

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *TETRANYCHUS URTICAE* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE)

M.A. Tamai¹, S.B. Alves¹, J.E.M. de Almeida², M. Faion¹

¹Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, CP 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil. E-mail: maatamai@carpa.ciagri.usp.br

RESUMO

Foram avaliados 45 isolados dos fungos *Aschersonia aleyrodís* (1), *Beauveria bassiana* (32), *Metarhizium anisopliae* (10), *Hirsutella* sp.(1) e *Paecilomyces farinosus* (1) quanto à patogenicidade ao ácaro *Tetranychus urticae*. Os ácaros foram inoculados com suspensões $1,7 \times 10^7$ (*Hirsutella* sp.) ou 5×10^7 conídios/mL e mantidos a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, 98% UR e 12 horas de fotofase. *A. aleyrodís* e *P. farinosus* apresentaram reduzida patogenicidade causando mortalidade corrigida inferior a 3% após cinco dias da inoculação. Todos os isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Hirsutella* sp. foram patogênicos para *T. urticae* com seus valores de mortalidade incrementando a partir do terceiro dia e com acme de mortalidade ocorrendo ao quarto e quinto dias após a inoculação. Para *B. bassiana*, 19 isolados (59%) apresentaram valores de mortalidade corrigida ao quinto dia entre 60 a 80% e apenas oito isolados (25%) causaram mortalidades superiores a 80%. Quanto a *M. anisopliae*, 8 isolados (80%) apresentaram valores superiores a 80% de mortalidade corrigida ao quinto dia, sendo que 4 isolados apresentaram mortalidades superiores a 90%. *Hirsutella* sp. causou 73% na concentração de $1,7 \times 10^7$ conídios/mL, cinco dias após a inoculação. Observou-se a presença de cristais de cálcio no interior de 80 a 100% dos ácaros colonizados pelos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

PALAVRAS-CHAVE: *Aschersonia aleyrodís*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutella*, *Paecilomyces farinosus*, *Tetranychus urticae*.

ABSTRACT

EVALUATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR CONTROL OF *TETRANYCHUS URTICAE* KOCH (ACARI: TETRANYCHIDAE). Forty-five isolates of *Aschersonia aleyrodís* (1), *Beauveria bassiana* (32), *Metarhizium anisopliae* (10), *Hirsutella* sp.(1) and *Paecilomyces farinosus* (1) were evaluated for pathogenicity against the mite *Tetranychus urticae*. The mites were inoculated with suspensions containing 1.7×10^7 (*Hirsutella* sp.) or 5×10^7 conidia/mL (other fungi) and maintained at $25 \pm 1^\circ \text{C}$, 98% RH and 12 h photofase. *A. aleyrodís* and *P. farinosus* had low pathogenicity, causing less than 3% Abbott-corrected mortality five days after inoculation. All isolates of *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *Hirsutella* sp. were pathogenic to *T. urticae* with mortalities increasing after the third day and peaking on the fourth or fifth day post inoculation. For *B. bassiana*, 19 isolates (59%) caused corrected mortalities between 60 to 80% after 5 days, and only 8 isolates (25%) caused corrected mortalities > 80%. For *M. anisopliae*, 8 isolates (80%) caused > 80% corrected mortality after 5 days, and 4 caused > 90% mortality. *Hirsutella* sp. caused 73% mortality 5 days after inoculation with 1.7×10^7 conidia/mL. Calcium oxalate crystals were observed inside 80 to 100% of mites infected with *B. bassiana* or *M. anisopliae*.

KEY WORDS: *Aschersonia aleyrodís*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutella*, *Paecilomyces farinosus*, *Tetranychus urticae*.

INTRODUÇÃO

Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) apresenta grande capacidade de desenvolvimento de resistência à acaricidas químicos, sendo considerado uma das principais pragas das culturas hortícolas em

todo mundo (JEPPSON *et al.*, 1975; CRANHAM & HELLE, 1985). Seus inimigos naturais incluem diversos grupos de artrópodos (insetos e ácaros predadores) e os entomopatógenos.

As pesquisas conduzidas com entomopatógenos concentram-se em dois grupos de fungos. O primeiro

²Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidad Vegetal, Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil.

é representado por espécies da Ordem Entomophthorales, conhecidas por causarem epizootias em populações de diversas espécies de ácaros da família Tetranychidae. Apesar de sua reconhecida importância, seu potencial como agente de controle tem sido pouco explorado em razão da dificuldade que ainda envolvem sua produção. Esta situação limita a utilização destes fungos às estratégias que preconizam sua proteção no agroecossistema e introdução em áreas onde ainda não ocorrem (controle biológico clássico), como é feito para algumas espécies desta Ordem que infectam insetos (LACEY *et al.*, 2001). No segundo grupo estão os fungos imperfeitos (Deuteromycotina: Hyphomycetes) de amplo espectro hospedeiro e de fácil produção em meios de cultura, como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viègas e *Hirsutella thompsonii* Fischer. Esses fungos são de ocorrência comum e podem ser facilmente isolados de amostras de solo e de insetos e/ou ácaros infectados, sendo predominantes nas principais coleções de fungos entomopatogênicos no Brasil (ESALQ/USP e Instituto Biológico) (ALMEIDA & BATISTA FILHO, 2001).

A variabilidade genética dos isolados nessas coleções já foi comprovada, principalmente, quanto aos padrões moleculares e patogenicidade à insetos e ácaros pragas (ALMEIDA *et al.*, 1997; LOPES, 1999; NEVES & ALVES, 2000; ALVES *et al.*, 2001; RAMOS, 2001), constituindo-se desta maneira em reservatórios diversificados para estudos visando a seleção de materiais que apresentem características adequadas para sua utilização em programas de controle biológico de pragas. Estas características são definidas de acordo com a estratégia de uso do entomopatogênico, em que se considera a bioecologia da praga alvo e as características da cultura e do ambiente em que a praga encontra-se.

A estratégia mais comum de uso de fungos entomopatogênicos no controle de pragas é a introdução inundativa, na qual se utilizam grandes quantidades do entomopatogênico para uma rápida supressão da população (LACEY *et al.*, 2001). Esta situação é adequada em tratando-se de pragas como *T. urticae* que apresenta grande capacidade biótica, ciclo de vida curto e que ocorre em culturas cujos níveis de dano são muito reduzidos, como nas culturas de ornamentais e olerícolas. Para esta estratégia, o entomopatogênico precisa ser efetivo no controle da praga, de fácil produção e armazenamento. Desse modo, o objetivo desta pesquisa foi o de avaliar a patogenicidade de 45 isolados de cinco espécies de fungos Hyphomycetes ao ácaro *T. urticae*, com a finalidade de selecionar isolados promissores para uso no controle da praga.

MATERIAL E MÉTODOS

Fêmeas adultas recém emergidas de *T. urticae* foram transferidas de uma criação estoque em plantas de feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis* (Dicotiledonea: Fabaceae), para placas de pelietireno de 4,0 cm de diâmetro, contendo cada placa um disco de folha de *C. ensiformis* de 2,5 cm de diâmetro sobre uma espuma de polietileno umedecida. Cada placa recebeu inicialmente 15 fêmeas do ácaro, sendo após trinta minutos retirados os ácaros mortos e o excedente, mantendo-se apenas 10 ácaros/placa. Em seguida, os ácaros foram pulverizados com suspensões de conídios em Torre de Potter, utilizando-se volume de 2 mL de suspensão $1,7 \times 10^7$ (*Hirsutiella* sp.) ou 5×10^7 conídios/mL (*Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*) e pressão de 15 libras/pol². Foram avaliados 45 isolados destas espécies de fungos entomopatogênicos. Cada isolado (tratamento) foi aplicado em 10 placas, sendo cada placa uma repetição. Após a pulverização, as placas foram mantidas em condição ambiente por 15 minutos para a evaporação da porção líquida da suspensão. Posteriormente, foram acondicionadas dentro de caixa plástica transparente (34 cm de comprimento x 22 cm de largura e 12 cm de altura). A caixa foi mantida fechada dentro de câmara para B.O.D., sob a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 98% de UR e 12 horas de fotofase. Diariamente a caixa foi mantida aberta por 30 minutos para a renovação do ar com o ambiente.

As avaliações foram realizadas uma vez ao dia, anotando-se as mortalidades diárias (total, confirmada e corrigida) em cada placa, além da porcentagem de ácaros mortos contendo cristais de cálcio no seu interior. A mortalidade corrigida foi calculada pela fórmula de ABBOTT (1925), a partir da mortalidade total, enquanto que a mortalidade confirmada correspondeu a porcentagem de ácaros mortos que esporularam de cada tratamento [(nº ácaros mortos esporulados x 100) ÷ (nº ácaros mortos total)]. Amostras de 10 a 20 ácaros mortos foram montados em lâmina contendo uma mistura de Hoyer + Azul láctico (1:1) para a visualização dos cristais de cálcio em microscópio de contraste de fase. Para a confirmação da morte pelo patógeno, os ácaros mortos foram lavados em álcool 70% e posteriormente colocados em câmara úmida. A câmara úmida consistiu em uma caixa plástica hermética, com espuma umedecida no fundo.

Os isolados dos fungos entomopatogênicos avaliados (Tabela 1) encontram-se armazenados no Banco de Microrganismos Entomopatogênicos do Laboratório de Controle Biológico do Centro Experimental Central do Instituto Biológico (IB/Campinas, SP) e também no Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Depar-

tamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, em freezer a -12°C na forma de conídios puros. Por ocasião dos testes, os isolados foram inoculados em meio de cultura M.C. (meio completo) (ALVES *et al.*, 1998) e mantidos por 7 dias em câmara B.O.D. a $26 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase para o crescimento e produção de conídios. Os conídios produzidos foram removidos da superfície do meio de cultura com auxílio de uma espátula de metal, para o preparo das suspensões em água destilada estéril mais espalhante adesivo (Tween 80[®] - 0,2 mL/L).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados dos fungos *A. aleyrodis* e *P. farinosus* apresentaram valores de mortalidade corrigida ao quinto dia inferiores a 3%. Apesar dessa baixa patogenicidade a *T. urticae*, comprovou-se a sua colonização e esporulação sobre os cadáveres do ácaro (Tabela 2). A reduzida patogenicidade de *A. aleyrodis* a *T. urticae* pode ser explicada, em parte, pelo fato desta espécie de fungo possuir seu espectro hospedeiro composto predominantemente por cochonilhas, pulgões e moscas brancas (Hemiptera: Sternorrhyncha) (ALVES, 1998; SAMSON *et al.*, 1988). O mesmo não se aplica a *P. farinosus* que apresenta um espectro hospedeiro mais amplo quando comparado com *A. aleyrodis*, distribuídos entre espécies de lepidópteros, coleópteros, himenópteros e homópteros (BOUCIAS & PENDLAND, 1998). No caso deste fungo outros fatores estão envolvidos. É importante considerar que o número de isolados avaliados destes fungos foi muito reduzido, não podendo generalizar estes resultados para toda a espécie.

Todos os isolados das espécies *Beauveria* spp., *M. anisopliae* e *Hirsutella* sp. foram patogênicos a *T. urticae*, com valores de mortalidade corrigida aumentando progressivamente com o tempo após a inoculação. Não houve mortalidade de ácaros na avaliação realizada 24 horas após a inoculação. Ao segundo dia, a mortalidade média corrigida foi inferior a 5% nos tratamentos. Os valores tornaram-se maiores a partir do terceiro dia, sendo o acme de mortalidade observado ao quarto e quinto dias após a inoculação pelos isolados (Tabela 2).

O comportamento médio dos isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Hirsutella* sp. foram muito semelhantes para a porcentagem de mortalidade corrigida e confirmada. Ao terceiro dia, a mortalidade média corrigida foi inferior a 24%, ao quarto dia entre 50 e 60% e ao quinto dia entre 70 e 80%. Os valores médios da mortalidade confirmada entre o terceiro e quinto dia foram sempre superiores a 80%, comprovando que os ácaros mortos, em quase sua totalidade, tiveram como causa de sua morte a infecção pelo entomopatógeno. O fato de alguns

ácaros não apresentarem a esporulação do entomopatógeno não descarta totalmente a possibilidade de terem sido mortos pelo inimigo natural. Em alguns casos, o álcool utilizado na desinfestação externa pode ter inviabilizado o fungo após sua entrada para o interior do cadáver por eventuais fissuras no tegumento, provocadas pelo pincel durante a transferência destes cadáveres para a câmara úmida. A ação rápida de bactérias decompositoras no cadáver pode também impedir que o fungo esporule sobre ele.

Houve variações entre os isolados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* quanto à porcentagem de mortalidade corrigida em todos os dias de avaliação. Grandes variações ocorreram ao terceiro dia após a inoculação, com valores entre 1 e 36%. Apenas dois isolados de *B. bassiana* não apresentaram valores de mortalidade (CB 4 e CB 66) neste dia de avaliação. Estes dois isolados juntamente com CB 87 apresentaram valores inferiores a 40% decorridos cinco dias da inoculação, os menores entre todos os isolados deste entomopatógeno.

Considerando a mortalidade corrigida ao quinto dia para *B. bassiana*, 19 isolados (59%) apresentaram valores entre 60 a 80%, enquanto que cinco (16%) e oito isolados (25%) tiveram valores inferiores e superiores a esta faixa de mortalidade, respectivamente. Os oito isolados com maiores valores de mortalidade foram: CB 2, CB 13, CB 75, CB 146, CB 154, CB 157, CB 161 e CB 166. Quanto a *M. anisopliae*, a grande maioria dos isolados (80%) apresentou valores superiores a 80%, destes, apenas 4 isolados (CB 348, 1247, 1286 e PL47) apresentaram valores superiores a 90% neste dia de avaliação. O isolado 1282 de *Hirsutella* sp. apresentou mortalidade de 73%, um pouco inferior aos melhores isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, contudo, esse resultado é referente a concentração de $1,7 \times 10^7$ conídios/mL, concentração cerca de 3 vezes menor do que a utilizada para todas as demais espécies de fungos. O reduzido rendimento na produção de conídios em meio de cultura sólido impediu que *Hirsutella* sp. fosse avaliada na mesma concentração dos demais fungos.

Não houve relação aparente entre os valores de mortalidade corrigida ao terceiro dia e os observados ao quinto dia. Alguns isolados como o CB 146 e CB 154 (*B. bassiana*) apresentaram valores de mortalidade reduzidos ao terceiro dia (< 3%) e elevados ao quinto dia (> 80%). O inverso também foi observado, como por exemplo para o CB 141 e 147 (*B. bassiana*) que apresentaram valores superiores a 29% ao terceiro dia e inferiores a 70% ao quinto dia.

Os valores elevados de mortalidade ao terceiro dia indicam uma ação rápida do patógeno sobre a praga, porém a utilização deste fator como parâmetro de seleção de isolados requer algumas considerações. Para insetos capazes de transmitir viroses e com

grande capacidade de dispersão, como os tripses e moscas-brancas, torna-se necessário seu controle de forma imediata como meio de impedir o alastramento da doença na cultura. Embora *T. urticae* não seja um transmissor de viroses, sua ocorrência em culturas de ciclo curto e que apresentam reduzido nível de dano econômico, como as culturas ornamentais e olerícolas, exige o seu rápido controle.

A rapidez com que o patógeno mata seu hospedeiro é uma característica desejável para o controle de muitas pragas agrícolas, contudo, não deve ser considerada como única. É imprescindível também que o isolado seja capaz de proporcionar elevada mortalidade final, exigindo desta maneira pulverizações menos frequentes e possibilitando reduzir os custos de controle das pragas.

Com exceção de *Hirsutellasp.*, as demais espécies de fungos testados não são observadas atacando ácaros fitófagos em condições naturais, o que de certa forma explica o baixo desempenho obtido por *A. aleyrodis*, como referido anteriormente. Com relação à *B. bassiana* e *M. anisopliae* embora não sejam observadas causando epizootias em ácaros fitófagos, o que facilitaria sua constatação em condições naturais, estes são referidos como entomopatógenos de amplo espectro hospedeiro ou pouco específicos, causando doença em espécies de insetos e ácaros de diversas ordens e famílias. Somente para o gênero *Beauveria* são conhecidas, pelo menos, 200 espécies de insetos e ácaros suscetíveis (ALVES, 1998). Esta característica tem contribuído para que estas espécies sejam muito estudadas em vista ao controle de pragas em todo mundo. Ao contrário de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, os fungos da Ordem Entomophthorales apresentam, muitas vezes, especificidade hospedeira (DELALIBERA JÚNIOR *et al.*, 1997). Esta característica confere aos fungos Entomophthorales uma grande segurança em termos de efeito sobre organismos não alvos, muito importante quando se deseja introduzir o inimigo natural em áreas onde não ocorre naturalmente (controle biológico clássico).

Embora muitos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* tenham se mostrado semelhantes quanto à mortalidade ao quinto dia após a inoculação, pode-se, por efeito prático, selecionar cinco isolados de cada espécie (*B. bassiana*: CB 2, CB 146, CB 157, CB 161 e CB 166; *M. anisopliae*: CB 345, CB 348, 1247, 1286 e PL47) promissores para seu desenvolvimento como constituintes de formulações micocaricidas.

Observou-se a presença de cristais de cálcio no interior dos ácaros mortos para todos os isolados de *B. bassiana* (32 isolados) e *M. anisopliae* (10 isolados) avaliados, com ocorrências média sempre superior a 80% dos ácaros mortos observados. Para os fungos *A. aleyrodis*, *Hirsutellasp.* e *P. farinosus* não foi constatada

a presença dos cristais em nenhum ácaro morto. Os fatores ligados a formação destes cristais nos ácaros ainda não são conhecidos, mas sua presença no interior dos ácaros mortos por *B. bassiana* e *M. anisopliae* sugerem semelhanças entre estes fungos no processo de colonização dos organismos hospedeiros.

Tabela 1 - Hospedeiros e procedências dos 45 isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios de seleção com *Tetranychus urticae*

Espécie	Isolado	Procedência	Hospedeiro
<i>A. aleyrodis</i>	1216	Guaíra, SP	<i>Bemisia tabaci</i>
<i>B. bassiana</i>	CB 2	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 4	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 6	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 7	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 13	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 14	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 15	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 16	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 21	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 23	Aral Moreira, MS	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 24	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 44	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 47	Cascavel-PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 66	São José Rio Pardo, SP	<i>Hypothenemus hampei</i>
<i>B. bassiana</i>	CB 74	Japão	<i>Lyzothopteus eryzoperus</i>
<i>B. bassiana</i>	CB 75	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 87	Goiânia, GO	<i>Cosmopolites sordidus</i>
<i>B. bassiana</i>	CB 141	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 145	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 146	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 147	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 149	Limeira, SP	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 150	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 154	Guaraniaçu, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 157	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 161	Guaraniaçu, SP	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 164	Espigão Azul, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 165	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	CB 166	Cascavel, PR	Amostra de solo
<i>B. bassiana</i>	PL 63	Piracicaba, SP	<i>Atta</i> sp.
<i>B. bassiana</i>	353	Piracicaba, SP (Hemiptera)	Pentatomidae
<i>B. bassiana</i>	1260	Itiquira, MT	<i>Leptopharsa heveae</i>
<i>Hirsutella</i> sp.	1282	Caçú, GO	<i>Calacarus heveae</i>

Cont. Tabela 1 - Hospedeiros e procedências dos 45 isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios de seleção com *Tetranychus urticae*

Espécie	Isolado	Procedência	Hospedeiro
<i>M. anisopliae</i>	CB 345	Cosmópolis, SP	<i>Mahanarva fimbriolata</i>
<i>M. anisopliae</i>	CB 347	Araras, SP	<i>Mahanarva fimbriolata</i>
<i>M. anisopliae</i>	CB 348	Sertãozinho, SP	<i>Mahanarva fimbriolata</i>
<i>M. anisopliae</i>	E6	Estado de Pernambuco	<i>Diatraea saccharalis</i>
<i>M. anisopliae</i>	E9	Boca da Mata, AL	<i>Mahanarva posticata</i>
<i>M. anisopliae</i>	PLA7	Campos, RJ	<i>Mahanarva posticata</i>
<i>M. anisopliae</i>	1037	Porto Alegre, RS	<i>Solenopsis</i> sp.
<i>M. anisopliae</i>	1247	Turvinia, SP	Amostra de solo
<i>M. anisopliae</i>	1286	Valparaíso, SP	<i>Mahanarva fimbriolata</i>
<i>M. anisopliae</i>	1294	Estado de São Paulo	<i>Mahanarva fimbriolata</i>
<i>P. farinosus</i>	1205	Santa Fé do Sul, SP	<i>Bemisia tabaci</i>

Estes cristais são de tamanho e forma variadas, alguns alongados e outros apresentando geometria bipiramidal. Sua constatação nos ácaros foi feita a partir do terceiro dia após a inoculação, correspondendo ao início do período de colonização do hospedeiro

pelo patógeno. Foram observados, predominantemente, na região posterior do corpo dos ácaros. Pelo tamanho e localização, sua presença deve interferir nas atividades normais de funcionamento dos órgãos do hospedeiro.

A formação de cristais é conhecida quase exclusivamente para ácaros infectados por vírus, contudo, ainda não havia sido observada para fungos. A presença de cristais é comum em *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) infectados por um vírus não-incluso em pomares cítricos nos Estados Unidos. De acordo com BEAVERS & REED (1972) a infecção pelo vírus pode ser determinada montando-se os ácaros em meio Hoyer e examinando-os em microscópio de luz polarizada para a presença ou ausência de cristais birefringentes no interior dos ácaros. A observação dos cristais era de fundamental importância para a comprovação da infecção pelo patógeno, pois as partículas virais são muito pequenas e de difícil visualização. Estes cristais foram observados por TASHIRO & BEAVERS (1966) em 77% dos ácaros mortos pelo patógeno e 54% dos ácaros vivos infectados, durante uma epizootia. Inclusões birefringentes dentro do mesêntero de *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae) foram observadas por BIRD (1967), quando os ácaros encontravam-se infectados por um outro vírus não-incluso. Na Europa existem suspeitas de que um entomopatógeno seja o responsável pela formação de cristais na forma de halteres na região posterior de *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae), capaz de comprometer sua reprodução, predação e longevidade (BJORNSON *et al.*, 2000).

Tabela 2 - Porcentagens de mortalidades corrigida (acumulada) e confirmada de *Tetranychus urticae* e porcentagem de ácaros mortos contendo cristais, pela inoculação com 45 isolados dos fungos entomopatogênicos.

Espécies*	Isolados	Dias após a Inoculação								
		3 D.A.I.			4 D.A.I.			5 D.A.I.		
		Corrig.	Conf.	Cristais	Corrig.	Conf.	Cristais	Corrig.	Conf.	Cristais
<i>M.a.</i>	E6	25,3	72,4	100,0	56,5	80,6	100,0	62,1	42,8	100,0
<i>M.a.</i>	E9	31,5	75,7	100,0	57,3	84,0	100,0	81,9	86,9	100,0
<i>B.b.</i>	CB 02	20,0	87,5	100,0	76,1	94,4	100,0	87,4	72,7	100,0
<i>B.b.</i>	CB 04	0,0	100,0	100,0	21,6	76,7	80,0	38,1	64,7	90,0
<i>B.b.</i>	CB 06	23,2	83,3	100,0	60,2	78,0	60,0	76,2	40,0	83,3
<i>B.b.</i>	CB 07	4,3	33,3	100,0	47,2	85,4	100,0	74,7	80,8	100,0
<i>B.b.</i>	CB 13	16,3	39,1	88,9	56,2	76,3	100,0	80,7	95,6	100,0
<i>B.b.</i>	CB 14	9,1	90,0	100,0	34,1	93,7	80,0	52,4	72,2	80,0
<i>B.b.</i>	CB 15	11,1	83,3	80,0	55,7	57,1	80,0	79,8	68,2	100,0
<i>B.b.</i>	CB 16	6,5	100,0	100,0	56,3	92,0	100,0	79,2	95,6	100,0
<i>B.b.</i>	CB 21	6,5	100,0	100,0	51,3	97,8	100,0	75,0	100,0	100,0
<i>B.b.</i>	CB 23	18,5	52,0	80,0	49,4	76,7	100,0	79,5	82,1	100,0
<i>B.b.</i>	CB 24	4,5	100,0	100,0	54,3	96,0	100,0	77,1	95,6	100,0

Cont. Tabela 2 - Porcentagens de mortalidades corrigida (acumulada) e confirmada de *Tetranychus urticae* e porcentagem de ácaros mortos contendo cristais, pela inoculação com 45 isolados dos fungos entomopatogênicos.

Espécies*	Isolados	Dias após a Inoculação								
		3 D.A.I.			4 D.A.I.			5 D.A.I.		
		Corrig.	Conf.	Cristais	Corrig.	Conf.	Cristais	Corrig.	Conf.	Cristais
<i>B.b.</i>	CB 44	5,4	76,9	100,0	40,4	76,5	100,0	68,7	81,5	100,0
<i>B.b.</i>	CB 47	4,5	75,0	100,0	53,3	97,9	100,0	78,1	100,0	100,0
<i>M.a.</i>	PL 47	17,0	100,0	100,0	67,3	100,0	100,0	94,8	100,0	100,0
<i>B.b.</i>	PL 63	14,2	81,2	70,0	49,3	89,2	90,0	73,6	91,7	90,0
<i>B.b.</i>	CB 66	0,0	0,0	0,0	19,0	88,9	100,0	26,5	100,0	100,0
<i>B.b.</i>	CB 74	17,4	62,5	100,0	50,6	75,0	100,0	72,3	85,7	100,0
<i>B.b.</i>	CB 75	6,5	100,0	100,0	58,4	79,2	100,0	81,3	88,5	100,0
<i>B.b.</i>	CB 87	1,0	100,0	100,0	1,1	27,3	33,3	10,7	25,0	66,7
<i>B.b.</i>	CB 141	36,0	86,1	100,0	56,8	95,6	90,0	69,6	92,3	80,0
<i>B.b.</i>	CB 145	1,0	100,0	100,0	55,0	87,0	100,0	78,0	100,0	100,0
<i>B.b.</i>	CB 146	2,0	100,0	100,0	60,0	91,4	90,0	87,0	92,6	100,0
<i>B.b.</i>	CB 147	29,0	82,7	80,0	48,4	86,4	100,0	57,6	90,0	88,9
<i>B.b.</i>	CB 149	36,0	75,0	100,0	55,8	86,4	100,0	78,3	100,0	100,0
<i>B.b.</i>	CB 150	1,0	100,0	100,0	19,2	100,0	100,0	60,4	91,4	90,0
<i>B.b.</i>	CB 154	3,0	100,0	100,0	57,0	81,5	100,0	82,0	92,0	100,0
<i>B.b.</i>	CB 157	8,0	100,0	100,0	76,0	80,9	100,0	93,0	94,1	90,0
<i>B.b.</i>	CB 161	6,0	100,0	100,0	64,0	100,0	100,0	88,0	95,8	90,0
<i>B.b.</i>	CB 164	7,1	75,0	83,3	43,2	71,4	100,0	65,5	66,7	90,0
<i>B.b.</i>	CB 165	6,0	100,0	100,0	38,4	97,3	100,0	66,7	89,3	100,0
<i>B.b.</i>	CB 166	11,0	90,9	100,0	73,0	91,9	100,0	89,0	93,7	100,0
<i>M.a.</i>	CB 345	36,4	94,7	100,0	64,5	100,0	100,0	88,6	100,0	100,0
<i>M.a.</i>	CB 347	30,3	100,0	100,0	62,4	100,0	100,0	82,9	100,0	100,0
<i>M.a.</i>	CB 348	24,1	96,1	100,0	60,2	100,0	100,0	90,9	100,0	100,0
<i>B.b.</i>	353	14,9	100,0	100,0	41,9	96,5	100,0	72,6	96,6	100,0
<i>M.a.</i>	1037	14,7	100,0	100,0	55,4	97,5	100,0	85,1	100,0	100,0
<i>P.f.</i>	1205	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,9	22,2	0,0
<i>A.a.</i>	1216	1,0	0,0	0,0	1,0	25,0	0,0	1,0	0,0	0,0
<i>M.a.</i>	1247	11,0	100,0	100,0	61,2	100,0	100,0	94,8	97,0	100,0
<i>B.b.</i>	1260	13,0	100,0	100,0	53,1	97,6	100,0	78,4	96,0	100,0
<i>Ht.</i>	1282	24,0	95,8	0,0	55,1	100,0	0,0	73,2	88,9	0,0
<i>M.a.</i>	1286	16,8	100,0	90,0	77,2	98,3	100,0	93,1	100,0	100,0
<i>M.a.</i>	1294	1,1	83,3	100,0	17,4	94,4	100,0	44,8	89,3	100,0

* Espécies de fungos entomopatogênicos: *B.b.* (*Beauveria bassiana*); *M.a.* (*Metarhizium anisopliae*); *Ht.* (*Hirsutella* sp.); *P.f.* (*Paecilomyces farinosus*); *A.a.* (*Aschersonia aleyrodii*)

Nos estudos de infecção de *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) (Acari: Eriophyidae) (McCoy & Couch, 1978; Sosa-Gómez & Nasca, 1983) e *T. urticae* (Gerson *et al.*, 1979) por *Hirsutella thompsonii* Fischer, não foram feitas pelos pesquisadores qualquer referência a possível presença de cristais nos ácaros infectados, mesmo quando descreveram com detalhes o processo de colonização dos ácaros por este fungo. O mesmo aconteceu para *Neozygites floridana* infectando os

ácaros tetraniquídeos *Eutetranychus banksi* McGregor (Selhime & Muma, 1966) e *T. urticae* (Carner, 1976).

Os fatores que envolvem a formação de cristais em ácaros ainda não são bem conhecidos, contudo, no estudo de Norton & Behan-Pelletier (1991) são propostas algumas hipóteses. Deposições de carbonato de cálcio e oxalato de cálcio foram observadas pelos autores em diversos pontos do tegumento de ácaros de solo (Acari: Oribatida), conferindo dureza

ao tegumento, e desta forma, contribuindo para a sua defesa contra o ataque de seus predadores. A origem destes cristais foi discutida e sugerem, com base na literatura, que estes cristais são formados pela reação entre o ácido oxálico produzido durante o metabolismo de fungos decompositores com o cálcio presente na solução do solo. Para estes fungos, o ácido oxálico atua no processo não-enzimático de decomposição vegetal, sendo os cristais de oxalato de cálcio precipitados na superfície de suas hifas. Estas deposições de cálcio presentes sobre o tegumento dos ácaros derivam dos cristais originalmente precipitados pelos fungos no solo, este por sua vez, servem de alimento para estes ácaros.

Considerando que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são também habitantes do solo, onde vivem dos componentes orgânicos deste ambiente, é provável que a origem dos cristais observados em *T. urticae* seja a reação entre o ácido oxálico produzido pelo metabolismo destes fungos, com o cálcio presente na hemolinfa do ácaro. Este tipo de cristal também foi observado por AMARAL & ALVES (1979) sobre o tegumento e na hemolinfa de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) infectados por *B. bassiana*. Neste caso, a formação dos cristais pode ter ocorrido externamente pela reação do ácido oxálico com a cálcio polvilhado sobre os insetos, como prática usual dos produtores para prevenir a infecção dos insetos por este entomopatógeno. MOINO JÚNIOR (1998) observou a formação de reduzido número de cristais em locais de intenso crescimento micelial de *B. bassiana* sobre o tegumento do cupim *Heterotermes tenuis* (Hagen) (Isoptera: Rhinotermitidae).

Estudos detalhados são necessários para que possa ser elucidado o fenômeno envolvido na formação dos cristais de cálcio durante a colonização de insetos e ácaros por *B. bassiana* e *M. anisopliae*, bem como o papel destes cristais no ciclo das relações entre patógeno-hospedeiro.

CONCLUSÕES

A. aleyrodis e *P. farinosus* apresentam reduzida patogenicidade a *T. urticae*;

Os valores médios de mortalidades corrigida e confirmada de *T. urticae* apresentados pelos isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Hirsutella* sp. são semelhantes;

Os isolados CB 2, CB 146, CB 157, CB 161 e CB 166 de *B. bassiana* e os isolados CB 345, CB 348, 1247, 1286 e PL47 de *M. anisopliae* são altamente patogênicos e promissores para o controle microbiano de *T. urticae*;

Todos os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* produzem cristais de cálcio no interior do corpo dos ácaros infectados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq-PRONEX e a FAPESP pelo financiamento desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, v.18, p.265-267, 1925.
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). *J. Appl. Entomol.*, v.121, p.539-543, 1997.
- ALMEIDA, J.E.M. & BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. *Biotecnol. Ciênc. & Desenvolvimento*, n.20, p.30-33, 2001.
- ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, 1998. p.289-381: Fungos entomopatogênicos.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JÚNIOR, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.) *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fealq, 1998. p.637-711.
- ALVES, S.B.; VIEIRA, S.A.; MACEDO, D.; LOPES, R.B. Diversidade genética de isolados de *Metarhizium anisopliae* detectada por RAPD-PCR e patogenicidade a *Diatraea saccharalis*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7., 2001, Poços de Caldas, MG. *Resumos*. Lavras: 2001. p.175.
- AMARAL, E. & ALVES, S.B. *Insetos úteis*. Piracicaba: Livroceres, 1979.
- 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. *J. Invertebr. Pathol.*, v.20, p.279-283, 1972.
- BIRD, F.T. A virus disease of the European red mite, *Panonychus ulmi* (Koch). *Can. J. Microbiol.*, v.13, p.1131, 1967.
- BJORNSON, S.; RAWORTH, D.A.; BÉDARD, C. Abdominal discoloration and the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot: prevalence of symptoms and their correlation with short-term performance. *Biol. Contr.*, v.19, p.17-27, 2000.
- BOUCIAS, D.G. & PENDLAND, J.C. *Principles of insect pathology*. Norwell: Kluwer Academic, 1998. p.321-364: Entomopathogenic fungi: fungi imperfecti.
- CARNER, G.R. A description of the life cycle of *Entomophthora* sp. in the two-spotted spider mite. *J. Invertebr. Pathol.*, v.28, p.245-254, 1976.
- CRANHAM, J.E. & HELLE, W. Pesticide resistance in tetranychidae. In: HELLE, W. & SABELIS, M.W. (Ed.) *Spider mites. their biology, natural enemies and control*. Amsterdam: Elsevier, 1985. p.405-421.
- 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., 1997, Salvador, BA. *Anais*. Cruz das Almas: 1997. p.151.

- GERSON, U.; KENNETH, R.; MUTTATH, T.I. *Hirsutella thompsonii*, a fungal pathogen of mites. II. Host-pathogen interactions. *Ann. Appl. Biol.*, v.91, n.1, p.29-40, 1979.
- JEPPSON, L.R.; KEIFER, H.H.; BAKER, E.W. *Mites injurious to economic plants*. Berkeley: University of California Press, 1975.
- LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.K.; VAIL, P. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future. *Biol. Contr.*, v.21, n.3, p.230-248, 2001.
- LOPES, R.B. Seleção de fungos entomopatogênicos e controle de *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). Piracicaba, 1999. 76p. [Dissertação (Mestrado) – ESALQ/USP].
- MCCOY, C.W. & COUCH, T.I. *Hirsutella thompsonii*: a potencial mycoacaricide. *Dev. Ind. Microbiol.*, v.20, p.89-96, 1978.
- MOINO JÚNIOR, A. Fatores que afetam a eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera, Rhinotermitidae). Piracicaba, 1998. 134p. [Tese (Doutorado) – ESALQ/USP].
- NEVES, P.J. & ALVES, S.B. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.43, n.4, p.373-378, 2000.
- NORTON, R.A. & BEHAN-PELLETIER, V.M. Calcium carbonate and calcium oxalate as cuticular hardening agents in oribatid (Acari: Oribatida). *Can. J. Zool.*, v.69, n.6, p.1504-1511, 1991.
- RAMOS, E.Q. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Bemisia tabaci* biótipo “B”. Piracicaba, 2001. 57p. [Dissertação (Mestrado) – ESALQ/USP].
- SAMSON, R.A.; EVANS, H.C.; LATGÉ, J.P. *Atlas of entomopathogenic fungi*. Berlin: Springer-Verlag, 1988.
- SELHIME, A.G. & MUMA, M.H. Biology of *Entomophthora floridana* attacking *Eutetranychus banksi*. *Fla. Entomol.*, v.49, n.3, p.161-168, 1966.
- SOSA-GÓMEZ, D.R. & NASCA, A.J. Primera cita del hongo patógeno de ácaros, *Hirsutella thompsonii* (Fisher, 1950) para la República Argentina. *CIRPON Rev. Invest.*, v.1, n.3, p.137-141, 1983.
- TASHIRO, H. & BEAVERS, J.B. Field epizootic of the citrus red mite virus disease. *Calif. Citrogr.*, v.51, n.12, p.503-506, 1966.

Recebido em 5/2/02

Aceito em 30/4/02