

BIOLOGICAL CONTROL

Efeito de Meios de Cultura na Virulência de *Hirsutella thompsonii* (Fischer) (Deuteromycetes) para o Controle *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae)LUCIANA S. ROSSI-ZALAF¹, SÉRGIO B. ALVES² E SOLANGE A. VIEIRA²¹Instituto Superior de Ciências Aplicadas, Via 147, Rod. Limeira-Piracicaba, km 4, Cruz do Padre, 13482-383 Limeira, SP, lsrzalaf@gmail.com²Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Av. Pádua Dias, 11, 13418-900 Piracicaba, SP, sebalves@esalq.usp.br*Neotropical Entomology* 37(3):312-320 (2008)Effect of Culture Media on Virulence of *Hirsutella thompsonii* (Fischer) (Deuteromycetes) to Control *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae)

ABSTRACT - The virulence of *Hirsutella thompsonii* (Fischer) to *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) was evaluated in laboratory, grown on complete and solid culture media (MC-S); complete and liquid culture media (MC-L); rice (APC) and powdered rice (APC-SM). Adults were confined to arenas prepared with citrus leaves in acrylic dishes containing water-agar. Conidial suspensions were prepared at different concentration (3.2×10^5 to 1×10^7 spores/ml) and applied on mites to establish the table curve-response on fourth day. For field evaluation, adults were maintained in arenas prepared with fruits which were placed in plants. In this test, four treatments were tried: *H. thompsonii* cultured on rice (APC) at two concentrations (20 kg/ha and 10 kg/ha), *H. thompsonii* produced by liquid fermentation (MC-L) (5 L/ha) and control (sterile water). Adult survival, number of eggs and nymphs per fruit were observed 10 and 20 days after the fungus application. The lowest LC_{25} value calculated was from pathogen produced in MC-S (1.9×10^5 conidia/ml). The LC_{25} values calculated to APC and APC-SM did not differ statistically. The LC_{25} values to MC-L and MC-S were 1.9×10^6 infective cells/ml and 2.2×10^5 conidia/ml. In the field, concentration and time to death differed between treatments and control. The applications resulted in reduction of adult survival and number of eggs.

KEY WORDS: Microbial control; false spider mite, citriculture, entomopathogenic fungus

RESUMO - O objetivo do trabalho foi avaliar a virulência de *Hirsutella thompsonii* (Fischer), a *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), produzido nos substratos: meio de cultura completo e sólido (MC-S); meio completo e líquido (MC-L); arroz pré-cozido (APC) e arroz pré-cozido seco e moído (APC-SM). Os adultos do ácaro foram mantidos em arenas foliares de citros inseridas em placas acrílicas contendo ágar-água. As suspensões do patógeno, preparadas em diferentes concentrações ($3,2 \times 10^5$ a 1×10^7 conídios/ml) foram pulverizadas sobre os ácaros, estabelecendo-se as curvas de concentração-resposta após o quarto dia. Para a avaliação no campo, os adultos foram mantidos em arenas preparadas em frutos que foram colocados em plantas de citros. Nesse experimento, quatro tratamentos foram aplicados: *H. thompsonii* produzida em arroz (APC) em duas concentrações (20 kg/ha e 10 kg/ha), *H. thompsonii* produzida em meio líquido (MC-L) (5L/ha) e a testemunha (água estéril). A sobrevivência dos adultos e o número de ovos e ninfas originados foram avaliados 10 e 20 dias após as aplicações. A menor CL_{25} calculada foi para o patógeno produzido em MC-S ($1,9 \times 10^5$ conídios/ml). Os valores de CL_{25} calculados para o fungo produzido em APC e APC-SM não diferiram estatisticamente. Para o fungo produzido em MC-L e MC-S os valores de CL_{25} foram de $1,9 \times 10^6$ células infectivas/ml e $2,2 \times 10^5$ conídios/ml. No campo, houve diferenças dos tratamentos quanto às concentrações aplicadas e o tempo após a pulverização. As aplicações do patógeno resultaram em redução apenas no número de adultos e de ovos.

PALAVRAS-CHAVE: Ácaro da leprose dos citros, citricultura, fungo entomopatogênico, controle microbiano

A leprose dos citros é uma doença responsável por grandes prejuízos econômicos, uma vez que as perdas geradas são quantitativas e qualitativas. O agente causal, um vírus de ação localizada pertencente à família *Rhabdoviridae*, é transmitido pelo ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) e compromete seriamente a produção da planta. A importância e descrição da doença têm sido amplamente discutidas por diversos especialistas em fitossanidade (Childers *et al.* 2003a, b).

As conseqüências indiretas da ocorrência dessa doença em citros estão relacionadas à redução da produção, perdas de árvores e também aumento dos custos de controle. De acordo com Bassanezi (2004) a queda e a depreciação dos frutos lesionados variam de 0 a 2% quando há um controle eficiente da doença, e de 40% a 100% quando não são adotadas medidas de controle. Os índices dependem das condições climáticas e de fatores como níveis de infestação do vetor, incidência da doença, idade e variedade das plantas. Assim, a adoção das medidas de manejo da leprose torna-se imprescindível em sistemas de produção de citros, o que aumenta os custos de produção. Conseqüentemente, a redução dos custos depende diretamente de constantes melhorias no sistema de manejo e das tecnologias empregadas.

Novas táticas de controle são desejáveis para o manejo sustentável da leprose nos pomares cítricos, incluindo o uso de agentes de controle biológico, que reduzem problemas como o desenvolvimento da resistência de ácaros e a ressurgência de pragas, e evitam o uso abusivo de agrotóxicos.

Os fungos entomopatogênicos podem ser empregados para auxiliar no controle de ácaros fitófagos, uma vez que, juntamente com os vírus, esses patógenos são os principais grupos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças em suas populações (Alves 1998, Van der Geest *et al.* 2000).

Um gênero de grande importância é *Hirsutella*, principalmente *H. thompsonii* (Fisher) devido à sua patogenicidade para eriofiídeos. Após seu isolamento a partir do ácaro-da-falsa-ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora* Ashmed) em 1924 e identificação em 1950, uma série de estudos foram realizados e auxiliaram no desenvolvimento desse fungo como bioinseticida, o qual foi comercializado por um pequeno período na década de 1980 nos Estados Unidos (Spears & Yothers 1924, Chandler *et al.* 2000, Van der Geest *et al.* 2000).

Com relação a sua produção, apesar de algumas dificuldades, essa espécie pode ser multiplicada *in vitro* em diferentes sistemas que utilizam meios de cultura sólidos e líquidos (Van der Geest *et al.* 2000). Os primeiros testes de produção do patógeno em pequena e média escala foram realizados em meios de cultura sólidos a base de agar-água (McCoy & Kanavel 1969). Posteriormente, novos estudos permitiram produzir *H. thompsonii* em meios semi-sólidos e líquidos em cultura submersa e com sistema de aeração (McCoy 1996).

Recentemente, a produção de *H. thompsonii* em média escala tem sido voltada para ensaios experimentais de controle de ácaros. Alguns trabalhos de laboratório e de campo vêm demonstrando o potencial de utilização do patógeno no controle do ácaro da leprose dos citros (Acevedo & Rosas 2000, Rossi-Zalaf & Alves 2006).

Os objetivos deste trabalho foram: determinar a virulência de *H. thompsonii* ao ácaro *B. phoenicis*, produzido em

diferentes meios de cultura, e avaliar a eficiência do patógeno no controle desse ácaro quando inoculado em laboratório e submetido em condições de campo.

Material e Métodos

Criação e manutenção de *B. phoenicis* em laboratório. O ácaro *B. phoenicis* foi mantido no laboratório, em colônias constituídas por frutos de laranja 'Pêra Rio' e/ou 'Valência' obtidas em pomares livres da aplicação de agrotóxicos.

Após a coleta, foram selecionados os frutos mais maduros e com presença de pústulas de verrugose (*Elsinoe fawcettii* Bit. & Jenk.) na casca, condição que favorece o desenvolvimento da população do ácaro (Chivegato & Kharfan 1993). Previamente à utilização, os frutos foram lavados em água corrente e enxugados utilizando papel toalha. Em seguida, cada fruto foi submetido a um banho de parafina em 2/3 de sua área total deixando uma arena de aproximadamente 4 cm de diâmetro sobre a superfície para evitar a fuga dos ácaros (Rossi-Zalaf & Alves 2006).

A população inicial de ácaros foi obtida junto a Laboratório de "Resistência de Artrópodes a Pesticidas" do setor de Entomologia da ESALQ/USP, identificada como BEL-1 (Piracicaba). Inicialmente, os adultos foram transferidos para cada fruto com auxílio de um pincel de um pêlo. Após a transferência, os frutos foram acondicionados em caixas plásticas (28 x 43 x 12 cm) contendo no fundo uma placa de isopor perfurada. As caixas foram mantidas em sala climatizada (25 ± 5°C; 12h de fotofase e 75 ± 10% UR) por aproximadamente 20 dias.

Após esse período os frutos mais velhos foram substituídos por frutos novos, previamente preparados como descrito anteriormente. Em seguida, a transferência de alguns ácaros foi realizada encostando-se a arena de confinamento dos frutos velhos com a dos frutos novos.

Produção de *H. thompsonii* e preparo das suspensões para pulverização. O fungo utilizado nos bioensaios foi *H. thompsonii* (ESALQ-1269), que se encontra armazenado no banco de patógenos do laboratório sob óleo mineral e liofilizado em condições de baixa temperatura (-40°C). Esse material foi isolado de cadáveres de *Calacarus heveae* Feres coletados em seringueira na região de Caçú (GO) e é patogênico ao ácaro da leprose dos citros (Rossi-Zalaf & Alves 2006).

Primeiramente, uma amostra do isolado proveniente da preservação foi inoculada em meio de cultura completo e sólido para multiplicação e obtenção do inóculo inicial. Para a realização dos bioensaios, o fungo foi produzido a partir do inóculo inicial em meio de cultura sólido (MC-S), arroz pré-cozido (APC) e meio de cultura líquido (MC-L). A produção em meio sólido foi realizada em placas de Petri previamente esterilizadas contendo meio de cultura completo (0,36 g de KH_2PO_4 ; 1,05 g de $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,60 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g de KCl; 10,0 g de glicose; 5 g de extrato de levedura; 20 g de agar; 1 litro de H_2O destilada) autoclavado a 120°C por 20 min (Alves *et al.* 1998). Após a inoculação do fungo, as placas foram mantidas por 10 dias em câmara climatizada (26 ± 0,5°C; 12h de fotofase e 70 ± 10% UR) para crescimento

e produção de conídios. A produção do patógeno em arroz pré-cozido foi realizada de acordo com o método das bandejas descrito por Alves & Pereira (1998). A produção em MC-L foi feita utilizando-se os mesmos ingredientes do meio completo, sem ágar-água em sua composição. Após o preparo, o meio foi colocado em erlenmeyers e autoclavado. Em seguida, o fungo foi inoculado e os frascos colocados em agitador com rotação de 225 e 250 rpm durante cinco dias, sendo realizadas observações das estruturas formadas após 6, 9, 12 e 24h da inoculação. Em todos os casos, as suspensões para a aplicação foram preparadas após o período de crescimento e esporulação do patógeno, que foi de 10 dias para MC-S e APC e 5 dias para MC-L.

Para o fungo produzido em meio completo, os conídios de *H. thompsonii* foram separados do meio utilizando-se uma alça de borracha estéril, sendo em seguida transferidos para recipientes de vidro contendo água estéril + 2% de espalhante adesivo (Tween 40®). A partir dessa suspensão foram obtidas três diluições sucessivas e realizada a contagem do número de conídios/ml em câmara de Neubauer. Na produção em arroz, foi retirada uma amostra de 1 g do substrato contendo o patógeno e esta foi diluída em 9 ml de água estéril mais espalhante adesivo por três vezes para contagem do número de conídios. Para o fungo produzido em MC-L, uma alíquota do material foi retirada, triturada em liquidificador e submetida à contagem de células infectivas/ml, não separando conídios submersos de pedaços de micélio. Em seguida, foram preparadas as suspensões para a pulverização sobre os ácaros.

Paralelamente à produção, foi avaliada a viabilidade de *H. thompsonii* produzida em MC-S, MC-L e em arroz pré-cozido (APC). No caso do arroz, as observações foram realizadas antes e após os processos de secagem (APC e APC-S) e moagem do substrato (APC-SM). Para isso, após a esporulação do fungo sobre o arroz, uma parte desse material foi submetida apenas à secagem em câmara com fluxo laminar horizontal por cinco dias seguidos, sendo a outra parte submetida a esse processo e, em seguida, à moagem. Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de viabilidade e número de unidades formadoras de colônias (U.F.C.). Para a determinação da viabilidade foram observados conídios germinados e não germinados após 32h de incubação com auxílio de microscópio ótico. Para a determinação de U.F.C. foi feita a contagem do número de colônias de *H. thompsonii* após 168h (sete dias) da incubação. A presença de contaminantes no meio de cultura também foi avaliada da mesma maneira, sendo eles posteriormente identificados. Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições para avaliação da viabilidade e cinco repetições para determinação de U.F.C.

Substrato para manutenção de *B. phoenicis*. Os bioensaios foram realizados utilizando-se folhas tenras de citros como substrato alimentar para os ácaros. As folhas foram coletadas em pomares livres da aplicação de agrotóxicos e levadas para o laboratório para limpeza e desinfestação por meio de lavagem em água corrente com detergente líquido. Em seguida, com um vazador de metal de 2,6 cm de diâmetro, foram recortados discos foliares que foram inseridos,

individualmente, no interior de placas acrílicas (3,5 cm de diâmetro) contendo uma mistura de 4 ml de ágar-água (2%) solidificado. Para garantir a fixação da folha ao ágar-água, evitar sua degradação e também impedir a fuga dos ácaros, foi confeccionada sobre a folha uma barreira de 2 ml da mesma mistura (ágar-água 2%) de maneira a delimitar uma arena de confinamento.

Determinação da curva de concentração-resposta de *H. thompsonii* para adultos de *B. phoenicis*. Os ácaros adultos foram confinados no interior de arenas de folhas de citros, confeccionadas em placas acrílicas contendo ágar-água (Rossi-Zalaf&Alves 2006). Para o interior de cada arena foram transferidos 10 ácaros sendo que para cada concentração foram utilizadas 10 arenas (100 ácaros/tratamento).

A curva de concentração-resposta de *H. thompsonii* para *B. phoenicis* foi determinada utilizando-se para o fungo produzido em MC-S, MC-L, arroz pré-cozido (APC) e em arroz pré-cozido seco e moído (APC-SM). Em todos os testes foram pulverizadas sobre os ácaros suspensões de $3,2 \times 10^5$; $6,3 \times 10^5$; $1,2 \times 10^6$; $2,5 \times 10^6$; $5,0 \times 10^6$ e 1×10^7 conídios ou células infectivas/ml de *H. thompsonii*, além da testemunha. As concentrações foram estabelecidas em função do valor logarítmico de 5,5 a 7,0 e espaçadas, entre si, em progressão aritmética.

Para os tratamentos com o fungo produzido em MC-S, em APC e APC-SM a pulverização foi realizada em Torre de Potter calibrada a 15 libras/pol² utilizando-se 2 ml da suspensão. Para o fungo produzido em MC-L o mesmo volume de suspensão foi aplicado nas arenas contendo os ácaros por meio de um pulverizador manual do tipo *airbrush set* devido ao tamanho das partículas em suspensão. Para a melhor interpretação dos resultados, os tratamentos em que as suspensões foram pulverizadas em Torre de Potter foram analisados separadamente daqueles aplicados via *airbrush set*, em função da diferença entre os dois aparelhos quanto à homogeneidade de aplicação.

Após a aplicação, as arenas tratadas foram transferidas para caixas plásticas forradas com papel toalha umedecido e estas armazenadas em câmara climatizada ($26 \pm 0,5^\circ\text{C}$; 12h de fotofase e $70 \pm 10\%$ UR). Durante todo o período de avaliação as caixas foram mantidas fechadas para promover umidade relativa constante em seu interior.

A avaliação foi realizada ao quarto dia após a aplicação (4 daa) anotando-se o número de ácaros mortos. Para análise geral dos resultados, a mortalidade de ácaros nos tratamentos com o fungo foi corrigida em função da testemunha de acordo com a fórmula de Schneider-Orelli (1947). Para determinação da concentração-letal (CL_{25}) os resultados foram analisados pelo programa estatístico POLO-PC (LeOra Software, 1987) por meio de análise de probit. Para a análise gráfica, foi utilizado o programa Probit-Basics.

Efeito de *H. thompsonii* sobre *B. phoenicis* em condições de campo. O experimento foi realizado em um pomar de citros da variedade 'Pêra' isento da aplicação de agrotóxicos, localizado na ESALQ-USP em Piracicaba (SP) em outubro de 2005.

Inicialmente, foram coletados nesse local, frutos com sintomas de verrugose. No laboratório os frutos foram lavados e desinfestados e em seguida 2/3 da área de cada um foi submetida a um banho de parafina, de maneira a formar uma arena. Cada arena foi delimitada com cola adesiva (Tanglefoot®) e ao redor foi colocada uma tira de plástico transparente para facilitar o manuseio. O fungo utilizado foi produzido em arroz pré-cozido (APC) pelo método das bandejas e em meio de cultura completo e líquido (MC-L).

Uma vez preparadas, cada arena foi infestada com 30 fêmeas adultas pré-emergidas que apresentavam alta mobilidade. Após a transferência dos ácaros, os frutos foram pulverizados com 5 ml das suspensões do patógeno, usando-se um pulverizador manual do tipo *airbrush set* e imediatamente submetidos à secagem em ambiente por alguns minutos.

Após a secagem no ambiente, cada fruto foi colocado no interior de uma malha de plástico, usada para embalagem de frutas, que foi envolvida por um barbante. No campo, os foram fixados nas plantas de citros adultas e mantidos até o período de avaliação, quando foram novamente levados ao laboratório. Os frutos foram posicionados na parte mediana da copa em todos os quadrantes de maneira aleatória.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, sendo que cada planta foi considerada um bloco e foram utilizadas 10 plantas (10 repetições). Os tratamentos foram: testemunha; *H. thompsonii* (10 kg/ha); *H. thompsonii* (20 kg/ha); *H. thompsonii* produzida em meio líquido (5 L/ha). Em todos os tratamentos de ambos os experimentos as suspensões receberam o óleo vegetal Natural Óleo na concentração de 0,8 ml/L de água.

As avaliações foram realizadas 10 e 20 dias após a aplicação, observando-se as arenas em estereoscópio. Os parâmetros foram: número de indivíduos nas arenas (adultos, ovos e ninfas), observando-se presença de ácaros doentes ou com sinais do patógeno e presença/ausência de predadores. Os indivíduos mortos foram examinados em microscópio ótico. Após a anotação dos resultados os frutos foram descartados. Paralelamente, informações de temperatura e umidade relativa do ar referentes ao período em que o experimento foi realizado foram determinadas por um termohigrômetro. Foi realizada também, uma consulta junto ao site do Departamento de Agrometeorologia da ESALQ/USP (<http://www.lce.esalq.usp.br/posto.html>) para confirmação das medidas.

Os resultados foram submetidos a análise de variância e transformados em logaritmo e raiz quadrada para o teste de comparação de médias (Tukey) a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o Analyse System (SAS).

Resultados e Discussão

Produção de *H. thompsonii* e preparo das suspensões para pulverização. O meio de cultura completo e sólido (MC-S) foi o que promoveu maior viabilidade de conídios (99,4%) e maior esporulação ($1,76 \times 10^6$ conídios/cm²). Não foi constatada incidência de contaminantes, embora no caso de *H. thompsonii* o crescimento do patógeno no substrato seja mais lento e, portanto, com maiores chances de ocorrer contaminação em relação a outras espécies como *Beauveria bassiana* Balls. Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin por exemplo. Os resultados comprovam que, principalmente, o alto valor nutricional de MC-S foi o aspecto determinante para o desenvolvimento de *H. thompsonii*. Porém, esse é um meio de cultura utilizado para a produção em laboratório e seu uso restringe-se apenas à obtenção de inóculo devido ao seu elevado custo (Alves & Pereira 1998, Leite *et al.* 2003).

Os outros substratos avaliados (MC-L, APC, APC-S e APC-SM) apresentaram diferenças quanto à produção de *H. thompsonii* (Tabela 1). Quando produzido no meio de cultura completo e líquido (MC-L), o fungo apresentou crescimento mais rápido nesse meio, porém com baixa produção quando comparada aos demais ($1,4 \times 10^3$ células infectivas/ml). Após 42h, observaram-se massas de micélio, todas com formato arredondado e formadas em função da força centrífuga do agitador, gerando um precipitado no fundo do frasco. Em termos de rendimento, este tipo de produção gerou, em média, $1,4 \times 10^9$ células infectivas/100 L de produto, incluindo fragmentos de micélio e conídios submersos.

No substrato MC-L o nível de contaminação constatado nas amostras foi de 30% em média e a viabilidade das células infectivas observada após 24h foi de 96,8%. Observações regulares após 6, 9, 12 e 24h não evidenciaram a presença de blastósporos, apenas poucos conídios submersos após 42h da inoculação. Mesmo após a centrifugação do material, foi muito reduzida a quantidade recuperada de conídios submersos. As massas de micélio, quando retiradas de

Tabela 1. Médias (\pm EP) de viabilidade de conídios, unidades formadoras de colônias (UFC), concentração de conídios viáveis e unidades formadoras de contaminantes em diferentes meios de cultura para a produção de *H. thompsonii*.

Meio para produção ¹	Viabilidade média de conídios após 48h (%)	U.F.C média/placa de contagem (10^{-5})	Concentração de conídios viáveis ²	UFC de contaminantes (%)
MC-L	96,8 \pm 1,01 ³	0,014 \pm 0,024	$1,4 \times 10^3 \pm 0,24$	30
APC	86,8 \pm 2,24	10,6 \pm 0,20	$1,0 \times 10^6 \pm 0,02$	3,19
APC-S	73,5 \pm 5,23	23,4 \pm 8,04	$2,3 \times 10^6 \pm 0,80$	0,0
APC-SM	52,1 \pm 6,49	2,8 \pm 0,58	$2,8 \times 10^5 \pm 0,58$	80,28

¹MC-L (meio completo líquido); APC (arroz pré-cozido); APC-S (arroz pré-cozido sólido); APC-SM (arroz pré-cozido sólido e moído).

²Conídios submersos/ml para MC-L e conídios/g para APC, APC-S e APC-SM.

³Para MC-L a leitura de viabilidade foi realizada após 24h.

MC-L e transferidas para o interior de placas contendo BDA (batata-dextrose-ágar), produziram conidióforos e conídios aéreos após 24h.

De acordo com Van de Geest *et al.* (2000) as estruturas de *H. thompsonii* obtidas pela produção em meios artificiais podem variar morfológicamente em função da disponibilidade de nutrientes. Segundo Latgé *et al.* (1988) diferentes isolados do patógeno produzidos *in vitro* apresentam taxa de pleomorfismo pronunciado, sendo observada a ocorrência dos conídios submersos. No entanto, Winkelhoff & McCoy (1984) ressaltaram que é possível a produção dessas estruturas em raras situações, por exemplo, quando o substrato recebe de componentes nutritivos em sua constituição. Ainda segundo esses autores, para *H. thompsonii* apenas um isolado de 14 testados, produziu esses conídios após a adição de xarope de milho e Tween 80 no meio de cultura.

A produção do fungo em substrato líquido pode ser mais vantajosa já que permite obter quantidades consideráveis do patógeno em um curto espaço de tempo. Porém, as estruturas formadas, na maioria das vezes blastósporos e principalmente massa micelial, podem ou não apresentar variação nos níveis de virulência, além de haver risco constante de contaminação por bactérias (Alves & Pereira 1998). Em larga escala, a produção em meio líquido tem sido cada vez maior, pela possibilidade de controle das exigências nutricionais dos microrganismos e das condições do processo de fermentação (Leite *et al.* 2003). De acordo com McCoy *et al.* (1971), a produção de *H. thompsonii* via fermentação submersa é vantajosa, principalmente, porque permite obtenção elevada de fragmentos de micélio e possibilita ocorrer a esporulação das partículas no campo, em contato com a praga-alvo. Porém, o sucesso do uso dos fragmentos miceliais depende de um nível populacional alto do hospedeiro e de condições de temperatura e umidade do ambiente, pois as estruturas fúngicas são sensíveis às variações climáticas.

O fungo *H. thompsonii* quando produzido em grãos de arroz pré-cozido (APC) apresentou maior média na concentração de esporos e U.F.C. em relação ao meio de cultura completo (MC-L). A principal diferença constatada foi de APC em relação a APC-S e APC-SM (Tabela 1).

A viabilidade média de conídios decresceu em função do processo de secagem e moagem dos grãos passando de 86,8% previamente a secagem para 73% em APC-S e ainda menor após a moagem (52,1%). Inversamente proporcional foi o aumento da presença de contaminantes no produto final após a secagem e moagem, chegando a 80,2% em APC-SM, sendo que os níveis estabelecidos como aceitáveis para fungos em geral são de 5% a 10% de contaminação e 80% de viabilidade mínima de conídios (Alves & Pereira 1998, Leite *et al.* 2003), demonstrando a inadequação dos processos adotados em relação à qualidade do produto final.

Em relação à concentração de conídios viáveis, o fungo produzido em ACP obteve 1×10^6 conídios/g, APC-S $2,3 \times 10^6$ conídios/g e APC-SM foi o que apresentou a menor concentração, com $2,8 \times 10^5$ conídios/g. Essas proporções correspondem a 1×10^{11} conídios/100 kg do produto para APC, $2,3 \times 10^{11}$ conídios/100 kg de produto para APC-S e $2,8 \times 10^{10}$ conídios/100 kg de produto para APC-SM.

No Brasil, os substratos sólidos, em especial grãos de arroz, são os mais utilizados para a produção de fungos

entomopatogênicos em larga escala, principalmente devido ao baixo custo (Alves & Pereira 1998, Leite *et al.* 2003). Porém, no caso de *H. thompsonii* o arroz pré-cozido não se mostrou um meio adequado, apesar da facilidade e do baixo custo, pois a qualidade do produto final obtida foi baixa, principalmente quando o substrato foi submetido a secagem e moagem. Assim, outros substratos devem ser considerados para a produção de *H. thompsonii* em larga escala, inclusive aqueles em que o processo de fermentação submersa é realizado.

Determinação da curva de concentração-resposta de *H. thompsonii* em adultos de *B. phoenicis*. O fungo *H. thompsonii* foi patogênico ao ácaro em todas as concentrações, havendo um acréscimo da mortalidade em função do aumento da concentração de conídios. As maiores taxas de mortalidade corrigida foram observadas para o fungo produzido em MC-S, enquanto que as menores ocorreram em ACP e ACP-SM (Tabelas 2 e 4). Os ácaros mortos apresentaram sintomas da infecção pelo patógeno, caracterizados pela alteração no comportamento, na coloração do tegumento e principalmente enrijecimento ventral das pernas (Rossi-Zalaf & Alves 2006). Algumas horas após a morte foi possível observar sinais do patógeno, caracterizados por hifas que emergiram, principalmente, da região posterior do corpo.

As estimativas da virulência de *H. thompsonii* para *B. phoenicis* foram diferentes em função do tipo de substratos em que o patógeno foi produzido (Tabelas 3 e 5). Nos substratos sólidos MC-S, APC e ACP-S, a CL_{25} calculada foi, respectivamente de $1,9 \times 10^5$, $4,7 \times 10^6$ e $2,9 \times 10^6$ conídios/ml.

Comparando-se a amplitude dos intervalos de confiança (95% I.C.) entre as retas estimadas, estatisticamente, apenas o valor da CL_{25} de MC-S é superior aos demais, indicando que *H. thompsonii* produzida no meio completo sólido apresentou maior virulência em relação ao fungo produzido em arroz pré-cozido. Esse aspecto pode estar associado a diversos fatores, inclusive variações genéticas do isolado, mas, certamente, as condições mais adequadas de nutrição foram as principais causas responsáveis pela obtenção de estruturas viáveis infectivas.

Tabela 2. Mortalidade corrigida (% \pm EP) de *B. phoenicis* após quatro dias da inoculação de *H. thompsonii* proveniente da produção *in vitro* em três diferentes substratos sólidos¹.

Concentração (conídios/ml)	Substrato de produção de <i>H. thompsonii</i>		
	MC-S	APC	APC-SM
$3,2 \times 10^5$	34,0 \pm 0,63	2,1 \pm 0,28	1,1 \pm 0,29
$6,3 \times 10^5$	46,4 \pm 0,67	6,2 \pm 0,27	15,5 \pm 0,49
$1,2 \times 10^6$	50,5 \pm 0,44	8,3 \pm 0,23	16,5 \pm 0,54
$2,5 \times 10^6$	58,8 \pm 0,54	14,4 \pm 0,30	23,1 \pm 0,47
5×10^6	81,4 \pm 0,51	25,8 \pm 0,38	29,7 \pm 0,66
1×10^7	83,5 \pm 0,60	41,2 \pm 0,55	41,8 \pm 0,66

¹MC-S (meio completo sólido), APC (arroz pré-cozido), APC-SM (arroz pré-cozido após secagem e moagem).

Tabela 3. Estimativa de CL_{25} do fungo *H. thompsonii* produzido em três substratos sólidos para *B. phoenicis* (n = 100; g.l. = 4).

Tratamento ¹	CL_{25} (conídios/ml) (95% I.C.)	Coef. angular ± desv. pad	χ^2
MC-S	$1,9 \times 10^5$ ($4,8 \times 10^4 - 4,7 \times 10^5$)	$0,97 \pm 0,11$	4,61
APC	$4,7 \times 10^6$ ($3,4 \times 10^6 - 6,2 \times 10^6$)	$1,12 \pm 0,24$	0,18
APC-SM	$2,9 \times 10^6$ ($1,5 \times 10^6 - 4,8 \times 10^6$)	$0,89 \pm 0,17$	2,45

¹MC-S (meio completo sólido), APC (arroz pré-cozido), APC-SM (arroz pré-cozido após secagem e moagem)

Tabela 4. Mortalidade corrigida (% ± EPM) de *B. phoenicis* após quatro dias da inoculação de *H. thompsonii* proveniente da produção *in vitro* em MC-S e MC-L¹.

Concentrações (conídios/ml)	Substratos de produção de <i>H. thompsonii</i>	
	MC-S	MC-L
$3,2 \times 10^5$	$34,0 \pm 0,63$	$1,1 \pm 0,26$
$6,3 \times 10^5$	$46,4 \pm 0,67$	$12,5 \pm 0,53$
$1,2 \times 10^6$	$50,5 \pm 0,44$	$23,9 \pm 0,49$
$2,5 \times 10^6$	$58,8 \pm 0,54$	$37,5 \pm 0,54$
5×10^6	$81,4 \pm 0,51$	$28,4 \pm 0,33$
1×10^7	$83,5 \pm 0,60$	$54,6 \pm 0,29$

¹MC-S (meio completo sólido), MC-S (meio completo líquido)

Observações semelhantes comprovaram que a baixa viabilidade do fungo *H. thompsonii* em um produto comercial (40 a 45%), aplicado para o controle de *Tetranychus urticae* Koch em casa-de-vegetação, causou níveis de mortalidade não superiores a 42%, muito inferiores aos demais testados (Gardner *et al.* 1982).

A capacidade de um patógeno para causar a mortalidade do hospedeiro com baixo potencial de inóculo é um aspecto importante, principalmente no caso de *H. thompsonii*. Esse fungo possui capacidade limitada de esporulação, especialmente quando é produzido em meio de cultura simples como é o caso do arroz. Esse fungo pode causar a morte do ácaro em curto espaço de tempo, porém, dada a baixa quantidade de conídios produzida, não é possível afirmar que os níveis de eficiência obtidos em laboratório serão semelhantes aos obtidos no campo, já que muitos fatores bióticos e abióticos estão envolvidos na ocorrência da doença. No caso de APC-SM, em que há possibilidade de aumentar a contaminação do produto e a inviabilização dos conídios após a moagem, a eficiência no campo pode ser drasticamente reduzida.

Os valores de CL_{50} apenas foram estimados pelo programa POLO-PC uma vez que a mortalidade observada nos tratamentos foi superior a 50% somente para MC-S. Nesse

caso, observou-se o mesmo padrão descrito anteriormente, ou seja, a virulência de *H. thompsonii* produzida em MC-S foi superior aos demais tratamentos [$9,4 \times 10^5$ ($5,1 \times 10^5 - 1,4 \times 10^6$)].

Além da composição do meio, algumas pesquisas já comprovaram também que a agressividade de *H. thompsonii* pode variar de acordo com a espécie de ácaro fitófago. Assim, para o ácaro branco, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae) o valor da CL_{50} de *H. thompsonii* encontrado foi de 2×10^3 conídios/ml (Pena *et al.* 1996), muito inferior ao observado para adultos de *B. phoenicis*. Segundo Gardner *et al.* (1982), a aplicação de apenas um conídio na superfície do tegumento de *T. urticae* promoveu 97% de mortalidade. De maneira semelhante, *H. thompsonii* tem se mostrado mais eficiente do que outras espécies de deuteromicetos no controle de ácaros. Para *Phyllocoptura oleivora* Asmed (Acari: Eriophyidae) a CL_{50} de *B. bassiana* para o fungo produzido em MC-S foi de $4,23 \times 10^6$ conídios/ml após cinco dias, uma concentração elevada (Alves *et al.* 2005).

As CL_{25} calculadas para MC-S e MC-L apresentaram intervalos de confiança de mesma amplitude, o que significa que a virulência de *H. thompsonii* produzida nesses meios foi semelhante para o hospedeiro. Isso é importante e pode afetar o desempenho do patógeno, pois o fungo proveniente de um substrato líquido produz outras estruturas além de conídios submersos que podem ser infectivas para o hospedeiro.

A análise gráfica das curvas de concentração-mortalidade baseada na diferença entre os coeficientes angulares (b) permitiu a comparação mais efetiva entre as retas de mortalidade que apresentaram paralelismo entre si. Os valores calculados das potências relativas de APC e APC-SM em relação ao MC-S foram de 0,04 (0,03-0,07) e 0,07 (0,04-0,11), o que significa que para se obter os mesmos resultados observados para MC-S o valor da CL_{25} destes deve ser maior nestas respectivas proporções (Haddad 1998).

Efeito de *H. thompsonii* sobre *B. phoenicis* em condições de campo. Nos frutos previamente tratados e levados para campo, *H. thompsonii* causou, além da mortalidade direta dos adultos, redução na taxa de oviposição (número de ovos/

Tabela 5. Estimativa de CL_{25} do fungo *H. thompsonii* produzido em MC-L e MC-S para *B. phoenicis* (n = 100; g.l. = 4).

Tratamento ¹	CL_{25} (conídios/ml) (90% I.C.)	Coef. angular ± desv. pad	χ^2
MC-S	$2,2 \times 10^5$ ($1,4 \times 10^5 - 3,1 \times 10^5$)	$0,95 \pm 0,11$	4,72
MC-L	$1,96 \times 10^6$ ($3,3 \times 10^5 - 4,9 \times 10^6$)	$0,80 \pm 0,15$	9,29

¹MC-S (meio completo sólido), MC-S (meio completo líquido)

fruto) e conseqüentemente no número de ninfas encontradas por fruto. Esses efeitos foram verificados nos dois períodos de avaliação.

O tratamento dos frutos infestados com *H. thompsonii* reduziu o número de adultos no decorrer do tempo. Aos 10 dias após a aplicação, todos os tratamentos com o fungo apresentaram número de ácaros inferior em relação à testemunha, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos. Depois de 20 dias, apenas o tratamento Ht10 kg/ha não diferiu estatisticamente da testemunha e apresentou sobrevivência de 6,3% contra 14,6% (Tabela 6).

A redução mais significativa do número de adultos ocorreu entre o período da primeira para a segunda avaliação, tanto no tratamento Ht 20 kg/ha (6,3 para 4,1 adultos) como na testemunha (40 para 14,6 adultos). Considerando que no interior da arena de confinamento confeccionada nos frutos, não foram encontrados insetos e/ou ácaros predadores, a redução da sobrevivência na testemunha pode ter ocorrido ao acaso, sendo que alguns ácaros podem ter sido levados pelo vento ou pela água da chuva. Em todos os tratamentos com o patógeno, foram encontrados poucos ácaros com sintomas de infecção por *H. thompsonii*, porém sem sinais de esporulação. Neste caso, os ácaros apresentavam-se aderidos à superfície do fruto, tal como já observado em folhas de citros em condições de laboratório (Rossi-Zalaf & Alves 2006).

A redução do número de ovos no tratamento Ht 20 kg/ha foi significativa em relação à testemunha. Na primeira avaliação (10 dias) esse tratamento apresentou menor número de ovos/fruto (11,2) em relação aos demais e principalmente à testemunha (40,4) (Tabela 7). Não foram observados ovos com sintomas de infecção pelo patógeno, sendo que a maioria encontrava-se em locais do fruto contendo verrugose, conforme era esperado.

Aos 20 dias da aplicação, houve redução do número de ovos em Ht 20 kg/ha e na testemunha, devido à eclosão das larvas, o que pode ser comprovado com o aumento destas (Tabela 8). Nesse caso, não foram constatadas diferenças entre os tratamentos, sendo que os ovos viáveis deram origem a larvas sadias no período esperado.

Tentativas do controle de ácaros em citros com *H. thompsonii* são relatadas na literatura desde o início do século 20, porém apenas os mais recentes enfocam os ácaros da ferrugem e da leprose

Trabalhando com *P. oleivora*, McCoy et al. (1971) demonstraram para duas regiões citrícolas da Flórida (EUA) que a aplicação de fragmentos de micélio de *H. thompsonii*, em diferentes concentrações, causou drásticas reduções na população do ácaro após 10 semanas do tratamento. Nessas áreas, as epizootias do patógeno acompanharam os níveis populacionais e distribuição da praga no campo. De maneira semelhante, a aplicação de Mycar® (Ht-ABG 6065) resultou em altos níveis de eficiência de controle de *P. oleivora* após várias semanas (McCoy & Couch 1982).

Posteriormente, Acevedo & Rosas (2001) observaram que a aplicação de suspensão de micélio de *H. thompsonii* (50g/l) em plantas de limão reduziu a população de *Brevipalpus* spp. em níveis inferiores aos encontrados em plantas tratadas com malation + diazinon e no tratamento testemunha, atingindo 70% logo após a aplicação. Além disso, após as aplicações, as epizootias de *H. thompsonii* ocorreram por até sete meses e impediram que a população do ácaro retornasse aos níveis iniciais.

As condições ambientais, especialmente de temperatura e umidade relativa do ar, são fatores abióticos que influenciam, significativamente, a ocorrência das epizootias de *H. thompsonii* em campo. No período em que o experimento foi

Tabela 6. Porcentagem média de adultos (\pm EP) sobreviventes de *B. phoenicis* observados após 10 e 20 dias da aplicação de *H. thompsonii* em frutos de laranja pré-infestados.

Tempo após a aplicação (dias)	Testemunha	5 L/ha	10 kg/ha	20 kg/ha
10	40,0 \pm 4,00 A a	9,3 \pm 2,61 A b	7,0 \pm 2,01 A b	6,3 \pm 1,92 A b
20	14,6 \pm 4,00 B a	4,8 \pm 2,70 A b	6,3 \pm 2,80 A a	4,7 \pm 1,00 B b

Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha ($P \leq 0,1$).

Tabela 7. Número médio de ovos (\pm EP) de *B. phoenicis* por fruto, observados após 10 e 20 dias da aplicação de *H. thompsonii* em frutos de laranja pré-infestados com adultos do ácaro.

Tempo após a aplicação (dias)	Testemunha	5 L/ha	10 kg/ha	20 kg/ha
10	40,4 \pm 2,10 Aa	18,0 \pm 1,63 A ab	17,6 \pm 2,40 A ab	11,2 \pm 2,53 A b
20	25,0 \pm 2,20 Aa	5,0 \pm 3,40B ab	6,2 \pm 2,30 B b	4,1 \pm 0,52 A b

Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha ($P \leq 0,01$).

Tabela 8. Número médio de ninfas (\pm EP) de *B. phoenicis* por fruto, observadas após 10 e 20 dias da aplicação de *H. thompsonii* em frutos de laranja pré-infestados com adultos do ácaro.

Tempo após a aplicação (dias)	Testemunha	5 L/ha	10 kg/ha	20 kg/ha
10	12,1 \pm 2,10 A a	16,7 \pm 1,71 A a	15,6 \pm 2,22 A a	14,8 \pm 1,90 A a
20	35,1 \pm 1,10 B a	26,0 \pm 2,90 A a	19,0 \pm 3,00 A a	14,5 \pm 1,20 A a

Letras maiúsculas para comparação de médias nas colunas e letras minúsculas para comparação de médias na linha ($P \leq 0,1$).

realizado, a umidade do ar apresentou médias de 55% a 96%, enquanto que para a temperatura a variação foi de 18,8°C a 27,5°C. As leituras destes parâmetros realizadas no local do experimento foram de 83%, 56% e 80%, respectivamente para a data da instalação do ensaio, e nos dias de avaliação (10 e 20 dias), enquanto que os valores de temperatura foram de 30°C, 28,6°C e 25°C.

Embora a eficácia de *H. thompsonii* tenha sido comprovada há algum tempo para *P. oleivora* e mais recentemente para *B. phoenicis*, as diferenças quando ao padrão de distribuição dos ácaros nos pomares citrícolas (Bassanezi 2004) certamente podem diferenciar o modo como as epizootias do fungo ocorrem em campo e alterar a eficácia de controle.

A distribuição homogênea e em altas densidades de *P.oleivora* favorece o contato dos hospedeiros com as estruturas infectivas do patógeno, que em condições abióticas adequadas, causa elevados índices de mortalidade em pouco tempo (McCoy *et al.* 1971). De acordo com McCoy *et al.* (1971) o padrão da epizootia de *H. thompsonii* em campo seria diferente se esse ácaro ocorresse em baixa densidade no pomar, tal como verificado para *B. phoenicis*. Além da baixa densidade populacional, característica dessa espécie, os ácaros distribuem-se na planta especialmente em frutos com verrugose (Bassanezi 2004). Esse padrão de distribuição agregada, inclusive das plantas com sintomas de leprose (CiLV), ressalta a dependência da presença dos ácaros virulíferos como fonte de inóculo. Assim, a eliminação dessas fontes por meio do controle localizado é um processo operacionalmente complexo, mas necessário.

Para produtores orgânicos ou pequenos produtores a aplicação inundativa e dirigida de *H. thompsonii* baseada na amostragem prévia e em locais infestados por ácaros, é uma estratégia que pode antecipar a ocorrência de epizootias do patógeno e, portanto, reduzir a ação do ácaro atuar como vetor. A avaliação de sua atividade em grandes áreas comerciais, bem como da interação do entomopatógeno em um ambiente onde a aplicação de agrotóxicos é elevada e constante, são relevantes e devem ser pesquisadas.

Assim, a importância de *H. thompsonii* como agente de controle microbiano de ácaros em citros é considerável, uma vez que a espécie é patogênica para *B. phoenicis* e *P. oleivora*, considerados ácaros-chave da cultura. Apesar de sua produção *in vitro* ser mais complexa quando comparada a de outras espécies de fungos como *B. bassiana* e *M. anisopliae*, o patógeno pode ser obtido em meio sólido de arroz pré-cozido e em meio líquido. Porém, um aspecto relevante que pode afetar a eficácia do controle são as variações na virulência do fungo, que podem ocorrer em função do processo produção e formulação do patógeno.

Referências

- Acevedo, J.L.R. & L.S Rosas. 2000. Control biológico de *Brevipalpus* spp. em *Citrus aurantifolia* em Guerrero, México. *Man. Integr. Plagas* 55: 56-59.
- Alves, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos, p.289-381. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*, Fealq, Piracicaba, 1163p.
- Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A. Moino Jr. & L.F.A. Alves. 1998. Técnicas de laboratório, p.637-710. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*, Fealq, Piracicaba, 1163p.
- Alves, S.B., M.A. Tamai, L.S. Rossi & E. Castiglioni 2005. *Beauveria bassiana* pathogenicity to the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. *Exp. Appl. Acarol.* 37: 117-122.
- Alves, S.B. & R.M. Pereira. 1998. Produção de fungos entomopatogênicos, p.845-867. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*, Fealq, Piracicaba, 1163p.
- Bassanezi, R.B. 2004. Leprose dos citros: Foco no controle do ácaro vetor. *Visão Agríc.* 2: 25-29.
- Chandler, D., G. Davison, J.K. Pell, B.V. Ball, K. Shaw & K.D. Sunderland. 2000. Fungal biocontrol of acari. *Biocontrol Sci. Technol.* 10: 357-384.
- Chiavegato, L.G. & P.R. Karfan. 1993. Comportamento do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (G.) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. *An. Soc. Entomol. Brasil* 22: 355-359.
- Childers, C.C., E.W. Kitajima, W.C. Welbourn, C. Rivera & R. Ochoa. 2001. *Brevipalpus* como vectores de la leprosis de los cítricos. *Man. Integr. Plagas* 60: 61-65.
- Childers, C.C., J.C.V. Rodrigues, K.S. Derrick, D.S. Achor, J.V. French, W.C. Welbourn, R. Ochoa & E.W. Kitajima. 2003b. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: Past and present. *Exp. Appl. Acarol.* 30: 181-202.
- Childers, C.C., J.V. French, & J.C. Rodrigues 2003a. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): A review of their biology, feeding injury and economic importance. *Exp. Appl. Acarol.* 30: 5-28.
- Gardner, W.A., R.D. Oetting, & G.K. Storey 1982. Susceptibility of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, to the fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* Fisher. *Fla. Entomol.* 65: 458-465.
- Guirado, N. & J.L. Silvério. 1992. Leprose e declínio: Problemas sérios da citricultura paulista. *Laranja* 13: 541-552.
- Haddad, M.L. 1998. Utilização do Pólo-PC para análise de Probit, p.999-1012. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*, Fealq, Piracicaba, 1163p.
- Latgé, J.P., R.I Cabrera & M.C Prevost. 1988. Microcycle conidiation in *Hirsutella thompsonii*. *Can. J. Microbiol.* 34: 625-630.
- Leite, L.G., A. Batista Filho, J.E.M. Almeida & S.B. Alves. 2003. Produção de fungos entomopatogênicos. *Ribeirão Preto*, 92p.
- McCoy, C.M. 1996. Pathogens of eriophyoid mites, p.481-490. In M.W. Lindquist, M.W. Sabelis, J. Bruin. (eds.), *Eriophyoid mites: Their biology, natural enemies and control*, Elsevier Science, Amsterdam, 790p.
- McCoy, C.W., A.G. Selhime, R.F. Kanavel & J. Hill. 1971. Suppression of citrus rust mite populations with application of fragmented mycelia of *Hirsutella thompsonii*. *J. Invertebr. Pathol.* 17: 270-276.
- McCoy, C.W. & R.F. Kanavel 1969 Isolation of *Hirsutella thompsonii* from citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora* and its cultivation on various synthetic media. *J. Invertebr. Pathol.* 14: 386-390.

- McCoy, C.W. & T.L. Couch. 1982 Microbial control of the citrus rust mite with the mycoacaricide Mycar®. Fla. Entomol. 65: 116-126.
- Peña, J.E., L.S. Osborne, & R.E. Duncan. 1996 Potencial of fungi as biocontrol agents of *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae). Entomophaga 41: 27-36.
- Poinar Jr., G. & R. Poinar. 1998. Parasites and pathogens of mites. Annu. Rev. Entomol. 43: 449-469.
- Rodrigues, J.C.V., N.L. Nogueira, H.S. Prates & D.S. Freitas. 1994. Leprose dos citros: Importância, histórico, distribuição e relações com o ácaro vetor. Laranja 15: 123-138.
- Rossi-Zalaf, L.S. & S.B. Alves 2006. Suscetibility of *Brevipalpus phoenicis* to entomopatogenic fungi. Exp. Appl. Acarol. 40: 37-47.
- Salva, R.A. & C.A. Massari. 1995. Situação do ácaro da leprose no estado de São Paulo (Levantamento – Fundecitros Agosto 1995), p.13-18. In C.A.L. de Oliveira & L.C. Donadio (eds.), Leprose dos citros. Jaboticabal, Capítulo, 219 p.
- SAS Institute. 2003. SAS/STAT® Software: Changes and enhancements through release 9.1, Cary, NC: SAS Institute Inc. 1167p.
- Schneider-Orelli, O. 1947. Entomologisches Praktikum: Eifuehrung in die land – und forstwirtschaftliche Insektkunde. Aarau, Zweite Aufl., 237p.
- Spears, A.T. & W.W. Yothers. 1924. Is there an entomogenous fungus attacking the citrus rust mite in Florida? Science 11: 41-42.
- Van der Geest, L.P.S., S.L. Elliot, J.A.J. Breeuwer & E.A.M. Beerling. 2000. Disease of mites. Exp. Appl. Acarol. 24: 497-560.
- Winkelhoff, A.J. & C.W. McCoy. 1984 Conidiation of *Hirsutella thompsonii* var. *synnematososa* in submerged culture. J. Invertebr. Pathol. 43: 59-68.

Received 08/I/07. Accepted 09/III/08.
