

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS**  
**ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE**  
***Tetranychus urticae* KOCH**

**MARCO ANTONIO TAMAI**

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **SÉRGIO BATISTA ALVES**

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

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Novembro - 1997

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

Tamai, Marco Antonio

Avaliação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tetranychus urticae*  
Koch / Marco Antonio Tamai. - - Piracicaba, 1997.  
85 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.  
Bibliografia.

1. Ácaro-rajado 2. Controle biológico 3. Fungo entomopatogênico 1. Título

CDD 632.6542

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS**  
**ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE**  
***Tetranychus urticae* KOCH**

MARCO ANTONIO TAMAI

Aprovada em: 14.01.1998

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves

ESALQ/USP

Prof. Dr. Gilberto José de Moraes

ESALQ/USP

Dr. Antônio Batista Filho

IB/SP

Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

Orientador

A DEUS

À Mônica Cagnin Martins

Aos meus pais, Siniti, Maria Vera (*in memorian*) e Verônica

Aos meus irmãos Carlos, Cristiane, Júlio César (*in memorian*) e Viviane

**Ofereço e Dedico**

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Sérgio Batista Alves pela orientação, estímulo, confiança, e amizade demonstrada durante nosso convívio.

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

Ao Prof. Dr. Gilberto José de Moraes e a Pesquisadora Dra. Nemauro Pedrosa Haji por terem sido os primeiros a me incentivar na pesquisa e pela amizade sincera.

À Prof. Denise Garcia pela orientação nas análises estatísticas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de estudos que possibilitaram a execução desse trabalho.

À bióloga Solange Aparecida Vieira, técnica do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (ESALQ/USP) pela amizade e auxílio na condução dos trabalhos.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Entomologia, pela amizade, compreensão e incentivos durante este tempo de convivência, em especial aos amigos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, Alcides Moino Júnior, José Eduardo Marcondes de Almeida, Luís Francisco Angeli Alves, Pedro M. O. J. Neves e Rogério Biaggioni Lopes.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP.

Aos funcionários da biblioteca da ESALQ/USP, especialmente às bibliotecárias Kátia Maria de Andrade Ferraz e Eliana Maria Garcia Sabino, pela colaboração na revisão das referências bibliográficas.

Aos amigos de “república” Cláudio Segateli, Edson Tafuri de Araújo, Miguel Francisco de Souza Filho e José Baldin Pinheiro, pela amizade, incentivo e principalmente pela interminável paciência durante a nossa convivência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
RESUMO .....	x
SUMMARY .....	xii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Importância dos ácaros tetraniquídeos e tipos de danos .....	3
2.2 Agentes de controle microbiano .....	4
2.2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner .....	4
2.2.2 Vírus não-inclusos .....	6
2.2.3 Fungos .....	12
2.2.3.1 <i>Hirsutella thompsonii</i> Fischer .....	12
2.2.3.2 Ordem Entomophthorales .....	19
2.2.3.3 <i>Verticillium lecanii</i> (Zimm.) Viègas .....	25
2.2.3.4 <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. ....	26
2.3 Patogenicidade de <i>B. bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin à ácaros hematófagos .....	28
2.4 Seleção de isolados em programas de controle microbiano .....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.1 Criação e manutenção de <i>Tetranychus urticae</i> em laboratório .....	33
3.2 Isolados dos fungos .....	34
3.3 Seleção de isolados .....	42
3.3.1 Estabelecimento da concentração de seleção .....	42
3.3.2 Seleção dos isolados mais virulentos de <i>Beauveria</i> spp. ....	44
3.3.3 Produção em arroz pré-cozido, pelo método de bandejas .....	44

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
4.1 Criação e manutenção de <i>Tetranychus urticae</i> em laboratório .....	46
4.2 Seleção de isolados .....	47
4.2.1 Estabelecimento da concentração de seleção .....	47
4.2.2 Seleção dos isolados mais virulentos de <i>Beauveria</i> spp. ....	53
4.2.3 Produção de <i>Beauveria</i> spp. em arroz pré-cozido .....	67
5 CONCLUSÕES .....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71



## LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Porcentagem de mortalidade acumulada média (total, corrigida e confirmada) de <i>Tetranychus urticae</i> , para os 28 isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> e 19 isolados de <i>Paecilomyces</i> spp., aplicados na concentração de $1 \times 10^8$ conídios/ml .....	47
2 Porcentagem de mortalidade acumulada total (A), corrigida (B) e confirmada (C) de <i>Tetranychus urticae</i> , submetido às concentrações de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> , isolado 447 .....	51
3 Distribuição de frequência dos 105 isolados de <i>Beauveria</i> spp., em faixas de porcentagem de mortalidade acumulada total (A), corrigida (B) e confirmada (C) causada em <i>Tetranychus urticae</i> .....	59
4 Porcentagem de mortalidade acumulada corrigida de <i>Tetranychus urticae</i> , aos 4 e 6 dias após a inoculação com conídios de 105 isolados diferentes de <i>Beauveria</i> spp. ....	60
5 Porcentagem de mortalidade acumulada corrigida de <i>Tetranychus urticae</i> , aos 4 e 6 dias após a inoculação com conídios, dos 22 melhores isolados de <i>Beauveria</i> spp. ....	63
6 Porcentagem de mortalidade acumulada corrigida de <i>Tetranychus urticae</i> , causada pelos oito melhores isolados de <i>Beauveria</i> spp., além da média geral dos 105 isolados testados e dos isolados 447 e Conídiá <sup>®</sup> .....	64

## LISTA DE TABELAS

	Página
1 Procedência e hospedeiro dos 105 isolados de <i>Beauveria</i> spp. utilizados nos bioensaios com <i>Tetranychus urticae</i> .....	35
2 Procedência e hospedeiro dos 28 isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizados nos bioensaios com <i>Tetranychus urticae</i> .....	39
3 Procedência e hospedeiro dos 19 isolados de <i>Paecilomyces</i> spp. utilizados nos bioensaios com <i>Tetranychus urticae</i> .....	41
4 Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) do ácaro <i>Tetranychus urticae</i> , inoculado com 28 isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> na concentração de $1 \times 10^8$ conídios/ml .....	48
5 Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) de <i>Tetranychus urticae</i> , inoculado com 19 isolados de <i>Paecilomyces</i> spp. na concentração de $1 \times 10^8$ conídios/ml .....	49
6 Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) de <i>Tetranychus urticae</i> , submetido à seis concentrações de <i>Beauveria bassiana</i> , isolado 447 .....	50
7 Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) do ácaro <i>Tetranychus urticae</i> , inoculado com 105 isolados de <i>Beauveria</i> spp., na concentração de $5 \times 10^8$ conídios/ml .....	53
8 Médias de produção de conídios/g de arroz, para nove isolados de <i>Beauveria</i> spp. em arroz pré-cozido, pelo método de bandejas .....	67

**AVALIAÇÃO DE FUNGOS**  
**ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE**  
***Tetranychus urticae* KOCH**

Autor: MARCO ANTONIO TAMAI

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

**RESUMO**

A pesquisa foi desenvolvida em câmara para B.O.D., a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  UR e 12 horas de fotofase, utilizando-se fêmeas adultas recém-emergidas de *Tetranychus urticae* Koch. Os ácaros foram mantidos durante seis dias em discos de folha de *Canavalia ensiformis* inoculadas com conídios dos fungos. Os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces* spp. provocaram baixos índices de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada), quando inoculados em discos de folha na concentração de  $10^8$  conídios/ml. Observou-se entre os 105 isolados testados de *Beauveria* spp., na concentração de  $5 \times 10^8$  conídios/ml, uma grande variação nos valores das três mortalidades acumuladas. No quinto e sexto dias após a inoculação com conídios de *Beauveria* spp., ocorreu um incremento nos valores das mortalidades acumuladas. Assim, decorridos seis dias da inoculação, 52 isolados causaram mortalidades corrigidas entre 41 e 80%, e apenas 19 isolados provocaram mortalidades iguais ou superiores a 81%. Nenhum isolado apresentou após seis dias, mortalidade confirmada igual ou superior a 81%, sendo que apenas três, provocaram mortalidade entre 61 e 80%. No quarto dia, apenas 22 isolados dos 105 testados, causaram mortalidade corrigida igual ou superior a 41% e destes, oito (307, 457, 489, 494, 868, 908, 969 e PL-63) provocaram mortalidades superiores a 35 e 95% ao terceiro e sexto dias, respectivamente, sendo os mais patogênicos a *T. urticae*. O isolado PL-63 foi o que apresentou a maior média

numérica de produção de conídios em arroz pré-cozido ( $1,0 \times 10^{10}$  conídios/g de arroz). Seis dos oito isolados testados, apresentaram valores de produção entre  $8,0 \times 10^9$  e  $1,0 \times 10^{10}$  conídios/g de arroz, sendo o isolado 457 o menos produtivo ( $3,0 \times 10^9$  conídios/g de arroz). Assim, foi possível selecionar oito isolados de *Beauveria* spp. com grande potencial para o controle de *T. urticae*.

**EVALUATION OF ENTOMOPATHOGENIC  
FUNGI FOR CONTROLLING THE  
*Tetranychus urticae* KOCH**

Author: MARCO ANTONIO TAMAI

Adviser: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

**SUMMARY**

This work was conducted in a rearing chamber at  $25\pm 2$  °C,  $70\pm 5\%$  RH and 12 h photophase, using recently emerged females of *Tetranychus urticae* Koch. Mites were maintained for 6 days on leaf disks of *Canavalia ensiformis* inoculated with conidia of different species and isolates of fungi. Isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces* spp. caused low levels of accumulated mortality (total, corrected and confirmed), at  $10^8$  conidia/ml. Great variation in accumulated mortality was observed for the 105 tested isolates of *Beauveria* spp., at  $5 \times 10^8$  conidia/ml. Significant increases in accumulated mortality were observed on the fifth and sixth days after inoculation; fifty two isolates (50% of the total) caused corrected mortality of 41 to 80% 6 days after inoculation, 19 of which (18%) caused at least 81% corrected mortality. After 6 days, none of the isolates caused 81% or more confirmed mortality; only 3 isolates (2.9%) caused 61 to 80% confirmed mortality. Of the most pathogenic isolates, 22 caused at least 41% corrected mortality on the fourth day and 8 (307, 457, 489, 494, 868, 908, 969 and PL-63) caused at least 35% and 95% mortality on the third and sixth days, respectively. Isolate PL-63 produced the largest numbers of conidia on pre-cooked rice substrate ( $1.0 \times 10^{10}$  conidia/g of rice substrate). Six of 8 tested isolates produced between  $8.0 \times 10^9$  and  $1.0 \times 10^{10}$  conidia/g of rice substrate; isolate 457 was the least

productive ( $3,0 \times 10^9$  conidia/g of rice substrate). The work allowed the selection of 8 isolates of *Beauveria* spp. with great potential to control *T. urticae*.

## 1 INTRODUÇÃO

Os ácaros são responsáveis por grandes prejuízos em lavouras de diferentes culturas e em muitas regiões agrícolas do mundo. O controle desses artrópodos é feito principalmente pela aplicação de acaricidas químicos, que nem sempre reduzem suas populações a níveis economicamente aceitáveis, podendo ser responsáveis por problemas relacionados com a contaminação ambiental, resistência e eliminação de inimigos naturais. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos de controle mais seguros para o homem e inimigos naturais.

O controle biológico é uma alternativa importante para o controle de ácaros fitófagos, quer seja pelo uso de predadores ou entomopatógenos. As doenças têm sido relatadas como um fator natural de controle, ocorrendo em enzootias ou epizootias, contribuindo para a diminuição das populações dos ácaros e conseqüentemente de seus danos.

Alguns patógenos de ácaros tetraniquídeos têm sido relatados em condições naturais, sendo em sua maioria vírus e fungos. Os vírus são observados com frequência em espécies do gênero *Panonychus*, entretanto não tendo sido relatados, até o momento, em ácaros de outros gêneros. As pesquisas com esses agentes foram conduzidas durante as décadas de 1950 e 1960, mas não tiveram continuidade. Um dos fatores que mais contribuíram para esta situação foi a dificuldade de se desenvolver um sistema econômico de produção em larga escala (Gilmore & Tashiro, 1966; Shaw et al., 1971; Reed et al., 1972b).

Os fungos são os patógenos mais frequentemente encontrados em populações de ácaros, contribuindo para o seu controle em diferentes culturas. Basicamente, os estudos para a utilização destes patógenos estão restritos a *Hirsutella thompsonii* Fischer e a várias espécies pertencentes à ordem Entomophthorales. O fungo *H. thompsonii* vem sendo observado em muitas partes do mundo atacando espécies pertencentes especialmente à família Eriophyidae (Speare & Yothers, 1924; Hall et al., 1980; Sosa-Gómez & Nasca, 1983; Cabrera et al., 1987). Esse patógeno já foi produzido, formulado e aplicado em campo (McCoy & Couch, 1982). Algumas espécies pertencentes à família Tetranychidae são descritas como suscetíveis a esse patógeno, entretanto, ao contrário do que ocorre com espécies de eriofiídeos, não é comum a ocorrência de epizootias em condições de campo, mas basicamente constatações em bioensaios de laboratório (Gerson et al., 1979; Gardner et al., 1982). Fungos da ordem Entomophthorales ocorrem como importantes patógenos de ácaros tetraniquídeos em todo o mundo, sendo descritas diversas espécies suscetíveis pertencentes aos gêneros *Eotetranychus*, *Eutetranychus*, *Mononychellus*, *Oligonychus*, *Panonychus* e *Tetranychus* (Fisher, 1951; Selhime & Muma, 1966; Weiser & Muma, 1966; Carner & Canerday, 1968; Weiser, 1968; Nemoto & Aoki, 1975; Delalibera Júnior et al., 1992), entretanto o seu potencial para uso em programas de controle biológico ainda não foi adequadamente avaliado.

Outras espécies de Deuteromycota, pertencentes aos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* e *Verticillium*, pela facilidade de produção em escala industrial e variabilidade genética, têm possibilidade para utilização no controle microbiano dessas pragas.

O objetivo principal desta pesquisa foi selecionar isolados dos fungos *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces* spp. altamente patogênicos a *Tetranychus urticae*.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância dos ácaros tetraniquídeos e tipos de danos

Os ácaros fitófagos em geral, alimentam-se através de um par de dígitos estiliformes da quelícera, usados para perfurar células das plantas hospedeiras. A maioria desses ácaros podem ser encontrados em duas superfamílias, a Tetranychioidea, da qual as famílias Tetranychidae e Tenuipalpidae são as mais importantes, e a superfamília Eriophyoidea, da qual Eriophyidae é a família mais importante. Além destes grupos, algumas espécies de outras famílias, especialmente de Tarsonemidae e Penthaleidae são pragas importantes (Yaninek & Moraes, 1991). Estes mesmos autores selecionaram 19 culturas representativas das mais importantes regiões agrícolas em todo o mundo, e fizeram um levantamento das principais espécies de ácaros fitófagos usando as informações disponíveis na literatura. Foram identificadas 85 espécies de ácaros, distribuídas em 27 gêneros e sete famílias. A família Tetranychidae foi a mais abundante, representando 64% das espécies, vindo a seguir a família Eriophyidae com 21%. As demais espécies estão distribuídas entre as famílias Tenuipalpidae, Tarsonemidae, Penthaleidae, Acaridae e Perlohmanniidae. Os tetraniquídeos congregam nove gêneros, sendo que três deles, *Tetranychus*, *Oligonychus* e *Eotetranychus*, corresponderam a 75% de todas as espécies desta família e aproximadamente a metade das espécies de ácaros identificados neste estudo. O gênero *Tetranychus* representou um terço de todos os tetraniquídeos e um quarto de todas as espécies encontradas. *Tetranychus urticae* foi a mais freqüente nas culturas selecionadas.

A espécie *T. urticae* é polífaga e ataca muitas culturas de importância econômica, colonizando e ovipositando na face inferior das folhas das plantas. Quando a população é muito alta, pode colonizar toda a planta. Este ácaro ataca preferencialmente folhas jovens, mas em colônias bem estabelecidas, folhas velhas podem se tornar altamente infestadas (Jeppson et al., 1975).

## **2.2 Agentes de controle microbiano**

### **2.2.1 *Bacillus thuringiensis* Berliner**

Poucos estudos foram realizados para avaliar o potencial de *B. thuringiensis* para o controle de ácaros fitófagos. As informações disponíveis são resultados de estudos isolados, nos quais avaliaram-se o efeito tóxico de formulações experimentais de sua  $\beta$ -exotoxina (thuringiensina) e também de produtos comerciais recomendados para o controle de lepidópteros e coleópteros.

Os trabalhos existentes tratam quase que exclusivamente do efeito da thuringiensina na sobrevivência das fases ninfais e adulta, na fecundidade das fêmeas, na taxa de eclosão de larvas e na taxa de alimentação. Esta toxina, produzida por algumas variedades de *B. thuringiensis*, atua como inibidor da produção de RNA-polimerase, bloqueando subsequente a mitose celular (Royalty et al., 1990). Estes autores consideram que esta forma de ação é vantajosa, por ser diferente de todos os acaricidas correntemente utilizados no controle de ácaros tetraniquídeos, o que dificultaria o aparecimento de resistência cruzada.

Os estágios imaturos são mais suscetíveis à toxina que o adulto. Em concentrações sub-letais, a toxina provoca anomalias, deformações e alterações teratogênicas em insetos (Habib & Andrade, 1986). Entretanto, o seu efeito teratogênico observado também em vertebrados e a possível mutagenicidade, levaram as autoridades

dos EUA e Canadá a impedirem o uso de linhagens de *B. thuringiensis* que produzam esta toxina (Burgess, 1975).

Um dos primeiros trabalhos sobre esta toxina foi conduzido por Hall et al. (1971). Esses pesquisadores determinaram, em condições de laboratório e casa-de-vegetação, o efeito da  $\beta$ -exotoxina ao ácaro *Panonychus citri* (McGregor). Observaram que a toxina agiu por contato e ingestão. Os ácaros contaminados ficaram paralisados e, quando mortos, o tegumento tornou-se flácido, rompendo-se facilmente quando tocado. Todas as fases de desenvolvimento do ácaro mostraram-se sensíveis à toxina, sendo o efeito proporcional à concentração utilizada. Ovos tratados apresentaram redução na viabilidade dos embriões e na sobrevivência das larvas eclodidas. Estudos em casa-de-vegetação mostraram que o material testado foi tóxico por até 45 dias após a aplicação. Os resultados em casa-de-vegetação foram similares aos observados em laboratório, com a população dos ácaros sobre "seedlings" sucumbindo entre 3 a 7 dias após a aplicação, dependendo da concentração utilizada.

Hoy & Ouyang (1987) mostraram que a  $\beta$ -exotoxina, em formulação concentrado emulsionável, foi tóxica a adultos e jovens de *Tetranychus pacificus* McGregor e ao seu predador, *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Tetranychidae e Phytoseiidae), ambos provenientes de colônias resistentes a diversos acaricidas. Para as duas espécies, o produto causou diminuição na sobrevivência de fêmeas adultas, redução na fecundidade e sobrevivência de larvas. Nesse estudo, ao contrário do citado anteriormente, ovos das duas espécies não apresentaram redução na viabilidade dos embriões, entretanto poucas larvas foram capazes de atingir o estágio ninfal, e nenhuma chegou à fase adulta.

Nos estudos desenvolvidos por Royalty et al. (1990), duas formulações de thuringiensina produzidas pelo laboratório Abbott (North Caroline, Ill.), quando aplicadas sobre discos de folhas de feijão-de-lima (*Phaseolus lunatus* L.) e posteriormente infestadas com *T. urticae*, foram tóxicas para ninfas (protoninfa e deutoninfa) e fêmeas adultas. As fases ninfais apresentaram sensibilidade semelhante entre si, entretanto foram significativamente mais sensíveis que as fêmeas. A thuringiensina apresentou atividade

muito lenta sobre os ácaros, com baixo índice de mortalidade em todas as fases, três dias após a aplicação. O efeito na redução da fecundidade de fêmeas tratadas não foi substancial, mas houve uma relação inversa entre a concentração e postura. O produto apresentou um forte efeito inibidor sobre a alimentação de fêmeas adultas.

A toxicidade de produtos experimentais e comerciais de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* e *B. t.* var. *kurstaki* foi avaliada por Chapman & Hoy (1991) para *T. urticae* e seu predador *M. occidentalis* (Acari: Tetranychidae e Phytoseiidae), sendo este último proveniente de colônias resistentes a enxofre, carbaril e diversos produtos fosforados. O tratamento de fêmeas adultas com duas formulações de *B. t.* var. *tenebrionis* causou, 48 horas após a aplicação, pequena mortalidade em *T. urticae*, sendo mais tóxico à fêmeas de *M. occidentalis*. Fêmeas de *T. urticae* apresentaram em média 90% de sobrevivência, contra 26% do predador, na concentração de campo. As duas espécies não sofreram redução na taxa de eclosão de larvas, entretanto apenas 65% dos imaturos do predador atingiram a fase adulta, contra 88% de *T. urticae*. O produto comercial Sandoz Trident<sup>®</sup> apresentou toxicidade moderada ao predador, com sobrevivência de 58% na dosagem comercial, enquanto que os produtos Mycogen M-ONE<sup>®</sup> (ambos *B. t.* var. *tenebrionis*) e Dipel 2X (*B. t.* var. *kurstaki*) foram os menos tóxicos, com sobrevivência de 80% na concentração comercial, contra 90% no tratamento testemunha (Chapman & Hoy, 1991).

O efeito supressivo muitas vezes observado sobre populações de ácaros tetraniquídeos, após a aplicação de *B. thuringiensis*, é atribuído à presença de subprodutos nas formulações, e não à ação direta da bactéria ou de seus produtos metabólicos (Van Der Geest, 1985).

### 2.2.2 Vírus não-inclusos

Existem poucos estudos sobre as doenças causadas por vírus em ácaros. O reduzido número de trabalhos foi feito nas décadas de 1950 e 1960, basicamente com duas espécies de tetraniquídeos, *Panonychus ulmi* (Koch) e *P. citri*.

A primeira constatação da ocorrência de uma doença virótica em ácaros tetraniquídeos foi feita por Muma (1955), em populações naturais de *P. citri*, em pomares de citros na Flórida. Os ácaros atacados apresentavam diarreia e, quando mortos, eram observados presos à superfície da folha por uma substância escura, exsudada através do ânus.

Alguns anos mais tarde, os mesmos sintomas foram observados em ácaros provenientes de pomares cítricos da Califórnia, muitos dos quais apresentando paralisia e pernas enrijecidas ventralmente (Smith et al., 1959). Estes autores conduziram os primeiros trabalhos no sentido de reconhecer o agente causal da doença. Em sua primeira tentativa, examinaram cortes ultrafinos do corpo de ácaros doentes e sadios, sem chegar a resultados conclusivos. Na tentativa seguinte, examinaram o centrifugado da suspensão aquosa de ácaros doentes, encontrando partículas semelhantes a vírus, medindo 35 milimicra de comprimento. Reed & Hall (1972) demonstraram mais tarde a presença de partículas de um vírus não-incluso formadas dentro do núcleo das células epiteliais do mesêntero. Em estudos mais detalhados, Reed & Desjardins (1978) observaram partículas esféricas de três tamanhos diferentes em ácaros doentes.

De acordo com Beavers & Reed (1972), a infecção pelo vírus pode ser determinada montando-se o ácaro em meio Hoyer e examinando-o em microscópio de luz polarizada, para a presença ou ausência de cristais birrefringentes presentes no interior do corpo. Para situações de campo, Reed et al. (1972a) chegaram a desenvolver um aparelho portátil utilizado para a visualização dos cristais birrefringentes nos ácaros doentes.

Munger et al. (1959) demonstraram, em condições de laboratório, a transmissão da doença para ácaros sadios de duas formas diferentes: através da inoculação de ácaros sadios em uma cultura com ácaros doentes, ou pela aplicação de uma suspensão aquosa preparada com ácaros doentes sobre colônias de ácaros sadios.

A partir do trabalho realizado por Shaw et al. (1968b), ficou comprovado que esta doença em *P. citri* encontrava-se amplamente distribuída na principal área produtora de citros do Estado da Califórnia, onde este ácaro causa problema econômico. Dos

cinquenta e um pomares amostrados, distribuídos em nove municípios, foram observados ácaros doentes em pomares de laranja “Valência”, limão, pomelo, tangerina e lima. O vírus esteve amplamente distribuído por toda a área citrícola amostrada, mas nenhum fator ambiental ou prática cultural pareceu ser um fator de predisposição para a sua ocorrência natural.

Através da utilização de um “strain” albino de *P. citri* contaminado pelo vírus, Gilmore & Tashiro (1966) determinaram que o período de incubação necessário para que o ácaro inicie a transmissão do patógeno é de dois dias após a inoculação e continua até um a três dias antes de sua morte, correspondendo a um período ótimo de transmissão entre três e quatro dias após a inoculação.

Este patógeno é capaz de infectar todos os estágios de desenvolvimento de *P. citri*, exceto o ovo (Munger et al., 1959). Estudos detalhados conduzidos por Gilmore & Tashiro (1966), determinaram que este vírus causa grande redução na longevidade e fecundidade de fêmeas adultas, sendo mais intensa quando a infecção ocorre na fase imatura. Assim, 50% das fêmeas adultas inoculadas na fase de protoninfa, morrem até o sétimo dia após a inoculação e 100% no décimo-segundo dia, o que corresponde ao terceiro e oitavo dias após atingirem a fase adulta, respectivamente.

Com relação ao impacto desta doença em ácaros predadores, Shaw et al. (1967) avaliaram o efeito do vírus não-incluso do ácaro *P. citri*, sobre o potencial biótico e mortalidade de três espécies de ácaros predadores desta praga, *Euseius hibisci* (Chant) (= *Amblyseius hibisci*), *M. occidentalis* (Nesbitt) (= *Typhlodromalus occidentalis*) e *A. limonicus* Garman & McGregor (Acari: Phytoseiidae). Os predadores ao ingerirem partículas virais através da alimentação com presas infectadas, mostraram uma menor, mas não significativa redução na fecundidade, entretanto, a mortalidade não foi incrementada.

Os estudos de epizootiologia são por natureza bastante complexos, pois abrangem diferentes aspectos da biologia, do comportamento do hospedeiro e de sua densidade populacional, bem como a etiologia e virulência do patógeno, entre outros. Estes aspectos, por sua vez, são influenciados e modificados pelos fatores físicos do

ambiente, como o seu estado fenológico, fisiológico, e com fatores químicos, principalmente a utilização de defensivos. As investigações existentes para os vírus em ácaros fitófagos, restringem-se a poucos estudos, nos quais altas incidências do vírus estavam associadas a altas populações de *P. citri*.

Através de estudos conduzidos durante um ano e meio sobre a ocorrência natural de vírus em populações de *P. citri* em Corona, Califórnia-EUA, Tashiro & Beavers (1966) observaram uma grande epizootia do vírus, quando a população do ácaro estava muita alta, com 40-50 formas móveis por folha. O exame destes ácaros revelou que 54% dos ácaros vivos e 77% dos ácaros mortos eram portadores de cristais birrefringentes, entretanto a incidência deveria ser consideravelmente maior, porque nem todos os ácaros doentes produzem cristais. Os autores convenceram-se que a doença tem um papel muito importante na supressão populacional do ácaro, em determinados períodos do ano. A doença nunca desapareceu completamente da população de ácaros, ocorrendo de forma enzoótica durante certos momentos do ano.

Observações semelhantes foram feitas por Shaw et al. (1968b) em estudos realizados em cinquenta e um pomares cítricos, em nove municípios do Estado da Califórnia. Altas incidências do vírus estiveram associadas com altas populações do ácaro, observando-se o aumento na incidência quando a população de *P. citri* foi superior a 5 fêmeas/20 folhas. Quando a população era superior a 40 fêmeas/20 folhas, 50% dos ácaros amostrados estavam infectados. A incidência da infecção permaneceu baixa até que altas populações do ácaro se desenvolvessem, sendo então seguida por uma drástica redução na população do mesmo.

A produção deste vírus para a sua utilização em laboratório e aplicações em campo era feita inicialmente sobre ácaros criados em laboratório. Em decorrência da necessidade de quantidades cada vez maiores, os pesquisadores passaram a utilizar ácaros provenientes do campo. Neste sentido, Reed et al. (1972b) desenvolveram uma forma de incrementar a incidência da doença virótica entre os ácaros coletados, baseada no conhecimento da transmissão do vírus de um ácaro para outro. A infecção do vírus na

população do ácaro passou de 30% no momento da coleta para 92% quando mantidos por seis dias alimentando-se em frutos frescos de limão com o inóculo.

Nos testes de virulência feitos por Shaw et al. (1971), não se observou diferença no número de ácaros doentes quando se utilizou suspensão de vírus obtidos de ácaros doentes coletados no campo e aqueles produzidos em laboratório. A aplicação de 1 ml de suspensão de vírus em frutos infestados com protoninfas, deutoninfas e adultos de *P. citri*, proporcionou infecção de 82,9 e 71%, para ácaros produzidos em laboratório e campo, na concentração de 0,1%, e de 71,3 e 93,4%, respectivamente, na concentração de 0,2%.

Em decorrência dos problemas práticos desta forma de produção de inóculo, Shaw et al. (1971) desenvolveram um aparelho de sucção para a coleta de grandes quantidades de *P. citri* doentes, em condições de campo. O custo de produção de inóculo foi de US\$ 1,00 a 2,50 por grama, em valores da época, correspondendo a uma redução entre 95 a 98% dos custos, quando comparado à técnica de produção em laboratório. Como desvantagem desta técnica, a obtenção no campo de grandes quantidades de inóculo seria possível somente se as coletas fossem concentradas um pouco antes da epizootia atingir o seu pico, o que corresponderia ao momento em que 50% da população do ácaro se encontrasse infectada.

Com o objetivo de se determinar outras espécies de ácaros tetraniquídeos hospedeiros do vírus, e se estas espécies poderiam ser agentes de perpetuação do patógeno em baixas populações de *P. citri*, Beavers & Reed (1972) desenvolveram trabalhos com as espécies *P. ulmi*, *Oligonychus punicae* (Hirst), *T. urticae*, *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval, *T. pacificus*, *T. evansi* Baker & Pritchard e *Eotetranychus sexmaculata* (Riley). Ácaros dessas espécies foram expostos ao vírus de *P. citri* pela alimentação em folhas de citros contaminadas com o patógeno, ou pela aplicação de uma suspensão aquosa de ácaros doentes triturados. Apenas poucos indivíduos de *T. cinnabarinus* desenvolveram o cristal característico da doença. Esta espécie mostrou ser vetor eficaz do vírus, transmitindo o patógeno para ácaros sadios de *P. citri* através das duas formas de inoculação referidas anteriormente.



Uma das primeiras tentativas de aplicação prática deste vírus para o controle de *P. citri* foi feito por Gilmore (1965). Durante dois anos consecutivos, este autor procurou avaliar a possibilidade de promover a supressão populacional da praga através da aplicação em campo de suspensões aquosas contendo partículas virais, e também pela liberação de ácaros doentes produzidos em laboratório. Não foi possível evidenciar o efeito dos tratamentos, devido à ocorrência freqüente de epizootias naturais nas áreas tratadas. Na mesma época, Gilmore & Tashiro (1966) fizeram algumas considerações sobre a implicação prática da produção de ácaros doentes para a liberação em campo. Segundo estes autores, o pequeno período de incubação da doença exige que os ácaros infectados sejam utilizados rapidamente, isso porque a transmissão do vírus começa com dois dias após a inoculação e continua até um a três dias antes de sua morte.

Uma outra tentativa de aplicação em campo foi feita por Shaw et al. (1968a). Nessa ocasião, não houve diferença quanto ao nível de infecção proporcionado pelas concentrações de 0,01% (0,1 g de ácaros doentes/litro de água) e 0,1% (1g de ácaros doentes/litro de água). A aplicação de suspensão de partículas virais depois do pôr do sol não foi mais efetiva que as realizadas durante o dia. Além disso, a liberação de ácaros infectados provenientes de uma área epizoótica para áreas livres do patógeno, produz incidência duas vezes maior que comparada com a produzida pela utilização de ácaros criados e infectados em laboratório.

Com relação ao armazenamento de ácaros mortos pelo vírus, Gilmore & Munger (1963) desenvolveram uma técnica que envolve a dessecação do material fresco a vácuo, por volta de 18 mm de mercúrio, na presença de cloreto de cálcio anidro por duas horas. Depois de seco, o material é armazenado em um recipiente contendo no fundo uma pequena quantidade de material dessecante, sendo então lacrado e estocado a -10°F. Esta técnica permite a conservação do material por seis meses ou mais, sem reduzir a infectividade.

O efeito da temperatura na viabilidade do vírus armazenado dentro do corpo de ácaros mortos foi estudado por Reed (1974). O autor constatou que ácaros doentes expostos a 40,5°C por 24 horas mantinham-se com alta capacidade de infecção,

entretanto, quando expostos a 46 e 60°C inativam-se em seis e uma hora, respectivamente. Estes resultados mostraram que a viabilidade do vírus diminuiu rapidamente em temperaturas superiores a 40,5°C, havendo uma completa inativação em temperaturas acima de 46,1°C.

### **2.2.3 Fungos**

#### **2.2.3.1 *Hirsutella thompsonii* Fischer**

A primeira constatação do fungo *Hirsutella thompsonii* como patógeno de ácaros, foi feita em populações naturais do ácaro-da-ferrugem-dos-citros *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead), por Speare & Yothers (1924) em pomares cítricos na Flórida. Segundo os autores, diversos relatos haviam sido feitos desde 1912, relacionando o desaparecimento repentino do ácaro com o início da estação chuvosa na região. Este fenômeno ocorria no momento em que a população do ácaro era muito elevada no campo, e era precedido por comportamentos incomuns aos indivíduos, caracterizados pela sua agregação em áreas de incidência direta de luz, contrapondo ao hábito da espécie em procurar áreas sombreadas e semi-sombradas. Este comportamento ocorria com frequência, previamente ao aparecimento de ácaros mortos no local. Também foi observado que muitos adultos mudavam a cor, de amarelo-limão para amarelo-laranja ou amarelo-escuro, sendo também observada lentidão nos movimentos.

Após a constatação feita na Flórida, o fungo *H. thompsonii* vem sendo observado em diversas partes do mundo, atacando especialmente ácaros da família Eriophyidae. Epizootias deste fungo foram observadas em importantes regiões citricolas da América do Sul, onde o ácaro *P. oleivora* constitui-se em uma das pragas chaves desta cultura. Assim, a primeira constatação da ocorrência deste patógeno na Argentina foi feita por Sosa-Gómez & Nasca (1983) em populações naturais na Província de Tucumán.

Mais recentemente, Correia et al. (1992) fizeram a constatação em espécimes mortos coletados em pomares cítricos da região de Jaboticabal-SP, nos anos de 1990/91.

Outra espécie de eriofídeo freqüentemente descrita sendo atacada por este fungo é *Eriophyes guerreronis* Keifer, uma importante praga do coqueiro em diversas regiões produtoras no mundo. Em trabalhos realizados por Hall et al. (1980) no sentido de se conhecer os inimigos naturais deste ácaro em diferentes áreas produtoras do mundo, determinou-se que o fungo *H. thompsonii* é o seu principal inimigo natural.

Este fungo ocorre em muitos hospedeiros, constituindo-se em um importante fator de controle natural de ácaros fitófagos, com epizootias tendo sido registradas em espécies pertencentes a diferentes famílias de ácaros. Observações de infecção entre 80 a 100% em populações naturais de *Dolichotetranychus floridamus* (Banks) (Acari: Tenuipalpidae), foram feitas por Zoebisch et al. (1992), na Costa Rica. Da mesma forma, Cabrera et al. (1987) comprovaram o parasitismo de *H. thompsonii* em *Rhynacus* sp., ácaro pertencente à superfamília Eriophyoidea, família Rhyncaphytoptidae, com índice de infecção de 48% nos ácaros amostrados.

Outra espécie do gênero *Hirsutella* foi observada causando epizootias em *Tydeus gloveri* (Acari: Tydeidae) em pomares de laranja na região central do Estado da Flórida (Samson & McCoy, 1982). Esta espécie foi classificada pelos autores como *H. tydeicola* Samson & McCoy n. sp., sendo responsável por infecção em 40 a 100% dos ácaros examinados de uma colônia de laboratório, formada com ácaros coletados em campos.

Algumas espécies da família Tetranychidae são descritas como suscetíveis a *H. thompsonii*, inclusive *T. urticae*. Ao contrário do que ocorre com as espécies de eriofídeos, não é comum a ocorrência de epizootias naturais em populações de tetraniquídeos, sendo em sua maioria, determinadas em condições de laboratório sob temperatura e umidade relativa ideais para o patógeno. Um dos poucos casos que evidenciam a importância deste patógeno na supressão populacional de tetraniquídeos em condições de campo, foi feita por Muma (1955), para a espécie *P. citri* (=

*Metatetranychus citri*), como resultado do levantamento dos inimigos naturais das principais pragas dos pomares de citros da Flórida.

Trabalhos conduzidos por Gardner et al. (1982) determinaram que a aplicação de um único conídio do fungo sobre o dorso de *T. urticae*, causou mortalidade média de 96,54% ao sétimo dia, com pico ocorrendo entre o terceiro e quinto dias após a exposição ao conídio. O produto Mycar<sup>®</sup>, à base de *H. thompsonii*, quando foi aplicado sobre a folhagem, também foi infectivo para *T. urticae* e *O. ilicis*. Neste caso, houve esporulação do fungo na planta e posterior infecção do ácaro pelo conídio, resultando em mortalidade entre 75 a 90% para *T. urticae*, e 73 a 100% para *O. ilicis*.

Devido a interesses práticos para a introdução de *H. thompsonii* em Israel, Gerson et al. (1979) avaliaram o potencial deste patógeno para o controle do ácaro carmim, *T. cinnabarinus*. Os adultos e ninfas foram suscetíveis ao fungo, com a maioria dos adultos morrendo no segundo dia após o contato com o patógeno, atingindo mortalidade de 84% ao quarto dia.

Os processos de infecção e desenvolvimento de *H. thompsonii* em *P. oleivora* e outras espécies de ácaros estão bem documentados em trabalhos de McCoy & Couch (1978), Gerson et al. (1979) e Sosa-Gómez & Nasca (1983). São também relacionados por Gerson et al. (1979) e Kenneth et al. (1979) alguns aspectos da influência dos fatores ambientais sobre o patógeno, especialmente a temperatura e a umidade relativa.

De acordo com McCoy & Couch (1978), os conídios podem aderir em todas as partes do corpo do ácaro e germinar quando em contato com a cutícula. A invasão do hemocele do hospedeiro ocorre unicamente através da cutícula, sendo observada a máxima infecção de *P. oleivora* em condições de alta umidade relativa (90 a 100%) ou na presença de água livre. O crescimento hifal desenvolve-se inicialmente na região central da hemocele, expandindo-se posteriormente através das pernas e outras regiões do corpo. Após ter ocorrido a penetração do fungo, ocorre alta mortalidade em temperaturas de 23 a 30°C. O processo de conidiogênese de *H. thompsonii* em *P. oleivora* foi descrito por Sosa-Gómez & Nasca (1983). De acordo com estes autores, as hifas do fungo foram observadas saindo do corpo do ácaro pela região anterior e posterior, em alguns casos

rompendo o tegumento e emergindo lateralmente. A formação dos conidióforos com os seus respectivos conídios se processa a uma certa distância do ácaro morto, sobre as hifas às quais se fixam à superfície das folhas, mediante rizóides. No interior do corpo dos ácaros, observam-se corpos hifais que eventualmente formam clamidósporos esféricos, que também servem para difundir a doença.

Informações bem detalhadas do ciclo de vida de *H. thompsonii* em tetraniquídeos, são apresentadas por Gerson et al. (1979). Segundo estes autores, os conídios germinam e penetram o tegumento principalmente através da perna, entretanto todas as partes do corpo também servem como locais de penetração. Após a penetração, micélio e corpos hifais do fungo começam a se formar dentro do corpo, preenchendo todo o ácaro em 48 horas, causando assim a sua morte. A conidiogênese do fungo ocorre com 12 a 14 horas após a morte do ácaro, a 26°C e 100% de umidade relativa, inicialmente com o crescimento das hifas presentes no interior do cadáver, que forçam a sua saída para o exterior, no início através das aberturas genital e anal, posteriormente pelas pernas e finalmente por todas as partes do corpo. Estas hifas, ao emergirem do corpo do cadáver, crescem e produzem células conidiogênicas a partir das quais é formado um simples conídio globoso.

Na década de 1970 teve início nos Estados Unidos a produção massal, formulação e aplicação do fungo *H. thompsonii* como micoacaricida para o controle de *P. oleivora* e outras espécies de ácaros pragas. De acordo com McCoy & Couch (1982) a primeira formulação comercial deste fungo disponível nos Estados Unidos foi produzida em 1976 pela Abbott Laboratories (North Chicago, Il) como ABG 6065 e subsequente com o nome comercial de Mycar<sup>®</sup>. A permissão para uso experimental foi emitida em 1978 e o registro concedido em 1981. Este micoacaricida tem como ingrediente ativo o fungo *H. thompsonii* (strain Fla CBS 556.77b) e foi utilizado por estes autores, durante os anos de 1979 e 1980, nas formulações pó-seco e pó-molhável, para o controle de *P. oleivora* em pomares de laranja “Valência”. Os resultados demonstraram que o produto Mycar<sup>®</sup> foi efetivo em estimular epizootias de *H. thompsonii* em populações de *P. oleivora*, em várias épocas do ano. O fungo se

estabeleceu nos frutos e folhagens tratadas, ocorrendo neste local o crescimento micelial e conseqüente conidiogênese. Em um experimento conduzido em 1979, o produto Mycar<sup>®</sup> causou epizootia prematura na população do ácaro, quatro semanas após a sua aplicação nos pomares.

O grande número de hospedeiros de *H. thompsonii* foi um ponto importante para a sua industrialização, do ponto de vista econômico. Entretanto, a seleção de “strains” estáveis e altamente virulentos também precisa ser levada em consideração, para que esse fungo possa ter sucesso como micoacaricida (McCoy & Couch, 1978). Com este objetivo, McCoy et al. (1984) utilizaram a radiação ultravioleta para a produção de dois mutantes de *H. thompsonii* e os avaliaram para a produção de conídios em meio artificial e virulência ao ácaro *P. oleivora*. Nos testes de produção de conídios, o mutante WS1 produziu aproximadamente dez vezes mais conídios que o isolado selvagem, enquanto que o isolado SS produziu conídios mais cedo. Nos testes de virulência, os resultados mostraram que a infecção média pelo isolado mutante SS (22,2%) foi significativamente maior que pelo mutante WS1 (10,9%) e pelo isolado selvagem de *H. thompsonii* (11,8%).

Trabalhos realizados por Boucias et al. (1982) demonstraram que existe uma grande variação intraespecífica entre as populações naturais de *H. thompsonii*. Através de análises eletroforéticas de doze enzimas presentes no micélio de dezessete isolados geográficos (6 isolados da Flórida, 3 de Cuba, 1 do Texas, 1 da Carolina do Norte, 1 da Jamaica, 1 da Costa do Marfim, 2 da Rodésia, 1 da Nova Guiné, e 1 de Nova Híbride) de *H. thompsonii*, observaram que existe uma intensa variabilidade no conteúdo enzimico dos isolados. O coeficiente de similaridade, baseado em amostras enzimicas, obedeceu rigorosamente o modelo morfológico usado para separar *H. thompsonii* em três variedades, entretanto, os resultados mostraram que também ocorre uma extensa diferenciação a nível subcelular entre isolados com as mesmas características morfológicas.

A eficiência deste patógeno em condições de campo é influenciada por diferentes fatores, especialmente temperatura e umidade relativa. A influência da

temperatura no desenvolvimento de *H. thompsonii* foi estudada por Kenneth et al. (1979) *in vitro*. Estes autores observaram que a temperatura afeta significativamente o crescimento da colônia, conidiogênese e germinação de conídios. Os melhores desempenhos para cada uma das fases, ocorreram dentro da mesma faixa térmica, de 25 a 30°C, indicando a natureza mesotérmica do fungo. Em trabalhos complementares, Gerson et al. (1979) determinaram que dentro desta faixa térmica, o fungo é capaz de causar maior índice de mortalidade em populações de *T. cinnabarinus*, e mais rapidamente, normalmente no segundo dia. O efeito da umidade relativa também foi bem documentado neste trabalho. Foi observado que para ocorrer a infecção pelo patógeno é necessário a presença de gotas de água ou condições de alta umidade relativa, sendo poucos ácaros infectados em umidade inferior a 98%. A conidiogênese do fungo em ácaros mortos ocorreu apenas a 98-100% de umidade relativa.

Alguns problemas práticos para a utilização deste patógeno foram demonstrados por Gardner et al. (1982), ao avaliarem o potencial do produto Mycar<sup>®</sup> na supressão populacional do ácaro *T. urticae* em condições de casa-de-vegetação. Após determinarem em condições de laboratório a suscetibilidade do ácaro ao patógeno, os autores não conseguiram a mesma eficiência em condições de casa-de-vegetação, apesar de promover condições ótimas ao patógeno, como alta umidade relativa e presença de água livre na folhagem das plantas onde viviam os ácaros. Estes autores sugerem que a adição de adjuvantes à formulação comercial, para estimular o crescimento e conidiogênese, poderá incrementar a eficiência de *H. thompsonii* sobre *T. urticae*.

A seletividade de *H. thompsonii* tem sido estudada para alguns grupos de inimigos naturais, com a finalidade de determinar o impacto de sua utilização em culturas onde ácaros fitófagos são pragas importantes. Neste sentido, Sosa-Gómez et al. (1985) avaliaram a patogenicidade de *H. thompsonii* var. *thompsonii* à larvas e adultos de *Coccidophilus citricola* Brethes e *Lindorus lophanthae* (Blaisdell) (Coleoptera: Coccinellidae), duas espécies de inimigos naturais comuns em agroecossistemas citrícolas em Tucumán, Argentina. Não se observou efeito patogênico do fungo sobre os insetos. Os autores sugeriram testes complementares para avaliar o efeito na fecundidade,

voracidade e longevidade. Este fungo entretanto não tem sido considerado seletivo para ácaros predadores. Neste sentido McCoy (1981) citou que *H. thompsonii* foi encontrado infectando *Amblyseius peregrinus* (Muma) (= *Typhlodromalus peregrinus*) (Acari: Phytoseiidae).

A segurança do uso de *H. thompsonii* tem sido pouco estudada. Entretanto, algumas publicações revelam que este patógeno não apresenta riscos ao homem e a animais de sangue quente. McCoy & Heimpel (1980) observaram que *H. thompsonii* não causou qualquer efeito nocivo sobre animais de laboratório (ratos, coelhos e ratos-da-índia) quando se utilizaram formulações de conídios e micélio do fungo, em testes feitos para avaliar irritações de pele e olho e toxicidade aguda dermal e oral.

Alguns produtos químicos, particularmente fungicidas, usados para o controle de doenças em pomares cítricos, têm sido referidos como sendo responsáveis por aumento populacional de *P. oleivora*. Alguns autores atribuem este fenômeno ao efeito dos fungicidas sobre o fungo *H. thompsonii*. Nos estudos conduzidos por Eger Júnior et al. (1985), com o propósito de avaliar o efeito de diferentes misturas de tanque, na eficiência do produto clorpirifós no controle de *P. oleivora*, observaram que o cobre com clorpirifós ou ethion resultou em um nível de controle menor comparado às suas aplicações isoladas. Este efeito foi atribuído pelos autores ao efeito tóxico do cobre sobre o patógeno.

A utilização de defensivos químicos compatíveis com o patógeno é de fundamental importância para aumentar a população deste fungo em pomares cítricos e, conseqüente redução dos danos causados por *P. oleivora* (Alves, 1986a). Neste trabalho, o autor relaciona os seguintes produtos químicos, referidos na literatura, como razoavelmente compatíveis com *H. thompsonii*: binapacryl, carboxin, sulfato de cobre, PCNB, thiabendazole, oxiclureto de cobre, dinocap, dichlorvos, dicofol, omite, plictan e aldicarbe.



### 2.2.3.2 Ordem Entomophthorales

Fungos da ordem Entomophthorales são importantes patógenos de ácaros tetraniquídeos em todo o mundo, tendo sido descritas diversas espécies pertencentes ao gênero *Entomophthora*. Este gênero foi recentemente revisto, e então subdividido nos gêneros *Entomophthora*, *Conidiobolus* e *Triplosporium*, sendo este último, atualmente considerado sinônimo júnior de *Neozygites* (Moraes & Delalibera Júnior, 1992 citando Lipa, 1971 e Remaudiere & Keller<sup>1</sup>, 1980). Da mesma forma, muitas espécies de *Entomophthora* que atacam ácaros, são referidas por Van Der Geest (1985) como pertencentes ao gênero *Neozygites*. Por falta de informações claras sobre estas mudanças, adotaremos nesta revisão os nomes das espécies da forma como foram citadas nos trabalhos correspondentes, exceto *Neozygites floridana*, recentemente confirmada como pertencente a este gênero.

Pelo menos uma dezena de espécies de ácaros tetraniquídeos pertencentes aos gêneros *Eotetranychus*, *Eutetranychus*, *Mononychellus*, *Oligonychus*, *Panonychus* e *Tetranychus* são relacionados na literatura sofrendo epizootias naturais por estes fungos. As espécies de três destes gêneros, *Tetranychus*, *Oligonychus* e *Eotetranychus* juntos, correspondem a quase metade das espécies de ácaros pragas encontradas em dezenove culturas representativas da agricultura em todo o mundo (Yaninek & Moraes, 1991). O gênero *Tetranychus* é observado como hospedeiro comum de fungos desta ordem, incluindo a espécie *T. urticae*.

Uma das primeiras observações de um fungo desta ordem infectando ácaros tetraniquídeos, foi feita por Fisher (1951), no Estado da Flórida. O fungo foi identificado como sendo uma espécie de *Entomophthora*, responsável por um índice de mortalidade superior a 70% em populações naturais de *P. citri*.

Desde então, muitas outras espécies de fungos Entomophthorales têm sido descritas, atacando espécies de ácaros pragas. Nos Estados Unidos, o fungo *Neozygites*

---

<sup>1</sup> REMAUDIERE, G.; KELLER, S. Revision systematique des genre d'Entomophthoraceae a potentialite entomopathogene. *Mycotaxon*, v.11, p.232-338, 1980.

*floridana* (= *Entomophthora floridana*) foi descrito por Selhime & Muma (1966), como sendo um importante agente de controle natural das populações de *Eutetranychus banksi* (McGregor). Em estudos de laboratório, o patógeno apresentou um índice de infecção de 60% para este ácaro, e de 20% para a espécie *E. sexmaculatus*. Assim, esse patógeno pode atacar espécies pertencentes a gêneros diferentes da família Tetranychidae, entretanto com índice de infecção diferente. Esta espécie de fungo também foi observada no Japão, causando epizootias em populações de *Oligonychus hondoensis* Ehara (Nemoto & Aoki, 1975).

Nos Estados Unidos, *Entomophthora fresenii* Nowakowsfi foi descrita em muitas localidades do Alabama, causando mortalidade de até 100% em populações de *T. urticae*, especialmente em indivíduos adultos (Carner & Canerday, 1968). Em trabalhos complementares, Carner & Canerday (1970) verificaram que a flutuação populacional de *T. urticae* em lavouras de algodão depende não somente dos fatores físicos do ambiente, mas também do fungo *Entomophthora* sp..

Uma das primeiras observações da ocorrência de fungos Entomophthorales em populações de ácaros no Brasil foi feita por Humber et al. (1981), em *T. evansi* na região de Petrolina-PE. O patógeno foi identificado como sendo uma espécie de *Triplosporium* sp., e foi observado causando epizootias durante os meses de abril a junho de 1979, correspondendo ao final do período chuvoso na região. Durante esse período, corpos hifais e estruturas reprodutivas do fungo foram observados na maioria dos ácaros mortos.

Um marco importante nos estudos de patologia de ácaros no Brasil teve início no ano de 1988, durante uma intensa busca iniciada na região nordeste para se identificar os possíveis inimigos naturais do ácaro-verde-da-mandioca, *Mononychellus tanajoa* (Bondar). Foi observado em campos de mandioca na região central da Bahia, um considerável número de ácaros mortos devido a uma epizootia causada por *Neozygites* sp.. A partir desta constatação, foi conduzida uma investigação adicional, durante fevereiro a junho de 1990, para se determinar a distribuição deste patógeno em populações naturais de *M. tanajoa*. Foram visitados 97 campos de mandioca em diferentes estados do nordeste do Brasil, encontrando-se o ácaro em 82 campos. Desses

campos, em 41 foram encontrados ácaros infectados por *Neozygites*. Cerca de 75% dos campos onde se constatou a presença de *Neozygites* sp., a precipitação anual média varia entre 700 e 1300 mm (Delalibera Júnior et al., 1992). Um trabalho semelhante foi realizado na Índia por Ramaseshiah (1971), em levantamentos realizados durante os anos de 1968 a 1970. Um fungo denominado *Entomophthora* sp. (próxima de *floridana*) foi observado infectando diferentes espécies de ácaros tetraniquídeos, incluindo *T. urticae* (= *T. telarius*), *Tetranychus* sp.1 (possivelmente *T. cinnabarinus* ou *T. neocaledonicus*) e *Tetranychus* sp.2 (possivelmente *T. ludeni*). Em algumas oportunidades, o índice de mortalidade em populações naturais de *Tetranychus* sp.2 (possivelmente *T. ludeni*) foi de 80 a 100% dos indivíduos.

Um estudo detalhado do desenvolvimento do fungo *N. floridana* (= *E. floridana*) sobre o ácaro *E. banksi*, foi conduzido por Selhime & Muma (1966). Estes autores observaram que a estrutura infectiva do fungo, conhecida como conídio adesivo, fixa-se às pernas e porções inferiores do corpo, mais freqüentemente na região anterior. Sob condições adequadas, estes conídios germinam, crescem através do integumento e penetram o hospedeiro. A partir do ponto de penetração, o fungo expande hifas através do corpo do ácaro, dividindo-se posteriormente em corpos hifais que crescem e dividem-se na cavidade do corpo, gnatossoma e pernas, preenchendo inteiramente o corpo do hospedeiro. Ácaros mortos ocorrem, principalmente, associados com grande crescimento interno do fungo. Após a morte, o fungo cresce dentro do cadáver, rompendo o tegumento e produzindo conidióforos externamente. Estes conidióforos produzem conídios primários em condições de alta umidade relativa, que são então lançados a distâncias variáveis do ácaro morto. Dentro destas condições, os conídios, ao caírem sobre uma superfície seca, germinam, produzindo um fino e ereto filamento onde é produzido um único esporo adesivo em sua extremidade. Esporos adesivos secundários e terciários podem ser ocasionalmente produzidos a partir dos conídios adesivos primários, sendo menores que os anteriores. Em condições de temperaturas constantes de 26°C em condições de laboratório, o ciclo completo, que se inicia com a infecção do hospedeiro e termina com a produção de conídios infectivos, varia entre cinco a seis dias.

O fungo *Entomophthora* cf. *floridana* que infecta *T. urticae* na Carolina do Sul-EUA, desenvolve corpos hifais na hemocele do ácaro, reproduzindo-se aparentemente por fissão binária (transversal). Com três dias, os corpos hifais preenchem completamente a hemocele do ácaro, momento em que são observados os primeiros sintomas externos. Estes sintomas são representados por uma diminuição na movimentação do ácaro, e com o seu corpo tornando-se entumecido e empalidecido. As pernas tornam-se rígidas e estendidas, com os pontos vermelhos dos olhos tornando-se difusos. Pouco depois os ácaros morrem, apresentando inicialmente uma coloração mais clara e corpo entumecido, posteriormente tornando-se marrons e mumificados. Os conidióforos são produzidos pelo crescimento dos corpos hifais após a morte do ácaro, emergindo de todas as partes do corpo, exceto das pernas, gnatosoma e escudos dorsais. Na extremidade de cada conidióforo é produzido um único conídio primário, que depois de ter sido lançado a uma certa distância do cadáver, poderá produzir um conídio secundário idêntico ao conídio primário, entretanto menor, ou um conídio adesivo. Os conídios adesivos apresentam em sua porção distal uma estrutura em forma de disco, que aparentemente produz uma substância adesiva, que lhes permite fixar-se ao ácaro. Conídios adesivos primários ocasionalmente produzem conídios adesivos secundários, que por sua vez formam conídios adesivos terciários. Esporos de resistência foram observados no final da estação. Os ácaros que produzem esporos de resistência têm sintomas completamente diferentes daqueles que produzem conídios. Os ácaros tornam-se lentos e depois morrem, tornando-se pretos e brilhantes. Nesse estágio, a cutícula torna-se frágil e quando rompem, liberam um líquido escuro sobre a folha. Os esporos recém-formados são marrom brilhantes e tornam-se pretos à medida que ficam mais velhos (Carner, 1976).

De acordo com Nemoto & Aoki (1975) com a aproximação do inverno, corpos hifais do fungo *N. floridana* (= *E. floridana*) infectando *O. hondoensis* formam apenas esporos de resistência sem formação de conídios. No inverno, apenas esporos de resistência são observados em ácaros mortos e mumificados. A maior parte das múmias desintegram-se e caem das plantas hospedeiras, mas algumas podem permanecer nos

ramos. Ácaros mortos pelo fungo *Entomophthora* sp. (próxima de *floridana*) foram observados por Ramaseshiah (1971), fracamente aderidos às folhas, em posição de alimentação ou retidos nas teias produzidas pelos ácaros.

O ciclo de vida do fungo *E. fresenii* atacando os ácaros *T. urticae* e *T. telarius* foi descrito por Carner & Canerday (1968), com observações semelhantes às feitas por Selhime & Muma (1966) e Nemoto & Aoki (1975) para a espécie *N. floridana* (= *E. floridana*) e Ramaseshiah (1971) e Carner (1976) para *Entomophthora* sp. (próxima de *floridana*).

Este grupo de fungos é capaz de infectar todas as fases de desenvolvimento do ácaro, exceto o ovo (Nemoto & Aoki, 1975; Selhime & Muma, 1966), com índice de infecção superior para as formas adultas. Estudos conduzidos em pomares cítricos com o ácaro *E. banksi*, mostraram que o índice de infecção de *N. floridana* (= *E. floridana*) é maior para fêmeas que para as outras fases de desenvolvimento pós-embrionários. Ao longo do período de amostragem, a infecção em protoninfas foi de até 16,5% com média de 1,9%, deutoninfas de até 20,2% com média de 2,2% e fêmeas de até 49,2% com média de 5,7% (Selhime & Muma, 1966). Resultados semelhantes foram observados por Carner & Canerday (1970), ao estudar a ocorrência de epizootias de *Entomophthora* em populações de *T. urticae*. O nível de infecção diferiu com o estágio de desenvolvimento do hospedeiro, apresentando deutoninfas e adultos (fêmeas e machos), infecção duas vezes superior à de protoninfas, enquanto que as larvas foram pouco infectadas.

Condições de alta umidade relativa do ar são necessárias para que muitas espécies de Entomophthorales possam produzir conídios, ejetar e infectar os seus hospedeiros. As epizootias parecem estar associadas aos meses chuvosos, sendo altas infecções observadas quando são precedidas por um período variável de dias chuvosos (Wilding, 1981). Estudos conduzidos por Nemoto & Aoki (1975) demonstraram que infecções do fungo *N. floridana* (= *E. floridana*), atacando o ácaro *O. hondoensis* no Japão, ocorrem especialmente durante a estação chuvosa do ano.

Nos trabalhos desenvolvidos por Smitley et al. (1986), os autores definiram as condições ambientais que mais contribuem para a produção de conídios, infecção de

ácaros e patogenicidade de *Neozygites floridana* em *T. urticae*. A conidiogênese apresentou significativa interação com a temperatura e umidade relativa. A faixa ótima de umidade relativa foi de 98 a 100%, com maior produção de conídios primários a 100%, enquanto que a faixa favorável de temperatura foi de 15 a 26°C, com ótimo de 21°C. Temperatura e umidade relativa necessárias para a formação de conídios adesivos foram similares às exigidas para a produção de conídios primários. Valores elevados de umidade relativa, 90 a 95%, foram muito favoráveis para a infecção pelos conídios, não tendo sido observados ácaros infectados quando a umidade relativa foi de 25 a 35%, em todas as temperaturas trabalhadas. Nestes testes a temperatura teve pouco efeito na incidência da infecção, entretanto apresentou efeito muito importante na duração das fases do ciclo do fungo. Assim, ácaros mantidos a 10, 20, 30 e 37°C morreram com 15, 5, 4 e 7 dias, respectivamente. De forma semelhante, os resultados de uma série de trabalhos de infectividade do fungo *N. floridana* (= *E. floridana*) em *E. banksi* desenvolvidos por Selhime & Muma (1966), mostraram que houve uma correlação positiva entre umidade e infectividade. Água condensada após os conídios adesivos terem sido produzidos, resultou em alta incidência de infecção.

A possibilidade de utilização deste grupo de patógenos em condições de casa-de-vegetação para o controle de ácaros não tem sido devidamente avaliada, com poucos estudos feitos até o momento. Alguns poucos trabalhos como os de Kenneth et al. (1972) informam a ocorrência natural do fungo *Triplosporium floridana* em casa-de-vegetação em Israel, atacando o ácaro *T. urticae* (= *T. telarius*). O seu aparecimento esteve relacionado a temperaturas entre 20 a 42°C e condições de alta umidade relativa. Entretanto, o índice de indivíduos infectados pelo patógeno diminuiu rapidamente quando a casa-de-vegetação foi aberta, como resultado da diminuição da umidade relativa. Trabalhos conduzidos por Smitley et al. (1986), demonstraram a possibilidade de se induzir epizootias de *N. floridana* em condições de casa-de-vegetação. Sob condições de temperaturas máximas de 32-38°C e mínimas de 16-20°C, plantas que apresentavam ácaros sadios mas que posteriormente foram infestadas com ácaros doentes, apresentaram após 14 dias sob condições de 100% de umidade relativa a cada noite, 65%

dos ácaros infectados. Entretanto, quando as plantas recebiam 30 minutos de chuva simulada por dia, sem um prolongado período de alta umidade relativa, apresentaram apenas 1,4% de ácaros infectados. Os ácaros não foram infectados na ausência de chuva simulada e períodos de alta umidade relativa.

Nos casos em que seja necessário o fornecimento contínuo e/ou grandes quantidades de inóculo para a condução de trabalhos em condições de campo ou bioensaios em laboratório, existe a possibilidade de se coletar grandes quantidades do patógeno durante as epizootias e armazená-los em condições adequadas. Uma forma simples de estocagem do fungo *Triplosporium*, pode ser feita através do armazenamento de cadáveres infectados (Kenneth et al., 1972). Estes autores observaram que o fungo permanece com a viabilidade inalterada por seis meses quando armazenado a 4°C e baixa umidade relativa. Quando os cadáveres foram mantidos em condições ambiente, a 22°C, verificou-se que, decorrido seis meses, a viabilidade do fungo havia sido reduzida para 30%.

### **2.2.3.3 *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viègas**

O fungo *V. lecanii*, vem sendo utilizado como inseticida microbiano em condições de casa-de-vegetação. Este patógeno, tem se mostrado capaz de causar infecções em algumas espécies de ácaros pertencentes às famílias Tetranychidae e Eriophyidae.

Durante os anos de 1977 e 1978 conduziu-se na Inglaterra, por Kanagaratnam et al. (1981), uma intensa busca para se determinar possíveis patógenos do ácaro *Cecidophyopsis ribis* (Westwood) (Acari: Eriophyidae). Foram analisados brotos recebidos de 54 localidades do país, sendo o fungo *V. lecanii* o único patógeno associado a este ácaro. Testes de laboratório demonstraram que um dos isolados de *V. lecanii* obtidos durante a busca e um outro isolado obtido do pulgão *Macrosiphoniella sanborni*

(Gillette), foram altamente patogênicos ao ácaro, matando-os com 2 a 4 dias após a inoculação do patógeno.

Nos estudos conduzidos por Sewify & Mabrouk (1991) ficou demonstrada a patogenicidade de *V. lecanii*, isolado de *Brevicoryne brassicae* L., ao ácaro-marrom-dos-citros *Eutetranychus orientalis* (Acari: Tetranychidae). Todos os estágios do ácaro foram suscetíveis ao patógeno, inclusive os ovos, quando imersos em uma suspensão contendo  $10^7$  conídios/ml. Os ovos apresentaram alta redução na taxa de eclosão de larvas, especialmente quando incubados a 20°C. Todas as larvas eclodidas de ovos tratados foram infectadas pelo fungo e morreram. Larvas e adultos morreram entre dois a quatro dias após o tratamento com o patógeno, sendo a  $DL_{50}$  estimada em  $1,7 \times 10^5$  conídios/ml para a fase adulta.

Em condições de casa-de-vegetação, Helyer (1993) observou que *V. lecanii* é capaz de suprimir populações de *T. urticae* em condições de alta umidade. Os resultados foram ainda melhores, quando um produto comercial à base de óleo vegetal mais emulsificante foi adicionado à suspensão de conídios.

#### **2.2.3.4 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill**

*B. bassiana* é um patógeno amplamente estudado como agente de controle biológico para muitas espécies de insetos pragas, entretanto o seu potencial como microacaricida não tem sido devidamente avaliado. Testes de campo conduzidos com *T. urticae* (= *Tetranychus bimaculatus* Harvey), em feijão, mostraram um grande número de ácaros mortos pelo polvilhamento de uma preparação de conídios a 0,5%, sendo ninfas e adultos suscetíveis ao patógeno (Dresner, 1949). Os autores observaram que ácaros mortos que se encontravam sobre a planta desprendiam-se facilmente da folha, enquanto que alguns cadáveres apresentavam sintomas de liquefação e crescimento micelial. Os resultados da avaliação, cinco dias após a aplicação do patógeno, revelaram que dos 239 ácaros analisados em 16 folhas obtidas de plantas pulverizadas com o patógeno, 63,6%



estavam mortos, contra 18% no tratamento testemunha, equivalendo a uma mortalidade 3,5 vezes maior. Alguns ácaros mortos também foram encontrados a uma distância de até dez metros do local onde o fungo foi aplicado.

Nos testes conduzidos por Dyadecho (1958<sup>1</sup>, 1959<sup>2,3</sup>) citados por Lipa (1971), foi demonstrado que o uso de conídios de *B. bassiana* misturado com pequenas concentrações de acaricidas, proporcionou bom controle de *Tetranychus* spp. e *Briobria rubrioculus* (Scheuten). Quando se aplicou acaricidas (dimetom metil a 0,025% e um outro produto à base de enxofre) ou 4 kg/acre de uma preparação de conídios, de concentração não conhecida, sobre *B. rubrioculus* em macieiras, foram moderadamente eficientes, entretanto quando o fungo foi aplicado junto com dimetom metil ou quatro dias após a aplicação do produto contendo enxofre, na metade da concentração recomendada, os resultados foram excelentes. O exame da hemolinfa dos ácaros mortos revelou estruturas do fungo em apenas 17% dos ácaros amostrados. Os demais ácaros apresentavam septicemia bacteriana. Dois meses após o tratamento, nenhum ácaro foi encontrado nas plantas tratadas, mas altas populações se desenvolveram em plantas não tratadas (Dyadecho, 1958<sup>1</sup> e 1959<sup>2</sup>). Resultados semelhantes foram observados posteriormente, quando 4 kg/acre do mesmo preparado de *B. bassiana* foram usados junto com 0,025% de fentiom, para o controle de *B. rubrioculus*, *T. urticae* e *Tetranychus viennensis* Zacher (Dyadecho, 1959<sup>3</sup>). De acordo com este pesquisador, o produto químico torna os ácaros mais suscetíveis à infecção fúngica, de tal modo que altas mortalidades são obtidas depois de tal tratamento.

Outras espécies de ácaros têm se mostrado suscetíveis ao fungo *B. bassiana*. Em trabalhos conduzidos por Bartkowski et al. (1988), o ácaro *Mononychellus* sp. apresentou mortalidade média de 53%, ao sétimo dia após a inoculação, quando se utilizou um isolado obtido de uma espécie de lepidóptero não especificada pelos autores,

<sup>1</sup> DYADECHO, N.P. In: VASSILIEV, V.P. et al. (Ed.). *Biologiceskij metod borby s vrediteljami sel'skochozjastvennyh kultur i lesnyh nasazdenij*. Kisinev: Izdatelstvo Min. Selsk. Choz. Moldavskoj SSR, 1958. p.14-16.

<sup>2</sup> DYADECHO, N.P. In: TELENGA, N.A. (Ed.). *Biologiceskij metod borby s vrediteljami rastenij*. Kiev: Izdatelstvo Ukrainskoj Akad. Selsk. Nauk, 1959. p.35-41.

<sup>3</sup> DYADECHO, N.P. *Zashchita Rastenii*, n.5, p.36-37, 1959.

na concentração de  $1 \times 10^9$  conídios/ml. Este fungo também já foi isolado de *Eriophyidae* spp. na Itália (Pelagatti et al., 1988).

Mais recentemente, Rath (1991) referindo-se à pesquisas anteriormente desenvolvidas por ele e colaboradores, foram capazes de infectar o ácaro *Halotydeus destructor* com diferentes isolados de *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

### **2.3 Patogenicidade de *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin à ácaros hematófagos**

Os carrapatos são ácaros hematófagos transmissores de doenças em animais domésticos, silvestres e ao homem em quase todo o mundo. Para seu controle, são usados quase que exclusivamente produtos químicos, embora algumas tentativas de controle biológico tenham sido realizadas (Bittencourt et al., 1992). Entre os seus inimigos naturais, os fungos entomopatogênicos aparecem como promissores agentes de controle, em especial, *Metarhizium anisopliae* e *B. bassiana*.

Diferentes espécies de fungos entomopatogênicos foram encontrados por Kalsbeek et al. (1995), em populações naturais de *Ixodes ricinus*, sendo *Paecilomyces farinosus* e *V. lecanii* as espécies predominantes. Outras espécies encontradas foram: *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *P. fumosoroseus* e *Verticillium araneorum*.

No Brasil, as pesquisas concentram-se na avaliação *in vitro* de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para o controle de *Boophilus microplus* (Canestrini), um importante transmissor da babesiose e anaplasiose bovina (Barci, 1997). Os resultados mostram que todas as fases de vida do carrapato são suscetíveis aos fungos.

Testes desenvolvidos por Alves et al. (1993) demonstraram a patogenicidade dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* a ovos de *B. microplus*. O isolado de *M. anisopliae* foi mais patogênico, impedindo a eclosão de larvas 30 dias após a inoculação com conídios do patógeno. Resultados semelhantes foram obtidos por Bittencourt et al. (1994b), ao observar a diminuição no percentual de eclosão e sobrevivência de larvas de

*B. microplus*, e por Monteiro et al. (1996), para ovos de *Rhipicephalus sanguineus*, uma espécie de carrapato de canídeos.

Quando a aplicação de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi feita diretamente sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, o patógeno foi capaz de provocar alterações biológicas não somente no adulto, mas também na descendência do carrapato. Assim, foram observadas reduções nos períodos de postura, produção de ovos, eclosão de larvas e peso da massa de ovo, e aumento na mortalidade de fêmeas ingurgitadas, período de pré-oviposição e incubação dos ovos. O efeito foi sempre proporcional a concentração usada do patógeno (Bittencourt et al., 1992, 1994a; Souza et al., 1996).

Trabalhos conduzidos no Quênia têm mostrado que os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são capazes de controlar algumas espécies de carrapatos quando aplicados sobre o corpo de animais infestados. Nos testes com gado zebu, naturalmente infestados com *Rhipicephalus appendiculatus*, tanto *B. bassiana* como *M. anisopliae* induziram mortalidade de 76 e 85%, redução na fecundidade de 85 e 99% e redução na taxa de eclosão de larvas de 94 e 100%, respectivamente (Kaaya et al., 1996). Testes de toxicidade conduzidos pelos mesmos autores mostraram que estes fungos são compatíveis com dois carrapaticidas organofosforados comumente usados na África.

## **2.4 Seleção de isolados em programas de controle microbiano**

No desenvolvimento de um programa de controle microbiano de pragas, é de fundamental importância a utilização de linhagens e/ou isolados apropriados do agente biológico. Para isso, é importante contar com um bom banco de isolados, devidamente preservado e com variabilidade genética comprovada, para então, iniciar o programa a partir da seleção dos materiais promissores.

Entre as qualidades desejadas para um fungo entomopatogênico, Alves (1986b) e Frigo & Azevedo (1986) destacam às seguintes: alta eficiência no controle, grande capacidade de disseminação, resistência a condições adversas, além de qualidades

industriais como ótima produção de conídios e taxa de crescimento elevada, entre outras. Essas qualidades podem existir naturalmente em linhagens selvagens ou serem conseguidas por indução de mutação.

A variabilidade genética entre isolados de uma mesma espécie de fungo, é amplamente relatada na literatura. Muitos dos trabalhos conduzidos para espécies de interesse entomológico foram feitos com *M. anisopliae* e *B. bassiana*, em muitos casos, como testes iniciais visando a sua utilização em programas de controle microbiano. Esta filosofia tem sido empregada há muitos anos pelo Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, da ESALQ/USP, tendo na maioria dos casos, encontrado materiais promissores para o controle de diferentes espécies de insetos (Alves et al., 1984; Moino Júnior, 1993; Vieira et al., 1993; Almeida, 1994).

Assim, no trabalho de Moino Júnior (1993), ao avaliar a patogenicidade de 72 isolados dos fungo *B. bassiana* e *M. anisopliae* a três espécies de insetos que atacam grãos armazenados no Brasil (Coleoptera: Curculionidae), observou uma grande variação nas mortalidades obtidas, encontrando isolados que foram totalmente ineficientes para estas pragas, e outros que causaram 100% de mortalidade. Variações também foram observados nos trabalhos de Vieira et al. (1993) e Almeida (1994), ao avaliarem a patogenicidade de mais de uma centena de isolados dos mesmos fungos, à barata *Periplaneta americana* (L.) e ao cupim *Heterotermes tenuis* (Hagen), respectivamente. No primeiro caso, foi possível selecionar 12 isolados de *M. anisopliae* e 21 isolados de *B. bassiana* que provocaram 100% de mortalidade a *P. americana*. Para o cupim *H. tenuis*, foi possível selecionar o isolado 634 de *B. bassiana*, que causa alta mortalidade ao inseto e apresenta boa produção de conídios em diversos meios de cultura e sobre o inseto teste.

De forma semelhante aos trabalhos referidos anteriormente, Lecuona et al. (1996) encontraram grandes diferenças na patogenicidade de 21 isolados brasileiros e argentinos de *B. bassiana* a larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius); Feng & Johnson (1990) para seis isolados de *B. bassiana* a *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae); e Moorhouse et al. (1993a,b) para 19 isolados de *Metarhizium* spp. a larvas de *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae). Para *D. saccharalis* a

mortalidade variou de 50 a 90% de larvas, sendo de forma geral, os isolados brasileiros menos patogênicos (50 a 70% de mortalidade) do que os argentinos (60 a 90% de mortalidade). Para *D. noxia*, a mortalidade variou de 10 a 75% e de 40 a 95%, nas concentrações de  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^7$  conídios/ml, respectivamente. Para *O. sulcatus*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou valores de  $TL_{50}$  variando entre 6,09 a 8,72 dias.

Esta diferença de patogenicidade entre isolados também tem sido documentada para outros entomopatógenos como *V. lecanii*, *P. fumosoroseus* e *Nomuraea rileyi* (Farlow) quanto à  $TL_{50}$  e a mortalidade total (Jackson et al., 1985; Maniania & Fargues, 1992).

Trabalhos como esses permitem chegar à materiais promissores, como os isolados 1037 de *M. anisopliae* e 447 de *B. bassiana*, ambos obtido de *Solenopsis* sp., e mantidos no banco de patógenos da ESALQ/USP. No caso do isolado 1037, bioensaios realizados demonstram o seu grande potencial para o controle de diferentes espécies de insetos, como larvas de *Culex quinquefasciatus* Say e *D. saccharalis*, além de adultos de *Blattella germanica* (L.), *Solenopsis saevissima* (Smith) e térmitas (*H. tenuis* e *Cornitermes cumulans* (Kollar)) (Alves et al., 1997).

Outra forma de se determinar a variabilidade genética entre isolados é através da análise eletroforética de enzimas. Usando esta técnica, Tigano & Riba (1990) analisaram nove sistemas enzimáticos diferentes, para 15 linhagens de *B. bassiana* de origens geográficas diferentes. As  $\alpha$ -esterases se mostraram as mais polimórficas para *B. bassiana* e as mais indicadas para estudos de variabilidade genética deste patógeno, tendo sido encontradas um grande número moléculas de atividade, tanto no interior de cada linhagem, como no conjunto das linhagens analisadas.

Estudos eletroforéticos conduzidos por Sosa-Gómez et al. (1994), para os sistemas  $\alpha$  e  $\beta$  esterase de diferentes isolados de *B. bassiana*, mostraram grandes diferenças entre eles. Entretanto, isolados provenientes de uma mesma região geográfica, apresentaram altos coeficientes de similaridades e, ainda, apresentaram comportamento semelhante quanto à produção de conídios em meio de cultura. Estas observações confirmam em parte, os resultados obtidos por Poprawski et al. (1988) para *B. bassiana*,

atacando *Sitona* spp. em três países diferentes. Neste trabalho, duas situações distintas ocorreram. Na primeira, 11 isolados obtidos em anos diferentes em Senneville (França), foram semelhantes entre si, compartilhando o mesmo modelo eletroforético. Por outro lado, 10 strains coletados em Achouria (Marrocos) em um mesmo campo de alfafa e na mesma data, tiveram cinco perfis eletroforéticos diferentes.

Outros parâmetros também usados para diferenciar isolados são: crescimento e produção de conídios em diferentes meios de cultura, sensibilidade a produtos químicos, produção de exoenzimas e sobrevivência à luz ultra-violeta (Frigo & Azevedo, 1986; Feng & Johnson, 1990; Paccola-Meirelles & Azevedo, 1990; Sosa-Gómez et al., 1994).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), em Piracicaba, SP.

#### **3.1 Criação e manutenção de *Tetranychus urticae* em laboratório**

Foram utilizados ácaros da espécie *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), comumente denominado de ácaro rajado. Este ácaro foi multiplicado em laboratório, sobre plantas de feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Dicotiledonea: Fabaceae), constituindo-se assim a sua colônia estoque.

Para o estabelecimento desta colônia, foram utilizados ácaros provenientes de uma criação mantida pelo Laboratório de Quarentena do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (EMBRAPA/CNPMA) em Jaguariúna-SP, vivendo sobre a mesma planta.

As plantas de feijão-de-porco foram produzidas em vasos plásticos contendo como substrato uma mistura de terra, areia e esterco bovino na proporção de 2:1:1, respectivamente. Em cada vaso, foram semeadas doze sementes, sendo os vasos mantidos em casa-de-vegetação para germinação e desenvolvimento das plantas. Foram utilizadas sementes fiscalizadas provenientes de campos de produção da empresa Pirai Sementes, com sede em Piracicaba-SP.

As plantas foram infestadas com ácaros quando atingiram idade de 15 a 20 dias após a germinação, sendo as mesmas substituídas a cada 7 dias, a fim de manter a qualidade do substrato e dos ácaros produzidos. Os vasos contendo essas plantas, foram mantidos em condições de laboratório a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 10\%$  UR e 8 horas de fotofase, a fim de controlar o crescimento populacional de *T. urticae* e prevenir a contaminação da colônia por ácaros predadores e por insetos em geral.

### 3.2 Isolados dos fungos

Foram utilizados 152 isolados, sendo 61 de *Beauveria bassiana*, 5 de *Beauveria brongniartii*, 39 de *Beauveria* sp., 28 de *Metarhizium anisopliae*, 18 de *Paecilomyces lilacinus* e 1 de *Paecilomyces farinosus*. Estes foram isolados em diferentes localidades do Brasil e de outros países, de amostras de solo e de insetos infectados (Tabelas 1 a 3).

Os isolados encontram-se armazenados no Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, em freezer a  $-12^\circ\text{C}$  na forma de conídios puros. Por ocasião dos testes, os isolados foram repicados e multiplicados em meio de cultura M.C. (meio completo), previamente autoclavado a  $120^\circ\text{C}$  por 20 minutos. As placas de Petri e demais vidrarias foram esterilizadas por calor seco em estufas a  $180^\circ\text{C}$  por um período de 8 horas.

A repicagem foi feita colocando-se uma amostra de conídios puros em placa de Petri contendo meio de cultura estéril. Estes foram então espalhados por toda a placa com alça de Drigalsky. Estas duas etapas foram realizadas em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas. As placas foram então mantidas durante 10 dias em câmara B.O.D. a  $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$  e 12 horas de fotofase, para o crescimento e esporulação do fungo.



Para a produção de 1,0 l do meio de cultura M.C., são gastos as seguintes quantias de seus componentes:

• $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,36 g
• $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	1,05 g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,60 g
• $\text{KCl}$ .....	1,00 g
• Glucose .....	10,00 g
• $\text{NaNO}_3$ .....	1,58 g
• Extrato de levedura .....	5,00 g
• Ágar .....	20,00 g
• Água destilada .....	1000,00 ml

Tabela 1. Procedência e hospedeiro dos 105 isolados de *Beauveria* spp. utilizados nos bioensaios com *Tetranychus urticae*.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Procedência</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>Beauveria bassiana</i>	196	Ipojuca-PE	<i>Diatraea saccharalis</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	197	Araras-SP	<i>Diatraea saccharalis</i>
<i>Beauveria brongniartii</i>	210	Araras-SP	<i>Diatraea saccharalis</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	252	Piracicaba-SP	<i>Hypothenemus hampei</i>
<i>Beauveria brongniartii</i>	258	Estado de Pernambuco	<i>Castnia licus</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	268	Carpina-PE	<i>Diatraea saccharalis</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	307	Araras-SP	<i>Diatraea saccharalis</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	309	Estado da Bahia	Broca do olho da Eritrina
<i>Beauveria</i> sp.	341	Iracemápolis-SP	<i>Diatraea saccharalis</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	353	Piracicaba-SP	Pentatomidae (Hemiptera)
<i>Beauveria</i> sp.	428	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	447	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	450	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>

Tabela 1. Procedência e hospedeiro dos 105 isolados de *Beauveria* spp. utilizados nos bioensaios com *Tetranychus urticae*.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Procedência</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>Beauveria bassiana</i>	457	EMGOPA-GO	<i>Euschistus heros</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	462	Parati-RJ	Gryllotalpidae (Orthoptera)
<i>Beauveria bassiana</i>	468	Volta Redonda-RJ	<i>Apis mellifera</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	476	Piracicaba-SP	<i>Cosmopolites sordidus</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	485	Piracicaba-SP	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	489	Desconhecida	Hemileucidae (Lepidoptera)
<i>Beauveria bassiana</i>	494	Piracicaba-SP	<i>Dorcadocerus barbatus</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	498	San Miguel Tucumán-Argent.	<i>Cycloneda sanguinea</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	499	Blanco Pozo-Argentina	<i>Diabrotica speciosa</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	500	Yerba Buena-Argentina	<i>Nezara viridula</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	501	Virginia-Argentina	<i>Maecolaspis monrosi</i>
<i>Beauveria</i> sp.	520	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	522	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Beauveria</i> sp.	524	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Beauveria</i> sp.	529	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Beauveria</i> sp.	532	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Beauveria</i> sp.	536	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	540	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	544	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	548	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	549	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	551	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	553	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	557	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	561	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	565	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	569	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.

Tabela 1. Procedência e hospedeiro dos 105 isolados de *Beauveria* spp. utilizados nos bioensaios com *Tetranychus urticae*.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Procedência</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>Beauveria bassiana</i>	573	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	579	Piracicaba-SP	<i>Canthon</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	589	Desconhecida	<i>Nezara viridula</i>
<i>Beauveria</i> sp.	590	Piracicaba-SP	<i>Solenopsis saevissima</i>
<i>Beauveria</i> sp.	600	Cuiabá-MT	Amostra de solo
<i>Beauveria</i> sp.	612	Cuiabá-MT	Amostra de solo
<i>Beauveria</i> sp.	615	Lavras-MG	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	617	CNPAF-GO	Pentatomidae (Hemiptera)
<i>Beauveria bassiana</i>	618	CNPAF-GO	<i>Tibraca limbativentris</i>
<i>Beauveria brongniartii</i>	619	CNPAF-GO	Pentatomidae (Hemiptera)
<i>Beauveria bassiana</i>	620	CNPAF-GO	<i>Nezara viridula</i>
<i>Beauveria</i> sp.	635	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Beauveria</i> sp.	641	Anhembi-SP	<i>Scapteriscus</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	642	Anhembi-SP	<i>Scapteriscus</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	643	Lavras-MG	Amostra de solo
<i>Beauveria</i> sp.	644	Lavras-MG	Amostra de solo
<i>Beauveria</i> sp.	647	Alambari-SP	Amostra de solo
<i>Beauveria</i> sp.	651	Amparo-SP	Amostra de solo
<i>Beauveria</i> sp.	683	Monte Mor-SP	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	695	Londrina-PR	<i>Metamasius hemipterus</i>
<i>Beauveria</i> sp.	722	Curitiba-PR	<i>Diabrotica speciosa</i>
<i>Beauveria</i> sp.	739	Região Sul do Brasil	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	749	Região Sul do Brasil	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	750	Região Sul do Brasil	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	755	Região Sul do Brasil	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	756	Região Sul do Brasil	<i>Solenopsis</i> sp.

Tabela 1. Procedência e hospedeiro dos 105 isolados de *Beauveria* spp. utilizados nos bioensaios com *Tetranychus urticae*.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Procedência</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>Beauveria</i> sp.	757	Região Sul do Brasil	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	759	São Pedro Alcântara-SC	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	760	Piracicaba-SP	<i>Cornitermes cumulans</i>
<i>Beauveria</i> sp.	764	Estado de Santa Catarina	Amostra de solo
<i>Beauveria</i> sp.	787	Florianópolis-SC	Formicidae (Hymenoptera)
<i>Beauveria</i> sp.	862	Curitiba-PR	Desconhecido
<i>Beauveria</i> sp.	868	Goiânia-GO	Formicidae (Hymenoptera)
<i>Beauveria bassiana</i>	876	Uruguai	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	881	Salinas-Uruguai	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	887	Punta Del Este-Uruguai	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	890	Rocha-Uruguai	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	893	Uruguai	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria brongniartii</i>	895	Uruguai	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	900	Estado do Rio Grande do Sul	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria brongniartii</i>	901	Estado do Rio Grande do Sul	<i>Solenopsis saevissima</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	902	Estado do Rio Grande do Sul	<i>Solenopsis saevissima</i>
<i>Beauveria</i> sp.	908	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria</i> sp.	931	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	969	Piracicaba-SP	<i>Blatella germanica</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	986	Piracicaba-SP	<i>Boophilus microplus</i> (Acari)
<i>Beauveria bassiana</i>	987	Rio das Pedras-SP	<i>Heterotermes</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	1006	Piracicaba-SP	<i>Cycloneda sanguinea</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	1010	Irlanduba-AM	<i>Diabrotica aglobini</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	1035	Porto Alegre-RS	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	1058	Boa Esperança-PR	Amostra de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	1078	Arapongas-PR	Amostra de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	1103	São João do Piauí-PI	Amostra de solo

Tabela 1. Procedência e hospedeiro dos 105 isolados de *Beauveria* spp. utilizados nos bioensaios com *Tetranychus urticae*.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Procedência</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>Beauveria</i> sp.	1108	Teresina-PI	Amostra de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	1126	Tucuruí-PA	Amostra de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	1157	Cruz das Almas-BA	Amostra de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	1161	Teresina-PI	Amostra de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	1185	Corumbá-MS	Amostra de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	1187	Corumbá-MS	Amostra de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	1192	Corumbá-MS	Amostra de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	1197	Corumbá-MS	Amostra de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	1202	Piracicaba-SP	<i>Blatella germanica</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	PL-61	Estado do Espírito Santo	<i>Cosmopolites sordidus</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	PL-63	Piracicaba-SP	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Beauveria bassiana</i>	Conídiã <sup>®</sup>	Colômbia	<i>Hypothenemus hampei</i>

Tabela 2. Procedência e hospedeiro dos 28 isolados de *Metarhizium anisopliae* utilizados nos bioensaios com *Tetranychus urticae*.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Procedência</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	319	Goiana-PE	<i>Mahanarva posticata</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	412	Iguape-SP	<i>Epilampra</i> (Blattodea)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	816	Piracicaba-SP	Amostra de solo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	860	Piracicaba-SP	<i>Macropis zincta</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	865	Goiânia-GO	Homoptera
<i>Metarhizium anisopliae</i>	866	Piracicaba-SP	<i>Atta</i> sp.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	959	Rio de Janeiro-RJ	<i>Deois</i> sp.

Tabela 2. Procedência e hospedeiro dos 28 isolados de *Metarhizium anisopliae* utilizados nos bioensaios com *Tetranychus urticae*.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Procedência</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1022	Piracicaba-SP	Tiphiidae (Hymenoptera)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1027	Boa Esperança-PR	Amostra de solo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1037	Porto Alegre-RS	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1076	Arapongas-PR	Amostra de solo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1097	Lavras-MG	Amostra de solo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1104	São João do Piauí-PI	Amostra de solo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1113	Piracicaba-SP	<i>Colaspis</i> sp. (Coleoptera)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1144	Piracicaba-SP	<i>Calosoma granulatum</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1172	Estado de São Paulo	Amostra de solo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1175	Estado de São Paulo	Amostra de solo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1184	Corumbá-MS	Amostra de solo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1189	Corumbá-MS	Amostra de solo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1203	Estado de Pernambuco	<i>Blatella germanica</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1204	Piracicaba-SP	<i>Mahanarva fimbriolata</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	E-6	Estado de Pernambuco	<i>Diatraea saccharalis</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	E9	Boca da Mata-AL	<i>Mahanarva posticata</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	PL-43	Flexeiras-AL	<i>Mahanarva posticata</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	PL-47	Campos-RJ	<i>Mahanarva posticata</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	RJ-C	Desconhecida	Desconhecido
<i>Metarhizium anisopliae</i>	RJ-D	Desconhecida	Desconhecido
<i>Metarhizium anisopliae</i>	SPL-358	Piracicaba-SP	<i>Anthonomus grandis</i>

Tabela 3. Procedência e hospedeiro dos 19 isolados de *Paecilomyces* spp. utilizados nos bioensaios com *Tetranychus urticae*.

<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>	<b>Procedência</b>	<b>Hospedeiro</b>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	508	Piracicaba-SP	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	578	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	581	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	582	Cuiabá-MT	<i>Solenopsis invicta</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	623	Cuiabá-MT	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	625	Cuiabá-MT	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	626	Cuiabá-MT	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	627	Cuiabá-MT	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	628	Cuiabá-MT	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	632	Cuiabá-MT	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	774	Região Sul do Brasil	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	827	Piracicaba-SP	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	828	Piracicaba-SP	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	831	Piracicaba-SP	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	871	Piracicaba-SP	<i>Eacles imperialis</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1053	Londrina-PR	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1125	Cachoeiro do Itapemirim-ES	Amostra de solo
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1145	Piracicaba-SP	<i>Sarsina</i> sp.
<i>Paecilomyces farinosus</i>	1200	Amélia Rodrigues-BA	<i>Mahanarva fimbriolata</i>

### 3.3 Seleção de isolados

#### 3.3.1 Estabelecimento da concentração de seleção

O estabelecimento da concentração de seleção foi realizado em duas etapas de bioensaios. Na primeira, avaliou-se a patogenicidade de cada gênero de fungo na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml. O fungo que se mostrou mais eficiente nessa concentração, foi submetido à uma segunda etapa de bioensaios onde se determinou a concentração de seleção para o gênero. Nesta etapa o fungo foi testado em seis concentrações diferentes ( $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios/ml), além do tratamento testemunha que recebeu apenas água estéril com espalhante adesivo. A concentração de seleção utilizada foi aquela que causou porcentagem de mortalidade acumulada corrigida, calculada conforme a fórmula proposta por Abbott (1925), igual ou superior a 30% dos ácaros no sexto dia após a inoculação. O isolado 447 de *B. bassiana* obtido de *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) foi escolhido como padrão para os isolados de *Beauveria* nessa segunda etapa de bioensaios, por ser um dos isolados mais utilizados nos programas de controle microbiano desenvolvidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, da ESALQ/USP.

O estabelecimento da concentração de seleção foi feito avaliando-se ao sexto dia, a mortalidade de *T. urticae* em discos de folha de feijão-de-porco previamente inoculadas com conídios. Os testes foram conduzidos em câmara B.O.D. a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 5\%$  UR e 12 horas de fotofase.

Os discos foram obtidos usando-se um vasador circular de metal com 2,5 cm de diâmetro e folhas tenras e bem desenvolvidas de plantas com 15 a 20 dias de idade em média, produzidas em casa-de-vegetação. Após sua preparação, esses foram inoculados com o patógeno por meio de imersão em 10 ml de suspensão de conídios. As suspensões de conídios foram preparadas a partir do fungo produzido em meio de cultura M.C., como descrito no item 3.2 (Isolados dos fungos), com água destilada mais espalhante adesivo (Tween 40<sup>®</sup>) a 0,1%. Os discos ainda molhados foram colocados dentro de



placas de Petri, contendo duas camadas de papel de filtro circular sobre uma espuma de polietileno umedecida. Posteriormente, os discos molhados contidos na placa de Petri foram colocados para secar em câmara de fluxo laminar, por aproximadamente uma hora.

Cada disco recebeu inicialmente quinze fêmeas de *T. urticae*, sendo após doze horas, retirados os ácaros mortos e o excedente, de forma a deixar apenas 10 ácaros por placa. Os ácaros foram transferidos da colônia estoque para discos de folha de feijão-deporco, através de um pincel com poucos pêlos.

Cada placa de Petri recebeu doze discos inoculados com o patógeno e infestados com fêmeas de *T. urticae* após a secagem da suspensão de conídios, totalizando-se assim doze repetições. Para cada isolado, foi utilizado uma placa de Petri, a qual foi mantida aberta dentro da B.O.D. e os discos não foram trocados durante todo o período de observação. A camada de água formada sobre o papel de filtro permitiu a distribuição uniforme da água em toda placa, propiciando a conservação adequada dos discos e servindo também como barreira física para fuga dos ácaros. O nível de água nas placas foi completado diariamente.

Nesses testes, foram utilizadas fêmeas adultas recém-emergidas de *T. urticae*, provenientes da colônia estoque, apresentando cor viva, tegumento brilhante e alta mobilidade. Procurou-se desta forma, selecionar a fase biológica do ácaro responsável pelos maiores danos à cultura, evitando-se as fases imaturas, pois a substituição do exoesqueleto durante a ecdise pode interferir na penetração do fungo. Por outro lado, ácaros senescentes podem se mostrar mais suscetíveis ao patógeno.

As avaliações foram realizadas uma vez ao dia, anotando-se a mortalidade diária em cada disco da placa. No segundo e quarto dias após a infestação, foram retirados os ovos e teias produzidas pelos ácaros, utilizando-se um pincel de poucos pêlos. Assegurou-se assim, um ambiente mais favorável aos ácaros.

Para a confirmação da morte pelo patógeno, os cadáveres foram lavados em álcool 70% e posteriormente colocados em câmara úmida, como descrito a seguir. Os cadáveres foram inicialmente retirados dos discos e colocados sobre dois círculos de papel de filtro estéril de 2,5 cm de diâmetro, contidos em uma das seis divisões circulares

de 3,5 cm de diâmetro de placas de poliestireno de 12,5 cm de comprimento, 8,5 cm de largura e 2,0 cm de altura. Os discos com os ácaros mortos foram inicialmente umedecidos com álcool 70% através de uma pisseta e então, aspergido álcool 70% sobre eles através de um pulverizador manual. A placa foi mantida aberta dentro de uma câmara de fluxo laminar por uma hora, em média, para a secagem dos ácaros e do papel de filtro. Após a secagem, os discos foram umedecidos com 0,1 ml de água estéril e em seguida a placa de bioensaio foi fechada e colocada dentro da câmara úmida. A câmara úmida consistiu em uma caixa plástica hermética, com espuma umedecida no fundo. Com este procedimento promoveu-se a inviabilização dos conídios aderidos externamente e também, condições adequadas para a emergência e esporulação do fungo que se encontrava internamente ao cadáver.

### **3.3.2 Seleção dos isolados mais virulentos de *Beauveria* spp.**

Nesta etapa do trabalho foi utilizada a metodologia descrita no item 3.3.1 (Estabelecimento da concentração de seleção), utilizando a concentração de  $5 \times 10^8$  conídios/ml. Foi determinada diariamente a mortalidade total, confirmada e corrigida.

Os isolados que apresentaram porcentagem de mortalidade acumulada corrigida igual ou superior a 35 e 95% ao terceiro e sexto dia após a inoculação, respectivamente, foram selecionados para a etapa de produção em arroz pré-cozido.

### **3.3.3 Produção em arroz pré-cozido, pelo método de bandejas**

Foram testados nesta etapa, apenas os isolados mais virulentos selecionados anteriormente.

Inicialmente, esses isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura M.C., previamente autoclavado a 120°C por 20 minutos. As placas com os

conídios foram mantidas durante dez dias em câmara B.O.D. a 26°C e 12 horas de fotofase para o crescimento e esporulação do fungo. Decorrido este período, a placa foi raspada para retirada dos conídios e então, preparada uma suspensão  $1 \times 10^8$  conídios/ml com água estéril mais espalhante adesivo a 0,1%.

Foram tomados 10 ml de suspensão de conídios para a inoculação de 300g de arroz pré-cozido em água, contido em um saco plástico de polipropileno de 35 cm de comprimento por 22 cm de largura, fechado com duas dobras, grampeado, esterilizado em autoclave a 120°C por 30 minutos e resfriado em condição ambiente.

A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar, usando-se uma pipeta de 10 ml. Agitou-se em seguida o saco plástico para uma distribuição uniforme dos conídios na massa de grãos. Cada isolado foi inoculado em quatro sacos plásticos.

Feita a inoculação, os sacos foram acondicionados em B.O.D. a 26°C e 12 horas de fotofase por três dias, para a germinação dos conídios e crescimento de micélio. Decorrido este período, foram selecionados para cada isolado, três sacos não contaminados com crescimento uniforme de micélio, que tiveram seu conteúdo adicionado em uma bandeja plástica de 46 cm de comprimento, 30 cm de largura e 11 cm de altura. As bandejas foram mantidas empilhadas em sala asséptica a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e 16 horas de fotofase, por 16 dias. No sétimo dia cruzou-se as bandejas, deixando-as ainda empilhadas, porém em sentido perpendicular uma à outra, permitindo assim uma maior ventilação entre elas e secagem mais rápida do arroz com fungo (Alves & Pereira, 1989).

Decorrido os 16 dias, com o material contido na bandeja completamente seco, foi feita a retirada de cinco amostras de 1 g de arroz com fungo de cada bandeja, em locais de plena esporulação. Cada amostra foi adicionada a 10 ml de água estéril mais espalhante adesivo a 0,1%, para a preparação de uma suspensão de conídios, a qual foi quantificada em câmara de Neubauer, tomando-se cinco amostras da suspensão.

A partir desses valores, foi utilizado o teste de Tukey para comparação entre médias de produção de conídios.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Criação e manutenção de *Tetranychus urticae* em laboratório

*Tetranychus urticae* mostrou-se bem adaptado para viver em *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco), apresentando durante todo o período de estudo, rápido crescimento populacional. Na colônia estoque, os ácaros tiveram preferência pela face inferior das folhas entretanto, quando em altas populações foram também encontrados em sua face superior. Nos dois casos, grandes quantidades de ovos e formas móveis foram observadas simultaneamente, demonstrando que este ácaro é capaz de se alimentar e reproduzir em qualquer uma das faces da folha desta planta.

Esta espécie de ácaro também é utilizada como presa para a criação de ácaros predadores, sendo criada de formas diferentes, conforme a finalidade. Na maioria dos casos, as plantas utilizadas para a sua criação são espécies leguminosas como *C. ensiformis*. Uma das grandes vantagens desta planta foi sua capacidade de suportar altas populações do ácaro. Por esta razão, não exigiu a substituição freqüente das plantas utilizadas para a manutenção da colônia, nem a troca dos discos de folhas usados nos bioensaios com os fungos.

Outra característica importante desta planta é a baixa pilosidade em suas folhas, permitindo que os ácaros fossem coletados facilmente, e conseqüentemente, reduzindo a mortalidade causada pelo manuseio durante a instalação dos experimentos.

## 4.2 Seleção de isolados

### 4.2.1 Estabelecimento da concentração de seleção

Os isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces* spp. provocaram baixos níveis de porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) quando inoculados na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml. Cerca de 64% dos isolados de *M. anisopliae* e 28% de *Paecilomyces* spp. não demonstraram qualquer patogenicidade a *T. urticae*, considerando-se a mortalidade confirmada ao quarto dias após a inoculação (Figura 1 e Tabelas 4 e 5).

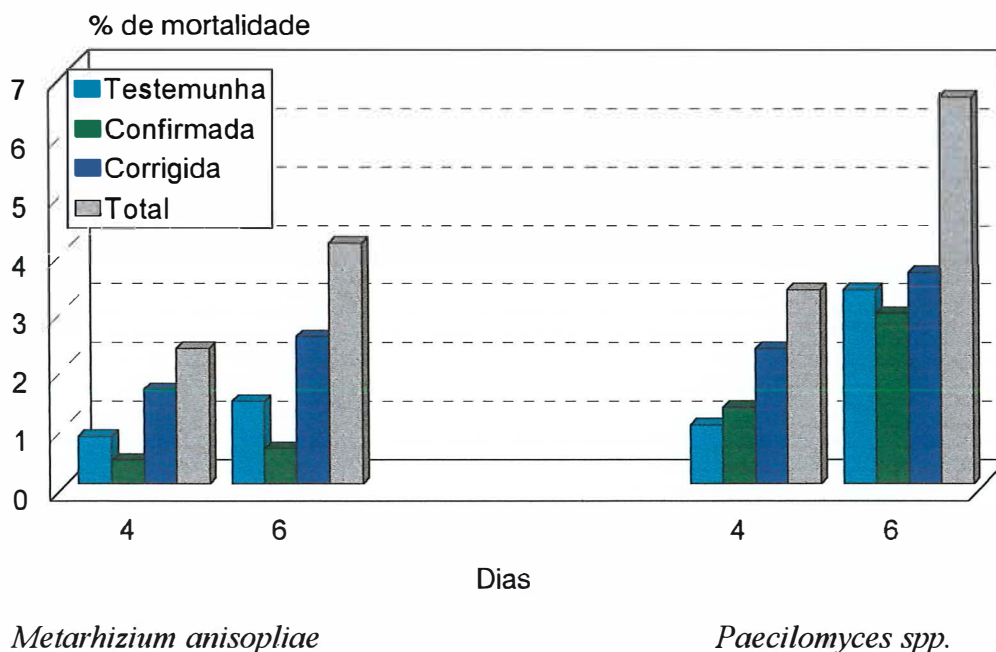


Figura 1. Porcentagem de mortalidade acumulada média (total, corrigida e confirmada) de *Tetranychus urticae*, para os 28 isolados de *Metarhizium anisopliae* e 19 isolados de *Paecilomyces* spp., aplicados na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml.

Tabela 4. Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) do ácaro *Tetranychus urticae*, inoculado com 28 isolados de *Metarhizium anisopliae* na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml.

Isolado	Mortalidade total (%)		Mortalidade corrigida (%)		Mortalidade confirmada (%)	
	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias
319	3,3	4,2	0,9	0,9	0,0	0,0
412	3,3	5,0	0,0	0,8	0,0	0,0
816	10,0	11,1	10,0	11,1	1,1	1,1
860	8,6	12,9	8,6	12,9	0,0	0,0
865	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
866	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
959	0,8	1,7	0,0	0,0	0,8	0,8
1022	4,2	5,0	1,7	2,6	0,8	0,8
1027	2,7	7,3	0,2	4,9	0,0	0,0
1037	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0
1076	0,8	0,8	0,8	0,8	0,0	0,0
1097	1,7	1,7	0,0	0,0	0,8	0,8
1104	3,3	5,0	2,5	1,7	0,8	1,7
1113	0,8	1,7	0,8	1,7	0,0	0,0
1144	5,8	8,3	3,4	6,0	2,5	4,2
1172	1,7	1,7	0,8	0,0	0,8	0,8
1175	0,8	2,5	0,8	2,5	0,0	0,0
1184	2,2	3,3	2,2	3,3	0,0	0,0
1189	0,9	1,8	0,9	1,8	0,0	0,0
1203	0,8	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
1204	0,0	5,0	0,0	1,7	0,0	0,8
E-6	2,5	5,0	2,5	5,0	0,8	0,8
E-9	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0
PL-43	0,0	1,7	0,0	1,7	0,0	0,0
PL-47	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0
RJ-C	5,8	9,2	5,0	6,0	2,5	3,3
RJ-D	3,3	4,2	2,5	0,9	0,8	0,8
SPL-358	0,0	3,3	0,0	3,3	0,0	0,0
Média	2,3	4,1	1,6	2,5	0,4	0,6

Tabela 5. Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) de *Tetranychus urticae*, inoculado com 19 isolados de *Paecilomyces* spp. na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml.

Isolado	Mortalidade total (%)		Mortalidade corrigida (%)		Mortalidade confirmada (%)	
	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias
508	2,5	12,5	2,5	9,5	0,8	1,7
578	0,8	1,7	0,0	0,0	0,8	1,7
581	0,8	2,5	0,8	1,7	0,0	1,7
582	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0
623	3,3	5,8	3,3	2,6	0,8	1,7
625	0,8	1,7	0,8	0,8	0,8	1,7
626	1,7	3,3	1,7	0,0	0,8	0,8
627	20,8	24,2	20,2	20,9	3,3	5,0
628	0,8	1,7	0,8	0,8	0,8	0,8
632	1,7	3,3	0,8	0,0	1,7	2,5
774	0,8	2,5	0,8	0,0	0,0	1,7
827	16,7	34,2	16,7	33,6	6,7	15,0
828	0,0	2,5	0,0	1,7	0,0	0,8
831	0,8	4,2	0,8	3,4	0,0	1,7
871	0,8	9,2	0,8	8,4	0,8	8,3
1053	1,7	3,3	0,8	0,0	0,8	0,8
1125	1,7	3,3	1,7	2,5	0,0	0,8
1145	1,7	5,0	0,8	0,9	0,8	1,7
1200	2,5	5,8	1,7	1,7	0,0	0,8
Média	3,2	6,8	2,0	4,7	1,0	2,6

A mortalidade total média ao quarto dia após a inoculação foi de 2,3 e 3,2% e ao sexto dia, de 4,1 e 6,8% para *M. anisopliae* e *Paecilomyces* spp., respectivamente. Apenas dois isolados de *Metarhizium* (816 e 860) e três de *Paecilomyces* spp. (508, 627 e 827) apresentaram mortalidade total superior a 10%, ao sexto dia (Tabelas 4 e 5).

A máxima mortalidade corrigida ao sexto dia foi de 12,9 e 33,6% para *M. anisopliae* e *Paecilomyces* spp., respectivamente. No mesmo período, a mortalidade confirmada média de *M. anisopliae* e *Paecilomyces* spp. foi de 0,6 e 2,6%, respectivamente (Tabelas 4 e 5).

Na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml, o isolado 447 de *Beauveria bassiana* mostrou-se mais patogênico para *T. urticae* do que a maioria dos isolados testados de *M. anisopliae* e *Paecilomyces* spp. (Tabelas 4, 5 e 6), sendo portanto testado em outras cinco concentrações diferentes ( $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios/ml) para a determinação da concentração de seleção para o gênero.

Tabela 6. Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) de *Tetranychus urticae*, submetido à seis concentrações de *Beauveria bassiana*, isolado 447.

Concen <sup>1</sup>	Mortalidade total (%)		Mortalidade corrigida (%)		Mortalidade confirmada (%)	
	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias
$5 \times 10^6$	1,7	6,7	0,0	0,0	0,8	1,7
$1 \times 10^7$	0,9	9,1	0,0	1,7	0,0	1,8
$5 \times 10^7$	13,0	27,0	7,6	21,1	7,0	14,0
$1 \times 10^8$	11,7	28,3	6,2	22,5	6,7	15,0
$5 \times 10^8$	24,4	38,9	19,8	33,9	13,3	23,3
$1 \times 10^9$	33,3	51,7	29,2	47,7	18,3	28,3

<sup>1</sup> Concen = concentração

O isolado 447 apresentou aumento nos valores de porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) à medida que a suspensão de conídios utilizada, se tornou mais concentrada. Em todas as concentrações testadas, não houve mortalidade de ácaros até o segundo dia após o contato com os conídios (Figuras 2 e Tabela 6).



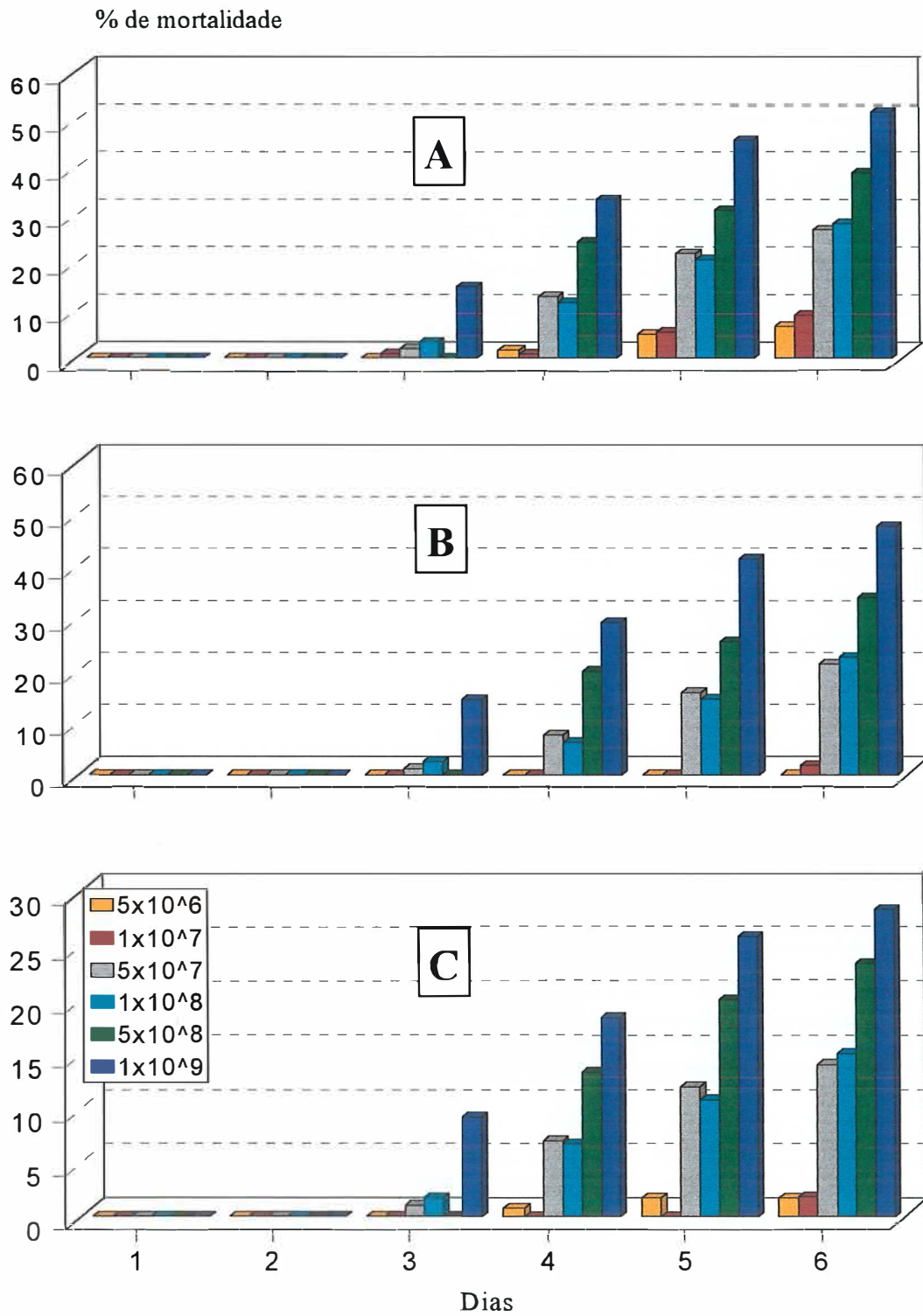


Figura 2. Porcentagem de mortalidade acumulada total (A), corrigida (B) e confirmada (C) de *Tetranychus urticae*, submetido às concentrações de conídios de *Beauveria bassiana*, isolado 447.

Nas seis concentrações de conídios do isolado 447, os valores de mortalidade corrigida ao sexto dia foram inferiores a 50%, sendo observada apenas na concentração de  $1 \times 10^9$  conídios/ml de suspensão, mortalidade total superior a 50%. Nesse mesmo período, quando se utilizou as duas concentrações menores ( $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  conídios/ml) o valor máximo de mortalidade total não alcançou 10% e o de mortalidade corrigida 2%, correspondendo a uma mortalidade inferior a 1 ácaro/disco de folha. Quando foram utilizadas as concentrações de  $5 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  conídios/ml, os valores de mortalidade corrigida e confirmada ao sexto dia foram muito semelhantes entre si, sendo de aproximadamente 20 e 15%, respectivamente (Tabela 6 e Figura 2).

Na concentração de  $5 \times 10^8$  conídios/ml o valor de mortalidade corrigida e confirmada ao sexto dia foi de aproximadamente 34 e 23% respectivamente, enquanto na concentração de  $1 \times 10^9$  conídios/ml foi de 48% aproximadamente para a mortalidade corrigida e 28% para a confirmada. Estes valores indicam uma maior diferença entre essas duas concentrações quanto à mortalidade corrigida, porém, foram menores quando a comparação foi feita entre os valores de mortalidade confirmada (Tabela 6). Isto ocorreu porque poucos ácaros mortos confirmaram a mortalidade pelo fungo ao terceiro dia após o contato com os conídios, momento em que houve o primeiro pico de mortalidade na concentração de  $1 \times 10^9$  conídios/ml de suspensão.

Em qualquer um dos casos, o que se observou foi uma baixa patogenicidade do isolado 447 de *B. bassiana* para fêmeas recém-emergidas de *T. urticae*, mesmo em concentrações muito elevadas, como  $1 \times 10^9$  conídios/ml. Essa concentração apresenta ainda, algumas limitações práticas para a sua utilização, como a dificuldade de homogeneização dos conídios na suspensão, devido a elevada quantidade de conídios necessária para a sua preparação. Por outro lado, nas concentrações de  $5 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  conídios/ml, a eficiência foi muito baixa, não superando 15 e 30% de mortalidade confirmada e total, respectivamente, aos seis dias após a inoculação (Tabela 6).

A partir desses resultados, utilizou-se uma suspensão com concentração de  $5 \times 10^8$  conídios/ml para a realização dos testes de seleção dos isolados mais virulentos de *Beauveria* spp.. Nessa concentração, o isolado 447 de *B. bassiana* causou mortalidade

total ao sexto dia de aproximadamente 40%, sendo 10% a mais do que na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/ml (Tabela 6).

#### 4. 2. Seleção dos isolados mais virulentos de *Beauveria* spp.

Os resultados da porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) de *T. urticae* aos 4 e 6 dias após a inoculação com conídios de 105 isolados de *Beauveria* spp. encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) do ácaro *Tetranychus urticae*, inoculado com 105 isolados de *Beauveria* spp., na concentração de  $5 \times 10^8$  conídios/ml.

Isolado	Mortalidade total (%)		Mortalidade corrigida (%)		Mortalidade confirmada (%)	
	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias
196	25,8	54,2	20,5	46,6	4,2	19,2
197	10,0	25,6	9,1	21,6	1,1	2,2
210	27,5	56,7	26,9	54,8	23,3	44,2
252	37,5	64,2	33,0	58,3	10,8	20,0
258	45,0	72,0	42,7	68,9	14,0	22,0
268	9,2	38,3	8,2	35,1	5,0	22,5
307	80,0	100,0	79,8	100,0	12,5	21,7
309	9,2	45,8	8,2	43,0	5,0	36,7
341	40,9	92,7	40,3	92,3	17,3	46,4
353	55,5	94,5	55,1	94,3	29,1	54,5
428	44,0	67,0	43,5	65,6	29,0	39,0
447	24,4	38,9	19,8	33,9	13,3	23,3
450	56,0	85,0	54,2	83,3	14,0	30,0
457	80,8	100,0	80,7	100,0	45,0	57,5
462	61,7	96,7	60,0	96,4	19,2	39,2
468	55,8	85,8	55,5	85,2	38,3	53,3

Tabela 7. Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) do ácaro *Tetranychus urticae*, inoculado com 105 isolados de *Beauveria* spp., na concentração de  $5 \times 10^8$  conídios/ml.

Isolado	Mortalidade total (%)		Mortalidade corrigida (%)		Mortalidade confirmada (%)	
	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias
476	12,5	28,3	6,3	16,5	8,3	20,8
485	5,8	25,0	5,0	23,7	2,5	17,5
489	66,7	99,2	66,4	99,2	16,7	37,5
494	95,0	99,2	94,6	99,0	17,5	19,2
498	34,2	65,0	33,5	63,2	27,5	48,3
499	30,8	75,0	27,2	67,5	24,2	48,3
500	39,2	76,7	36,0	69,7	23,3	40,0
501	10,0	38,3	9,1	35,1	6,7	31,7
520	22,5	59,2	9,7	50,5	12,5	35,0
522	20,0	58,3	16,5	55,4	10,8	40,0
524	25,0	59,0	22,7	55,4	16,0	38,0
529	19,2	44,2	5,8	32,3	14,2	29,2
532	25,0	48,3	21,9	42,6	11,7	18,3
536	17,3	34,5	13,8	27,3	9,1	15,5
540	14,0	41,0	10,4	34,4	2,0	13,0
544	17,3	47,3	16,6	45,0	12,7	38,2
548	25,0	49,2	24,4	43,0	8,3	15,8
549	15,0	51,7	14,3	45,8	5,0	20,0
551	48,3	79,2	47,9	76,6	4,2	11,7
553	23,3	53,3	22,7	51,3	16,7	33,3
557	49,1	84,5	48,7	83,9	19,1	35,5
561	25,8	48,3	25,2	46,1	15,8	30,0
565	5,0	35,0	5,0	35,0	3,0	24,0
569	10,8	41,7	10,1	39,1	8,3	27,5
573	15,8	56,7	15,1	54,8	11,7	39,2
579	23,3	59,2	22,7	57,4	20,0	46,7
589	27,5	64,2	24,3	61,6	13,3	28,3
590	11,7	35,8	11,7	35,3	6,7	25,8

Tabela 7. Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) do ácaro *Tetranychus urticae*, inoculado com 105 isolados de *Beauveria* spp., na concentração de  $5 \times 10^8$  conídios/ml.

Isolado	Mortalidade total (%)		Mortalidade corrigida (%)		Mortalidade confirmada (%)	
	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias
600	61,7	86,7	58,9	84,5	12,5	20,0
612	19,0	67,0	16,5	64,1	14,0	50,0
615	18,3	40,8	18,3	40,3	15,8	29,2
617	20,0	59,0	20,0	58,7	14,0	37,0
618	51,7	95,8	51,3	95,8	18,3	41,7
619	11,7	39,2	11,7	38,7	7,5	23,3
620	28,3	44,2	27,7	43,2	15,8	28,3
635	32,5	57,5	27,7	50,5	15,8	25,0
641	18,3	44,2	17,6	43,2	12,5	21,7
642	31,7	60,8	31,1	60,2	25,8	51,7
643	49,2	84,2	40,8	80,8	21,7	42,5
644	13,3	32,5	13,3	32,5	10,8	25,8
647	7,5	23,3	7,5	23,0	6,7	15,8
651	54,5	85,5	51,3	83,1	5,5	10,0
683	9,1	28,2	9,1	28,2	6,4	19,1
695	11,7	54,2	10,8	51,8	9,2	28,3
722	30,0	63,3	29,4	62,7	18,3	35,0
739	5,0	12,5	5,0	12,5	5,0	9,2
749	27,5	59,2	22,3	52,4	10,8	20,0
750	21,8	50,9	21,0	48,3	6,4	25,5
755	17,5	34,2	16,8	31,3	5,8	8,3
756	11,7	39,2	10,9	31,8	0,0	4,2
757	20,8	44,2	15,2	35,0	18,3	26,7
759	26,7	51,7	25,9	49,1	10,0	25,8
760	17,5	47,5	16,8	41,1	5,8	10,0
764	28,3	71,7	25,2	67,3	14,2	27,5
787	30,8	74,2	28,7	71,9	22,5	46,7
862	1,8	5,5	1,8	5,5	0,9	2,7

Tabela 7. Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) do ácaro *Tetranychus urticae*, inoculado com 105 isolados de *Beauveria* spp., na concentração de  $5 \times 10^8$  conídios/ml.

Isolado	Mortalidade total (%)		Mortalidade corrigida (%)		Mortalidade confirmada (%)	
	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias
868	97,5	100,0	97,1	100,0	10,8	13,3
876	16,7	35,0	14,5	20,4	14,2	29,2
881	22,5	40,0	20,5	26,5	20,8	36,7
887	26,7	70,8	24,8	64,3	22,5	40,0
890	24,2	45,8	22,2	33,7	10,8	27,5
893	14,2	40,0	12,0	26,5	13,3	36,7
895	19,2	45,8	17,1	33,7	14,2	36,7
900	18,3	46,7	17,6	40,2	1,7	5,0
901	27,3	76,4	24,1	72,7	23,6	60,9
902	47,5	79,2	45,2	76,0	24,2	50,0
908	90,8	100,0	90,4	100,0	65,8	73,3
931	25,0	70,0	21,7	65,4	15,8	46,7
969	97,5	99,2	97,4	99,0	43,3	44,2
986	32,5	75,0	29,6	71,2	21,7	47,5
987	32,5	80,8	29,6	77,9	25,8	65,8
1006	44,2	82,5	40,2	79,6	10,0	20,8
1010	15,0	65,0	15,0	64,7	2,5	24,2
1035	29,1	69,1	24,0	64,0	23,6	53,6
1058	40,0	71,7	30,1	65,7	20,8	41,7
1078	50,8	85,8	42,7	82,8	25,8	50,0
1103	6,7	21,7	6,7	21,7	3,3	8,3
1108	5,8	24,2	5,8	23,5	0,0	4,2
1126	37,3	53,6	36,7	51,6	22,7	31,8
1157	15,5	39,1	11,9	32,3	2,7	12,7
1161	31,8	50,0	31,2	47,8	15,5	22,7
1185	33,8	75,0	31,7	72,8	26,3	48,8
1187	21,1	56,7	18,7	52,9	13,3	33,3
1192	25,8	47,5	25,2	45,2	7,5	21,7

Tabela 7. Porcentagem de mortalidade acumulada (total, corrigida e confirmada) do ácaro *Tetranychus urticae*, inoculado com 105 isolados de *Beauveria* spp., na concentração de  $5 \times 10^8$  conídios/ml.

Isolado	Mortalidade total (%)		Mortalidade corrigida (%)		Mortalidade confirmada (%)	
	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias	4 dias	6 dias
1197	20,8	54,2	15,2	46,6	8,3	18,3
1202	2,5	33,3	-4,5	22,3	2,5	15,0
Conídiá <sup>®</sup>	10,9	39,1	10,2	37,5	2,7	13,6
PL-61	2,5	31,7	1,7	30,5	2,5	12,5
PL-63	85,8	99,2	85,7	99,1	37,5	44,2
Média	30,0	58,4	27,9	54,9	14,4	30,1

Pode-se observar que entre os isolados testados houve uma grande variação nos valores das três mortalidades acumuladas, com alguns isolados causando elevada mortalidade para *T. urticae*, enquanto outros mostraram-se pouco patogênicos. De uma forma geral, os isolados foram pouco eficientes a este ácaro, com valor médio de mortalidade total, inferior a 60% aos seis dias após a inoculação. Os valores mínimos e máximos de mortalidade corrigida, decorridos 4 e 6 dias da inoculação, foram de 1,7 e 97,4%, e de 5,5 e 100%, respectivamente. Uma grande amplitude entre os valores máximos e mínimos também foi observada para mortalidade confirmada, variando de 0 a 65,8% ao quarto dia, e de 2,2 a 73,3% ao sexto dia após a inoculação (Tabela 7).

Essas diferenças de mortalidade para fêmeas recém-emergidas de *T. urticae*, mostram a grande variação de patogenicidade entre os isolados de *Beauveria* spp., o que reflete a grande variabilidade genética do material disponível.

A representação gráfica da frequência dos isolados de *Beauveria* spp. em faixas de porcentagem de mortalidade, encontram-se na Figura 3. Pode-se observar que ao quarto dia após o contato com os conídios, 81 isolados (77% do total) encontravam-se na faixa entre 0 a 40% de mortalidade total (Figura 3-A). De forma semelhante, 102

isolados (97%) apresentavam mortalidade confirmada entre 0 e 40%, sendo 22 isolados (21%), com valores entre 21 e 40% (Figura 3-C).

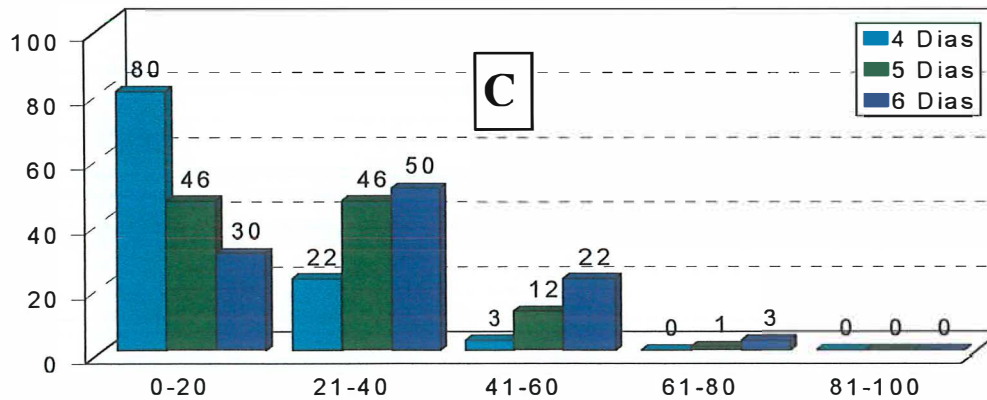
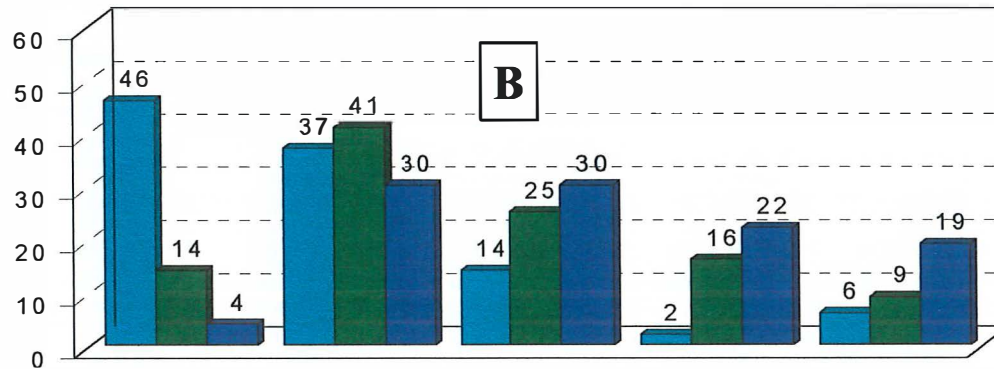
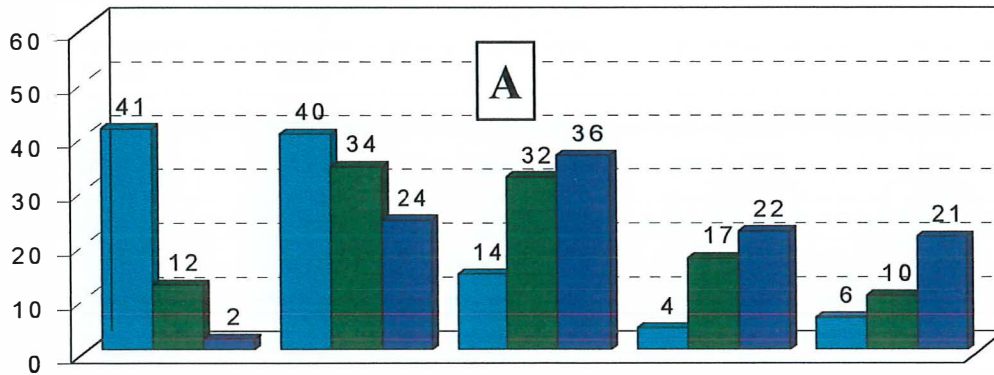
No quinto e sexto dias, observou-se um incremento nos valores das porcentagens de mortalidades acumuladas (total, corrigida e confirmada). Assim, decorrido cinco dias da inoculação, 66 isolados (63%) de *Beauveria* spp. apresentavam valores de mortalidade acumulada corrigida na faixa entre 21 e 60%, sendo que destes, 25 isolados (24%) apresentam valores entre 41 e 60% (Figura 3-B). De forma semelhante, pouco mais da metade dos isolados testados apresentavam valores de mortalidade confirmada entre 21 e 60% (Figura 3-C).

Ao sexto dia, 52 isolados (50%) apresentavam mortalidade corrigida entre 41 e 80%, sendo apenas 19 isolados (18%) com valores iguais ou superiores a 81% de mortalidade (Figura 3-B). Nenhum isolado testado apresentou ao sexto dia, valores de mortalidade confirmada igual ou superior a 81%, sendo apenas 3 isolados (2,9%) destes, compreendidos na faixa de 61 a 80% de mortalidade (Figura 3-C).

Esse comportamento geral dos isolados de *Beauveria* spp., em incrementar os valores de mortalidade, principalmente a partir do quarto dia, pode ser melhor compreendido a partir dos estudos feitos por Neves et al. (1997) ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), sob condições de temperatura e umidade relativa idênticas às adotadas para esta etapa da pesquisa. Esses autores verificaram que a maioria dos conídios do isolado 447 de *B. bassiana* iniciou o processo de germinação, e alguns a penetração, 24 horas após à fixação ao corpo de *T. urticae* sendo que, entre as 24 e 48 horas os conídios haviam penetrado o tegumento do ácaro. O aparecimento de ácaros mortos ocorre, principalmente, a partir do quarto dia após a inoculação, o que corresponde ao segundo ou terceiro dia após a fase de penetração.



## Número de isolados



## Faixas de mortalidade

Figura 3. Distribuição de frequência dos 105 isolados de *Beauveria* spp., em faixas de mortalidade total (A), corrigida (B) e confirmada (C), causada por *Tetranychus urticae*.

A representação gráfica dos valores da percentagem de mortalidade corrigida de *T. urticae*, aos 4 e 6 dias após a inoculação com conídios, para os 105 isolados de *Beauveria* spp., e o desempenho destes isolados em relação à média, encontram-se na Figura 4.

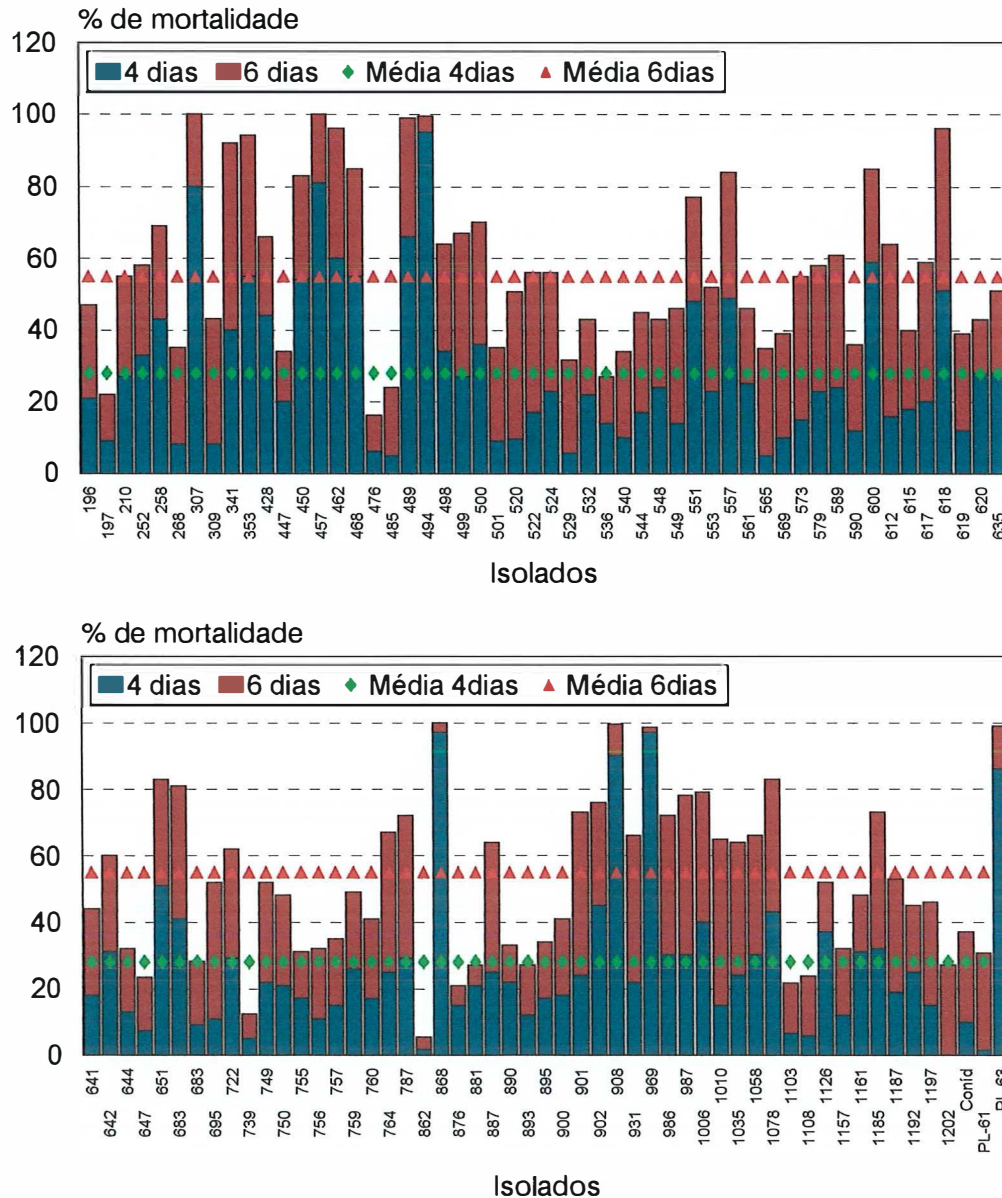


Figura 4. Percentagem de mortalidade acumulada corrigida de *Tetranychus urticae*, aos 4 e 6 dias após a inoculação com conídios de 105 isolados de *Beauveria* spp..

A maioria dos 25 isolados de *Beauveria* spp. provenientes de Cuiabá-MT apresentaram comportamento semelhante entre si, com valores de mortalidade corrigida ao quarto e sexto dia, nas faixas de 0 a 30% e 30 a 60%, respectivamente. Muitos destes, apresentaram valores de mortalidade inferiores à média, principalmente ao quarto dia, tendo apenas quatro isolados apresentado mortalidade superior a 80%, ao sexto dia. De forma semelhante, não houve grandes variações quanto à mortalidade corrigida dos seis isolados de *Beauveria* spp. obtidos de *Solenopsis* sp. no Uruguai (isolados 876 a 895), e também entre quatro isolados obtidos de amostras de solo em Corumbá-MS (isolados 1185 a 1197) (Figura 4 e Tabela 7).

O mesmo não aconteceu com os 13 isolados de *Beauveria* spp. provenientes de Piracicaba-SP. Neste caso, alguns isolados apresentaram-se altamente patogênicos a *T. urticae* (isolados 494, 969 e PL-43), até aqueles com índice de mortalidade corrigida inferior a 40% ao sexto dia (isolados 476, 485 e 590). Estes isolados foram obtidos de diferentes hospedeiros, pertencentes às mais distintas ordens e famílias de insetos, além de alguns obtidos de amostras de solo. O único isolado obtido de ácaro, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) (isolado 986), apresentou desempenho semelhante à média, tanto ao quarto como ao sexto dia (Figura 4 e Tabela 7).

O comportamento distinto apresentado pelos diferentes isolados de *Beauveria* spp. procedentes de Piracicaba, sugere a existência de uma ampla variabilidade natural neste local, entretanto, esta variabilidade parece ser menor entre os isolados procedentes de Cuiabá. Essas duas situações distintas já haviam sido observadas por Poprawski et al. (1988) em estudos de eletroforese para o fungo *B. bassiana*. Quando analisaram 11 isolados obtidos em anos diferentes, mas em uma mesma localidade da França, todos os isolados compartilharam do mesmo perfil eletroforético. Por outro lado, dez isolados coletados em uma mesma localidade no Marrocos, na mesma data, campo e espécie hospedeira, apresentaram cinco perfis eletroforéticos distintos.

A análise eletroforética é uma técnica importante, que possibilita diferenciar isolados morfológicamente semelhantes, com facilidade, segurança e rapidez nos resultados (Paccola-Meirelles & Azevedo, 1990). Entretanto, para que esta técnica possa

ter uma utilidade maior em programas de controle microbiano, existe a necessidade de selecionar isolados promissores, através dos testes de patogenicidade, para que possam então ser submetidos à análise eletroforética, a fim de se estabelecer os seus perfis eletroforéticos, permitindo assim, sua caracterização, monitoramento e controle de qualidade por ocasião da sua produção.

A maioria dos isolados de *B. bassiana* apresentou um comportamento muito semelhante entre si, com valores de mortalidade corrigida em torno de 30% ao quarto dia. Entretanto, 22 isolados de *Beauveria* spp. apresentaram valores de mortalidade corrigida superiores a 40% nesse período (Figura 4 e Tabela 7). A mortalidade média destes isolados, decorrido quatro e seis dias de inoculação, foram de 63,2 e 88,8%, respectivamente, correspondendo a um valor duas vezes maior que a média dos 105 isolados de *Beauveria* spp., ao quarto dia. Destes 22 isolados, 12 apresentaram ao quarto dia, valores de mortalidade corrigida superiores à média dos 105 isolados ao sexto dia, que foi de aproximadamente 55% (Figura 5 e Tabela 7). Dos 12 isolados, 8 (isolados 307, 457, 489, 494, 868, 908, 969 e PL-63) apresentaram valores de mortalidade superiores a 35 e 95%, ao terceiro e sexto dia, respectivamente, sendo três deles provenientes de Piracicaba-SP (isolados 494, 969, PL-63) (Figura 6).

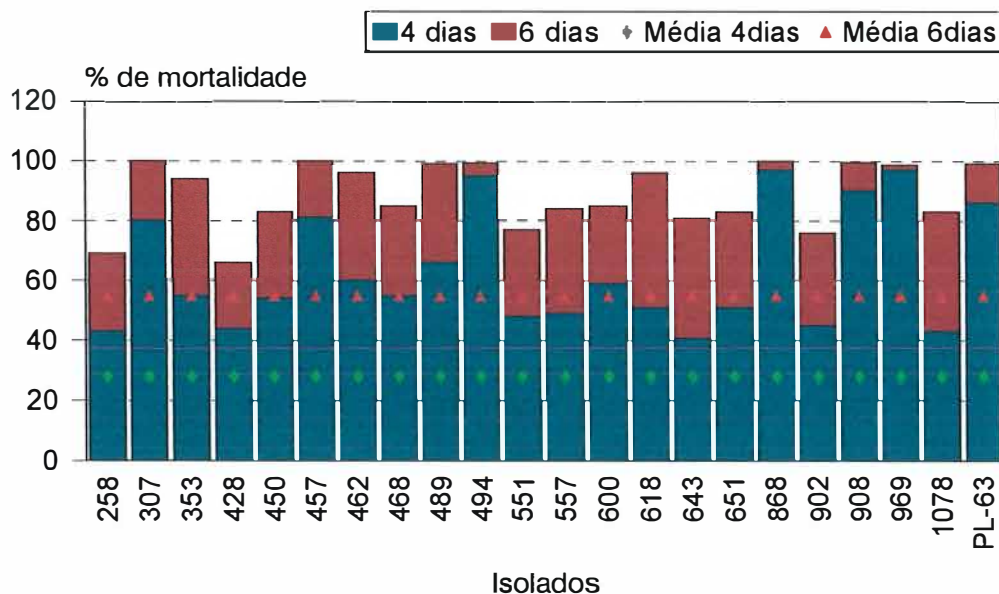


Figura 5. Porcentagem de mortalidade acumulada corrigida de *Tetranychus urticae*, aos 4 e 6 dias após a inoculação com conídios dos 22 melhores isolados de *Beauveria* spp..

A Figura 6 mostra a evolução da mortalidade corrigida para os oito isolados mais virulentos de *Beauveria* spp. obtidos nesta fase do trabalho, ao longo dos seis dias de avaliação, além do desempenho destes isolados em relação à média geral dos 105 isolados testados e aos isolados 447 e conídios obtidos do produto Conídia®.

Os isolados 447 e Conídia® (conídios obtidos do produto comercial) apresentaram ao longo de todo o período de avaliação comportamentos muito semelhantes entre si, com desempenho quase sempre abaixo da média dos 105 isolados (Figura 6 e Tabela 7). Estes isolados apesar de apresentarem eficiência comprovada para uma série de insetos, não devem ser utilizados como princípios ativos de futuros micoacaricidas, em culturas onde *T. urticae* ocorre como praga.

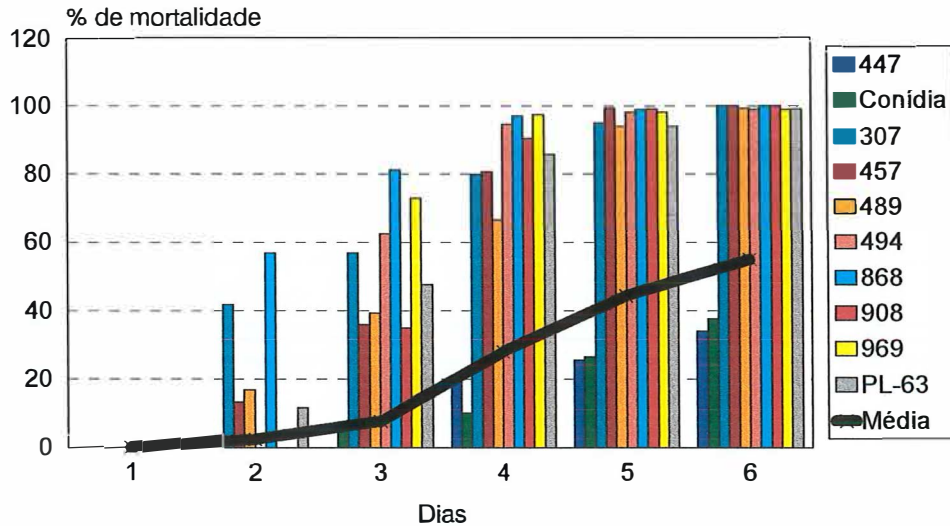


Figura 6. Porcentagem de mortalidade acumulada corrigida de *Tetranychus urticae*, causada pelos oito melhores isolados de *Beauveria* spp., além da média geral dos 105 isolados testados e dos isolados 447 e Conídia®.

Assim, foi possível selecionar oito isolados de *Beauveria* spp. com grande potencial para o controle de *T. urticae*. Estes resultados foram consequência da variabilidade genética existente entre os isolados, comprovando que, para o desenvolvimento de um programa de controle microbiano, a etapa de seleção de isolados é de fundamental importância para o seu sucesso. Esta filosofia tem sido empregada pelo Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, da ESALQ/USP, sendo selecionados isolados promissores para o controle de diversas espécies de insetos (Alves et al., 1984; Moino Júnior., 1993; Vieira et al., 1993; Almeida, 1994; Alves et al., 1997).

Em se tratando de ácaros fitófagos, a seleção de isolados tem sido pouco explorada. Um dos trabalhos desenvolvidos com este propósito, foi conduzido por Delalibera Júnior et al. (1997). Nesse estudo, ao se avaliar a patogenicidade de 19 isolados de *Neozygites* cf. *floridana* aos ácaros *Mononychellus tanajoa* e *T. urticae* (Acari: Tetranychidae), verificou-se que os isolados apresentaram grandes variações quanto à sua patogenicidade e especificidade hospedeira.

Preocupações neste sentido já haviam sido demonstradas por McCoy & Couch (1978). Segundo os autores, a seleção de “strains” estáveis e altamente virulentos também precisa ser levada em consideração, para que o fungo *Hirsutella thompsonii* possa ter sucesso como um micoacaricida. Isto porque, os isolados deste patógeno até então utilizados haviam sido selecionados com base na máxima produção de conídios em meio artificial, em detrimento de outras características de interesse no controle microbiano, como a virulência.

De acordo com Alves (1986a), os termos virulência e agressividade são empregados como sinônimos em patologia dos insetos e indicam níveis de doenças provocadas pelo patógeno. Assim, diz-se que um patógeno é virulento, quando ele incide sobre um grande número de indivíduos, matando-os rapidamente e produzindo uma epizootia. Por outro lado, a virulência está associada com a capacidade de vencer a resistência específica do hospedeiro, e pode ser expressa através de diferentes índices, sendo a  $DL_{50}$  (dose letal mediana) e a  $TL_{50}$  (tempo letal mediano) alguns comumente utilizados. Neste caso, quanto menores os valores estimados, mais virulento o isolado.

Algumas das qualidades desejadas para um isolado de *B. bassiana* estão diretamente associadas, com a forma de vida, tipo de dano e a capacidade biótica do organismo que se deseja controlar, além de alguns aspectos relativos à planta hospedeira. Assim, para o controle de uma espécie polífaga como *T. urticae*, deve-se procurar durante a seleção, isolados com qualidades naturais que lhes confirmem eficiência sob condições adversas, que sejam comuns à maioria das culturas às quais se destina a sua aplicação. Assim, para o controle de *T. urticae* em plantas ornamentais e culturas muito sensíveis ao seu ataque, é importante que o patógeno apresente uma ação rápida, devido a alta capacidade reprodutiva e curto ciclo de vida desta praga. Aliado a isso, em muitas culturas como ornamentais e hortícolas, a aplicação de fungicidas é feita de forma intensiva exigindo, desta forma, que o isolado de *B. bassiana* conclua em pouco tempo, o seu desenvolvimento sobre o hospedeiro, sem correr o risco de ter a sua eficiência diminuída pela ação do produto químico. Também nessas condições há necessidade da



utilização de produtos compatíveis, exigindo do usuário a elaboração de um plano de MIP para a cultura.

As condições de temperatura, umidade relativa e fotofase utilizadas nos bioensaios, permitiram a seleção de isolados que não exigem condições muito especiais para expressar a sua patogenicidade. Esta característica é muito importante, pois a manipulação das condições ambientais para melhorar a eficiência de um entomopatógeno pode favorecer a ocorrência de doenças causadas por fitopatógenos. Essas limitações, fizeram com que Gerson et al. (1979) considerassem o fungo *H. thompsonii* inviável para o controle de *T. cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) em condições de casa-de-vegetação, em Israel. Segundo estes autores, os produtores são relutantes em adotar técnicas para atingir artificialmente estas condições, com receio de aumentar a incidência de doenças foliares. Uma das possibilidades, seria a utilização deste fungo para o controle de ácaros em culturas com relativa tolerância ao desenvolvimento de doenças. De forma semelhante, Gardner et al. (1982) constataram que a umidade relativa é o fator limitante para a utilização de *H. thompsonii* na supressão populacional de *T. urticae* em casa-de-vegetação.

A mesma limitação prática pode ocorrer com espécies de Entomophthorales. Elevada umidade relativa é necessária para que ocorra infecção dos ácaros pelos fungos, enquanto a temperatura apresenta maior influência na duração das fases do ciclo destes fungos, além de induzir o aparecimento de estruturas de resistência do fungo em ácaros infectados (Selhime & Muma, 1966; Kenneth et al., 1972; Nemoto & Aoki, 1975; Humber & Moraes, 1981; Smitley et al., 1986).

Os oito melhores isolados obtidos na fase de seleção de isolados de *Beauveria* spp. foram: 307, 457, 489, 494, 868, 908, 969 e PL-63. Apesar da alta patogenicidade apresentada por estes isolados, outras características precisam ser avaliadas para que possam ser recomendados como ingrediente ativo de produtos a serem desenvolvidos para o controle de *T. urticae*. Uma dessas qualidades é a produtividade visando a obtenção de conídios em grandes quantidades. Dessa forma, esses isolados seguiram para a fase de produção de conídios em arroz pré-cozido.



### 4.2.3 Produção de *Beauveria* spp. em arroz pré-cozido

Os resultados referentes à produção de conídios do isolado 447 de *Beauveria bassiana* e dos oito isolados mais virulentos de *Beauveria* spp., em arroz pré-cozido pelo método de bandejas (Alves & Pereira, 1989), encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Médias de produção de conídios/g de arroz, para nove isolados de *Beauveria* spp. em arroz pré-cozido, pelo método de bandejas.

Isolado	Médias <sup>1</sup>	
PL-63	100,57	a
494	91,82	a b
307	86,29	a b
489	85,14	a b
969	81,03	a b
868	80,03	a b
447	75,55	a b
908	62,78	b
457	30,31	c

Coefficiente de variação: 19,87%

<sup>1</sup> Média x10<sup>8</sup> conídios/g de arroz

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey

Os valores referentes à produção dos isolados foram analisados através dos testes de Cochran & Bartlett e Lilliefors, mostrando-se com homogeneidade e distribuição normal, respectivamente.

O isolado PL-63 foi numericamente o mais produtivo, embora tenha diferido estatisticamente apenas dos isolados 908 e 457, este último com produção três vezes menor em relação ao PL-63.

Os valores das produções de conídios para os nove isolados testados, apresentaram uma distribuição muito semelhantes aos obtidos por Almeida (1994), usando a mesma técnica de produção. No trabalho desse autor, houve uma grande diferença na produção entre os seis isolados testados de *B. bassiana*, com valor máximo e mínimo de  $1,16 \times 10^{10}$  e  $3,52 \times 10^8$  conídios/g de arroz, respectivamente, sendo três isolados com produção superior a  $8,0 \times 10^9$  conídios/g de arroz.

Nos estudos dessa dissertação, sete dos nove isolados testados, apresentaram valores de produção entre  $7,5 \times 10^9$  e  $1,0 \times 10^{10}$  conídios/g de arroz, sendo o isolado 457 o menos produtivo ( $3,0 \times 10^9$  conídios/g de arroz) e diferindo estatisticamente de todos os demais (Tabela 8). Entre os isolados testados por Almeida (1994) estava o isolado 447, com produção de  $4,8 \times 10^9$  conídios/g de arroz, valor 1,6 vezes menor ao que foi obtido neste trabalho ( $7,5 \times 10^9$  conídios/g de arroz). De forma semelhante, a produção obtida por Fernandes (1991) para o isolado 868 de *B. bassiana* ( $3,3 \times 10^9$  conídios/g de arroz), através da mesma técnica, foi aproximadamente 2,4 vezes menor que a obtida neste trabalho.

A diferença na produção de conídios para os isolados 447 e 868 de *B. bassiana* obtidas neste trabalho, comparado com os de Almeida (1994) e Fernandes (1991), respectivamente, pode estar relacionada, entre outras causas, com a dificuldade de se reproduzir, entre um experimento e outro, todas as condições disponíveis para o crescimento dos fungos na massa de arroz, tais como: teor de umidade e tempo de cozimento do arroz, flutuação da temperatura na sala de produção, nível de contaminação, entre outras. Entretanto, estes resultados são importantes para a comparação da produção de isolados dentro do mesmo experimento.

Assim, os oito isolados mais virulentos de *Beauveria* spp. a *T. urticae*, podem ser produzidos satisfatoriamente pela técnica desenvolvida por Alves & Pereira (1989).

Testes adicionais são necessários para se avaliar o potencial de cada um destes isolados visando a sua utilização como formulações micoacaricidas.

## 5 CONCLUSÕES

- Os isolados testados de *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus* e *P. farinosus* são pouco ou não patogênicos para *Tetranychus urticae*.
- Todos os isolados testados dos fungos *Beauveria bassiana* e *Beauveria brongniartii* são patogênicos para *T. urticae*.
- Os isolados 307, 457, 494, 969 e PL-63 de *Beauveria bassiana* e os isolados 489, 868, 908 de *Beauveria* sp., são virulentos e promissores para o controle microbiano de *T. urticae*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, J.E.M. Avaliação de fungos entomopatogênicos visando ao controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera; Rhinotermitidae). Piracicaba, 1994. 105p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986b. cap.4, p.28-64: Epizootiologia.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986a. cap.6, p.73-126: Fungos entomopatogênicos.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M.P. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em bandejas. **Ecossistema**, v.14, p.188-192, 1989.

ALVES, S.B.; VIEIRA, S.A.; SILVEIRA NETO, S. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para ovos do carrapato *Boophilus microplus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., ENCONTRO NACIONAL DE FITOSSANITARISTAS, 5., Piracicaba, 1993. **Anais**. Piracicaba, 1993. p.344.

ALVES, S.B.; ALVES, L.F.A.; LOPES, R.B.; VIEIRA, S.A. Isolado 1037 de *Metarhizium anisopliae* promissor para o controle microbiano de insetos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., ENCONTRO NACIONAL DE FITOSSANITARISTAS, 7., Salvador, 1997. **Anais**. Salvador, 1997. p.139.

ALVES, S.B.; RISCO, S.H.; SILVEIRA NETO, S.; MACHADO NETO, R. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. to *Diatraea saccharalis* (Fabr.). **Zeitschrift für angewandte Entomologie**, v.97, p.403-406, 1984.

BARCI, L.A.G. Perspectivas para o controle biológico do carrapato do boi. In: Ciclo de palestras sobre controle biológico de pragas, 5., Campinas, 1997. **Anais**. Campinas, 1997. p.60-71.

BARTKOWSKI, J.; ODINDO, O.; OTIENO, W.A. Some fungal pathogens of the cassava green spider mites *Mononychellus* spp. (Tetranychidae) in Kenya. **Insect Science and its Application**, v.9, n.4, p.457-459, 1988.

BEAVERS, J.B.; REED, D.K. Susceptibility of seven tetranychids to the nonoccluded virus of the citrus red mite and the correlation of the carmine spider mite as a vector. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.20, p.279-283, 1972.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.15, p.197-202, 1992.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Revista da Universidade Rural, Série Ciência da Vida**, v.16, n.1/2, p.41-47, 1994 b.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista da Universidade Rural, Série Ciência da Vida**, v.16, n.1/2, p.49-55, 1994a.

BOUCIAS, D.G.; McCOY, C.W.; JOSLYN, D.J. Isozyme differentiation among 17 geographical isolates of *Hirsutella thompsonii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.39, p.329-337, 1982.

BURGES, H.D. Teratogenicity of the thermostable beta-exotoxins of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.26, p.419-420, 1975.

CABRERA, R.I.; CACERES, I.; DOMINGUEZ, D. Estudio de dos especies de *Hirsutella* y sus hospedantes en el cultivo de la guayaba *Psidium guajava*. **Agrotecnia de Cuba**, v.19, n.1, p. 29-34, 1987.

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

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

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

CHAPMAN, M.H.; HOY, M.A. Relative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) and its predator *Metaseiulus occidentalis* (Wesbitt) (Acari, Tetranychidae and Phytoseiidae). **Journal of Applied Entomology**, v.111, n.2, p.147-154, 1991.

CORREIA, A.C.B.; GRAVENA, S.; KREBKSY, E.O. Primeira citação do fungo *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* parasitando *Phyllocoptruta oleivora* (Ashm.) (Acari, Eriophyidae) no Brasil. **Laranja**, v.13, n.2, p. 553-558, 1992.

DELALIBERA JÚNIOR, I.; MORAES, G.J.; SMITH, L. Patogenicidade de isolados de *Neozygites* cf. *floridana* aos ácaros *Mononychellus tanajoa* e *Tetranychus urticae*. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 16., Encontro Nacional de Fitossanitaristas, 7., Salvador, 1997. **Anais**. Salvador, 1997. p.151.

DELALIBERA JÚNIOR, I.; SOSA GOMEZ; D.; MORAES, G.J. Infection of *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) by the fungus *Neozygites* sp. (Entomophthorales) in northeastern Brazil. **Florida Entomologist**, v.75, n.1, p.145-147, 1992.

DRESNER, E. Culture and use of entomogenous fungi for the control of insect pests. **Contributions from Boyce Thompson Institute**, v.15, p.319-335, 1949.



- EGER JÚNIOR, J.E.; FERGUSON, V.M.; TOWNSEND, K.G. Efficacy of selected miticides and spray tank mixtures used to control rust mite in Florida citrus. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, v. 98, p. 11-14, 1985.
- FENG, M.; JOHNSON, J.B. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v.19, n.3, p.785-790, 1990.
- FERNANDES, P.M. Controle microbiano de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) utilizando *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, 1991. 115p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- FISHER, F.E. An *Entomophthora* attacking citrus red mite. **Florida Entomologist**, v.34, n.3, p.83-88, 1951.
- FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural para crescimento, conidiação e sobrevivência à luz ultra-violeta em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. **Revista de Agricultura**, v.61, n.2, p.137-147, 1986.
- GARDNER, W.A.; OETTING, R.D.; STOREY, G.K. Susceptibility of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, to the fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* Fisher. **Florida Entomologist**, v.65, n.4, p. 458-465, 1982.
- GERSON, U.; KENNETH, R.; MUTTATH, T.I. *Hirsutella thompsonii*, a fungal pathogen of mites. II. Host-pathogen interactions. **Annals of Applied Biology**, v.91, n.1, p.29-40, 1979.

- GILMORE, J.E. Preliminary field evaluation of a noninclusion virus for control of the citrus red mite. **Journal of Economic Entomology**, v.58, n.6, p.1136-1140, 1965.
- GILMORE, J.E.; MUNGER, F. Stability and transmissibility of a viruslike pathogen of the citrus red mite. **Journal of Insect Pathology**, v.5, n.2, p.141-151, 1963.
- GILMORE, J.E.; TASHIRO, H. Fecundity, longevity, and transinfectivity of citrus red mites (*Panonychus citri*) infected with a noninclusion virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.8, p.334-339, 1966.
- HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. cap.7, p.127-170.
- HALL, I.M.; HUNTER, D.K.; ARAKAWA, K.Y. The effect of the  $\beta$ -exotoxin fraction of *Bacillus thuringiensis* on the citrus red mite. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.18, p.359-362, 1971.
- HALL, R.A.; HUSSEY, N.W.; MARIAU, D. Results of a survey of biological control agents of the coconut mite *Eriophyes guerreronis*. **Oléagineux**, v.35, n.8/9, p.395-398, 1980.
- HELYER, N. *Verticillium lecanii* for control of aphids and thrips on cucumber. **Bulletin OILB-SROP**, v.16, n.2, p.63-66, 1993.
- HOY, M.A.; OUYANG, Y. Toxicity of the  $\beta$ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis* to *Tetranychus pacificus* and *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Tetranychidae and Phytoseiidae). **Journal of Economic Entomology**, v.80, n.2, p.507-511, 1987.

- HUMBER, R.A.; MORAES, G.J; SANTOS, J.M. Natural infection of *Tetranychus evansi* (Acarina: Tetranychidae) by a *Triplosporium* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) in Northeastern Brazil. **Entomophaga**, v.26, n.4, p. 421-425, 1981.
- JACKSON, C.W.; HEALE, J.B.; HALL, R.A. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. **Annals of Applied Biology**, v.106, p.39-48, 1985.
- JEPPSON, L.R.; KEIFER, H.H.; BAKER, E.W. **Mites injurious to economic plants**. Berkeley: University of California Press, 1975. 614p.
- KAAYA ,G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, n.1, p.15-20, 1996.
- KALSBECK, V.; FRANSEN, F.; STEENBERG, T. Entomopathogenic fungi associated with *Ixodes ricinus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v.19, n.1, p.45-51, 1995.
- KANAGARATNAM, P.; HALL, R.A.; BURGESS, H.D. Effect of fungi on the black currant gall mite, *Cecidophyopsis ribis*. **Plant Pathology**, v.30, n.2, p. 117-118, 1981.
- KENNETH, R.; MUTTATH, T.I.; GERSON, U. *Hirsutella thompsonii*, a fungal pathogen of mites. I. Biology of the fungus *in vitro*. **Annals of Applied Biology**, v.91, n.1, p.21-28, 1979.

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

LECUONA, R.E.; TIGANO, M.S.; DIAZ, B.M. Characterization and pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) in Argentina. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v.25, n.2, p.299-307, 1996.

LIPA, J.J. Microbial control of mites and ticks. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, W.W. (Ed.). **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1971. p.357-373.

MANIANIA, N.K.; FARGUES, J. Susceptibility of *Mamestra brassicae* (L.), and *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae (Lep., Noctuidae) to the hyphomycetes *Paecilomyces fumosoroseus* (Brown and Smith) and *Nomuraea rileyi* (Samson) at two temperatures. **Journal of Applied Entomology**, v.113, n.5, p.518-524, 1992.

McCOY, C.W. Pest control by the fungus *Hirsutella thompsonii*. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial control of insects, mites and plant diseases**. London: Academic Press, 1981. v.2, cap.26, p.499-512.

McCOY, C.W.; COUCH, T.I. *Hirsutella thompsonii*: A potencial mycoacaricide. **Developments in Industrial Microbiology**, v.20, p.89-96, 1978.

McCOY, C.W.; COUCH, T.L. Microbial control of the citrus rust mite with the mycoacaricide, Mycar<sup>®</sup>. **Florida Entomologist**, v.65, n.1, p.116-126, 1982.

McCOY, C.W.; HEIMPEL, A.M. Safety of the potential mycoacaricide, *Hirsutella thompsonii*, to vertebrates. **Environmental Entomology**, v.9, n.1, p.47-49, 1980.

McCOY, C.W.; STAMPER, D.H.; TUVESON, R.W. Conidiogenous cell differences among mutant and wild-type pathotypes of *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.43, n.3, p.414-421, 1984.

MOINO JÚNIOR., A. Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o controle de pragas de grãos armazenados. Piracicaba, 1993. 100p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Avaliação da eficácia dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre ovos do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais**. Foz do Iguaçu, 1996. p.403.

MOORHOUSE, E.R.; GILLESPIE, A.T.; CHARNLEY, A.K. Laboratory selection of *Metarhizium* spp. isolates for control of vine weevil larvae (*Otiorhynchus sulcatus*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, n.1, p.15-21, 1993 a.

MOORHOUSE, E.R.; GILLESPIE, A.T.; CHARNLEY, A.K. Selection of virulent and persistent *Metarhizium anisopliae* isolates to control black vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus*) larvae on glasshouse begonia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, n.1, p.47-52, 1993 b.

- MORAES, G.J.; DELALIBERA JÚNIOR, I. Specificity of strain of *Neozygites* sp. (Zygomycetes: Entomophthorales) to *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, v.14, p.89-94, 1992.
- MUMA, M.H. Factors contributing to the natural control of citrus insects and mites in Florida. **Journal of Economic Entomology**, v.48, n.4, p.432-438, 1955.
- MUNGER, F.; GILMORE, J.E.; DAVIS, W.S. A disease of citrus red mites. **California Citrograph**, v.44, p.190-216, 1959.
- NEMOTO, H.; AOKI, J. *Entomophthora floridana* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) attacking the sugi spider mite, *Oligonychus hondoensis* (Acarina: Tetranychidae), in Japan. **Applied Entomology Zoology**, v.10, n.2, p. 90-95, 1975.
- NEVES, P.J.; TAMAI, M.A.; ALVES, S.B. Processo de infecção e reprodução de *Beauveria bassiana* em *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari, Tetranychidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., ENCONTRO NACIONAL DE FITOSSANITARISTAS, 7., Salvador, 1997. **Anais**. Salvador, 1997. p.138-139.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural no fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.33, n.3, p.657-672, 1990.
- PELAGATTI, O.; FRATE, G.; CARETTA, G. Funghi isolati da insetti e acari. **Redia**, v.71, p.255-266, 1988.

- POPRAWSKI, T.J.; RIBA, G.; JONES, W.A.; AIOUN, A. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona* weevils (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v.17, n.2, p.275-279, 1988.
- RAMASESHIAH, G. Occurrence of an *Entomophthora* on Tetranychid mites in India. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.18, p.421-424, 1971.
- RATH, A.C. Pathogens for the biological control of mite and collembolan pests. **Plant Protection Quartely**, v.6, n.4, p.172-174, 1991.
- REED, D.K. Effects of temperature on virus-host relationships and on activity of the noninclusion virus of citrus red mites, *Panonychus citri*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.24, p.218-223, 1974.
- REED, D.K.; DESJARDINS, P.R. Isometric virus-like particles from citrus red mites, *Panonychus citri*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.31, p.188-193, 1978.
- REED, D.K.; HALL, I.M. Electron microscopy of a rod-shaped non-inclusion virus infecting the citrus red mite. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.20, n.3, p.272-278, 1972.
- REED, D.K.; RICH, J.E.; SHAW, J.G. A portable apparatus for detection of virus-diseased citrus red mites in the field. **Journal of Economic Entomology**, v.65, n.3, p.890-891, 1972a.
- REED, D.K.; SHAW, J.G.; RICH, J.E. Increased infection through laboratory culturing of citrus red mites collected from diseased populations. **Journal of Economic Entomology**, v.65, n.5, p.1507, 1972 b.

- ROYALTY, R.N.; HALL, F.R.; TAYLOR, R.A.J. Effects of thuringiensin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) mortality, fecundity, and feeding. **Journal of Economic Entomology**, v.38, n.3, p.792-798, 1990.
- SAMSON, R.A.; McCOY, C.W. A new fungal pathogen of the scavenger mite, *Tydeus gloveri*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.40, p.216-220, 1982.
- SELHIME, A.G.; MUMA, M.H. Biology of *Entomophthora floridana* attacking *Eutetranychus banksi*. **Florida Entomologist**, v.49, n.3, p.161-168, 1966.
- SEWIFY, G.H.; MABROUK, A.M. The susceptibility of different stages of the citrus brown mite, *Eutetranychus orientalis* Oudemans (Acarina: Tetranychidae) to the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. **Egypt. J. Biol. P. Cont.**, v.1, n.1, p.89-92, 1991.
- SHAW, J.G.; CHAMBERS, D.L.; TASHIRO, H. Introducing and establishing the noninclusion virus of the citrus red mite in citrus groves. **Journal of Economic Entomology**, v.61, n.5, p.1352-1355, 1968 a.
- SHAW, J.G.; MOFFITT, C.; SCRIVEN, G.T. Biotic potential of phytoseiid mites fed on virus-infected citrus red mites. **Journal of Economic Entomology**, v.60, n.6, p.1751-1752, 1967.
- SHAW, J.G.; REED, D.K.; STEWART, J.R.; GORDEN, J.M.; RICH, J.E. Mechanical collection of diseased citrus red mites as a method of providing inoculum. **Journal of Economic Entomology**, v.64, n.5, p.1223-1224, 1971.



- SHAW, J.G.; TASHIRO, H.; DIETRICK, E.J. Infection of the citrus red mite with virus in central and southern California. **Journal of Economic Entomology**, v.61, n.6, p.1492-1495, 1968 b.
- SMITH, K.M.; HILLS, G.J.; MUNGER, F.; GILMORE, J.E. A suspected virus disease of the citrus red mite *Panonychus citri* (McG.). **Nature**, v.184, p.70, 1959.
- SMITLEY, D.R.; BROOKS, W.M.; KENNEDY, G.G. Environmental effects on production of primary and secondary conidia, infection, and pathogenesis of *Neozygites floridana*, a pathogen of the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.47, p.325-332, 1986.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; NASCA, A.J. Primera cita del hongo patógeno de ácaros, *Hirsutella thompsonii* (Fisher, 1950) para la República Argentina. **CIRPON - Revista de Investigación**, v.1, n.3, p.137-141, 1983.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; RICCI, J.G.; NASCA, A.J. Efecto de *Hirsutella thompsonii* Fisher var. *thompsonii*, sobre larvas y adultos de *Coccidophilus citricola* Brethes y *Lindorus lophanthae* (Blaisdell) (Col.; Coccinellidae). **CIRPON - Revista de Investigación**, v. 3, n. 1/2, p. 73-77, 1985.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B.; MILANI, M.T. Characterization and phenetic analysis of geographical isolates of *Beauveria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.3, p.401-409, 1994.
- SOUZA, E.J.; PERALVA, S.L.F.S.; MASCARENHAS, A.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ALVES, S.B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* para fêmeas engurgitadas de *Boophilus microplus*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais**. Foz do Iguaçu, 1996. p.113.

- SPEARE, A.T.; YOTHERS, W.W. Is there an entomogenous fungus attacking the citrus rust mite in Florida ?. **Science**, v.11, p.41-42, 1924.
- TASHIRO, H.; BEAVERS, J.B. Field epizootic of the citrus red mite virus disease. **California Citrograph**, v.51, n.12, p.503-506, 1966.
- TIGANO, M.S.; RIBA, G. Estudo de sistemas isoenzimáticos polimórficos para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v.19, n.2, p.487-491, 1990.
- VAN DER GEEST, L.P.S. Pathogens of spider mites. In: HELLE, W.; SABELIS, M.W. (Ed.). **Spider mites**. their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier, 1985. v.1B, cap.2.4, p.247-258.
- VIEIRA, S.A.; ALVES, S.B.; STIMAC, J.L.; ESTAVAM, R.C. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para o controle de *Periplaneta americana* (L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., ENCONTRO NACIONAL DE FITOSSANITARISTAS, 5., Piracicaba, 1993. **Anais**. Piracicaba, 1993. p.347.
- WEISER, J. *Triplosporium tetranychii* sp. n. (Phycomycetes, Entomophthoraceae), a fungus infecting the red mite *Tetranychus althaeae* Hanst. **Folia Parasitologica**, v.15, p.115-122, 1968.
- WEISER, J.; MUMA, M.H. *Entomophthora floridana* n. sp. (Phycomycetes: Entomophthoraceae), a parasite of a the Texas citrus mite, *Eutetranychus banksi*. **Florida Entomologist**, v.49, n.3, p.155-159, 1966.

WILDING, N. Pest control by Entomophthorales. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial control of pest and plant diseases**. London: Academic Press, 1981. cap.28, p.539-554.

YANINEK, J.S.; MORAES, G.J. A synopsis of classical biological control of mites in agriculture. In: DUSBABECK, F.; BUKVA, V. (Ed.). **Modern acarology**. Prague: SPB Academic Publishing, 1991. cap.5.1, p.133-149.

ZOEBISCH, T.G.; OCHOA, R.; VARGAS, C.; GAMBOA, A. Identificación y potencial del hongo *Hirsutella thompsonii* Fisher para el control de ácaros de importancia económica en América Central. **Manejo Integrado de Plagas**, n.23, p.9-12, 1992.