concentração-resposta ao enxofre são distintas, resultado confirmado pelos testes de igualdade e paralelismo que foram rejeitados ($\chi^2 = 1.075,9$; g.l. = 2; $p < 0,05$) e ($\chi^2 = 278,11$; g.l. = 1; $p < 0,05$), respectivamente.

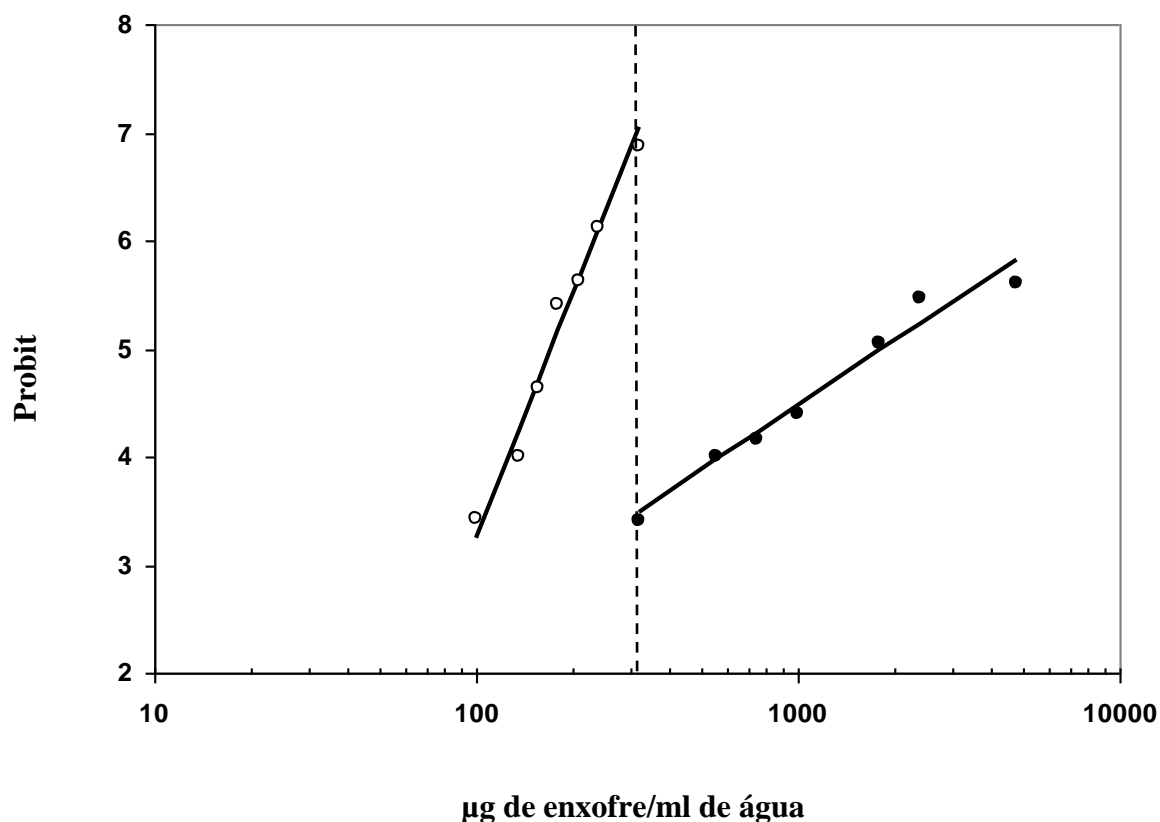


Figura 2.3 - Caracterização toxicológica das linhagens S (o) e Enxofre-R (●) de *B. phoenicis* ao enxofre com bioensaio de contato residual. A linha tracejada indica a concentração diagnóstica de enxofre (320 µg de I.A./ml de água). Razão de resistência de 10,77 vezes

Resistência cruzada positiva foi verificada entre enxofre e calda sulfocálcica. Revelando que a evolução da resistência de *B. phoenicis* ao enxofre afeta a suscetibilidade de populações de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica. A CL_{50} (I.C. 95%) estimada para a linhagem Enxofre-R à calda

sulfocálcica foi de 921,06 ppm (I.A.) (773,17 – 1.068,32), coeficiente angular (\pm desvio padrão) de 2,71 (\pm 0,15), ($\chi^2 = 8,01$; g.l. = 4; $P > 0,05$). Não foi observada sobreposição dos intervalos de confiança das CL_{50} , indicando que as curvas de concentração-resposta das linhagens S e Enxofre-R à calda sulfocálcica são distintas, resultado confirmado pelos testes de igualdade e paralelismo que foram rejeitados ($\chi^2 = 558,04$; g.l.= 2; $p < 0,05$) e ($\chi^2 = 92,73$; g.l.= 1; $p < 0,05$), respectivamente. A intensidade de resistência cruzada (I.C.95%) verificada entre enxofre e calda sulfocálcica foi de 4,59 vezes (4,32 – 4,88) (Tabela 2.2 e Figura 2.4). Devido à resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica, a concentração diagnóstica de 320 ppm I.A. de enxofre ($\approx CL_{95}$) foi definida para futuros trabalhos de monitoramento da suscetibilidade de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica, utilizando-se enxofre.

Tabela 2.2 - Respostas das linhagens de *B. phoenicis* S, Calda-R e Enxofre-R à calda sulfocálcica com bioensaio de contato direto e residual

Linhagem	n ¹	CL ₅₀ (µg I.A./ml) (IC 95%)	Coeficiente Angular (\pm EP)	χ^2	g.l. ²	RR ³ (I.C. 95%)
S	1.149	200,79 (182,96 – 218,82)	5,79 \pm 0,29	12,54	4	--
Calda-R	1.585	1.142,75 (1.033,52 – 1.268,36)	3,88 \pm 0,15	18,93	6	5,69 (5,35 – 6,05)
Enxofre- R	1.109	921,06 (773,17 – 1.068,32)	2,71 \pm 0,15	8,01	4	4,59 (4,32 – 4,88)

¹ Número de ácaros testados

² Graus de liberdade

³ Razão de resistência

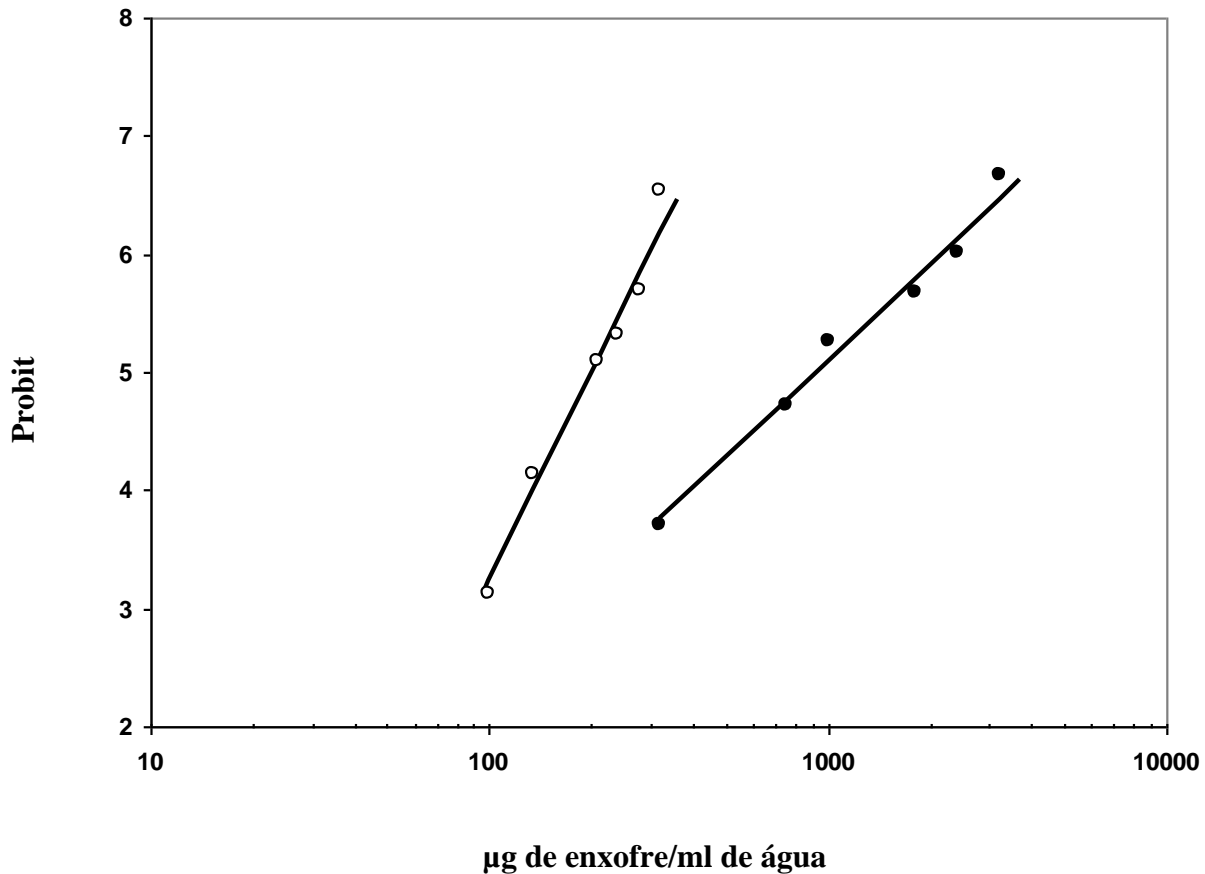


Figura 2.4 - Caracterização toxicológica das linhagens S (○) e Enxofre-R (●) de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica com bioensaio de contato direto e residual. Intensidade de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica de 4,59 vezes

2.4 Discussão

O número de pulverizações com calda sulfocálcica no sistema de manejo orgânico foi superior ao no convencional. Entretanto, não foi possível associar o regime de uso de calda sulfocálcica com a porcentagem de sobrevivência na concentração diagnóstica de 320 ppm de I.A. de calda sulfocálcica para as populações de *B. phoenicis* testadas. Por exemplo, tanto a população Org4 como a Org8 foram submetidas a um número médio de pulverizações com calda sulfocálcica muito próximos de 7,2 e 6,5 por ano, respectivamente (Quadro 2.1), mas apresentaram porcentagens de sobrevivência distintas de 18,4 e 0,0%, respectivamente. Dessa forma, alguns outros fatores podem estar associados à pressão de seleção com calda sulfocálcica

e assim favorecendo a evolução da resistência de *B. phoenicis* a esse produto em pomares de citros.

Um dos fatores que podem favorecer a evolução da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica, tanto em pomares de citros com sistema de manejo orgânico que se originaram da conversão do sistema convencional, como no próprio sistema de manejo convencional, são as relações de resistência cruzada entre os produtos alternativos à base de enxofre (calda sulfocálcica e enxofre elementar) e os acaricidas convencionais que atuam como inibidores da respiração celular. Franco et al. (2007) constataram a resistência cruzada entre acaricidas inibidores da respiração celular utilizados na citricultura em *B. phoenicis*, sendo que, as intensidades de resistência entre o acaricida propargite e os demais acaricidas inibidores da respiração celular azocyclotin, cyhexatin, dinocap e pyridaben, e mesmo o acaricida alternativo enxofre, foram de 1,8; 4,6; 3,5; 3,5 e >111 vezes, respectivamente. Casarin et al. (2004) detectaram resistência cruzada entre propargite e calda sulfocálcica de 4,6 vezes. No presente trabalho foi constatada uma intensidade de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica de 4,59 vezes. Portanto, a evolução da resistência de *B. phoenicis* ao enxofre e ao acaricida propargite reduziu a suscetibilidade desse ácaro à calda sulfocálcica, afetando assim a eficiência da calda sulfocálcica no controle *B. phoenicis* na citricultura e favorecendo a evolução da resistência à calda sulfocálcica.

Levando-se em consideração ainda que, entre os ingredientes ativos registrados para o controle do ácaro-da-leprose na cultura dos citros, quase a metade interfere na respiração celular (incluindo os acaricidas do grupo dos organoestânicos, além de propargite, chlorfenapyr, dinocap, pyridaben, fenpyroximate e enxofre) (MAPA, 2009). A pressão de seleção exercida por acaricidas inibidores da respiração celular sobre *B. phoenicis* é muito elevada na citricultura. Dessa forma, talvez a evolução da resistência à calda sulfocálcica em algumas populações de *B. phoenicis*, não esteja apenas relacionada ao regime de uso da mesma, mas sofra grande influência da pressão de seleção exercida indiretamente por acaricidas convencionais inibidores da respiração celular. Segundo Vieira et al. (2010), os pomares orgânicos, na sua maioria, originam-se da conversão de pomares convencionais, pois o risco para formação de um pomar orgânico é muito maior que a conversão. Nos primeiros anos as plantas ficam muito suscetíveis às doenças, exigindo tratamentos fitossanitários. Sendo assim, seria mais seguro formar o pomar seguindo o manejo convencional, e depois convertê-lo para o cultivo orgânico, quando o pomar estiver com

aproximadamente cinco anos. Portanto, ao longo dessa etapa de formação do pomar, o ácaro-da-leprose está sujeito a pressão de seleção exercida por acaricidas convencionais, entre os quais estão os inibidores da respiração celular.

Há ainda fatores associados à calda sulfocálcica que podem estar contribuindo para retardar ou evitar a evolução da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica em algumas populações. Entre esses fatores estão a baixa ação ovicida da calda sulfocálcica sobre *B. phoenicis* (PATTARO et al., 2004), e a baixa persistência da atividade biológica da calda sulfocálcica observada em trabalho conduzido em campo, onde foi constatada uma mortalidade de adultos de *B. phoenicis* abaixo de 50% aos 5 dias após a pulverização com calda sulfocálcica. Devido à baixa persistência da calda sulfocálcica, a pressão de seleção exercida por esse produto não seria tão intensa em algumas situações. Entretanto, segundo Taylor e Georghiou (1982), agrotóxicos de baixa persistência podem exigir aplicações mais frequentes devido à rápida reinfestação da praga, o que comprometeria ou mesmo anularia todo o potencial benéfico da baixa persistência no ambiente. Situações como essa de pulverizações em intervalos muito curtos podem ser observadas para a calda sulfocálcica em algumas populações de *B. phoenicis*. E foram também relatadas por Pattaro (2006), que na condução de experimento em campo precisou realizar 10 pulverizações de calda sulfocálcica para o controle do ácaro-da-leprose, contra apenas 3 do acaricida convencional spirodiclofen ao longo de 16 meses. No entanto, mesmo com 10 aplicações de calda sulfocálcica, a infestação de *B. phoenicis* manteve-se sempre próxima ao nível de controle, evidenciando o curto período residual do produto.

A variabilidade na suscetibilidade de ácaros a produtos à base de enxofre foi constatada também por Hoy e Standow (1982) que avaliaram a suscetibilidade do inimigo natural *Metaseiulus* [= *Galandromus* = *Thyphlodromus*] *occidentalis* Nesbitt (Acari: Phytoseiidae) a diferentes formulações de enxofre e à calda sulfocálcica. Franco et al. (2007) constataram variabilidade na suscetibilidade ao enxofre em populações de *B. phoenicis* coletadas em campo na concentração diagnóstica de 1.800 ppm (I.A) de enxofre, com taxa de sobrevivência variando de 9,0 a 82,6%.

No presente trabalho foi possível comprovar a presença de variabilidade na resposta à calda sulfocálcica em populações de *B. phoenicis*, bem como o isolamento e caracterização da resistência de *B. phoenicis* a esse produto. No entanto, como a padronização da qualidade da calda sulfocálcica pode variar de lote para lote e a confirmação da resistência cruzada entre

enxofre e calda sulfocálcica em *B. phoenicis*, o monitoramento da suscetibilidade de populações de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica pode ser realizada com enxofre, por ser um produto de melhor controle de qualidade e possibilitar boa discriminação entre as linhagens S e Calda-R. Segundo French-Constant e Roush (1990) um método de bioensaio adequado para avaliação da suscetibilidade deve maximizar as diferenças entre os indivíduos suscetíveis e resistentes e aumentar a magnitude (razão de resistência) entre os genótipos e/ou aumentar o coeficiente angular da curva de concentração-resposta. Para atender aos requisitos citados acima, o melhor agrotóxico não precisa, necessariamente, ser o que é utilizado em campo para o controle da praga.

Baseado nos resultados obtidos no presente trabalho, as estratégias de manejo de *B. phoenicis* com calda sulfocálcica, tanto em pomares com sistema de manejo de citros orgânico como convencional, precisam ser repensadas e planejadas para evitar a evolução da resistência. Além disso, o impacto da calda sulfocálcica sobre os agentes de controle biológico também deve ser estudado para a avaliação dos benefícios desse produto no manejo de *B. phoenicis* na cultura dos citros.

2.5 Conclusões

- Há variabilidade na suscetibilidade de populações de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica;
- Não há diferença na suscetibilidade à calda sulfocálcica entre populações de *B. phoenicis* coletadas em pomares de citros com sistema de manejo orgânico e convencional;
- Há resistência cruzada entre calda sulfocálcica e enxofre.

Referências

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

CASARIN, N.F.B.; FRANCO, C.R.; ALVES, E.B.; OMOTO, C. Resistência do ácaro-da-leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) à calda sulfocálcica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., 2004, Gramado **Resumos...** Gramado, 2004. p. 516.

CHIAVEGATO, L.G. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.8, p. 13-816, 1986.

CROFT, B.A. **Arthropod biological control and agents pesticides**. New York: Wiley Interscience, 1990. 723 p.

FFRENCH-CONSTANT, R.H.; ROUSH, R.T. Resistance detection and documentation: The relative roles of pesticidal and biochemical assay. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. cap.2 p.4-48.

FRANCO, C.R.; CASARIN, N.F.B.; DOMINGUES, F.A.; OMOTO, C. Resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) a acaricidas inibidores da respiração celular em citros: resistência cruzada e custo adaptativo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.36, n.4, p.565-576, 2007.

GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.) **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p.769-792.

HELLE, W.; BOLLAND, H.R.; HEITMANS, W.R.B. Chromosomes and types of parthenogenesis in the fase spider mites (Acari: Tenuipalpidae). **Genetica**, Dordrecht, v.54, n.1, p.45-50, 1980.

HOY, M.A.; STANDOW, K.A. Inheritance of resistance to sulfur in the spider mite predator *Metaseiulus occidentalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.31, p.316-323, 1982.

LEORA SOFTWARE. **POLO-PC**: a user's guide to Probit or logit analysis. Berkeley, 1987. 20 p.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2009. AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

NAKANO, O.; SANCHEZ, G.A.; ISHIDA, A.K. Redução na infestação do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros através do controle da verrugose. **Laranja**, Cordeirópolis, v.8, p.19-33, 1987.

OMOTO, C. Acaricide resistance management of leprosis mite (*Brevipalpus phoenicis*) in brazilian citrus. **Pesticide Science**, Oxford, v.52, p.189-198, 1998.

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

PATTARO, F.C. **Aspectos técnicos e econômicos da poda e do controle químico no manejo da leprose dos citros**. 2006. 140 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Entomologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

PATTARO, F.C.; OLIVEIRA, C.A.L.; OLIVEIRA, M.L. Eficiência de calda sulfocálcica por ação residual, tópica e ovicida no controle de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) sobre frutos de citros, em laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., 2004, Gramado **Resumos...** Gramado, 2004. p.168.

PENTEADO, S.R **Uso da calda sulfocálcica no controle alternativo de ácaros na citricultura**. Disponível em:<<http://www.agroorganica.com.br>>. Acesso em: 3 set. 2004.

ROBERTSON, J.L.; H.K. PREISLER. **Pesticide bioassay with arthropods**. Boca Ranton: CRC Press, 1992. 127p.

SAS INSTITUTE INC. 2002. SAS/STAT: **user’s guide**. Version 8. : Cary, NC :SAS Institute, 2002.

TAYLOR, C.E.; GEORGHIU, G.P. Influence of pesticide persistence in the evolution of resistance. **Environmental Entomology**, College Park, v.11, n.3, p.746-750, 1982.

VIEIRA, A.C.; RODRIGUES, I.C.; ALVES, F.J.C. **Desenvolvimento de atributos visando o mercado externo: o suco de laranja orgânico – Estudo de caso**. Disponível em:<http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGERP2000_E0062.PDF>. Acesso em 13 jan. 2010.

ZEHNDER, G.; GURR, G.M.; KUHNE, S.; WADE, M.R.; WRATTERN, S.D.; WYSS, E. Arthropod pest management in organic crops. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.52, p.57-80, 2007.

3 IMPACTO DA TOXICIDADE DE CALDA SULFOCÁLCICA NA EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA EM *Brevipalpus phoenicis* (ACARI: TENUIPALPIDAE)

Resumo

A calda sulfocálcica tem sido bastante utilizada para o controle de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) em pomares de citros no Brasil, principalmente, em sistemas de produção orgânica. Devido ao intenso uso desse produto, a resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica já foi detectada. Para uma melhor compreensão do impacto da toxicidade da calda sulfocálcica na evolução da resistência, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade da calda sulfocálcica na demografia de três linhagens de *B. phoenicis*, uma suscetível de referência (S), uma resistente à calda sulfocálcica (Calda-R), e outra resistente ao enxofre (Enxofre-R), que apresentou resistência cruzada com a calda sulfocálcica. A avaliação foi realizada com bioensaio de contato direto e residual com a exposição de fêmeas adultas de *B. phoenicis* as concentrações de calda sulfocálcica de 0, 56, 100, 180, 240, 320, 600, 1.800, 3.000 e 6.000 µg de enxofre/ml de água [(ppm) I.A.]. Os bioensaios foram conduzidos em frutos parafinados de laranja, deixando-se uma arena de 4 cm de diâmetro para a colonização do ácaro. Antes da pulverização das diferentes concentrações da calda sobre o fruto, 5 fêmeas adultas de *B. phoenicis* foram transferidas por arena. A avaliação foi baseada na estimativa das taxas instantâneas de crescimento (r_i) após um período de tempo de 25 dias. A r_i diminuiu com o aumento das concentrações de calda sulfocálcica para todas as linhagens de *B. phoenicis*. As linhagens Calda-R e Enxofre-R apresentaram crescimento positivo mesmo nas concentrações de calda sulfocálcica de 3.000 e 6.000 ppm (equivalentes a 50 e 100% da concentração de calda sulfocálcica recomendada), enquanto que a linhagem S foi extinta a partir da concentração de 3.000 ppm. Verificou-se que há discriminação entre as linhagens suscetível S e as resistentes Calda-R e Enxofre-R, a partir das concentrações de 320 e 240 ppm, respectivamente. A redução significativa no crescimento populacional da linhagem S em relação às linhagens resistentes possibilita a evolução da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica.

Palavras-chave: Ácaro-da-leprose; Controle químico; Citros orgânico; Ecotoxicologia; Taxa instantânea de crescimento

IMPACT OF LIME SULFUR TOXICITY ON RESISTANCE EVOLUTION IN *Brevipalpus phoenicis* (ACARI: TENUIPALPIDAE)

Abstract

The lime sulfur has been intensively used for controlling *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) in Brazilian citrus groves, mainly in organic production systems. Due to high use of this product, resistance to lime sulfur has already been detected in *B. phoenicis*. To better understand the impact of the lime sulfur toxicity in the resistance evolution, the objective of this research was to evaluate the toxicity of the lime sulfur in the demography of three strains of *B. phoenicis*, that is, one susceptible reference (S), one lime sulfur-resistant (Lime-R) and sulfur-resistant (Sulfur-R) which showed cross-resistant to lime sulfur. A residual and direct contact bioassay was used to evaluate the exposure of *B. phoenicis* at concentrations of 0, 56, 100, 180, 240, 320, 600, 1.800,

3.000 and 6.000 μg of sulfur/ml of distilled water (ppm). The bioassays were performed with waxed citrus fruits by leaving an arena of 4 cm diameter for mite rearing. Before spraying different concentrations of lime sulfur on the fruit, 5 adult females of *B. phoenicis* were transferred onto each arena. The evaluation was based on estimation of the instantaneous rate of increase (r_i) after time interval of 25 days. The r_i decreased with the increase of lime sulfur concentrations to all strains. The Lime-R and Sulfur-R strains showed positive population growth, even at concentrations of 3,000 and 6,000 ppm (equivalent to 50 and 100% of recommended rate), while the S strain was extinct from concentration of 3,000 ppm of lime sulfur. Discrimination between the S strain and the resistant strains Lime-R and Sulfur-R from concentrations of 320 and 240 ppm respectively, due to significant decrease in the population growth of S strain relative to the resistant strains, and thus allowing resistance evolution of *B. phoenicis* to lime sulfur.

Keywords: Flat mite; Chemical control; Organic citrus; Ecotoxicology; Instantaneous rate of increase

3.1 Introdução

A calda sulfocálcica tem sido intensamente utilizada para o controle do ácaro-da-leprose, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), principalmente, em pomares de citros com sistema de manejo orgânico no Brasil, atingindo uma média de 11 pulverizações por ano. No entanto, apesar do intenso uso de calda sulfocálcica no controle de *B. phoenicis*, e da detecção da evolução da resistência de *B. phoenicis* a esse produto, bem como a presença de resistência cruzada entre enxofre e calda sulfocálcica (Capítulo 2), estudos relacionados à avaliação do impacto da toxicidade da calda sulfocálcica na demografia do ácaro-da-leprose, e mesmo de outras pragas, são escassos.

Para avaliar a toxicidade de agrotóxicos a artrópodes tem-se utilizado, comumente, apenas as estimações de concentrações letais (CLs) (OVERMEER; VAN ZON, 1981; STARK; RANGUS, 1994). A importância desses testes tradicionais de toxicidade amplamente empregados é inegável. Entretanto, recentemente, trabalhos têm demonstrado que o uso de concentrações letais não permitem avaliar completamente o impacto dos agrotóxicos sobre os organismos (FORBES; CALOW, 1999; STARK; BANKEN, 1999; STARK; BANKS, 2003). As CLs são estimadas a partir de observações dos indivíduos num único estágio de desenvolvimento e por um curto período de tempo, não permitindo assim, supor o efeito sobre a população do organismo (STARK et al., 1997).

Ecologistas e ecotoxicologistas têm chamado a atenção para a utilização de testes de avaliação de toxicidade mais realísticos do que os tradicionalmente utilizados, baseados na estimativa de CLs (VAN LEEUWEN et al., 1985; VAN DER HOEVEN, 1990; SEITZ; RATTE 1991; CROMMENTUIJIN et al., 1995; BEACHMAN, 1994; KAMMENGA et al., 1996; KAREIVA et al., 1996). Nesse aspecto, uma abordagem que vem ganhando popularidade em ecotoxicologia é o uso de parâmetros demográficos como representantes do efeito toxicológico (DANIELS; ALLAN, 1981; VAN LEEUWEN et al., 1985; BEACHMANN, 1994; KAMMENGA et al., 1996; CALOW et al., 1997; WALTHALL; STARK, 1997a,b). Análises toxicológicas demográficas parecem superar alguns dos problemas associados às análises toxicológicas tradicionais. Pois, a determinação da taxa de crescimento populacional é obtida levando-se em consideração o efeito total de um produto químico (efeito letal e subletal) (STARK; BANKEN, 1999).

A taxa de crescimento populacional e, especialmente, a taxa intrínseca de crescimento (r_m) tem sido recomendada, juntamente com a estimativa de concentrações letais (CLs) para avaliar o efeito tóxico dos compostos químicos de maneira mais precisa sobre os níveis populacionais (STARK et al., 1997; WALTHALL; STARK, 1997a; FORBES; CALOW, 1999). Entretanto, o cálculo da r_m é demorado e requer estudos de tabela de vida e fertilidade. Desta forma, uma simplificação da estimativa de crescimento populacional foi proposta por Hall (1964), mediante a utilização da taxa instantânea de crescimento (r_i), que tem se mostrado muito robusta (HALL, 1964; STARK et al. 1997; WALTHALL; STARK, 1997b; STARK; BANKEN, 1999; STARK; BANKS 2003).

A estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) poderia permitir uma melhor compreensão do impacto da toxicidade de calda sulfocálcica na evolução da resistência de *B. phoenicis*, pois refletiria de forma mais realística o impacto desse produto nos níveis populacionais do ácaro-da-leprose. Dessa forma, diante da ausência de trabalhos que avaliam a toxicidade da calda sulfocálcica na dinâmica populacional de *B. phoenicis*, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto da toxicidade da calda sulfocálcica na evolução da resistência de *B. phoenicis*, mediante estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) sobre linhagens suscetível e resistentes de *B. phoenicis* expostas a diferentes concentrações de calda sulfocálcica para simular a degradação que ocorre em condições de campo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Linhagens e criação de *B. phoenicis*

As linhagens de *B. phoenicis* utilizadas no estudo foram suscetível (S), resistente à calda sulfocálcica (Calda-R), e resistente ao enxofre (Enxofre-R), conforme descritas no Capítulo 2. Essas linhagens foram multiplicadas em condições laboratoriais sobre frutos de laranja das variedades Pêra Rio ou Valência. Os frutos foram lavados em água corrente e após a secagem foram parafinados, deixando-se uma arena livre da parafina de, aproximadamente, 4 cm de diâmetro delimitada com cola (Tanglefoot[®]). Antes da transferência dos ácaros, uma mistura de areia, gesso, farinha de trigo e água destilada na proporção 4:1:1:3 foi pincelada em alguns pontos da arena, com o objetivo de simular os sintomas de verrugose, que favorecem o desenvolvimento deste ácaro (CHIAVEGATO, 1986; NAKANO et al., 1987). Após a transferência dos ácaros para as arenas, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas mantidas em sala climatizada à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. Os frutos foram renovados a cada 20 ou 30 dias mediante sobreposição da arena do fruto novo sobre arena do fruto infestado com os ácaros, para que estes se deslocassem para o fruto novo.

3.2.2 Determinação de período de avaliação (Δt) para estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) de *B. phoenicis*

A estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) em diferentes períodos de avaliação foi realizada com a linhagem S de *B. phoenicis*. Frutos de laranja (variedade Pêra) livres de resíduo de agrotóxicos foram lavados, e após secagem, parafinados em aproximadamente 2/3 de sua área. Na área livre de parafina foi construída uma arena circular de 4 cm de diâmetro com cola (Tanglefoot[®]) para o confinamento dos ácaros. Foram transferidas 5 fêmeas adultas de *B. phoenicis* no início da fase reprodutiva (fêmeas entre 1 e 5 dias de idade) por arena. Esses frutos foram mantidos em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. A avaliação do crescimento populacional foi realizada após 18, 20, 22, 25 e 30 dias da transferência dos ácaros nas arenas.

Para cada período de avaliação (Δt) foi registrado o número total de ovos, imaturos e adultos em cada fruto para a estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) pela equação $r_i = [\ln (N_f / N_o)] / \Delta t$, onde N_f é o número final de indivíduos vivos, N_o é o número inicial de

indivíduos vivos e Δt é o intervalo de tempo (dias) entre o início e término do bioensaio (STARK et al., 1997; WALTHALL; STARK, 1997b).

Cada fruto constituiu-se em uma repetição, sendo que cada período de avaliação (Δt) foi composto por 18 repetições. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado. As taxas instantâneas de crescimento (r_i) estimadas para os diferentes períodos de avaliação (Δt) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2002).

3.2.3 Impacto da toxicidade da calda sulfocálcica na demografia de *B. phoenicis*

A avaliação do efeito da calda sulfocálcica na demografia de *B. phoenicis* foi realizada com as linhagens S, Calda-R e Enxofre-R sobre frutos de laranja. A calda sulfocálcica utilizada foi a Fertibom[®] (200 g de enxofre/L de produto comercial - Fertibom Indústria Ltda., Catanduva-SP). As concentrações de calda sulfocálcica testadas foram 56, 100, 180, 240, 320, 600, 1.800, 3.000 e 6.000 ppm (I.A.), baseadas nas curvas de concentração-resposta das linhagens S, Calda-R e Enxofre-R (Capítulo 2). As concentrações de 600, 3.000 e 6.000 μg de enxofre/ml de água correspondem a 10, 50 e 100% da concentração de calda sulfocálcica recomendada para o controle do ácaro-da-leprose, respectivamente.

Frutos de laranja foram parafinados, deixando-se uma arena circular de 4 cm de diâmetro que foi delimitada com cola adesiva (Tanglefoot[®]) para o confinamento dos ácaros. Após a transferência de 5 fêmeas adultas de *B. phoenicis* no início da fase reprodutiva (fêmeas entre 1 e 5 dias de idade) por fruto, os frutos foram pulverizados com o auxílio de torre de pulverização de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, Herts, Reino Unido) calibrada à pressão de 10 psi (68,95 kPa). Um volume de 2 ml de solução foi utilizado em cada fruto obtendo-se uma deposição de resíduo úmido de 1,56 mg/cm². Após pulverização, esses frutos foram mantidos em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. Cada fruto constituiu-se em uma repetição, sendo que foram realizadas 10 repetições por tratamento. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado.

O número total de ovos, imaturos e adultos de cada fruto foi contabilizado após 25 dias (Δt) da transferência dos ácaros nas arenas para a determinação da taxa instantânea de crescimento (r_i) estimada pela equação $r_i = [\ln (N_f / N_o)] / \Delta t$ (STARK et al., 1997; WALTHALL; STARK, 1997b).

Os valores de N_f foram transformados pela somatória de 0,1 devido à presença de N_f igual a zero e N_f maior que zero num mesmo tratamento, pois quando N_f é igual a zero não é possível estimar a taxa instantânea de crescimento (r_i) através da equação ($r_i = [\ln (N_f / N_o)] / \Delta t$) (STARK; BANKEN, 1999). Após transformação os valores de N_f foram submetidos à análise de variância com interação baseada nos postos (ANOVA_R) e as médias de N_f comparadas pelo teste de Dunnett em relação ao controle dentro de cada linhagem, e teste de Tukey para a comparação entre as linhagens ($\alpha = 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2002).

Os valores de r_i também foram comparados, sendo que r_i positivo indicou crescimento populacional, o r_i igual a zero indicou estabilidade populacional e o r_i negativo indicou uma população em declínio e caminhando para a extinção, que ocorre quando N_f é igual a zero (HALL, 1964; WALTHALL; STARK, 1997).

3.3 Resultados

3.3.1 Determinação de período de avaliação (Δt) para estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) para *B. phoenicis*

Foram observadas diferenças significativas nas taxas instantâneas de crescimento (r_i) estimadas nos diferentes períodos de avaliação (Δt) ($F= 16,30$; g.l.= 4, 85; $P<0,05$) (Tabela 3.1). Para os períodos de avaliação (Δt) de 22, 25 e 30 dias, os r_i s foram de $0,131 \pm 0,004$; $0,118 \pm 0,003$ e $0,120 \pm 0,003$, respectivamente. Estes valores foram bastante próximos das taxas intrínsecas de crescimento (r_m) obtidas por Teodoro e Reis (2006), Campos (2006) e Franco et al. (2007) que estimaram valores de r_m de 0,128; 0,99 e 0,100 para *B. phoenicis* criados em frutos de laranja à 25°C. Dessa forma, como o r_i para o Δt de 22 dias não diferiu do Δt de 20 dias; e o r_i para o Δt de 30 dias é difícil de ser estimado em função da maior possibilidade de deterioração dos frutos, o período de avaliação (Δt) de 25 dias foi definido como ideal para a estimativa de taxa instantânea de crescimento (r_i) de *B. phoenicis*.

Tabela 3.1 - Médias das taxas instantâneas de crescimento (r_i) (\pm erro padrão da média) estimadas para a linhagem suscetível de resistência (S) em diferentes períodos de avaliação (Δt)

Período de avaliação em dias (Δt)	Taxa instantânea de crescimento (r_i)
18	0,152 \pm 0,004a
20	0,143 \pm 0,004ab
22	0,131 \pm 0,004bc
25	0,118 \pm 0,003c
30	0,120 \pm 0,003c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

3.3.2 Impacto da toxicidade da calda sulfocálcica na demografia de *B. phoenicis*

Foram detectadas diferenças significativas para o N_f (número final de ácaros vivos) entre as linhagens ($F=30,66$; g.l. = 2, 270; $P<0,05$), entre as concentrações ($F=13,80$; g.l. = 9, 270; $P<0,05$) e houve interação entre linhagem e concentração ($F=4,81$; g.l. = 18, 270; $P<0,05$). O aumento na concentração de calda sulfocálcica proporcionou uma redução no N_f , que conseqüentemente, afetou negativamente a taxa instantânea de crescimento (r_i) nas três linhagens de *B. phoenicis* avaliadas (S, Calda-R e Enxofre-R) (Figura 3.1 e Tabela 3.2).

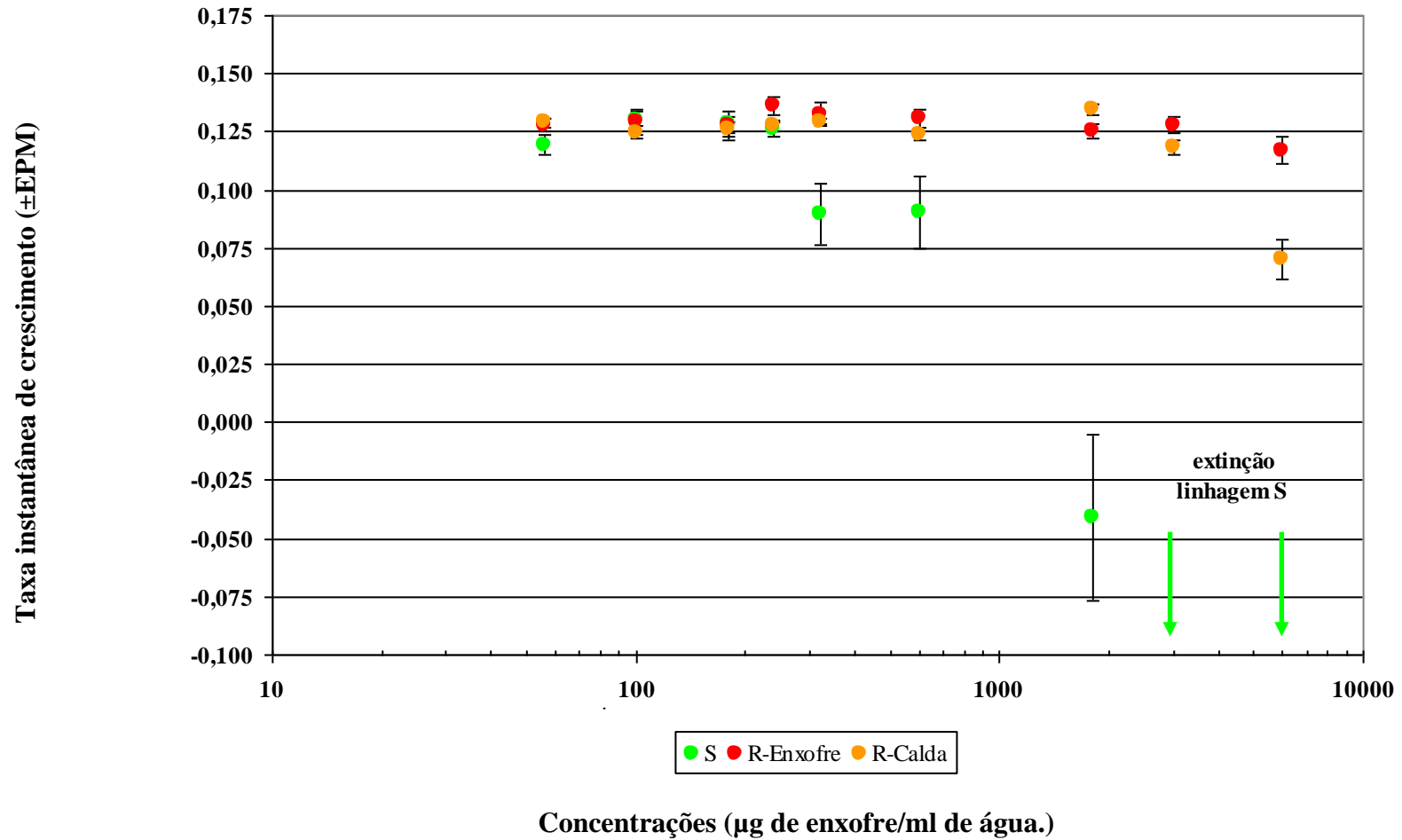


Figura 3.1 - Taxa instantânea de crescimento média (r_i) (\pm EPM) para as linhagens de *B. phoenicis* S, Enxofre-R e Calda-R sobre efeito de diferentes concentrações de calda sulfocálcica de 56, 100, 180, 240, 320, 600, 1800, 3000 e 6000 μg de enxofre/ml de água. Setas indicam a extinção da linhagem S de *B. phoenicis*

Tabela 3.2 - Número final de indivíduos (N_f) e taxa instantânea de crescimento (r_i) após 25 dias da pulverização para a avaliação do impacto da toxicidade de calda sulfocálcica na demografia das linhagens S, Calda-R e Enxofre-R de *B. phoenicis*

Concentração ($\mu\text{g I.A./ml}$)	Linhagens de <i>B. phoenicis</i>						
	S		Calda-R		Enxofre-R		
	N_f^1	r_i^2	N_f	r_i	N_f	r_i	
0	161,3 \pm 9,01 a	0,138 \pm 0,002	126,6 \pm 5,50 b	0,129 \pm 0,002	144,5 \pm 6,61 ab	0,134 \pm 0,002	
56	103,8 \pm 10,74* a	0,119 \pm 0,004	126,7 \pm 6,50 a	0,129 \pm 0,002	124,3 \pm 7,54 a	0,128 \pm 0,003	
100	133,2 \pm 12,32* a	0,130 \pm 0,004	115,2 \pm 6,72 a	0,125 \pm 0,002	137,5 \pm 20,04 a	0,129 \pm 0,005	
180	127,0 \pm 9,75* a	0,128 \pm 0,003	119,2 \pm 8,91 a	0,126 \pm 0,003	132,8 \pm 17,88 a	0,127 \pm 0,006	
240	119,5 \pm 9,11* b	0,126 \pm 0,003	123,6 \pm 6,18 ab	0,128 \pm 0,002	156,7 \pm 14,89 a	0,136 \pm 0,004	
320	67,9 \pm 14,51* b	0,089 \pm 0,013	127,0 \pm 3,86 a	0,129 \pm 0,001	146,2 \pm 16,5 a	0,132 \pm 0,005	
600	71,4 \pm 15,60* b	0,090 \pm 0,016	113,3 \pm 7,45 ab	0,124 \pm 0,003	136,9 \pm 12,27 a	0,131 \pm 0,004	
1.800	19,8 \pm 10,33* c	-0,041 \pm 0,036	146,0 \pm 7,65 a	0,134 \pm 0,002	117,3 \pm 8,10 b	0,125 \pm 0,003	
3.000	0,00 \pm 0,00* c	Extinção	98,7 \pm 8,16* b	0,118 \pm 0,003	126,7 \pm 10,57 a	0,128 \pm 0,004	
6.000	0,00 \pm 0,00* b	Extinção	34,6 \pm 6,10* b	0,070 \pm 0,009	102,4 \pm 14,78* a	0,117 \pm 0,006	

*Média de N_f na linhagem (coluna), difere significativamente da testemunha (concentração 0) pelo teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Na linhagem S o N_f diferiu significativamente entre a testemunha (concentração 0) e todas as concentrações de calda sulfocálcica testadas. A r_i para as concentrações de calda sulfocálcica de 56 a 600 ppm I.A. foi positiva, o que caracteriza crescimento populacional. No entanto, quando a linhagem S foi submetida à concentração 1.800 ppm (I.A.) de calda sulfocálcica a r_i (\pm EPM) foi negativa de -0,041 (\pm 0,036), o que caracteriza decréscimo populacional, sendo que a população pode estar caminhando para a extinção. Já nas concentrações de 3.000 e 6.000 ppm (I.A.) de calda sulfocálcica (concentrações equivalentes a 50 e 100% da concentração recomendada para o controle de *B. phoenicis* em campo) a linhagem S foi extinta.

Na linhagem Calda-R o N_f diferiu significativamente apenas entre a testemunha (concentração 0) e as concentrações de 3.000 e 6.000 ppm (I.A.) de calda sulfocálcica, com valores de N_f (\pm EPM) de 126,6 (\pm 5,50), 98,7 (\pm 8,16) e 34,6 (\pm 6,10), respectivamente. Os valores de r_i (\pm EPM) foram positivos e iguais a 0,118 (\pm 0,003) e 0,070 (\pm 0,009) nas concentrações de 3.000 e 6.000 ppm (I.A.) de calda sulfocálcica, respectivamente, o que caracteriza crescimento populacional. Portanto, mesmo nas concentrações de calda sulfocálcica equivalentes a 50% (3.000 ppm (I.A.)) e 100% (6.000 ppm (I.A.)) da recomendada para o controle de *B. phoenicis* em campo, a linhagem Calda-R foi capaz de manter-se em crescimento populacional positivo.

Na linhagem Enxofre-R o N_f diferiu significativamente apenas entre a testemunha (concentração 0) e a concentração de 6.000 ppm (I.A.) de calda sulfocálcica, sendo que, os valores de N_f (\pm EPM) foram iguais a 144,5 (\pm 6,61) e 102,4 (\pm 14,78), respectivamente. O valor da r_i (\pm EPM) foi positivo e igual a 0,117 (\pm 0,006), mesmo quando a linhagem Enxofre-R foi submetida a concentração de 6.000 ppm (I.A.) de calda sulfocálcica.

O N_f da linhagem Calda-R diferiu significativamente da linhagem S nas concentrações de 320, 1.800 e 3.000 ppm (I.A.) de calda sulfocálcica, sendo que a discriminação máxima entre estas linhagens foi observada na concentração de 3.000 ppm, pois nessa concentração a linhagem S foi extinta e a linhagem Calda-R manteve crescimento populacional positivo com r_i igual a 0,118 (\pm 0,003). Para a concentração de 6.000 ppm de calda sulfocálcica o N_f da linhagem Calda-R não diferiu significativamente do N_f da linhagem S, no entanto, a r_i foi positiva ($0,070 \pm 0,009$) para a linhagem Calda-R, o que indica que essa linhagem manteve crescimento populacional, enquanto que, a linhagem S foi extinta. Dessa forma, houve discriminação entre as linhagens S e Calda-R a partir de 320 ppm de I.A. de calda sulfocálcica.

Comparando-se os N_f das linhagens S e Enxofre-R, as diferenças foram significativas para as concentrações de 240, 320, 600, 1.800, 3.000 e 6.000 ppm (I.A.) de calda sulfocálcica, sendo que a discriminação máxima entre as linhagens foi observada para as concentrações de 3.000 e 6.000 ppm (I.A.) de calda sulfocálcica, onde a linhagem S foi extinta e a linhagem Enxofre-R manteve crescimento populacional positivo com r_i (\pm EPM) igual a 0,128 (\pm 0,004) e 0,117 (\pm 0,006), para as respectivas concentrações. Dessa forma, houve discriminação entre as linhagens S e Enxofre-R a partir de 240 ppm de I.A. de calda sulfocálcica.

3.4 Discussão

Na literatura, a taxa instantânea de crescimento (r_i) tem sido estimada para espécies de artrópodes que apresentam um período curto entre os estágios de ovo a adulto. Entretanto, o ácaro-da-leprose, apresenta um período relativamente longo entre esses estágios, variando de 17,27 a 21,2 dias (CHIAVEGATO, 1986, CAMPOS; OMOTO, 2006, TEODORO; REIS, 2006, FRANCO et al., 2007), o que dificulta os estudos de ecotoxicologia envolvendo parâmetros demográficos, uma vez que o período de avaliação (Δt) também deverá ser longo. A determinação do Δt está diretamente relacionada com a estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i), sendo que a r_i deve estar correlacionado com a taxa intrínseca de crescimento (r_m) obtida mediante a confecção de tabela de vida e fertilidade (HALL, 1964; WALTHALL; STARK, 1997b). No entanto, a correlação entre r_i e r_m é empírica uma vez que os trabalhos até então publicados não fornecem procedimentos estatísticos para testes de correlação entre esses valores (HALL, 1964; WALTHALL; STARK, 1997b). Portanto, mediante comparações empíricas entre as r_i s estimadas neste trabalho e r_m s obtidas por outros autores, foi determinado que o período de avaliação (Δt) equivalente a 25 dias seria o tempo ideal para avaliar o efeito letal e subletal de um determinado produto no crescimento demográfico de *B. phoenicis*.

O período de 25 dias para *B. phoenicis* permite que os primeiros descendentes dos adultos que receberam diretamente a pulverização com calda sulfocálcica, atinjam a fase adulta ao final do experimento e possam iniciar a oviposição, uma vez que trabalhos demonstram que à temperatura de 25°C, o ácaro-da-leprose criado sobre frutos de laranja apresenta um período de ovo a adulto variando de 19,11 a 24,10 dias (CHIAVEGATO 1986; CAMPOS; OMOTO 2006; TEODORO; REIS, 2006; FRANCO, 2007). Dessa forma, a r_i refletiria um possível efeito da

calda sulfocálcica na reprodução dos descendentes que passaram todo o experimento em contato com resíduo de calda sulfocálcica, como provavelmente ocorreria em condições de campo.

Na caracterização toxicológica utilizando-se da estimativa de CLs, a concentração de 320 ppm I.A. de calda sulfocálcica causou uma mortalidade média de 94% na linhagem S. Avaliando o efeito letal e subletal da calda sulfocálcica utilizando-se da estimativa do crescimento populacional de *B. phoenicis* foi verificado que a população S não é levada à extinção nessa concentração. Embora, a r_i de 0,089 obtido para a concentração de 320 ppm seja 1,55 vezes menor que a r_i do controle, esse valor positivo indica que a concentração de calda sulfocálcica de 320 ppm não é suficiente para impedir o crescimento populacional da linhagem S. Portanto, a recomendação feita pelos autores para realização de avaliação de crescimento populacional associados à estimativa de CLs são imprescindíveis para avaliar o efeito tóxico dos compostos químicos de maneira mais precisa sobre os níveis populacionais (STARK et al., 1997; WALTHALL; STARK, 1997a; FORBES; CALOW, 1999).

Fatores como a curta atividade biológica de calda sulfocálcica, o período prolongado de incubação de ovos do ácaro-da-leprose associado à baixa eficiência ovicida do produto podem ser fatores decisivos para obtenção das r_i s positivas. Estudos de persistência da calda sulfocálcica detectaram uma redução na mortalidade de *B. phoenicis* a partir do 5º dia após a aplicação, quando a mortalidade foi de aproximadamente 30% para adultos de *B. phoenicis* expostos por 48 horas aos resíduos do produto. Curta ação residual de calda sulfocálcica foi verificada também por Pattaro (2003). Associado a este fator, o período de incubação de ovos do ácaro-da-leprose sobre frutos de laranja em condições de temperatura média de 25°C variou de $7,33 \pm 0,04$ a $7,71 \pm 0,48$ dias (CHIAVEGATO 1986, CAMPOS; OMOTO, 2006, TEODORO; REIS, 2006; FRANCO et al., 2007). Além disso, a calda sulfocálcica não apresenta ação ovicida em *B. phoenicis* (PATTARO, 2003).

Trabalhos de avaliação de toxicidade de agrotóxicos sobre ácaros têm adotado a taxa instantânea de crescimento (r_i) como parâmetro de avaliação do efeito tóxico de produtos químicos sobre níveis populacionais. Segundo Venzon et al. (2006), o ácaro-branco, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), submetido à pulverização com calda sulfocálcica na concentração recomendada apresentou redução significativa na taxa instantânea de crescimento (r_i) com valor negativo de -0,292, indicando decréscimo populacional e tendência a extinção, enquanto que no controle (água), o valor de r_i foi de 0,1971, indicando crescimento populacional.

Stavrínides e Mills (2009) avaliaram o efeito de agrotóxicos na demografia do ácaro-praga *Tetranychus pacificus* McGregor e do seu ácaro predador *Galendromus occidentalis* (Nesbitt). Um dos agrotóxicos avaliados foi o enxofre, que reduziu significativamente a taxa instantânea de crescimento de *T. pacificus*. E Teodoro et al. (2005) avaliaram o efeito de enxofre sobre o ácaro-praga *Olygonychus ilicis* e seu predador *Iphiseiodes zuluagai* mediante estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i). Ao avaliar o efeito de enxofre sobre *I. zuluagai*, observou-se que a r_i decresceu linearmente com o aumento das concentrações, sendo que a CL₂₅ de enxofre foi capaz de levar o ácaro predador à extinção após sete dias de exposição. *O. ilicis* quando foi exposto ao enxofre também apresentou declínio populacional com o aumento da concentração, mas a extinção não foi observada nem mesmo com a CL₉₀. O elevado potencial reprodutivo de *O. ilicis* comparado com o do seu predador *I. zuluagai*, é capaz de minimizar a mortalidade causada pelo enxofre. Segundo Teodoro et al. (2005), apenas a estimativa de CL não permitiria evidenciar os prejuízos ocasionados pelo enxofre no potencial reprodutivo de *I. zuluagai*, pois a CL₂₅ de enxofre foi capaz de levar o ácaro predador à extinção quando parâmetros demográficos foram utilizados.

A razão de resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica foi de 5,7 vezes e a máxima concentração de calda sulfocálcica testada para a caracterização da resposta da linhagem Calda-R foi de 320 ppm, que possibilitou mortalidade próxima de 95% (Capítulo 2). Portanto, a concentração recomendada de calda sulfocálcica (6.000 ppm I.A. de calda sulfocálcica) poderia evitar a discriminação dos indivíduos resistentes e suscetíveis, e conseqüentemente, impedir a evolução da resistência. Segundo Roush (1989), a discriminação de indivíduos resistentes e suscetíveis somente é observada durante a degradação do resíduo do produto avaliado. De acordo com o estudo da demografia de linhagens de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica, verificou-se que a partir da concentração de 320 ppm houve discriminação entre as linhagens S e Calda-R, sendo que a partir de 3.000 ppm I.A. de calda sulfocálcica, a linhagem S foi extinta, enquanto a linhagem Calda-R apresentou taxa instantânea de crescimento positiva, evidenciando a discriminação entre as linhagens S e R.

Embora o crescimento populacional das linhagens resistentes à calda sulfocálcica seja retardado na concentração de calda sulfocálcica recomendada (6.000 ppm) para o manejo do ácaro-da-leprose na citricultura brasileira, esta concentração não foi suficiente para impedir a evolução da resistência.

Para uma melhor compreensão da ecotoxicologia da calda sulfocálcica sobre o ácaro-da-leprose, este produto deveria ser testado em populações estáveis de *B. phoenicis*, ou seja, populações com diferentes estágios de vida e em proporções que refletem exatamente as populações naturais em condições de campo, onde estágios com diferentes graus de suscetibilidade ocorrem ao mesmo tempo. Segundo Stark e Banken (1999), a estrutura inicial das populações tem influência no impacto de agrotóxicos e deveria ser levada em consideração quando se avalia o efeito tóxico de um produto. A população estável do ácaro da leprose foi estudada por Kennedy et al. (1996), que determinou uma distribuição de 74,9% de ovos, 19,24% de imaturos e 6,07% de adultos, sendo que uma população iniciada com 10 indivíduos levou 156 dias para atingir a estabilidade. Essas populações estáveis refletiriam de forma ainda mais realística a interação da calda sulfocálcica com *B. phoenicis*, pois simulariam de forma precisa as populações naturais de campo quando expostas a ação da calda sulfocálcica.

3.5 Conclusões

- A calda sulfocálcica afeta negativamente a taxa instantânea de crescimento (r_t) nas linhagens S, Calda-R e Enxofre-R de *B. phoenicis* avaliadas;
- Há discriminação entre as linhagens suscetível S e as resistentes Calda-R e Enxofre-R de *B. phoenicis*;

Referências

BECHMANN, R.K. Use of life tables and LC₅₀ tests to evaluate chronic and acute toxicity effects to copper on the marine copepod *Tisbe furcata* (Baird.) **Environmental Toxicology Chemistry**, New York, v.13, p.1509-1517, 1994.

CALOW, P.; SIBLY, R.M.; FORBES, V. Risk assessment on the basis of simplified life-history scenarios. **Environmental Toxicology Chemistry**, New York, v.16, p.1983-1989, 1997.

CAMPOS, F.J.; OMOTO, C. Estabilidade da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) a hexythiazox em pomares de citros. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 6, p.840-848, 2006.

CHIAVEGATO, L.G. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.8, p. 813-816, 1986.

CROMMENTUIJIN, T.; DOODEMAN, C.J.A.; VAN DER POL, J.J.C.; DOORNEKAMP, A.; RADEMAKER, M.C.J.; VAN GESTEL, C.A.M. Sublethal sensitivity index as an ecotoxicity parameter measuring energy allocation under toxicant stress: Application to cadmium in soil arthropods. **Ecotoxicology Environmental Safety**, New York, v.31, p.192-200, 1995.

DANIELS, R.E.; ALLAN, J.D. Life table evaluation of chronic exposure to pesticides. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 38, p. 485-494, 1981.

FORBES, V.E.; CALOW, P. Is the per capita rate of increase a good measure of populational-level effect in ecotoxicology? **Environmental Toxicology Chemistry**, New York, v.18, p.1544-1556, 1999.

FRANCO, C.R., N.F.B. CASARIN, F.A. DOMINGUES E C. OMOTO. Resistencia de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) a acaricidas inibidores da respiração celular em citros: resistência cruzada e custo adaptativo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.36, p.565-576, 2007.

HALL, D.J. An experimental approach to the dynamics of natural population of *Daphnia galeata mendotae*. **Ecology**, Tempe, v.45, p.94-112, 1964.

KAMMENGA, J.E.; BUSSCHERS, M.; VAN STRALEN, N.M.; JEPSON, P.C.; BAKKER, J. Stress induced fitness reduction is not determined by the most sensitive life-cycle trait. **Functional Ecology**, Oxford, v.10, p.106-111, 1996.

KAREIVA, P.; STARK, J.D.; WENNERGREN, U. Using demographic theory, community ecology, and spatial models to illuminate ecotoxicology. In: **Ecotoxicology: Ecological Dimensions** (L. Maltby and P. Grieg_Smith, Eds), Chapman Hall, London. 1996. p.13-23.

KENNEDY, J.S.; VAN IMPE, G.; HANCE, T.; LEBRUN, P. Demecology of the false spider mite, *Brevipalpus phoenicis*, (Geijskes) (Acari, Tenuipalpidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.120, p493-499, 1996.

NAKANO, O.; SANCHEZ, G.A.; ISHIDA, A.K. Redução na infestação do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros através do controle da verrugose. **Laranja**, Cordeirópolis, v.8, p.19-33, 1987.

OVERMEER, W.P.J.; ZON, A.Q. van. A comparative study of the effect of some pesticides on three predaceous mite species: *Typhlodromus pyri*, *Amblyseius potentillae* and *A. bibens* (Acari: Phytoseiidae). **Entomophaga**, Paris, v.26, p.3-9, 1981.

PATTARO, F.C. **Calda sulfocálcica no agrossistema citrícola**. 2003. 73 p. Dissertação (Mestre em Agronomia – Entomologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.

ROUSH, R.T. Designing resistance management programs: How can you choose? **Pesticide Science**, Oxford, v.26, p.423-441, 1989.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT: user's guide, Version 8. SAS Institute Inc.: Cary, NC, 2002.

SEITZ, A.; RATTE, H.T. Aquatic ecotoxicology: On the problems of extrapolating from laboratory experiments with individuals and populations to community effects in the field. **Comp. Biochem. Physiol.**, New York, v.100, p.301-304, 1991.

STAVRINIDES, M.C. E MILLS, N.J. Demographic effects of pesticides on biological control of Pacific spider mite (*Tetranychus pacificus*) by the western predatory mite (*Galendromus accidentalis*). **Biological Control**, Orlando, v.48, p. 267-273, 2009.

STARK, J.D.; BANKEN, J.A.O. Importance of population structure at the time of toxicant exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.42, p.282-287. 1999.

STARK, J.D.; BANKS, J.E. Population-level effects of pesticide and other toxicants on arthropods. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.48, p.505-519. 2003.

STARK, J.D.; RANGUS, T. Lethal and sublethal effects of neem insecticide, Morgosan-O, on pea aphid. **Pesticide Science**, Oxford, v.41, p.144-160, 1994.

STARK, J.D.; TANIGOSHI, L.; BOUNFOUR, M.; ANTONELLI, A. Reproductive potential: its influence on the susceptibility of a species to pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.37, p.273-279. 1997.

TEODORO, A.V.; REIS, P.R. Reproductive performance on the mite *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) on citrus and coffee, using life table parameters. **Brazilian Journal Biology**, São Carlos, v.66, p.899-905, 2006.

TEODORO, A.V.; FADINI, M.A.M.; LEMOS, W.P.; GUEDES, R.N.C.; PALLINI, A. Lethal and sub-lethal selectivity of fenbutatin oxide and sulphur to the predator *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae) and its prey, *Olygonychus ilicis* (Acari: Tetranychidae), in Brazilian coffee plantations. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.36, p.61-70, 2005.

VAN DER HOEVEN, N. Effect of 3,4-dichloroaniline and metavaldate on *Daphnia* populations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.20, p.53-70, 1990.

VAN LEEWEN, C.J.; LUTTMER, W.J.; GRIFFIOEN, P.S. The use of cohorts and population in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: A cadmium example. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.9, p.26-39.1985.

VENZON, M.; ROSADO, M.C.; PINTO, C.M.F.; DUARTE, V.; EUZÉBIO, D.E.; PALLINI, A. Potencial de defensivos alternativos para o controle do ácaro-branco em pimenta “Malagueta”. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p.224-227, 2006.

WALTHALL, W.K.; STARK, J.D. Comparison of two populations-level ecotoxicological endpoints: The intrinsic (r_m) and instantaneous (r_i) rates of increase. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.16, p.1068-1073, 1997a.

WALTHALL, W.K.; STARK, J.D. A comparison of acute mortality and population growth rate as endpoints of toxicological effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.37, p.45-52, 1997b.

4 ESTABILIDADE DA RESISTÊNCIA DE *Brevipalpus phoenicis* (ACARI: TENUIPALPIDAE) À CALDA SULFOCÁLCICA EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

Resumo

A resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) à calda sulfocálcica foi detectada em pomares de citros do Estado de São Paulo. Estudos para a avaliação da estabilidade da resistência têm sido fundamentais para o estabelecimento de estratégias de manejo da resistência, pois a instabilidade da resistência pode ser explorada mediante rotação de agrotóxicos ou de outras táticas de controle. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabilidade da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica em condições de laboratório mediante a estimativa de mudanças temporais nas frequências de resistência em populações com diferentes proporções de ácaros suscetíveis (S) e resistentes à calda sulfocálcica (Calda-R); e a estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) em linhagens S e Calda-R e em uma população de campo de *B. phoenicis* (Con7) para medir o crescimento populacional na ausência da pressão de seleção. A frequência de resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica foi estimada mensalmente, ao longo de seis meses, em populações com frequências iniciais de resistência de 20, 50 e 80 %, utilizando-se de bioensaio de contato residual na concentração diagnóstica de enxofre de 320 µg de I.A./ml de água. A r_i foi avaliada em frutos parafinados de laranja, deixando-se uma arena de 4 cm de diâmetro para a colonização por 5 fêmeas adultas de *B. phoenicis*, por um período de tempo de 25 dias. Não foram observadas reduções significativas na frequência de resistência mesmo após 6 meses na ausência de pressão de seleção nas populações avaliadas. Além disso, a taxa instantânea de crescimento das linhagens S e Calda-R, e da população Con7 foram bastante próximas ($r_i \approx 0,12$). A resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica é estável em condições laboratoriais. Portanto, é essencial a implantação de estratégias de manejo da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica para preservar a vida útil desse produto.

Palavras-chave: Ácaro-da-leprose; Custo adaptativo; Demografia; Taxa instantânea de crescimento; Manejo da resistência

STABILITY OF *Brevipalpus phoenicis* (ACARI: TENUIPALPIDAE) RESISTANCE TO LIME SULFUR UNDER LABORATORY CONDITIONS

Abstract

The resistance of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to lime sulfur was detected in citrus groves of the State of São Paulo. Studies to evaluate the stability of resistance have been fundamental for implementing resistance management strategies by exploiting the instability of the resistance with the use of rotation of pesticides or other control tactics. Thus, the objective of this study was to evaluate the stability of *B. phoenicis* resistance to lime sulfur under laboratory conditions, by estimating temporal changes in the frequency of resistance in populations with different proportions of susceptible (S) and resistant to lime sulfur (Lime-R) individuals, and by estimating the instantaneous rate of increase (r_i) in S and Lime-R strains and in a field population of *B. phoenicis* (Con7) to measure the population growth in the absence of selection pressure.

The frequency of resistance of *B. phoenicis* to lime sulfur was estimated monthly during a 6-month period, in populations with initial frequency of resistance of 20, 50 and 80%, with the use of residual contact bioassay at diagnostic concentration of 320 µg of sulfur/ml of water. The r_i was evaluated on waxed citrus fruits by leaving an arena of 4 cm diameter for mite rearing for a period of 25 days. There was no significant reduction in the frequency of resistance even after 6 months in the absence of selection pressure in all populations tested. Furthermore, the instantaneous rates of increase of S and Lime-R strains and Con7 population were very similar ($r_i \approx 0.12$). Therefore, resistance of *B. phoenicis* to lime sulfur was stable under laboratory conditions. Strategies for managing *B. phoenicis* resistance to lime sulfur should be implemented to preserve the lifetime of this product.

Keywords: Flat mite; Fitness cost; Demographic; Instantaneous rate of increase; Resistance management

4.1 Introdução

A calda sulfocálcica vem sendo intensamente utilizada na citricultura, principalmente, em pomares com produção orgânica, para o controle do ácaro-da-leprose, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), uma das principais pragas da citricultura brasileira. No sistema de produção orgânica de citros são realizadas, em média, 11 pulverizações de calda sulfocálcica por ano. Devido à alta pressão de seleção, uma intensidade de resistência à calda sulfocálcica de aproximadamente 5,7 vezes foi detectada para *B. phoenicis*, além da presença de resistência cruzada entre calda sulfocálcica e enxofre (Capítulo 2). Portanto, as aplicações complementares de enxofre para o controle de *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) podem contribuir para o aumento do problema da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica em alguns pomares de citros. Para a implantação de estratégias de manejo da resistência, conhecimentos relativos à estabilidade da resistência têm sido fundamentais. Os principais fatores que afetam a estabilidade da resistência de artrópodes a agrotóxicos são a imigração de indivíduos suscetíveis e o custo adaptativo associado à resistência na ausência de pressão de seleção, o que poderia possibilitar o restabelecimento da suscetibilidade (GEORGHIU, 1983). As principais diferenças no custo adaptativo podem estar relacionadas aos parâmetros biológicos, como tempo de desenvolvimento, fecundidade e fertilidade (GEORGHIU; TAYLOR, 1986; GEORGHIU; TAYLOR, 1977; ROUSH; CROFT, 1986; ROUSH; MCKENZIE, 1987).

Estudos de estabilidade da resistência de *B. phoenicis* a acaricidas têm apresentado resultados distintos de acordo com o acaricida e condições experimentais. Para o acaricida

dicofol, a resistência foi altamente instável, ou seja, decréscimos significativos na frequência de resistência foram observados na ausência da pressão de seleção (ALVES, 1999). No entanto, a resistência foi relativamente estável para os acaricidas propargite (FRANCO et al., 2007) e hexythiazox (CAMPOS; OMOTO, 2002) em condições laboratoriais. Em algumas situações, a resistência de *B. phoenicis* a hexythiazox foi instável em condições de campo (CAMPOS; OMOTO, 2006). Apesar de o ácaro-da-leprose apresentar hábito alimentar polífago (TRINDADE; CHIAVEGATO, 1994), possibilitando a imigração de ácaros suscetíveis de áreas de refúgio (áreas não tratadas) para as áreas pulverizadas, a dispersão de *B. phoenicis* por caminamento e pelo vento pode ser bastante limitada (ALVES et al., 2005), além da possibilidade de isolamento entre as populações de *B. phoenicis* originárias de diferentes plantas hospedeiras (ALVES, 2004; GROOT et al., 2005).

Dessa forma, para entender a estabilidade da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica, foram conduzidos estudos em condições de laboratório mediante: (a) estimativa das mudanças temporais na frequência de resistência em populações com diferentes proporções de ácaros suscetíveis e resistentes à calda sulfocálcica; e (b) estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) em linhagens suscetível e resistente à calda sulfocálcica e em uma população de campo para avaliar o crescimento populacional na ausência da pressão de seleção.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Criação de *B. phoenicis*

Foram utilizadas as linhagens de *B. phoenicis* suscetível (S) e resistente à calda sulfocálcica (Calda-R), além de uma população proveniente de pomar de citros comercial localizado no município de Onda Verde-SP (população Con7) (Capítulo 2). Os ácaros foram multiplicados em condições laboratoriais sobre frutos de laranja das variedades Pêra Rio ou Valência. Os frutos foram lavados em água corrente e após a secagem foram parafinados, deixando-se uma arena livre da parafina de, aproximadamente, 4 cm de diâmetro delimitada com cola (Tanglefoot®). Antes da transferência dos ácaros, uma mistura de areia, gesso, farinha de trigo e água destilada na proporção 4:1:1:3 foi pincelada em alguns pontos da arena, com o objetivo de simular os sintomas de verrugose, que favorecem o desenvolvimento deste ácaro

(CHIAVEGATO, 1986; NAKANO et al., 1987). Após a transferência dos ácaros para as arenas, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas mantidas em sala climatizada à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. Os frutos foram renovados a cada 20 ou 30 dias mediante sobreposição da arena do fruto novo sobre arena do fruto infestado com os ácaros, para que estes se deslocassem para o fruto novo.

4.2.2 Estimativa da frequência de resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica

O acompanhamento da frequência de resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica foi realizado em condições laboratoriais para populações com frequências iniciais de resistência de 20, 50 e 80%. Essas populações foram estabelecidas a partir de combinações de diferentes proporções de ácaros das linhagens S e Calda-R. Cada uma das três populações foi constituída por 8 frutos, sendo que em cada fruto foram transferidas 100 fêmeas adultas, com as respectivas porcentagens de indivíduos S e R (20% S e 80% de R; 50% de S e 50% de R; e 80% de S e 20% de R). As populações com 100% de S e 100% de Calda-R foram tomadas como populações controle.

As populações de *B. phoenicis* foram mantidas na ausência de pressão seletiva e monitoradas mensalmente ao longo de seis meses. O método de bioensaio adotado para estimar a sobrevivência de ácaros resistentes foi o de contato residual com concentração diagnóstica de enxofre de 320 μg de I.A./ml de água ($\approx \text{CL}_{95}$), com o uso de Kumulus DF (800 g de enxofre/Kg de produto comercial - Basf S.A.).

Os bioensaios foram realizados em arenas de 2,6 cm de diâmetro confeccionadas com folhas de laranjeira coletadas em um pomar sem aplicação de acaricidas. Os discos de folha foram acondicionados em placas acrílicas de 3,5 cm de diâmetro (Falcon 1008, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, Estados Unidos) contendo 2 ml de uma mistura ainda não geleificada de ágar-água na concentração de 2,0 %. Após a geleificação do substrato no fundo da placa, foi construída uma barreira ao redor dos discos de folha com a mesma mistura de ágar-água para confinamento dos ácaros, seguindo metodologia descrita por Omoto et al. (2000).

A pulverização do enxofre foi feita na superfície adaxial dos discos de folhas com auxílio de torre de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, Herts, Reino Unido) calibrada à pressão de 10 psi (68,95 kPa). Foi utilizado um volume de 2 ml de solução na pulverização de cada arena, obtendo-se uma deposição média de resíduo úmido de 1,56 mg/cm^2 sobre as arenas.

Após a pulverização, foram transferidas 10 fêmeas adultas de *B. phoenicis* para cada arena de bioensaio. Essas arenas foram mantidas em condições ambientais até a secagem do produto. Em seguida, as arenas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

A mortalidade foi avaliada 48 horas após a exposição dos ácaros ao enxofre. Para a avaliação, os ácaros foram colocados com a face ventral voltada para cima e aqueles que retornaram imediatamente à posição normal e caminharam, foram considerados vivos. As repetições que apresentaram mortalidade superior a 15% na testemunha foram descartadas, assim como aquelas cuja perda de ácaros na barreira de ágar ultrapassou 15%.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado. A frequência de resistência foi acompanhada por 6 meses, mediante a realização de estimativas mensais para cada população. Em cada período de avaliação, os bioensaios foram repetidos 5 vezes por população, sendo que cada repetição foi constituído por quatro arenas com 10 ácaros cada. Os dados de sobrevivência (x) para cada população foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância de dois fatores (população e tempo) com interação e teste de Tukey. O nível de significância do teste foi de $\alpha = 0,05$ (SAS INSTITUTE, 2002).

4.2.3 Estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) em *B. phoenicis*

A estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) foi realizada para as linhagens S, Calda-R e a população Con7. Para tanto, frutos de laranja (variedade Pêra) livres de resíduo foram lavados, e após secagem, parafinados em aproximadamente 2/3 de sua área. Na área livre de parafina foi construída uma arena circular de 4 cm de diâmetro com cola (Tanglefoot[®]) para o confinamento dos ácaros. Foram transferidas 5 fêmeas adultas de *B. phoenicis* no início da fase reprodutiva (fêmeas entre 1 e 5 dias de idade) por fruto. Esses frutos foram mantidos em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. Cada fruto constituiu-se em uma repetição, sendo que foram realizadas 35 repetições para cada linhagem. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado.

A avaliação foi realizada após 25 dias da infestação (Δt). Nessa avaliação, o número de ovos, de imaturos e de adultos de cada fruto foram contabilizados para a estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) através da equação $r_i = [\ln (N_f / N_o)] / \Delta t$, onde N_f é o número final de indivíduos vivos, N_o é o número inicial de indivíduos vivos e Δt é o intervalo de tempo

(dias) entre o início e término do bioensaio, ou seja, o período de avaliação (STARK et al., 1997; WALTHALL; STARK, 1997). Valores positivos de r_i indicam crescimento populacional, valores negativos indicam decréscimo na população e tendência à extinção que é alcançada com N_f igual a zero, e valores de r_i iguais a zero indicam uma população estável (HALL, 1964; WALTHALL; STARK, 1997). Paralelamente, a comparação dos valores de r_i , o número final de indivíduos (N_f) foi submetido à análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett para comparar o resultado obtido no controle (linhagem S) com a da linhagem Calda-R, e a população Con7 ($\alpha = 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2002).

4.3 Resultados

4.3.1 Estimativa da frequência de resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica

Diferenças significativas na frequência de resistência ao longo do tempo foram verificadas para as populações com frequências iniciais de resistência de 20, 50 e 80% ($F = 8,59$; g.l. = 6, 140; $P < 0,0001$), sendo que ocorreu interação entre os fatores população e tempo ($F = 2,70$; g.l. = 24, 140; $P = 0,0002$) (Figura 4.1 e Tabela 4.1). No entanto, os resultados sugerem que a resistência de *B. phoenicis* a calda sulfocálcica é estável na ausência de pressão de seleção com o produto (Figura 4.1 e Tabela 4.1).

Embora pequenas oscilações na frequência de resistência tenham sido verificadas ao longo do período de avaliação, no sexto mês foi verificado que as frequências de resistência não declinaram em relação às frequências iniciais estabelecidas para cada população. Para as populações com frequências iniciais de resistência de 80% e 20% foram verificadas pequenas diferenças entre a frequência de resistência no mês 0 e no final do sexto mês, sendo que os valores não diferiram significativamente, com porcentagem média de sobrevivência (\pm EPM) para a população com 80% de R de 76,2% ($\pm 0,73$) e 88,6% ($\pm 4,07$), para os meses 0 e 6, respectivamente. A porcentagem média de sobrevivência (\pm EPM) para a população com 20% de R foi de 21,3% ($\pm 0,73$) e 27,9% ($\pm 5,15$), para os meses 0 e 6, respectivamente (Figura 4.1 e Tabela 4.1).

Para a população com frequência inicial de 50% de resistência, as diferenças entre as frequências de resistência estimadas no início do experimento até o final do experimento,

indicaram até um aumento na frequência de resistência a partir do 4º mês de monitoramento. As porcentagens de sobrevivência (\pm EPM) registradas no início (mês 0) e o fim do experimento (mês 6) foram de 48,7% (\pm 0,57) e 64,3% (\pm 4,78), respectivamente (Figura 4.1 e Tabela 4.1).

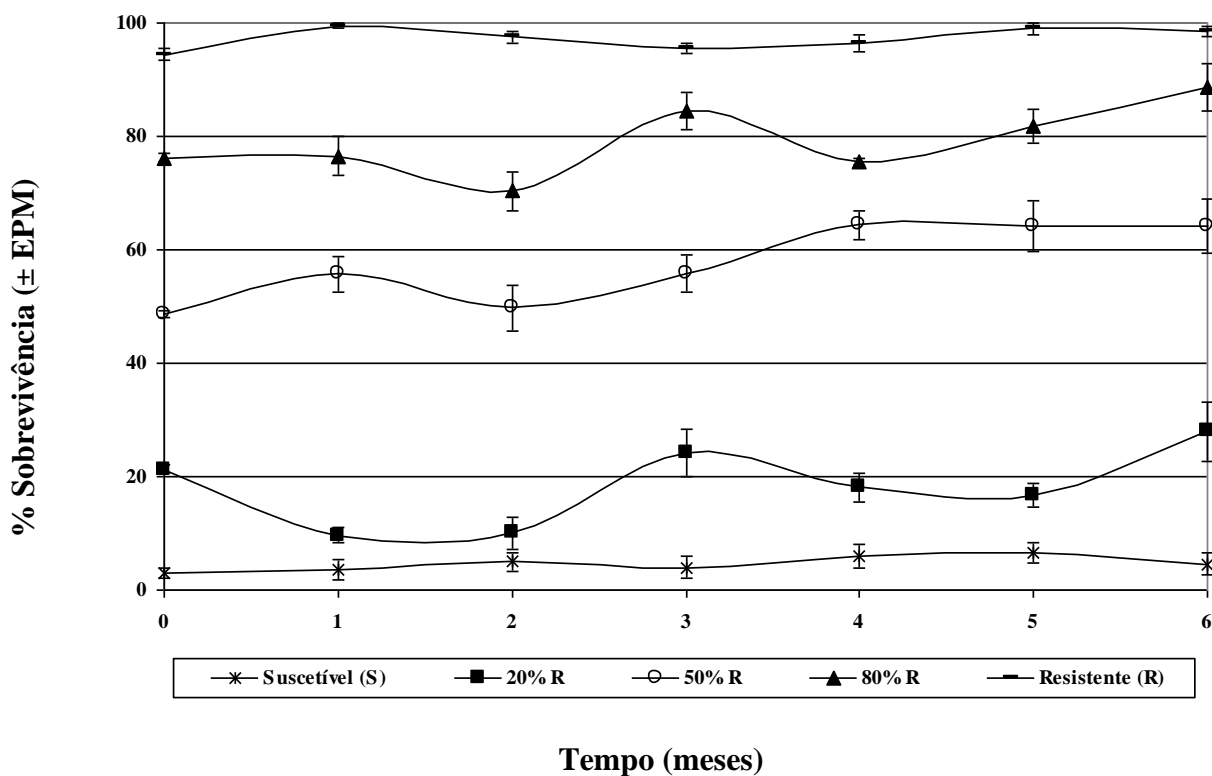


Figura 4.1 - Porcentagem média de sobrevivência (\pm EPM) ao longo do tempo em três populações de *B. phoenicis* (20, 50 e 80% de indivíduos resistentes) e linhagens suscetível (S) e resistente à calda sulfocálcica (Calda-R) na concentração diagnóstica de enxofre de 320 μ g de I.A./ml de água

Tabela 4.1 - Porcentagem média de sobrevivência (\pm EPM) ao longo do tempo em três populações de *B. phoenicis* (20, 50 e 80% de indivíduos resistentes) e linhagens suscetível (S) e resistente à calda sulfocálcica (Calda-R) na concentração diagnóstica de enxofre de 320 μ g I.A./ml de água

População	Tempo (mês)						
	0	1	2	3	4	5	6
Calda-R	94,5 \pm 0,96 a	99,5 \pm 0,50 a	97,5 \pm 1,12 a	95,5 \pm 0,94 a	96,5 \pm 1,50 a	99,0 \pm 1,00a	98,5 \pm 1,01 a
20 S:80 R	76,2 \pm 0,73 ab	76,5 \pm 3,42 ab	70,3 \pm 3,45 b	84,3 \pm 3,28 a	75,6 \pm 0,56 ab	81,7 \pm 2,90ab	88,6 \pm 4,07 a
50 S:50 R	48,7 \pm 0,57 b	55,7 \pm 3,18 ab	49,7 \pm 3,97 ab	55,8 \pm 3,23 ab	64,4 \pm 2,51 a	64,1 \pm 4,45a	64,3 \pm 4,78 a
80 S:20 R	21,3 \pm 0,73 ab	9,7 \pm 1,22 b	10,0 \pm 2,84 b	24,2 \pm 4,16 a	18,1 \pm 2,56 ab	16,8 \pm 2,08ab	27,9 \pm 5,15 a
S	3,0 \pm 0,95 a	3,5 \pm 1,72 a	5,0 \pm 1,58 a	4,0 \pm 2,03 a	6,0 \pm 2,04 a	6,5 \pm 1,90 a	4,6 \pm 1,84 a

Média seguida pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

4.3.2 Estimativa da Taxa instantânea de crescimento (r_i) em *B. phoenicis*

Não foram verificadas diferenças significativas quanto ao crescimento populacional das linhagens de *B. phoenicis* suscetível e resistentes à calda sulfocálcica. Os N_f s (número final de indivíduos vivos) registrados para as linhagens de *B. phoenicis* S, Con7 e Calda-R não diferiram significativamente ($F = 0,01$; g.l. = 2, 102; $P = 0,993$). Os valores da taxa instantânea de crescimento (r_i) foram positivos e próximos para todas as linhagens de *B. phoenicis*, indicando que as populações se comportam de maneira semelhante em relação ao crescimento populacional (Tabela 4.2). Portanto, não há custo adaptativo nos parâmetros biológicos associados ao crescimento populacional das linhagens de *B. phoenicis* resistentes à calda sulfocálcica avaliadas.

Tabela 4.2 - Valores médios do número final de indivíduos vivos (N_f) e das taxas instantâneas de crescimento (r_i) para as linhagens de *B. phoenicis* suscetível (S) e resistente à calda sulfocálcica (Calda-R) e para a população de campo (Con7)

Linhagem	N_f	r_i
S	110,91 ± 9,52	0,119 ± 0,003
Con7	112,34 ± 9,08	0,119 ± 0,004
Calda-R	111,31 ± 7,18	0,120 ± 0,003

* N_f médio no tratamento difere do N_f no controle (linhagem S) pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$)

4.4 Discussão

A resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica foi estável, em condições laboratoriais, pelo período de seis meses na ausência de pressão de seleção (Tabela 4.1 e Figura 4.1).

A estabilidade da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica foi confirmada mediante estimativas da taxa instantânea de crescimento (r_i). Os N_f s das linhagens S, Calda-R e Con7 não diferiram significativamente, e os valores da r_i foram positivos e muito próximos entre as linhagens S e Calda-R (Tabela 4.2); evidenciando a ausência de custo adaptativo associado à resistência, baseado nos parâmetros demográficos avaliados no presente estudo.

A ausência de custo adaptativo também foi observada em trabalhos com *B. phoenicis* resistentes a hexythiazox (CAMPOS; OMOTO, 2006) e propargite (FRANCO et al., 2007). Campos e Omoto (2006) estimaram a taxa de intrínseca de crescimento (r_m) para as linhagens de *B. phoenicis* suscetível de referência (S) e resistente a hexythiazox (Hexythiazox-R) de 0,099 e

0,100, respectivamente, e constataram que essas taxas foram próximas para as duas linhagens. Campos e Omoto (2002) avaliaram também a estabilidade da resistência de *B. phoenicis* ao hexythiazox em condições de laboratório e constataram estabilidade. Segundo Franco et al. (2007), os valores de r_m das linhagens de *B. phoenicis* suscetível de referência (S) e resistente a propargite (Propargite-R) foram de 0,100 e 0,097, respectivamente, constatando assim que as taxas foram também bastante próximas entre as duas linhagens. Por outro lado, Alves (1999) avaliando linhagens de *B. phoenicis* suscetível e resistente ao acaricida dicofol verificou diferenças significativas entre os parâmetros biológicos da tabela de vida e fertilidade, com valores de r_m de 0,091 e 0,078 para as linhagens suscetível e resistente, respectivamente. A presença de custo adaptativo associado à resistência é considerada como um fator fundamental para a implementação do manejo da resistência, pois é uma das premissas para o sucesso da estratégia de rotação de agrotóxicos com diferentes mecanismos de ação (TABASHNIK, 1990). Entretanto, a presença de alelos resistentes não está sempre associada à presença do custo adaptativo (HOY; COMLEY, 1989; HOY, 1990; ROUSH; DALY, 1990). A ausência de custo adaptativo pode ser explicada pelo histórico evolutivo da espécie, pois durante o processo evolutivo há possibilidade da incorporação de genes modificadores que podem aumentar o valor adaptativo dos indivíduos resistentes. Nesta situação, o restabelecimento da suscetibilidade seria lento mesmo na ausência da pressão seletiva (FFRENCH-CONSTANT, 2007; HARTLEY et al., 2006; McCART; BUCKLING; FFRENCH-CONSTANT, 2005). A estabilidade da resistência dificulta o manejo (GEORGHIOU, 1983; ROUSH; MCKENZIE, 1987), visto que, mesmo na ausência da pressão de seleção não seria possível verificar o restabelecimento da suscetibilidade. No entanto, para confirmar a estabilidade da resistência a calda sulfocálcica, seria interessante conduzir estudos de estabilidade em condições de campo, pois outros fatores poderiam possibilitar o restabelecimento da suscetibilidade, tais como a imigração de indivíduos suscetíveis ou ação diferencial de inimigos naturais, como os ácaros predadores fitoseídeos, sobre as linhagens suscetível e resistente.

4.5 Conclusões

- A resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica é estável em condições de laboratório;

- Não há custo adaptativo associado à resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica, baseado em parâmetros demográficos.

Referências

- ALVES, E.B. **Manejo da resistência do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) ao acaricida dicofol.** 1999. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Entomológicas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.
- ALVES, E.B. **Dinâmica da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) ao acaricida dicofol.** 2004. 79 p. Tese (Doutorado em Ciências Entomológicas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- ALVES, E.B.; CASARIN, N.F.B.; OMOTO, C. Mecanismos de dispersão de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) em pomares de citros. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.31, n.1, p.89-96, 2005.
- CAMPOS, F.J.; OMOTO, C. Resistance to hexythiazox in *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) from Brazilian citrus. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.26, n.3/4, p.243-251, 2002.
- CAMPOS, F.J.; OMOTO, C. Estabilidade da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) a hexythiazox em pomares de citros. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 6, p.840-848, 2006.
- CHIAVEGATO, L.G. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.8, p.813-816, ago. 1986.
- FFRENCH-CONSTANT, R.H. Which came first: insecticides or resistance? **Trends in Genetics**, London, v.23, n.1, p.1-4, 2007.
- FRANCO, C.R., CASARIN, N.F.B., DOMINGUES, F.A.; OMOTO, C. Resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) a acaricidas inibidores da respiração celular em citros: resistência cruzada e custo adaptativo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.36, n.4, p.565-576, 2007.
- GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.) **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p.769-792.

- GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Factors influencing the evolution of resistance. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. Washington, D.C.: National Academic Press, 1986. chap.3, p. 157-169.
- GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and Biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.70, n.3, p.319-323, 1977.
- GROOT, T.V.M.; JANSSEN, A.; PALLINI, A.; BREEUWER, J.A.J. Adaptation in the asexual false spider mite *Brevipalpus phoenicis*: evidence for frozen niche variation. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.36, p.165-176, 2005.
- HALL, D.J. An experimental approach to the dynamics of natural population of *Daphnia galeata mendotae*. **Ecology**, Tempe, v.45, p.94-112, 1964.
- HARTLEY, C.J.; NEWCOMB, R.D. RUSSEL, R.J. YONG, C.G. STEVENS, J.R. YEATES, D.K. LA SALLE, J. OAKESHOTT, J.G. Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v.103, n.23, p.8757-8762, 2006.
- HOY, M.A.; COMLEY, J. Propargite resistance in Pacific spider mite (Acari: Tetranychidae): stability and mode of inheritance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.82, n.1, p.11-16, 1990.
- HOY, M.A. Pesticide resistance in arthropod natural enemies: variability and selection responses. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**, New York:Chapman and Hall, 1990. p. 203-236.
- MCCART, C.; BUCKLING, A.; FRENCH-CONSTANT, R.H. DDT resistance in flies carries no cost. **Current Biology**, London, v.15, n.15, p.587-589, 2005.
- NAKANO, O.; SANCHEZ, G.A.; ISHIDA, A.K. Redução na infestação do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros através do controle da verrugose. **Laranja**, Cordeirópolis, v.8, p.19-33, 1987.
- OMOTO, C.; ALVES, E.B.; RIBEIRO, P.C. Detecção e monitoramento da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) ao dicofol. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.29, n.4, p.757-764, 2000.
- ROUSH, R.T.; CROFT, B.A. Experimental population genetics and ecological studies of pesticide resistance in insects and mites In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. Washington, D.C.: National Academic Press, 1986. chap.3, p.257-270.
- ROUSH, R.T.; DALY, J.C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p.97-152.

ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.32, p.361-380, 1987.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT: user's guide**. Cary: SAS Institute, 2002.

STARK, J.D.; TANIGOSHI, L.; BOUNFOUR, M.; ANTONELLI, A. Reproductive potencial: its influence on the susceptibility of a species to pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.37, p.273-279, 1997.

TABASHINIK, B.E. Modeling and evaluation of resistance management tactics. In: ROUSH, R.T. TABASHINIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p.153-182.

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

WALTHALL, W.K.; STARK, J.D. Comparison of two populations-level ecotoxicological endpoints: The intrinsic (r_m) and instantaneous (r_i) rates of increase. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.16, p.1068-1073, 1997.

5 EFEITO LETAL E SUBLETAL DE CALDA SULFOCÁLCICA SOBRE *Iphiseiodes zuluagai* (ACARI: PHYTOSEIIDAE)

Resumo

O ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma é um dos principais fitoseídeos associado ao ácaro-da-leprose, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), em pomares de citros do Estado de São Paulo. Devido ao intenso uso da calda sulfocálcica para o manejo de *B. phoenicis*, principalmente, em sistemas de produção orgânica de citros, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito letal e subletal da calda sulfocálcica sobre *I. zuluagai*. Foram conduzidos estudos para caracterizar a toxicidade da calda sulfocálcica a *I. zuluagai* em relação a *B. phoenicis*; avaliar o impacto de calda sulfocálcica na demografia de *I. zuluagai*, mediante estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) em laboratório; e mensurar a persistência da atividade biológica da calda sulfocálcica em casa de vegetação. A caracterização da toxicidade da calda sulfocálcica a *I. zuluagai* foi avaliada com bioensaio de contato direto e residual sobre discos de folhas de feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis* L.. A estimativa da r_i foi realizada em arenas confeccionadas com discos de folhas de feijão-de-porco pulverizadas nas concentrações de calda sulfocálcica de 60, 600, 3.000 e 6.000 µg de I.A./mL de água (ppm) que são equivalentes a 1, 10, 50 e 100% da concentração recomendada para o controle do ácaro-da-leprose, respectivamente. A persistência da atividade biológica da calda sulfocálcica a *I. zuluagai* foi avaliada sobre plantas de feijão-de-porco pulverizadas com calda sulfocálcica na concentração de 6.000 ppm. A avaliação da persistência foi realizada até 41 dias da pulverização mediante coletas periódicas de folhas pulverizadas para a confecção de arenas para a estimativa da mortalidade e da r_i para *I. zuluagai*. A CL_{50} de calda sulfocálcica estimada para *I. zuluagai* foi de 865,07 ppm e razão de tolerância relativa a *B. phoenicis* foi de 4,31 vezes. A calda sulfocálcica nas concentrações de 3.000 e 6.000 ppm afetou negativamente o crescimento populacional de *I. zuluagai* em condições de laboratório, levando à extinção. A persistência da atividade biológica da calda sulfocálcica em casa de vegetação foi relativamente alta, pois resíduos de calda sulfocálcica com até 41 dias de idade afetaram negativamente o crescimento populacional de *I. zuluagai*. Portanto, a calda sulfocálcica poderia afetar negativamente a dinâmica populacional de *I. zuluagai* em pomares de citros.

Palavras-chave: Persistência; Taxa instantânea de crescimento; Controle químico; Controle biológico, Ácaro predador

LETHAL AND SUBLETHAL EFFECT OF LIME SULFUR ON *Iphiseiodes zuluagai* (ACARI: PHYTOSEIIDAE)

Abstract

The predaceous mite *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma is one of the most important phytoseiid mites associated to flat mite, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), in citrus groves in the State of São Paulo. Due to intense use of lime sulfur for managing *B. phoenicis*, mainly in organic citrus production systems, the objective of this research was to evaluate the lethal and

sublethal effect of lime sulfur on *I. zuluagai*. The following studies were conducted: (a) characterization of lime sulfur toxicity to *I. zuluagai* relative to *B. phoenicis*; (b) evaluation of the impact of lime sulfur on demograph of *I. zuluagai* with estimation of the instantaneous rate of increase (r_i) in the laboratory; and (c) to measure the persistence of biological activity of lime sulfur in the greenhouse. The toxicity of lime sulfur in *I. zuluagai* was evaluated with residual and direct contact bioassay on leaf disks of *Canavalia ensiformis* L.. The estimation of r_i was conducted on leaf disks of *C. ensiformes* sprayed with lime sulfur at concentrations of 60, 600, 3.000 and 6,000 μg of sulfur/mL of water (ppm), which correspond to 1, 10, 50 e 100% of the recommended rate to control *B. phoenicis* respectively. The persistence of biological activity of lime sulfur to *I. zuluagai* was evaluated on plants of *C. ensiformis* sprayed at concentration of 6,000 ppm of lime sulfur. The persistence was evaluated until 41 days after spraying by collecting sprayed leaves periodically to bioassay and estimate the mortality and r_i to *I. zuluagai*. The estimated LC_{50} of lime sulfur to *I. zuluagai* was 865.07 ppm and tolerance ratio relative to *B. phoenicis* was 4,31-fold. The lime sulfur at concentrations of 3,000 and 6,000 ppm had negative impact on population growth of *I. zuluagai* under laboratory conditions, by leading to extinction. The persistence of biological activity of lime sulfur on *C. ensiformis* was relatively high because even 41-day old residues had also negative impact on *I. zuluagai* population growth. Therefore, the use of lime sulfur may affect the population dynamics of *I. zuluagai* in citrus groves.

Keywords: Persistence; Instantaneous rate of increase; Chemical control; Biological Control; Predaceous mite

5.1 Introdução

Os ácaros predadores são considerados os inimigos naturais mais efetivos no controle biológico de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) na citricultura brasileira, com destaque para os ácaros Phytoseiidae (MORAES, 1991; MORAES; GASTALDO JR., 1992; SATO et al., 1994; SATO, 2005). Os principais fitoseídeos associados ao ácaro-da-leprose nos pomares de citros do Estado de São Paulo são *Iphiseiodes zuluagai* Denmark & Muma, *Euseius concordis* (Chant), e *Euseius citrifolius* Denmark & Muma (GRAVENA, 1990; CHIAVEGATO, 1991; SATO et al., 1994; SATO et al., 1995; REIS et al., 2000), sendo que *I. zuluagai* ocorre com maior frequência entre abril e setembro (outono e inverno), período de temperaturas amenas e baixa precipitação (SATO et al., 1994; REIS et al., 2000), coincidindo com o período de maior ocorrência de *B. phoenicis* (OLIVEIRA, 1995). Apesar da relevância desses ácaros predadores, a sua preservação tem sido comprometida devido ao uso excessivo de agrotóxicos no manejo de pragas e doenças da cultura dos citros mesmo no sistema de manejo orgânico.

Apesar do sistema de manejo orgânico exigir a adoção de novas filosofias que visem sustentabilidade, o manejo de pragas ainda é baseado no controle químico. A preferência pela

estratégia de controle químico no sistema orgânico é favorecida pelo baixo custo dos agrotóxicos inorgânicos (produtos à base de enxofre), que não estão livres dos mesmos riscos e custos sociais associados ao uso intensivo dos agrotóxicos orgânicos sintéticos (ZEHNDER et al., 2007).

Na citricultura orgânica, a calda sulfocálcica é o único produto permitido pelas certificadoras de produtos orgânicos que apresenta eficiência no controle do ácaro-da-leprose (PENTEADO, 2004), sendo pulverizada em média 11 vezes por ano. Já na citricultura convencional, a calda sulfocálcica é adotada como uma opção de baixo custo e é utilizada, principalmente, em épocas de baixa rentabilidade da cultura. Devido ao intenso uso desse produto, a resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica foi detectada com intensidades de resistência de 5,7 vezes, além da resistência cruzada com enxofre (Capítulo 2). Dentro das estratégias para o manejo da resistência do ácaro-da-leprose, o controle biológico com ácaros predadores poderia ser integrado ao controle químico (GRAVENA, 1990; SATO et al., 1994; POLETTI; OMOTO, 2005), mediante o uso de agrotóxicos seletivos aos ácaros predadores para conservação desses inimigos naturais que poderiam atuar indistintamente sobre indivíduos resistentes ou suscetíveis, além de reduzir o nível populacional da praga e possibilitar a redução de uso de agrotóxicos (GEORGHIOU, 1983; ROUSH, 1989).

Apesar de inúmeros trabalhos de seletividade de enxofre a ácaros predadores (Phytoseiidae), não há relatos sobre o efeito da calda sulfocálcica sobre os mesmos. Estudos conduzidos por Sato et al. (1995), demonstraram que o enxofre foi prejudicial à população de predadores (Phytoseiidae), em condições de campo, até 58 dias após a aplicação. Trabalhos de seletividade realizados por Reis et al. (1998) revelaram que o enxofre é moderadamente nocivo a *I. zuluagai*. Teodoro et al. (2005), utilizando-se de testes ecotoxicológicos baseados em parâmetros demográficos, verificaram que o enxofre compromete drasticamente populações de *I. zuluagai*, levando rapidamente à extinção devido ao baixo potencial reprodutivo desta espécie quando comparada com sua presa, *Oligonychus ilicis* (McGregor). Portanto, como o principal ingrediente ativo da calda sulfocálcica é o enxofre, além da presença de outros componentes, a calda sulfocálcica também poderia afetar negativamente a população de ácaros predadores em pomares de citros, comprometendo o manejo de *B. phoenicis*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito letal e subletal da calda sulfocálcica sobre o ácaro predador *I. zuluagai*. Para tanto, foram conduzidos estudos para: (a) caracterização da toxicidade da calda sulfocálcica a *I. zuluagai* em relação a *B. phoenicis*; (b) avaliação do

impacto de calda sulfocálcica na demografia de *I. zuluagai*, mediante estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i) em laboratório; e (c) mensuração da persistência da atividade biológica da calda sulfocálcica em casa de vegetação.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Coleta e criação de *I. zuluagai*

Uma população de *I. zuluagai* foi coletada em um pomar livre de tratamentos fitossanitários e isolado de pomares comerciais localizado em Piracicaba-SP. A coleta foi realizada por amostragem de folhas grandes e internas da copa das plantas de citros nos terços médio e inferior (RAGA et al., 1993). Quando constatada a presença de ácaros nas folhas, as mesmas foram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em caixa térmica para serem transportadas ao laboratório. No laboratório, os ácaros presentes nas folhas foram transferidos com auxílio de um microscópio estereoscópico e um pincel para arenas de criação.

Para a manutenção de *I. zuluagai* em condições laboratoriais foram utilizadas arenas de criação proposta por McMurtry e Scriven (1965). As arenas de criação foram constituídas de recipientes plásticos contendo em seu interior uma espuma embebida em água destilada, sobre a qual, uma placa preta (Paviflex[®]) foi circundada com algodão hidrófilo mantido constantemente úmido para atuar como barreira de contingência e fonte de água para os ácaros predadores. Os recipientes plásticos contendo os ácaros foram mantidos fechados. Os ácaros foram alimentados diariamente com pólen de taboa (*Typha angustifolia* L.). Fios de algodão sob um pedaço de lamínula de vidro foram posicionados no centro da arena para servir como local de oviposição e abrigo aos ácaros predadores. A criação foi realizada em sala climatizada regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e 14 h de fotofase.

5.2.2 Bioensaio toxicológico

A calda sulfocálcica utilizada foi a Fertibom[®] (200 g de enxofre/L de produto comercial - Fertibom Indústria Ltda., Catanduva-SP). O método de bioensaio adotado foi de contato direto e residual.

Inicialmente, para a confecção das arenas para os bioensaios, diferentes concentrações de calda sulfocálcica foram pulverizadas sobre a superfície adaxial de discos de folha de feijão-deporco, *Canavalia ensiformis* (L.), de 3,2 cm de diâmetro com uso da torre de Potter (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, Inglaterra) calibrada à pressão de 68,95 kPa (10 lb/pol²). Foi utilizado um volume de 2 ml de solução na pulverização de cada arena, obtendo-se uma deposição média de resíduo úmido de 1,56 mg/cm² sobre as arenas. Após a pulverização, as arenas foram mantidas em condições ambientais até a secagem do produto. Após secagem, as arenas foram acondicionadas em placas acrílicas de 3,5 cm de diâmetro (Falcon 1008, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, Estados Unidos) contendo 1 ml de uma mistura ainda não geleificada de ágar-água na concentração de 2,5 %. Para facilitar a pulverização das diferentes concentrações de calda sulfocálcica sobre *I. zuluagai*, grupos de 30 fêmeas adultas de *I. zuluagai* foram mantidas em arenas maiores (\approx 10 cm de diâmetro) confeccionadas com folhas de *C. ensiformis*, e dispostas sobre espuma embebida em água destilada contida em placa de Petri de 12 cm de diâmetro. A borda da folha foi circundada com algodão hidrófilo umedecida para mantê-la túrgida e impedir a fuga dos ácaros. Essas arenas contendo os ácaros foram pulverizadas em torre de Potter conforme descrito anteriormente. Após a pulverização, cinco fêmeas adultas foram transferidas para as arenas de bioensaio previamente pulverizadas. Uma pequena porção de pólen de taboa foi fornecida como fonte de alimento aos ácaros e alguns fios de algodão foram dispostos sob um pedaço de lamínula de microscopia de aproximadamente 0,25 cm² para oviposição e abrigo. As arenas foram fechadas com filme plástico para o confinamento dos ácaros no seu interior, e acondicionadas em recipientes plásticos tampados e mantidas em câmara climatizada à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10 \%$ e fotofase de 14 horas.

5.2.3 Caracterização da toxicidade da calda sulfocálcica a *I. zuluagai*

Para a caracterização da suscetibilidade de *I. zuluagai*, foram utilizadas concentrações de calda sulfocálcica espaçadas logaritmicamente entre 100 a 1.800 μg de enxofre/ml de água destilada. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado e cada concentração foi repetida cinco vezes, sendo que cada repetição foi constituída por quatro arenas com cinco fêmeas adultas de *I. zuluagai* cada. A avaliação da mortalidade foi realizada após 48 h da pulverização, sendo que ácaros que não apresentaram deslocamento por uma distância de no mínimo o comprimento de seu corpo foram considerados mortos.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit para a estimativa da CL_{50} e intervalo de confiança (I.C. 95%) utilizando o programa Polo-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). A razão de tolerância foi obtida pela divisão da CL_{50} da linhagem suscetível de *I. zuluagai* pela CL_{50} da linhagem suscetível de *B. phoenicis* estimada no Capítulo 2.

5.2.4 Efeito letal e subletal de calda sulfocálcica na taxa instantânea de crescimento (r_i) de *I. zuluagai*

Para avaliar o impacto de calda sulfocálcica sobre *I. zuluagai* foram utilizadas concentrações de calda sulfocálcica de 60, 600, 3.000 e 6.000 μg de enxofre/ml de água (ppm), equivalentes a 1, 10, 50 e 100% da concentração recomendada para o controle do ácaro-da-leprose. A avaliação foi realizada após sete dias da pulverização mediante contagem do número total de ovos, imaturos e adultos para estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i). A taxa instantânea de crescimento (r_i) foi estimada através da equação $r_i = [\ln(N_f / N_o)] / \Delta t$, onde N_f é o número final de ácaros vivos, N_o é o número inicial de ácaros vivos a Δt é o intervalo de tempo (dias) entre o início e término do bioensaio (STARK et al., 1997; WALTHALL; STARK, 1997). De acordo com a equação, se o valor estimado para $r_i = 0$ verifica-se uma população estável, se $r_i > 0$ verifica-se crescimento populacional, e se $r_i < 0$ verifica-se decréscimo na população, que poderá levar à extinção (HALL, 1964; WALTHALL; STARK, 1997). Os N_f s médios (número finais médios) foram submetidos à análise de variância e teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2002).

5.2.5 Persistência da atividade biológica da calda sulfocálcica a *I. zuluagai*

A persistência da atividade biológica da calda sulfocálcica a *I. zuluagai* foi conduzida em casa de vegetação entre novembro e dezembro de 2009. Foram utilizadas como substrato para essa avaliação, plantas de feijão-de-porco, *C. ensiformis*, com 20 a 30 dias de idade, cultivadas em vasos de 0,75 L de volume. A calda sulfocálcica foi utilizada na concentração recomendada de 6.000 μg de enxofre/mL de água destilada [I.A. (ppm)], equivalente a 60 L de produto comercial/2.000 L de água.

Plantas de *C. ensiformis* foram pulverizadas com calda sulfocálcica em casa de vegetação até o ponto de escorrimento, com auxílio de um pulverizador manual. Após a aplicação, as folhas de *C. ensiformis* foram coletadas para avaliação da atividade biológica dos resíduos, após uma

hora (0 dia) e no 5°, 11°, 17°, 25°, 30° e 41° dia após a aplicação. Em cada coleta foram retiradas 5 folhas. No laboratório, de cada folha foi retirado uma arena de 3,2 cm de diâmetro. Os discos de folha foram acondicionados em placa acrílica de 3,5 cm de diâmetro (Falcon 1008, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, Estados Unidos) contendo 1 ml de uma mistura ainda não geleificada de ágar-água na concentração de 2,5 %. Em seguida, cinco fêmeas adultas de *I. zuluagai* foram transferidas para cada arena pulverizada. Uma pequena porção de pólen de taboa foi colocada na arena como fonte de alimento para o ácaro predador e alguns fios de algodão sob um pedaço de lamínula de microscopia de aproximadamente 0,25 cm² para oviposição e abrigo. Essas arenas foram fechadas com filme plástico para o confinamento dos ácaros no seu interior. Os bioensaios foram acondicionados em recipientes plásticos tampados e mantidos em câmara climatizada à temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotofase de 14 horas.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado e cada concentração foi repetida cinco vezes, sendo que cada arena constitui-se em uma repetição. A avaliação da mortalidade foi realizada 72 h após a pulverização, sendo que ácaros que não apresentaram deslocamento por uma distância de no mínimo o comprimento de seu corpo foram considerados mortos. Os dados de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de Abbott (1925) e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). A avaliação do efeito de calda sulfocálcica na demografia de *I. zuluagai* foi realizada após sete dias da infestação das arenas mediante contagem do número de ovos, de imaturos e de adultos para estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i). A taxa instantânea de crescimento (r_i) foi estimada através da equação $r_i = [\ln(N_f / N_0)] / \Delta t$ (STARK et al., 1997; WALTHALL; STARK, 1997). De acordo com a equação, se o valor estimado para $r_i = 0$ verifica-se uma população estável, se $r_i > 0$ verifica-se crescimento populacional, e se $r_i < 0$ verifica-se decréscimo na população, que poderá levar à extinção (HALL, 1964; WALTHALL; STARK, 1997). Os N_f s foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas com o controle pelo teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$) (SAS INSTITUTE, 2002).

5.3 Resultados

5.3.1 Caracterização da toxicidade da calda sulfocálcica a *I. zuluagai*

A CL_{50} (I.C. 95%) estimada pela análise de Probit para *I. zuluagai* à calda sulfocálcica foi de 865,07 μg de I.A./ml de água (691,59 – 1024,85) e coeficiente angular (\pm EPM) de 2,62 (\pm 0,42) ($\chi^2 = 0,18$, g.l. = 2). De acordo com a caracterização toxicológica de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) à calda sulfocálcica reportada no Capítulo 2, a CL_{50} (I.C. 95%) para a linhagem suscetível de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica foi de 200,79 ppm (I.A.) (182,96 – 218,82). Nessas condições, a razão de tolerância entre *I. zuluagai* e *B. phoenicis* foi de 4,31 vezes (Figura 5.1). Portanto, baseado apenas no efeito letal, *I. zuluagai* foi mais tolerante que a sua presa.

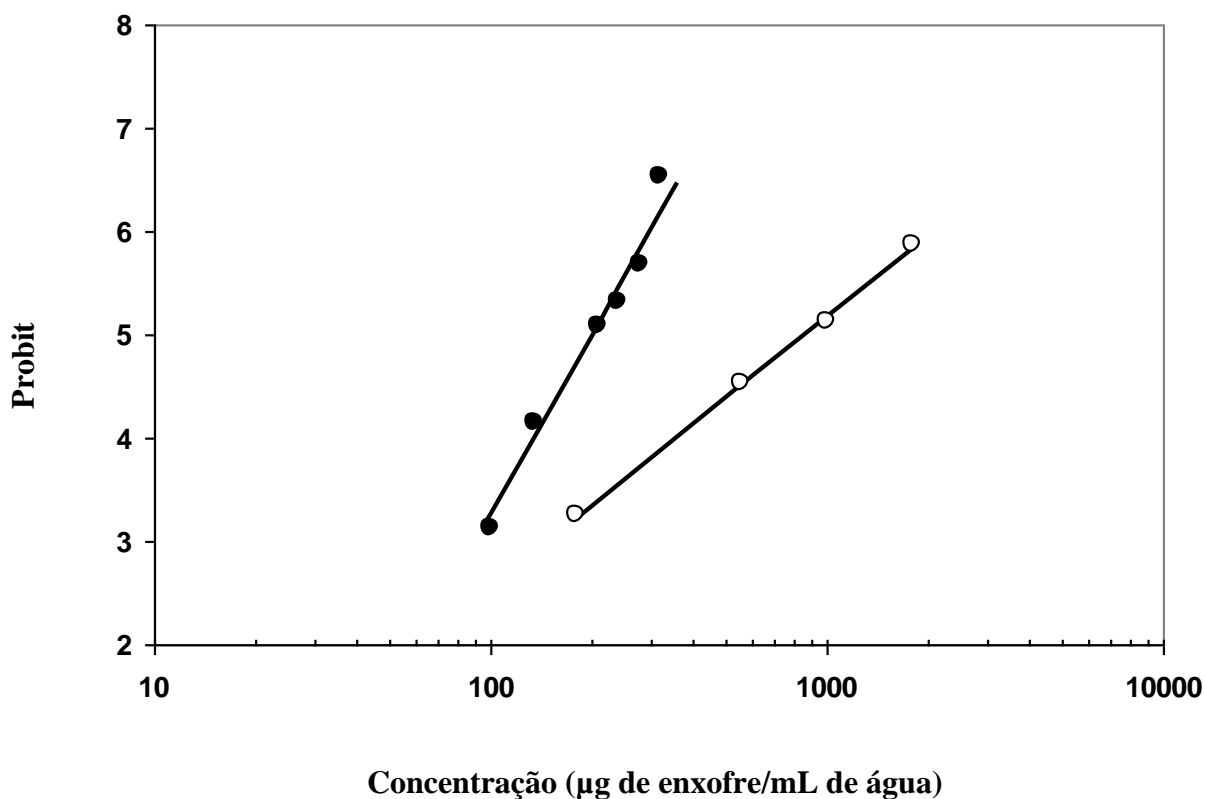


Figura 5.1 - Caracterização toxicológica de linhagens suscetíveis de referência de *B. phoenicis* (●) e *I. zuluagai* (○) à calda sulfocálcica. Razão de tolerância de 4,31 vezes

5.3.2 Efeito letal e subletal de calda sulfocálcica na taxa instantânea de crescimento (r_i) de *I. zuluagai*

As concentrações de calda sulfocálcica avaliadas (60, 600, 3.000 e 6.000 μg de enxofre / ml de água) ocasionaram uma redução na taxa instantânea de crescimento (r_i) de *I. zuluagai*. No entanto, as concentrações de 60 e 600 ppm de I.A. da calda sulfocálcica apresentaram r_i positiva, indicando crescimento populacional, enquanto as concentrações de 3.000 e 6.000 ppm de I.A. de calda sulfocálcica ocasionaram a extinção da população. O N_f (número final de indivíduos vivos) para as concentrações de 600, 3.000 e 6.000 ppm I.A. de calda sulfocálcica diferiram significativamente do controle ($F = 62,03$; g.l. = 4, 45; $P < 0,0001$). O crescimento populacional de *I. zuluagai* não foi afetada somente na concentração de 60 ppm (Tabela 5.2 e Figura 5.2).

A partir desses resultados, verifica-se que a calda sulfocálcica afeta significativamente os níveis populacionais de *I. zuluagai*.

Tabela 5.2 - Número final médio (N_f) (\pm EPM) e taxa instantânea de crescimento média (r_i) (\pm EPM) para *I. zuluagai* submetido às concentrações de calda sulfocálcica de 60, 600, 3.000 e 6.000 μg de enxofre/mL de água (ppm)

Concentração (μg I.A./ ml água)	N_f (\pm EPM)	r_i (\pm EPM)
0	29,3 \pm 2,27	0,221 \pm 0,014
60	23,3 \pm 2,25	0,192 \pm 0,014
600	11,8 \pm 2,03 *	0,107 \pm 0,009
3.000	0,0 \pm 0,0 *	extinção
6.000	0,0 \pm 0,0 *	extinção

* Média do tratamento difere significativamente do controle (concentração 0) pelo teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$)

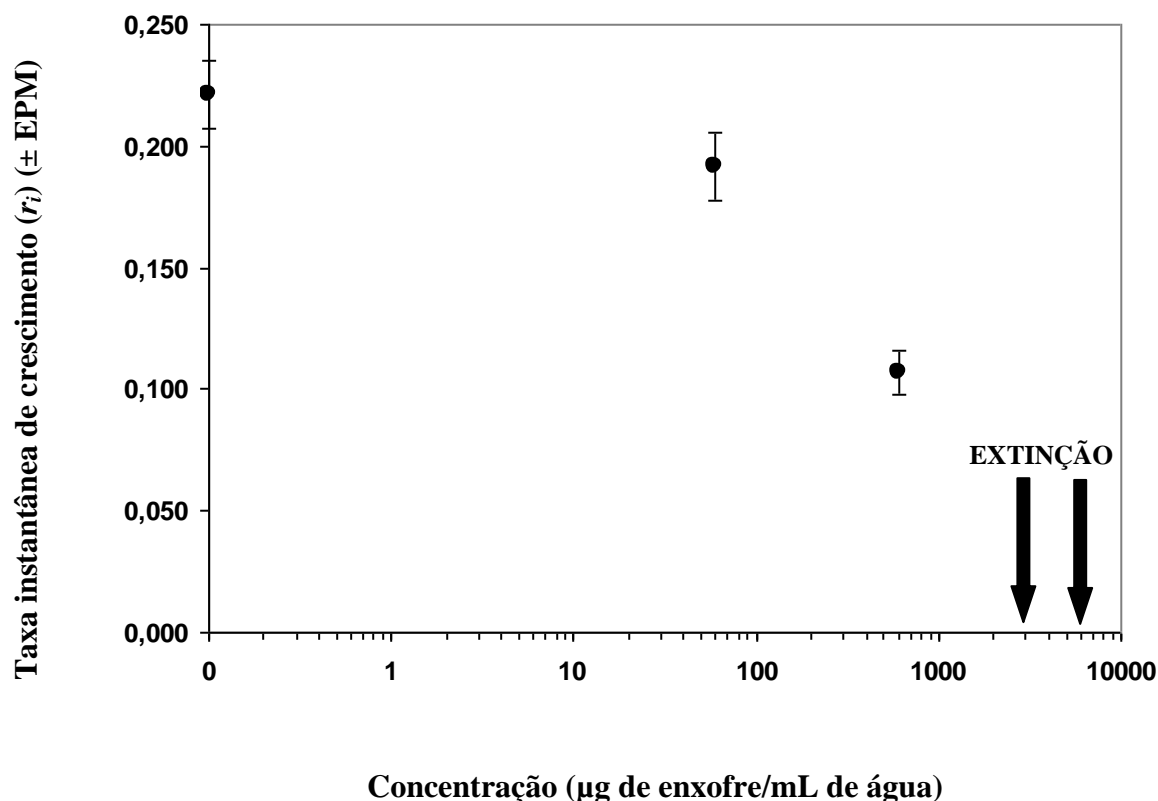


Figura 5.2 - Taxa instantânea de crescimento (r_i) para *I. zuluagai* nas concentrações de calda sulfocálcica de 60, 600, 3.000 e 6.000 µg de enxofre/ml de água (ppm), equivalentes a 1, 10, 50 e 100% da concentração recomendada para o controle de *B. phoenicis*, respectivamente. Setas indicam extinção da população de *I. zuluagai*

5.3.3 Persistência da atividade biológica de calda sulfocálcica a *I. zuluagai*

Diferenças significativas foram observadas na atividade biológica da calda sulfocálcica ao longo tempo ($F = 3,27$; g.l. = 6, 28; $P = 0,014$). No entanto, apenas os resíduos de calda sulfocálcica com 0 e 41 dias de idade diferiram significativamente entre si, apresentando mortalidade de 41,7% ($\pm 7,80$) e 8,57% ($\pm 5,08$). Observa-se pelo resultado de persistência que a ação residual do produto resultou em mortalidades inferiores a 50%, o que indica uma baixa toxicidade deste produto para esta espécie de ácaro predador, quando comparado aos efeitos deste produto sobre o ácaro-da-leprose (Figura 5.4 e Tabela 5.4). A taxa instantânea de crescimento (r_i) aumentou com a degradação do resíduo de calda sulfocálcica ao longo do tempo, sendo negativa até os 25 dias após a pulverização, indicando decréscimo populacional, e tornando-se positiva a partir do resíduo com 30 dias de idade, entretanto, os valores de r_i mantiveram-se

significativamente inferiores ao do controle até os 41 dias após a pulverização. Todos os N_f s obtidos na presença de resíduo de calda sulfocálcica diferiram significativamente do controle (Figura 5.5 e Tabela 5.4).

Apesar da mortalidade uma hora após a pulverização (tempo 0) ter sido baixa (41,7%), ela foi suficiente para afetar significativamente o crescimento populacional de *I. zuluagai*, o tornando negativo ($r_i = -0,384$), o que indica que a população está em decréscimo populacional, fato observado para os resíduos com idades de 5 a 25 dias após a pulverização, sendo que o resíduo com idade de 11 dias levou a extinção.

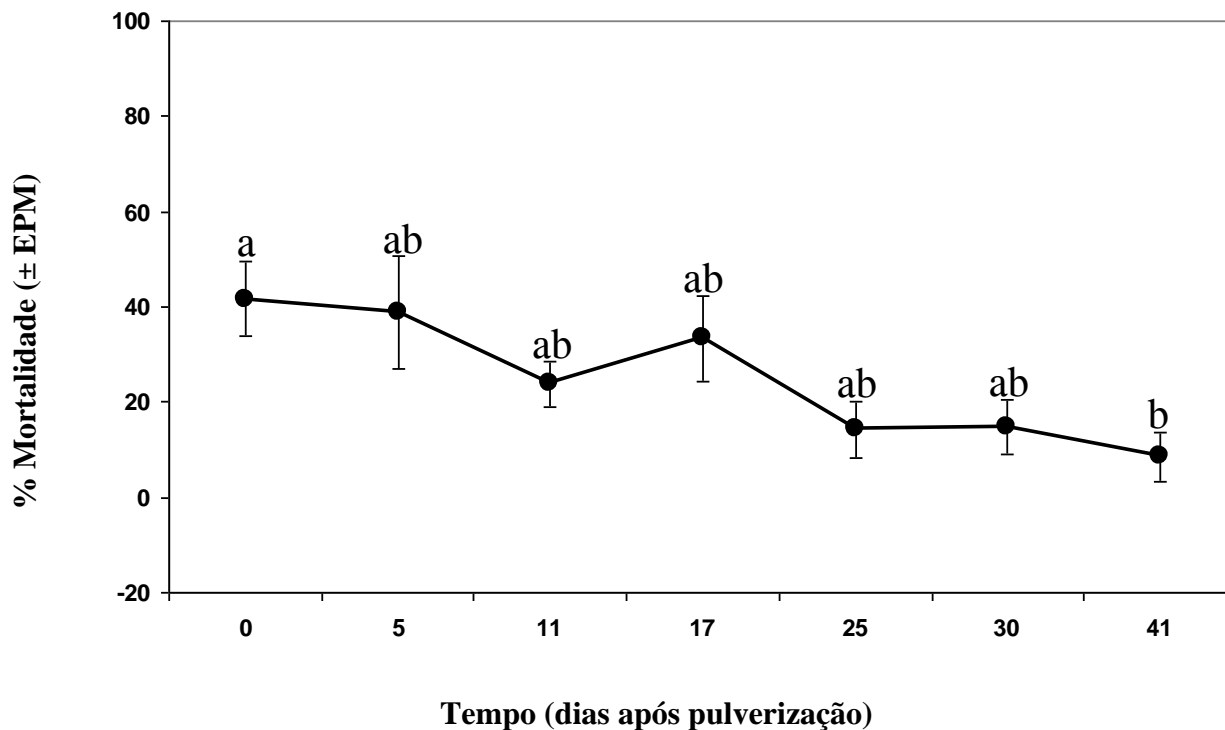


Figura 5.4 - Persistência da atividade biológica de calda sulfocálcica em plantas de *C. ensiformes* sobre *I. zuluagai*

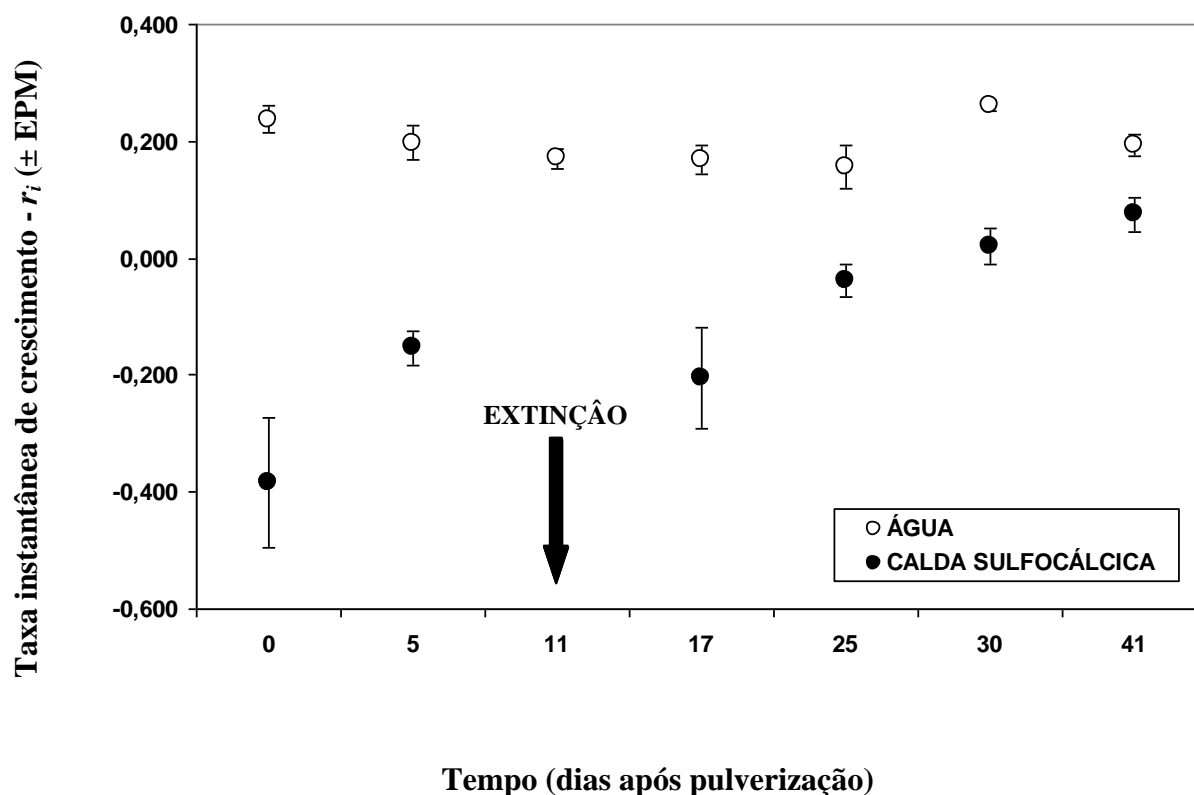


Figura 5.5 - Taxa instantânea de crescimento (r_i) (\pm EPM) para *I. zuluagai* para avaliar a persistência da atividade biológica de calda sulfocálcica em plantas de *C. ensiformes*. Seta indica extinção da população de *I. zuluagai*

Tabela 5.4 – Porcentagem de mortalidade (\pm EPM), número final (N_f) (\pm EPM) e taxa instantânea de crescimento (r_i) (\pm EPM) para *I. zuluagai* submetido a diferentes idades de resíduos de calda sulfocálcica em plantas de *C. ensiformes*

Dias após pulverização	% Mortalidade (\pm EPM)	N_f (\pm EPM)	r_i (\pm EPM)
Controle	--	22,31 \pm 2,43	0,198 \pm 0,015
0	41,7 \pm 7,80 a	1,10 \pm 0,77 *	-0,384 \pm 0,111
5	39,0 \pm 11,87 ab	1,90 \pm 0,46 *	-0,154 \pm 0,028
11	23,8 \pm 4,76 ab	0,00 \pm 0,00 *	extinção
17	33,3 \pm 8,91 ab	2,10 \pm 0,76 *	-0,204 \pm 0,087
25	14,3 \pm 5,83 ab	4,10 \pm 0,71 *	-0,038 \pm 0,027
30	14,8 \pm 5,60 ab	6,30 \pm 1,36 *	0,020 \pm 0,030
41	8,57 \pm 5,08 b	9,30 \pm 1,86 *	0,074 \pm 0,029

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

* Média do tratamento difere significativamente do controle pelo teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$)

5.4 Discussão

Na caracterização da suscetibilidade de *I. zuluagai* à calda sulfocálcica estimou-se uma CL_{50} de 865,07 μg de I.A./ml de água, e uma razão de tolerância entre *I. zuluagai* e *B. phoenicis* de 4,31 vezes (Figura 5.1). O que demonstra que o ácaro-da-leprose apresentou-se mais suscetível em relação ao seu inimigo natural *I. zuluagai*. Essa maior tolerância de *I. zuluagai* à calda sulfocálcica favorece a manutenção desse inimigo natural no ambiente citrícola e a associação entre o controle químico e biológico. Entretanto, quando avaliamos o efeito letal associado ao subletal de concentrações de calda sulfocálcica equivalentes a 1, 10, 50 e 100% da recomendada para o controle do ácaro-da-leprose, mediante estimativa de taxa instantânea de crescimento, verificou-se que a população de *I. zuluagai* foi extinta a partir da concentração de 50% de calda sulfocálcica, que equivale a 3.000 μg de I.A./ml de água (Figura 5.2). Dessa forma, a calda sulfocálcica afeta significativamente os níveis populacionais do ácaro predador *I. zuluagai* na concentração utilizada no campo.

Embora os resultados de persistência da atividade biológica da calda sulfocálcica em casa de vegetação demonstrem que os resíduos de 0 a 41 dias de idade causam um efeito moderado na mortalidade de *I. zuluagai* (< 50% de mortalidade); a avaliação do efeito letal e subletal mediante estimativa da taxa instantânea de crescimento demonstra que resíduos com até 25 dias de idade levaram ao decréscimo populacional (valores negativos de r_i) e a extinção (N_f igual a zero), e resíduos com 30 e 41 dias de idade, apesar de resultarem em r_i positiva, afetaram significativamente o crescimento populacional de *I. zuluagai* (Figura 5.4 e Tabela 5.4). Segundo Mani e Wood (1984), um produto pode ser considerado como altamente persistente quando sua atividade biológica é superior ou igual ao tempo de uma geração de um determinado organismo. Como a duração média de uma geração de *I. zuluagai* é de 18,7 dias (REIS et al., 1998), e a atividade biológica da calda sulfocálcica afetou significativamente o crescimento populacional de *I. zuluagai* até os 41 dias após a pulverização, podemos considerar a calda sulfocálcica como um produto de alta persistência a *I. zuluagai*.

A persistência da atividade biológica é característica para cada agrotóxico e pode exercer papel importante na evolução da resistência (TAYLOR et al., 1983; MANI; WOOD, 1984). Assim, compostos com alta persistência exercem uma pressão de seleção mais intensa (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977, TAYLOR; GEORGHIOU, 1982), e quanto maior a pressão de seleção, mais rapidamente se dá a evolução da resistência (CROW, 1957). Segundo Roush

(1989), compostos persistentes permanecem ativos (matando) por períodos prolongados, e quando há sua degradação, o resíduo causa maior mortalidade de genótipos suscetíveis do que resistentes. Portanto, a alta persistência da calda sulfocálcica a *I. zuluagai* poderia contribuir para a evolução da resistência desse ácaro predador, o que favoreceria a associação entre o controle químico e biológico nos pomares de citros. Entretanto, agrotóxicos de alta persistência no ambiente não são desejáveis, pois afetam as populações de inimigos naturais e favorecem a evolução da resistência na praga-alvo.

Após uma hora da pulverização (tempo 0), a porcentagem de mortalidade de *I. zuluagai* no resíduo de calda sulfocálcica foi de apenas 41,7% (Figura 5.5 e Tabela 5.4). Essa baixa mortalidade pode ser resultado da maior tolerância (4,31 vezes) de *I. zuluagai* em relação a sua presa *B. phoenicis*. Além disso, as condições climáticas da casa de vegetação podem ter promovido uma rápida degradação da calda sulfocálcica na primeira hora após a pulverização, pois a toxicidade da calda sulfocálcica a pragas agrícolas deve-se a liberação de gases tóxicos, essa liberação ocorre quando a solução de calda sulfocálcica entra em contato com o ar, pois nessa reação o enxofre precipita e os gases tóxicos são liberados. A decomposição da calda sulfocálcica em gases é proporcional a quantidade de dióxido de carbono presente no ar (ABBOTT, 1945). Segundo Beers et al. (2009) altas temperaturas podem aumentar a volatilização de enxofre, que segundo Shepard (1951) é considerado um agrotóxico fumegante. Dessa forma, é interessante que a persistência da atividade biológica da calda sulfocálcica a *I. zuluagai* seja também conduzida em campo sobre plantas de citros, pois a interação calda sulfocálcica, planta cítrica e condições ambientais em campo, como precipitação, podem afetar a persistência da atividade biológica da mesma. Mas é essencial a avaliação do efeito letal e subletal mediante a estimativa da taxa instantânea de crescimento, pois como pudemos observar na persistência da atividade biológica em casa de vegetação, apenas o efeito letal não permitiria verificar o real impacto da calda sulfocálcica sobre os níveis populacionais de *I. zuluagai*, uma vez que, a mortalidade foi moderada (< 50%), mas o efeito no crescimento populacional foi drástico, levando *I. zuluagai* até mesmo a extinção.

Beers et al. (2009) também avaliou a persistência da atividade biológica de calda sulfocálcica a um fitoseídeo, *Galandromus occidentalis* (Nesbitt) no estágio larval, e verificou mortalidades 89; 50 e 17% nos resíduos com 7; 14 e 22 dias de idade, respectivamente.

Segundo Pattaro (2006), as populações de *I. zuluagai* e *Euseius* spp. foram afetadas negativamente em experimento conduzido em pomar de citros com a adoção da calda sulfocálcica para o controle do ácaro-da-leprose.

Testes de avaliação do impacto de enxofre, principal componente da calda sulfocálcica e um produto muito utilizado nos pomares de citros, têm sido conduzidos sobre *I. zuluagai* e outros ácaros predadores mediante trabalhos de seletividade, de letalidade e de estimativa de taxas instantâneas de crescimento, revelando o efeito negativo desse produto sobre *I. zuluagai*. Segundo Sato et al. (1992), o enxofre afetou significativamente a população de ácaros predadores até 48 dias após a aplicação, com reduções oscilando entre 73,7 e 85,9%, sendo que as principais espécies observadas foram *Euseius concordis*, *I. zuluagai* e *Amblyseius* sp. Dados semelhantes foram observados por Sato et al. (1995), que demonstraram que o enxofre foi significativamente prejudicial à população de predadores (Phytoseiidae) em condições de campo até 58 dias após a aplicação, com índice de redução que variou entre 74,3 e 80,3% nesse período. Trabalhos de seletividade realizados por Reis et al. (1998) revelaram que o enxofre é moderadamente nocivo a *I. zuluagai*. Teodoro et al. (2005) avaliaram o efeito de enxofre sobre o ácaro-praga *Olygonychus ilicis* e seu predador *I. zuluagai* mediante estimativa da taxa instantânea de crescimento (r_i). Ao avaliar o efeito de enxofre sobre *I. zuluagai*, observou-se que a r_i decresceu linearmente com o aumento das concentrações, sendo que a CL₂₅ de enxofre foi capaz de levar o ácaro predador a extinção após sete dias de exposição. Enquanto que, *O. ilicis* quando exposto ao enxofre também apresentou declínio populacional com o aumento da concentração, mas a extinção não foi observada nem mesmo com a CL₉₀. O elevado potencial reprodutivo de *O. ilicis* comparado com o do seu predador *I. zuluagai*, é capaz de minimizar a mortalidade causada pelo enxofre. Segundo Teodoro et al. (2005), apenas a estimativa de CL não permitiria evidenciar os prejuízos ocasionados pelo enxofre no potencial reprodutivo de *I. zuluagai*., pois a CL₂₅ de enxofre foi capaz de levar o ácaro predador a extinção quando utilizou-se de parâmetros demográficos.

Os efeitos negativos do enxofre a *I. zuluagai* citados acima, associado aos efeitos negativos da calda sulfocálcica demonstrados nesse trabalho, possivelmente, estão reduzindo drasticamente a densidade populacional desse ácaro predador em campo. Dessa forma, falhas observadas no controle do ácaro-da-leprose em citros devido à evolução da resistência de *B. phoenicis* à calda sulfocálcica, provavelmente, estão sendo agravadas pela redução dos níveis populacionais de *I. zuluagai*. Segundo Roush (1989), a seletividade do agrotóxico pode retardar a

evolução da resistência, uma vez que, possibilita a sobrevivência de inimigos naturais, que podem atuar na eliminação dos indivíduos resistentes, além de reduzir o nível populacional da praga e possibilitar a redução de uso dos agrotóxicos e da pressão de seleção exercida por eles. Para Hoy (1998), a compatibilidade entre agrotóxicos e agentes de controle biológico é crucial em programas efetivos de Manejo Integrado de Pragas.

O ácaro *I. zuluagai* pode ser considerado um eficiente predador de estágios imaturos de *B. phoenicis*, e assim contribuir para a redução da presa em pomares de citros (REIS et al., 2003). Entretanto, um dos grandes problemas associados à eficiência no controle biológico de ácaros-praga em citros é a alta mortalidade provocada pelos agrotóxicos aos ácaros predadores e outros inimigos naturais presentes na cultura (SATO, 2005).

Uma alternativa para permitir a associação entre controle químico e biológico com ácaros predadores no manejo de ácaros-praga na citricultura poderia ser o emprego de populações de fitoseídeos tolerantes ou resistentes a agrotóxicos (GEORGHIU, 1972; HOY, 1985; SATO, 2005). Embora a resistência a agrotóxicos não seja freqüente em inimigos naturais (GEORGHIU; LAGUNES-TEJEDA, 1991), são conhecidos diversos casos de resistência em ácaros predadores da família Phytoseiidae (GEORGHIU, 1972; HOY, 1990). Hoy e Standow (1982) avaliaram a suscetibilidade do inimigo natural *Metaseiulus* [= *Galandromus* = *Thyphlodromus*] *occidentalis* Nesbitt a diferentes formulações de enxofre e à calda sulfocálcica e constaram altos níveis de resistência em populações desse ácaro a esses produtos.

Devido ao efeito letal e subletal negativo da calda sulfocálcica sobre populações de *I. zuluagai* constatado no presente trabalho, o uso desse produto no manejo de *B. phoenicis* deve ser feito com cautela para possibilitar a ação desse ácaro predador e assim contribuir para sustentabilidade da citricultura.

5.5 Conclusões

- Baseado no efeito letal, a calda sulfocálcica é menos tóxica para *I. zuluagai* do que para *B. phoenicis*;

- A calda sulfocálcica afeta negativamente a taxa instantânea de crescimento (r_i) de *I. zuluagai*;
- A persistência da calda sulfocálcica sobre plantas de *C. ensiformes* é relativamente alta e afeta a demografia de *I. zuluagai*.

Referências

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

ABBOTT, C.E. The toxic gases of lime-sulfur. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.38, p.618-620, 1945.

BEERS, E.H.; MARTINEZ-ROCHA, L.; TALLEY, R.R.; DUNLEY, J.E. Lethal, sublethal, and behavioral effects of sulfur containing products in bioassays of three species of orchard mites. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v.102, n.1, p.324-335, 2009.

CHIAVEGATO, L.G. Ácaros da cultura dos citros. In. RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR., J.; AMARO, A. (Eds.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.2, 941 p.

CROW, J. Genetics of insect resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**. Stanford, v.2, p.227-246, 1957.

GEORGHIOU, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.3, p.133-168, 1972.

GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.) **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p.769-792.

GEORGHIOU, G.P.; LAGUNES-TEJEDA. **The occurrence of resistance to pesticides in arthropods**. Roma: FAO, 1991. 318p.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and Biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.70, n.3, p.319-323, 1977.

GRAVENA, S. Manejo ecológico de pragas no pomar cítrico. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.205-225, 1990.

HALL, D.J. An experimental approach to the dynamics of natural population of *Daphnia galeata mendotae*. **Ecology**, Tempe, v.45, p.94-112, 1964.

HOY, M.A. Recent advances in genetics and genetic improvement of the Phytoseiidae. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.30, p.345-370, 1985.

Hoy, M.A. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v.353, p.1787-1795, 1998.

HOY, M.A. Pesticide resistance in arthropod natural enemies: variability and selection responses. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**, New York:Chapman and Hall, 1990. p. 203-236.

HOY, M.A. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v.353, p.1787-1795, 1998.

HOY, M.A.; STANDOW, K.A. Inheritance of resistance to sulfur in the spider mite predator *Metaseiulus occidentalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.31, p. 316-323, 1982.

LEORA SOFTWARE. **POLO-PC**: a user's guide to Probit or logit analysis. Berkeley, 1987. 20 p.

MANI, G.S.; WOOD, R.J. Persistence and frequency of application of insecticide in relation to the rate of evolution of resistance. **Pesticide Science**, Oxford, v.15, p.325-336, 1984.

McMURTRY, J.A.; SCRIVEN, G.T. Insectary production of phytoseiid mites. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.58, n.2, p.282-284, 1965.

MORAES, G.J. Controle biológico de ácaros fitófagos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.15, n.167, p.53-55, 1991.

MORAES, G.J.; GASTALDO JR., I. Uso de inimigos naturais para o controle de ácaros pragas dos citros. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1992, Águas de Lindóia. **Anais...** Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA, 1992. p.111-115.

OLIVEIRA, C.A.L. Aspectos ecológicos de *Brevipalpus phoenicis*. In: OLIVEIRA, C.A.L.; DONADIO, L.C. (Ed.). **Leprose dos citros**. Jaboticabal: Funep, 1995. p.37-48.

PATTARO, F.C. **Aspectos técnicos e econômicos da poda e do controle químico no manejo da leprose dos citros**. 2006. 140 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Entomologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

PENTEADO, S.R **Uso da calda sulfocálcica no controle alternativo de ácaros na citricultura**. Disponível em:<<http://www.agroorganica.com.br>>. Acesso em: 3 set. 2004.

POLETTI, M.; OMOTO, C. Variabilidade inter e intraespecífica na suscetibilidade de ácaros fitoseídeos à deltametrina em citros no Brasil. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, Costa Rica, v.75, p.32-37, 2005.

RAGA, A.; SATO, M.E.; CERÁVOLO, L.C.; ROSSI, A.C. Distribuição de ácaros predadores (Phytoseiidae) em laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osbeck). In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6., 1993. São Paulo, **Resumos....** São Paulo, Instituto Biológico, .1993. p.42.

REIS, P.R.; CHIAVEGATO, L.G.; ALVES, E.B. Biologia de *Iphiseiodes zuluagai* Denmark e Muma (Acari: Phytoseiidae). **Anais da Sociedade Entomologia do Brasil**, Jaboticabal, v.27, n.2, p.185-191, 1998.

REIS, P.R.; CHIAVEGATO, L.G.; MORAES, G.J.; ALVES, E.B.; SOUSA, E.O. Seletividade de agroquímicos ao ácaro predador *Iphiseiodes zuluagai* Denmark e Muma (Acari: Phytoseiidae). **Anais da Sociedade Entomologia do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, n.2, p.265-274, 1998.

REIS, P.R.; CHIAVEGATO, L.G.; ALVES, E.B.; SOUSA, E.O. Ácaros da família Phytoseiidae associados aos citros no município de Lavras, sul de Minas Gerais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.29, n.1, p. 95-104, 2000.

REIS, P.R.; SOUSA, E.O.; TEODORO, A.V.; PEDRO NETO, M. Effect of prey density on functional and numerical responses of two species of predaceous mites (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.32, n.3, p.461-467, 2003.

ROUSH, R.T. Designing resistance management programs: How can you choose? **Pesticide Science**, Oxford, v.26, p.423-441, 1989.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT**: user's guide, Version 8. Cary: SAS Institute, 2002.

SATO, M.E. Perspectivas do uso de ácaros predadores no controle biológico de ácaros-praga na citricultura. **Laranja**, Cordeirópolis v.26, n.2, p.291-306, 2005.

SATO, M.E.; RAGA, A.; CERÁVOLO, L.; ROSSI, A.C.; CEZÁRIO, A.C. Efeito de acaricidas sobre *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) e ácaros predadores (Phytoseiidae) em citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.2, p.79-86, 1992.

SATO, M.E.; RAGA, A.; CERÁVOLO, L.C.; ROSSI, A.C.; POTENZA, M.R. Ácaros predadores em pomares cítricos de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.435-441, 1994.

SATO, M.E. RAGA, A.; CERÁVOLO, A.C.; ROSSI, A.C. Efeito da utilização de acaricidas em citros, sobre a população de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) e ácaros predadores (Phytoseiidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.52, n.2, p.282-286, 1995.

SHEPARD, H.H. The chemistry and action of insecticides. McGraw-Hill, New York, 1951.

STARK, J.D.; TANIGOSHI, L.; BOUNFOUR, M.; ANTONELLI, A. Reproductive potencial: its influence on the susceptibility of a species to pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.37, p.273-279, 1997.

TAYLOR, C.E.; GEORGHIU, G.P. Influence of pesticide persistence in evolution of resistance. **Environmental Entomology**, College Park, v.11, p.746-750, 1982.

TAYLOR, C.E.; QUAGLIA, F.; GEORGHIU, G.P. Evolution of resistance to insecticides: a cage study on the influence of migration and insecticide decay rates. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.76, p.704-707, 1983.

TEODORO, A.V.; FADINI, M.A.M.; LEMOS, W.P.; GUEDES, R.N.C.; PALLINI, A. Lethal and sub-lethal selectivity of fenbutatin oxide and sulfur to predator *Iphiseiodes zuluagai* (Acari: Phytoseiidae) and its prey, *Oligonychus ilicis* (Acari: Tetranychidae), in Brazilian coffee plantations. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.36, p.61-70, 2005.

WALTHALL, W.K.; STARK, J.D. Comparison of two populations-level ecotoxicological endpoints: The intrinsic (r_m) and instantaneous (r_i) rates of increase. **Environmental Toxicology Chemistry**, New York, v. 16, p. 1068-1073, 1997.

ZEHNDER, G.; GURR, G.M.; KUHNE, S. ; WADE, M.R. ; WRATTERN, S.D. ; WYSS, E. Arthropod pest management in organic crops. **Annual Review of Entomology**, Standfort, v.52, p.57-80, 2007.