

Patogenicidade de *Isaria fumosorosea* sobre o ácaro vermelho europeu em laboratório

Cláudia Andréia Gräff *

Liana Johann

Claucia Fernanda Volken de Souza

Noeli Juarez Ferla

Centro Universitário UNIVATES, PPG Biotecnologia
Avenida Avelino Tallini, 171, CEP 95900-000, Lajeado – RS, Brasil

* Autor para correspondência
claudiagraff@gmail.com

Submetido em 29/04/2016

Aceito para publicação em 11/01/2017

Resumo

A vitivinicultura no estado do Rio Grande do Sul tem sofrido infestações significativas de ácaros praga, destacando-se recentemente *Panonychus ulmi* (Koch). Há relatos sobre a capacidade de controle de ácaros fitófagos com *Isaria fumosorosea*. O objetivo deste trabalho foi avaliar em laboratório a ação patogênica de *I. fumosorosea* sobre o ácaro *P. ulmi*. As criações de *P. ulmi* foram estabelecidas a partir de coletas realizadas em videiras da Serra Gaúcha. Sobre os ovos de *P. ulmi*, as aplicações de suspensões de esporos foram feitas em diferentes concentrações. As triplicatas das fêmeas de 12 a 15 dias foram tratadas com suspensão a 10^8 esporos x mL⁻¹. As testemunhas foram tratadas com água destilada. Após sete dias da aplicação, observaram-se 55,6% de ovos não eclodidos tratados com suspensão 10^6 esporos x mL⁻¹ e com fêmeas tratadas obteve-se uma mortalidade total entre 85-90% e mortalidade confirmada entre 50-55%. A mortalidade máxima dos controles no tratamento dos ovos e das fêmeas foi, em média, de 12,8 e 15,5%, respectivamente. Conclui-se que o isolado *I. fumosorosea* possui habilidade para infectar ovos e fêmeas adultas de *P. ulmi* e portanto mostra-se como uma alternativa viável para ser experimentada no campo.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos; *Panonychus ulmi*; Serra Gaúcha; Vitivinicultura; *Vitis vinifera*

Abstract

Pathogenicity of *Isaria fumosorosea* to European red mite in the laboratory. Vineyard in Rio Grande do Sul State, Brazil have suffered significant infestations of mites, especially *Panonychus ulmi* (Koch) recently. There are reports on the ability to control mites with *Isaria fumosorosea*. The objective of this study was to evaluate in the laboratory the pathogenicity of *I. fumosorosea* to *P. ulmi* mites. *Panonychus ulmi* was reared from harvests from vineyards in Serra Gaúcha. Fungal spore suspensions at different concentrations were applied to *P. ulmi* eggs. Triplicates of females, 12 to 15 days old, were treated with a spore suspension of 10^8 mL⁻¹. Controls were treated with distilled water. Seven days after application, 55.6% of eggs treated with a spore suspension of 10^6 mL⁻¹ did not hatch, and treated females showed a total mortality of 85-90% and confirmed mortality of 50-55%. The maximum mortality of water-treated control

eggs and females was on average 12.8 and 15.5%, respectively. It is concluded that the *I. fumosorosea* isolate has the ability to infect eggs and adult females of *P. ulmi* and thus appears to be a viable alternative to be tested in the field.

Key words: Entomopathogenic fungi; *Panonychus ulmi*; Serra Gaúcha; Vineyard; *Vitis vinifera*

Introdução

As videiras são suscetíveis a uma série de doenças e pragas que podem causar prejuízos à cultura, podendo interferir na qualidade e até mesmo provocar perda completa da safra (KLOCK et al., 2011).

O uso excessivo de produtos fitossanitários causa prejuízos tanto do ponto de vista ecológico como de saúde pública. Citam-se a eliminação de agentes de controle biológico, o aparecimento de populações de artrópodes fitófagos resistentes, a ressurgência de pragas que eram consideradas secundárias como também a contaminação das uvas, do vinho e do próprio vitivinicultor (PARRA et al., 2002; GODFREY, 2011; DUSO et al., 2012).

Os tetraniquídeos são os ácaros de maior importância econômica para a agricultura mundial e cerca de 80% dos acaricidas comercializados são utilizados para controlar esses ácaros fitófagos (VAN LEEUWEN et al., 2015). Devido ao seu curto ciclo de vida e alta fecundidade, frequentes aplicações de acaricidas são necessárias para controlá-los, o que conduz rapidamente ao desenvolvimento de resistência. *Panonychus ulmi* (Koch) está entre os doze artrópodes mais resistentes, sendo relatada resistência para 46 princípios ativos, ao passo que para *Tetranychus urticae* (Koch) é relatada a resistência para 93 princípios ativos, assumindo o topo dos casos de resistência (VAN LEEUWEN et al., 2015). Infestações significativas de espécies acarinas têm sido relatadas na cultura da videira no estado do Rio Grande do Sul desde 2006 (FERLA; BOTTON, 2008; JOHANN; FERLA, 2012).

Casos de baixa ocorrência de *P. ulmi* têm sido relatados em vinhedos orgânicos europeus (DUSO et al., 2012), por isso o uso criterioso de acaricidas combinados com controle biológico provavelmente venha a ser a melhor abordagem para alcançar uma produção sustentável e o seu controle (VAN LEEUWEN

et al., 2015). O controle microbiano com uso de fungos entomopatogênicos é amplamente relatado na literatura científica para controle de insetos e artrópodes (ALVES et al., 1998; CIANCIO; MUKERJI, 2010). Estudos a respeito da patogenicidade de *Isaria fumosorosea* sobre ácaros fitófagos em laboratório são relatados para *T. cinnabarinus* com efetividade superior a 50% (SHI; FENG, 2004; SHI et al., 2008) e *T. urticae* com 75% de mortalidade das fêmeas e redução de fertilidade (SHI; FENG, 2009; ZHANG et al., 2014).

Escassa é a pesquisa publicada a respeito de controle microbiano de *P. ulmi* em laboratório e em nível de campo (SANTAMARINA et al., 1987; AFIFI et al., 2010; MARCIC et al., 2012). Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar em laboratório o efeito patogênico do fungo *I. fumosorosea* sobre ovos e adultos de *P. ulmi*.

Material e Métodos

Criação em laboratório

Os ácaros foram coletados em videiras da região de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. Posteriormente realizou-se a transferência dos ácaros para folhas de macieira mantidas sobre algodão hidrófilo umedecido no interior de bandejas.

Para manter alta a umidade relativa, cada bandeja foi coberta com uma placa de vidro, deixando-se aberta uma fresta lateral de cerca de 1 cm para evitar a condensação de água sobre as folhas. O algodão foi umedecido com água destilada sempre que necessário.

As criações foram mantidas em câmara de germinação $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80 \pm 5\%$ e fotofase de 14 h (JOHANN, 2008).

Os ácaros foram transferidos de arenas quando as folhas apresentavam coloração amarelada indicando estarem inadequadas para manutenção das colônias.

O material de coleta foi triado em lupa e deste foram transferidas dez fêmeas adultas para cada folha. Após 48 h, as fêmeas foram removidas para novas arenas. Os ovos datados foram observados durante 12 dias para a aplicação posterior da suspensão fúngica.

Manutenção do fungo

Utilizou-se o fungo *I. fumosorosea* CCT 5825 proveniente da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello. O isolado foi recebido em ampola de vidro com esporos liofilizados e em ampolas de plástico seladas com o cultivo em ágar. Os esporos liofilizados foram ressuspensos com água estéril por 30 minutos e, depois de inoculados, em ágar batata dextrose. Os isolados das ampolas de plástico foram repicados. Os cultivos foram mantidos em bioincubadora à temperatura de 24°C, conforme recomendado no certificado do fornecedor. Essa cultura estoque foi mantida através do método de repique para a produção dos esporos e a realização dos bioensaios.

Bioensaios

Coletaram-se os esporos através de raspagem da superfície do cultivo fúngico com auxílio de alça de Drigalski e de água autoclavada. A suspensão obtida foi filtrada com auxílio de seringa com lã de vidro estéril e armazenada em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Da suspensão obtida, procedeu-se a uma diluição de dez vezes (100 µL da suspensão adicionado de 900 µL de água estéril) para realizar a contagem. Utilizou-se câmara de Neubauer visualizada sob microscópio ótico marca Olympus modelo CX3-1 com aumento de 400x. Pipetou-se 10 µL para cada câmara. A suspensão foi ajustada para 10⁸ esporos/mL de solução. Incubaram-se placas de Rodac com ágar batata para testar a viabilidade dos esporos. Pipetou-se 100 µL da suspensão ajustada para o centro da placa, na qual foram feitos movimentos circulares para espalhar o líquido. A contagem dos conídios germinados foi realizada após um período de incubação entre 16 e 24 h, em aumento de 400x ao microscópio.

As arenas para aplicação dos fungos foram montadas com folha de macieira e de videira com

papel germinativo sob a folha e algodão como barreira antifuga.

Os bioensaios foram conduzidos com ovos de 48 h e fêmeas adultas de 12 a 15 dias, todos provenientes da criação realizada em laboratório. Preparou-se um experimento com arenas em triplicata para a aplicação da suspensão de esporos. Em arenas montadas com folha de macieira, colocou-se de 10 a 15 fêmeas para oviposição. Após 48 h, removeram-se as fêmeas das arenas, procedeu-se à contagem dos ovos e, em seguida, à aplicação da suspensão sobre os ovos. A suspensão de esporos foi aplicada por meio de pulverização manual, no volume de 1 mL nas concentrações de 1x10², 1x10⁴, 1x10⁶ e 10⁸ esporos x mL⁻¹.

O tratamento testemunha recebeu apenas água destilada sobre os ovos. Os ovos foram contabilizados sete dias após a aplicação. Calculou-se apenas a mortalidade total em porcentagem.

Com as fêmeas adultas, realizaram-se triplicatas que consistiram de 10 a 15 ácaros em cada arena. A suspensão de esporos foi aplicada por meio de pulverização manual, no volume de 1 mL na concentração de 1x10⁸ esporos x mL⁻¹.

Para o controle (testemunha), procedeu-se de acordo com as mesmas condições experimentais, exceto pela pulverização de água destilada em substituição à suspensão de esporos.

A cada 24 h até o sétimo dia realizou-se a observação das arenas e retiraram-se os ácaros mortos retiraram-se os ácaros mortos com pincel, sendo estes repassados para uma câmara úmida, conforme Alves et al. (1998). Após o 4º dia, verificava-se ao microscópio os ácaros-cadáveres. Contabilizou-se a mortalidade total (%Mt); a mortalidade confirmada (%Mcf) pela presença do fungo e a mortalidade corrigida (%Mc) em função do controle, de acordo com Abbott (1925) (Equação 1). %Mc= 100 x (T - i / T). Onde "T" corresponde aos ácaros vivos na testemunha e "i" corresponde aos ácaros vivos no tratamento.

Os resultados foram analisados estatisticamente ao nível de 5% de significância. Realizou-se análise de variâncias no programa Bioestat versão 5.3. Os

resultados com diferença significativa foram avaliados com o teste de Tukey.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra a média de ovos tratados para cada concentração de suspensão fúngica experimentada e o percentual de mortalidade, ou seja, de ovos não eclodidos. A mortalidade total obtida no tratamento dos ovos com as diferentes concentrações fúngicas variou de $8,62 \pm 4,02\%$ a $55,56 \pm 10,12\%$.

TABELA 1: Mortalidade dos ovos de *Panonychus ulmi* 10 dias após a aplicação de suspensão de *Isaria fumosorosea* em diferentes concentrações de esporos.

Tratamento	Esporos x mL ⁻¹	Média de ovos tratados	% Mortalidade total
<i>I. fumosorosea</i>	10 ²	113	8,6 ^a ± 4,02
<i>I. fumosorosea</i>	10 ⁴	107	34,7 ^b ± 7,62
<i>I. fumosorosea</i>	10 ⁶	76	55,6 ^a ± 10,12
<i>I. fumosorosea</i>	10 ⁸	102	31,9 ^b ± 5,82
Testemunha	-	39	3,6 ± 0,76
Testemunha	-	73	12,5 ± 6,85
Testemunha	-	100	8,8 ± 4,67
Testemunha	-	89	2,5 ± 0,76

* Média seguida do desvio padrão. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si estatisticamente ao nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos para a concentração de 10⁶ esporos x mL⁻¹ diferiram significativamente das demais concentrações experimentadas. Houve comportamento linear somente até a concentração 10⁶ esporos x mL⁻¹, ou seja, à medida que aumentava a concentração de esporos, aumentava a porcentagem de mortalidade dos ovos. Nas arenas dessa concentração obteve-se a maior porcentagem média de ovos não eclodidos com o maior desvio padrão entre as triplicatas. A concentração 10⁸ esporos x mL⁻¹ apresentou resultado semelhante ao da concentração 10⁴ esporos x mL⁻¹.

Três isolados de *I. fumosorosea* em concentrações de 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 esporos x mL⁻¹ sobre ovos de

Tetranychus cinnabarinus (Boisduval) com 18 h de idade causaram uma mortalidade dos ovos entre 7 e 66% com uma relação linear das concentrações (SHI; FENG, 2004). O fungo *Penicillium funiculosum* aplicado sobre ovos de *P. ulmi* produziu 52% de mortalidade (SANTAMARINA et al., 1987).

Aproximadamente 24 h após a aplicação, os esporos de *I. fumosorosea* aderem e germinam sobre os ovos de tetraniquídeos. O fungo expressa sua patogenicidade inviabilizando os ovos através da perturbação do embrião por falta de nutrientes, fazendo com que os ovos apresentem deformação por encolhimento (ZHANG et al., 2014).

A taxa de mortalidade no controle deste estudo variou de $2,50 \pm 0,76\%$ a $12,50 \pm 6,85\%$ (Tabela 2). A mortalidade total e a mortalidade corrigida de adultos foram semelhantes (Tabela 2). A mortalidade confirmada causada pelo fungo variou de 50 a 55%.

TABELA 2: Mortalidade total (%Mt), mortalidade corrigida (%Mc) e mortalidade confirmada (%Mcf) das fêmeas adultas de *Panonychus ulmi* 10 dias após a aplicação da suspensão de esporos na concentração 10⁸ esporos x mL⁻¹.

Tratamento	Esporos x mL ⁻¹	Fêmeas tratadas	% Mt	% Mc	% Mcf
<i>I. fumosorosea</i>	10 ⁸	40	90 ± 8	87,5	55
<i>I. fumosorosea</i>	10 ⁸	30	80 ± 3	75,0	50
Testemunha	-	20	15 ± 5	-	-

Média de mortalidade total (%Mt) seguida de desvio padrão.

Em ambos os experimentos, a mortalidade na testemunha variou de 10 a 20%. Essa mortalidade ‘natural’ é semelhante à encontrada em outros ácaros como *T. cinnabarinus* e *T. urticae* (SHI et al., 2008; SHI; FENG, 2009).

A mortalidade causada por fungos em outros experimentos parece se situar dentro dos limites dos resultados deste trabalho, ainda que aqueles tenham alcançado cerca de 80% de mortalidade (SHI et al., 2008; SHI; FENG, 2009; AFIFI et al., 2010). Testes de campo com produto comercial a base de *B. bassiana* obtiveram níveis de mortalidade semelhantes (MARCIC et al., 2012).

A mortalidade causada pelo fungo foi estimada neste estudo entre 50 e 55% (Tabela 2). Não obstante, essa mortalidade pode ter sido subestimada, pois ácaros com esporos de resistência (dormentes) também foram mortos pelo fungo, adquirindo coloração escura e/ou preta, e dificilmente é possível distinguir essa morte da natural. A presença de esporos resistentes produzidos sob condições ambientais desfavoráveis tem sido relatada para *Neozygites floridana* em cadáveres de ácaros *Mononychellus tanajoa* no nordeste brasileiro (ELLIOT et al., 2002). Sob ambientes naturais, a mumificação com esporulação exterior tem maiores probabilidades de causar epizootias e de se estabelecer no ambiente (DELALIBERA JR.; HAJEK, 2004).

Nossos resultados confirmam o valor patogênico do isolado *I. fumosorosea* CCT 5825 sobre ovos e fêmeas adultas de *P. ulmi*.

Assim, levando-se em consideração que os tetraniquídeos são caracterizados pelo curto ciclo de vida e alta taxa de fecundidade (JOHANN; FERLA, 2012), os resultados de percentual de mortalidade de ovos e adultos obtidos neste trabalho representam uma alternativa para auxiliar no controle da população do ácaro *P. ulmi*.

Agradecimentos

Ao Instituto André Tosello (Campinas, Brasil) pela doação do isolado *I. fumosorosea* CCT 5825.

Referências

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

AFIFI, A. A. M.; MABROUK, A. M.; ASRAN, A. A. Effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on three acarine pests. In: SABELIS, M. W.; BRUIN, J. (Ed.). **Trends in Acarology**, Dordrecht: Springer, 2010. p. 439-440.

ALVES, S. B.; HABIB, M. E. M.; ALVES, L. F. A. Padronização de inseticidas microbianos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998. p. 779-797.

CIANCIO, A.; MUKERJI, K. G. (Ed.). **Integrated management of arthropod pests and insect borne diseases**. Integrated Management of Plant Pests and Diseases. Dordrecht: Springer, 2010. 325 p.

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

DUSO, C.; POZZEBON, A.; KREITER, S.; TIXIER, M. S.; CANDOLFI, M. Management of Phytophagous mites in European vineyards. In: BOSTANIAN, N. J. (Ed.). **Arthropod management in vineyards: pests, approaches and future directions**. Dordrecht: Springer, 2012. p. 191-217.

ELLIOT, S. L.; MUMFORD, J. D.; MORAES, G. J. The role of resting spores in the survival of the mite-pathogenic fungus *Neozygites floridana* from *Mononychellus tanajoa* during dry periods in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 81, n. 3, p. 148-157, 2002.

FERLA, N. J.; BOTTON, M. Ocorrência do ácaro vermelho europeu *Panonychus ulmi* (Koch) (Tetranychidae) associado à cultura da videira no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 6, p. 1758-1761, 2008.

GODFREY, L. D. **Spider mites**. Integrated pest management for home gardeners and landscape professionals. Pest Notes. 2011. Disponível em: <<http://www.ipm.ucdavis.edu/PDF/PESTNOTES/pnspidermites.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2016.

JOHANN, L. **Ecologia de ácaros (Acari) em *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) no Rio Grande do Sul**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento) – Centro Universitário Univates, Lajeado. 2008.

JOHANN, L.; FERLA, N. J. Mite (Acari) population dynamics in grapevines (*Vitis vinifera*) in two regions of Rio Grande do Sul, Brazil. **International Journal of Acarology**, Queensland, v. 5, p. 386-393, 2012.

KLOCK, C. L.; JOHANN, L.; BOTTON, M.; FERLA, N. J. Mitefauna (Arachnida: Acari) associated to grapevine, *Vitis vinifera* L. (Vitaceae), in the municipalities of Bento Gonçalves and Candiota, Rio Grande do Sul, Brazil. **Check List**, Rio Claro, v. 7, p. 522-536, 2011.

MARCIC, D.; PRIJOVIC, M.; DROBNJAKOVIC, T.; MEDO, I.; PERIC, P.; MILENKOVIC, S. Greenhouse and field evaluation of two biopesticides against *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). **Pesticide and Phytomedicine**, Belgrado, v. 27, n. 4, p. 313320, 2012.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. **Controle biológico no Brasil**. Parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. 609 p.

SANTAMARINA, M. P.; JIMENEZ, M.; SANCHIS, V.; GARCIA, F.; HERNANDEZ, E. A strain of *Penicillium funiculosum* Thorn with activity against *Panonychus ulmi* Koch (Acari: Tetranychidae). **Journal of Applied Entomology**, Goettingen, v. 103, p. 471-476, 1987.

SHI, W. B.; FENG, M. G. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. **Biological Control**, Cambridge, v. 30, p. 165-173, 2004.

SHI, W. B.; FENG, M. G. Effect of fungal infection on reproductive potential and survival time of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 229-237, 2009.

SHI, W. B.; ZHANG, L.; FENG, M. G. Time-concentration-mortality responses of carmine spider mite (Acari: Tetranychidae) females to three hypocrealean fungi as biocontrol agents. **Biological Control**, Cambridge, v. 46, p. 495-501, 2008.

VAN LEEUWEN, T.; TIRRY, L.; YANAMOTO, A.; NAUEN, R.; DERMAUW, W. The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amherst, v. 121, p. 12-21, 2015.

ZHANG, L.; SHI, W.B.; FENG, M. G.. Histopathological and molecular insights into the ovicidal activities of two entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite. Illinois: **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 117, p. 73-78, 2014.