

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL DO ÁCARO PREDADOR
Protogamasellopsis zaheri (RHODACARIDAE)
NO CONTROLE DO FITONEMATOIDE
Meloidogyne incognita (MELOIDOGYNIDAE)**

**Thais Juliane do Prado
Engenheira Agrônoma**

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL DO ÁCARO PREDADOR
Protogamasellopsis zaheri (RHODACARIDAE)
NO CONTROLE DO FITONEMATOIDE
Meloidogyne incognita (MELOIDOGYNIDAE)**

Discente: Thais Juliane do Prado

Orientador: Prof. Dr. Raphael de Campos Castilho

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Martins Soares

Coorientador: Prof. Dr. Yann Tricault

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Entomologia Agrícola)

P896p

Prado, Thais Juliane do

Potencial do ácaro predador *Protogamasellopsis zaheri* (Rhodacaridae) no controle do fitonematoide *Meloidogyne incognita* (Meloidogynidae) / Thais Juliane do Prado. -- Jaboticabal, 2023

78 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Raphael de Campos Castilho

Coorientador: Pedro Luiz Martins Soares Soares

1. Acarologia agrícola. 2. Ácaros de solo. 3. Controle biológico. 4.
Mesofauna. 5. Nematologia agrícola. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

A presente pesquisa é inovadora, estuda um novo agente de controle biológico no manejo de fitonematoides. Tem impacto potencial sobre a sociedade, fortemente relacionada com o Objetivo do Desenvolvimento Sustentável – “fome zero e agricultura sustentável” por ser promissora em reduzir perdas agrícolas, além de preservar a qualidade do solo, a biodiversidade e os serviços ecossistêmicos.

Potential impact of this research

This innovative research studies a new biological control agent for the management of plant parasitic nematodes, with potential impact on society and a strong relation to the Sustainable Development Goal of "Zero Hunger and Sustainable Agriculture". It is promising in reducing yield losses, preserving soil quality, biodiversity, and ecosystem services.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: POTENCIAL DO ÁCARO PREDADOR *Protogamasellopsis zaheri* (RHODACARIDAE)
NO CONTROLE DO FITONEMATOIDE *Meloidogyne incognita* (MELOIDOGYNIDAE)

AUTORA: THAIS JULIANE DO PRADO
ORIENTADOR: RAPHAEL DE CAMPOS CASTILHO
COORIENTADOR: PEDRO LUIZ MARTINS SOARES
COORIENTADOR: YANN TRICAULT

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA
(ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RAPHAEL DE CAMPOS CASTILHO (Participação Virtual)
Departamento de Entomologia e Acarologia / ESALQUSP PiracicabaSP

Documento assinado digitalmente
gov.br RAPHAEL DE CAMPOS CASTILHO
Data: 10/03/2023 08:13:06-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. DENISE NÁVIA MAGALHÃES FERREIRA (Participação Virtual)
Institut National de Recherchepour l'Agriculture et l'Environnement (INRAE) / Paris/

Documento assinado digitalmente
gov.br DENISE NAVIA MAGALHAES FERREIRA
Data: 09/03/2023 18:52:38-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES (Participação Virtual)
Departamento de Ciencias da Producao Agricola / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
gov.br ODAIR APARECIDO FERNANDES
Data: 21/03/2023 20:16:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOSÉ WAGNER DA SILVA MELO (Participação Virtual)
Departamento de Fitotecnia / Universidade Federal de Pernambuco UFPE

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSE WAGNER DA SILVA MELO
Data: 09/03/2023 15:40:18-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. JERONIMO VIEIRA DE ARAÚJO FILHO (Participação Virtual)
Universidade Federal de Pelotas / Pelotas/RS

Documento assinado digitalmente
gov.br JERONIMO VIEIRA DE ARAUJO FILHO
Data: 09/03/2023 11:08:35-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Thais Juliane do Prado, brasileira, nascida no dia quatro de junho de 1988 em São Paulo/SP. Técnica em Nutrição e Dietética pelo Centro Paula Souza, Ribeirão Preto/SP em 2007. Engenheira Agrônoma pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), em 2014. Bolsista PROEX (Pró-Reitoria de Extensão Universitária) no programa UNATI (Universidade Aberta a Terceira Idade) vinculado ao PISC (Programa de Integração Social Comunitária) em 2010/11. Bolsista Capes/Brafagri em intercambio acadêmico na universidade francesa Montpellier SupAgro, onde cursou o «Master international» em «Sciences et technologies de l'agriculture, de l'alimentation et de l'environnement» em 2011/12. Realizou atividade voluntária de caráter extensionista no ensino de alimentação e cultura às crianças alunas do colégio francês «Las Cazes», dentro do projeto «Alimentation et Culture», do programa do governo francês «Les Cordées de la réussite» em 2011. Estagiária do centro de pesquisa francês CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement), com estudo intitulado «Caractérisation du modèle Pest LCI pour l'estimation des émissions de produit phytosanitaire après application sur la culture de tomate» sob orientação do Dr. Mitchel Burns e Dr. Aurélie Perrin, em 2012. Realizou estágio curricular na empresa AGROEXATA, conduzindo área experimental e realizando o monitoramento de pragas e doenças na cultura do café e do feijão na fazenda do grupo ZANCANARO, região de Cristalina/GO, em 2013. Foi Profa. Voluntária de Botânica no NAV (Núcleo de Apoio ao Vestibulando), curso comunitário gratuito de preparo ao vestibular, durante em 2014/15. Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola) pela FCAV/UNESP em 2018, bolsista CNPq. Iniciou o doutorado em março de 2018 no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da FCAV/UNESP, bolsista CNPq, sob orientação do Prof. Dr. Raphael de Campos Castilho e coorientação do Prof. Dr. Pedro Luiz Martins Soares. Realizou intercambio acadêmico na universidade francesa «L'institut Agro Renne-Angers», bolsista Capes/Print, sob coorientação do Prof. Dr. Yann Tricault. Foi membro do comitê organizador do XI e XIII Curso de Inverno em Entomologia Agrícola da FCAV/UNESP. Foi premiada no III CLAC/VI SIBAC, VII SIBAC e HACKATHON UNESP 2020 - 'Goal Zero Hunger'.

EPÍGRAFE

*“Este foi seu primeiro sentimento de remorso. Mas ele retomou a coragem.
– Que lugar o senhor me aconselha visitar – perguntou ele.
– O planeta Terra – respondeu o geógrafo – Ele tem uma boa reputação...
E o pequeno príncipe se foi, sonhando com a sua flor.”*
(Antoine de Saint-Exupéry)

DEDICO

Aos meus pais, Edna Regina Roque do Prado e José Roberto do Prado;
Aos meus irmãos, Thiago Roberto do Prado e Vanessa Regina do Prado;
Aos meus familiares e em especial ao meu tio, Nilton Ferri Roque;
À grande matriarca da minha família materna, minha avó Laura Ferri Roque;
Aos meus avós paternos, Felicia Elvira Selverio do Prado (*in memoriam*) e
José Luiz do Prado
Aos meus eternos amigos, Larissa Zuccatti, Leandro Costa, Leticia Estoraro,
Priscila Ambrozio, Raquel Mira e Samara Poch.

AGRADECIMENTOS

À FCAV – Unesp de Jaboticabal, por tornar possível meu título de doutora, juntamente com todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) do Departamento de Ciências da Produção Agrícola, que admiro e me inspiram. Agradeço em especial aos professores Dr. Odair A. Fernandes que disponibilizou a casa de vegetação e a Dr. Priscila Lupino Gratão que disponibilizou sementes de tomateiro cv. Micro-tom para realização do trabalho descrito no capítulo 3, e ao professor Daniel Junior de Andrade que disponibilizou a Torre de Potter para a realização do trabalho descrito no capítulo 4.

À L'institut Agro, Rennes-Angers, onde realizei o doutorado sanduíche. À toda equipe do Depto. de "Écologie, botanique, entomologie", que me acolheram tão bem e foram além de colaboradores verdadeiros amigos, em especial Dra. Ainara Peñalver, Christelle Heintz, Ferréol Braud, Dr. Martin Luquet, Dra. Sylvia Anton e prof. Dr. Yann Tricault.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro no Brasil (Processo: 140945/2018-0) e à CAPES/ Print pela bolsa de doutorado sanduíche na França (Processo: 88887.467893/2019-00).

Ao Prof. Dr. Raphael de Campos Castilho pela orientação durante o Doutorado, sempre solícito e paciente, que tratou com respeito minhas limitações e ofereceu liberdade e suporte na medida para o desenvolver do espírito científico, se colocando favorável aos desafios que estivesse disposta a encarar.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Martins Soares pela coorientação durante o Doutorado, que permitiu meu desenvolvimento na área da nematologia agrícola juntamente com toda sua equipe do LabNema, que me ajudaram com todo o processo para aquisição da suspensão de nematoides, todos sempre foram adoráveis e solícitos.

Novamete, ao prof. Dr. Yann Tricault pela coorientação durante o Doutorado na França, que permitiu meu desenvolvimento na área da modelagem e dinâmica populacional.

Aos colegas de laboratório Ávylla Barros, Daiana Polli, Emiliano Azevedo, Flávia Fagundes, Flávia Gonçalves, Larissa Rossini, Letícia Azevedo, Letícia Inocente.

Aos amigos da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal pelos sorrisos e choros compartilhados desde 2018, muito companheirismo nas atividades acadêmicas, rotinas de laboratório, e nos momentos de descontração. Em especial à Ana Letícia Zéro, Beatriz Miotto, Daniel Dalvan, Fernanda Silva, Maiara Cruz, Natália Sarmanho, Nicole de Paula, Stéfane Faria.

Aos meus novos e velhos amigos que conheci durante minha estadia na França e foram minha família e meu suporte emocional, Breno Moreira, David Bourgeais, Emanuel Grevet, François Marchive, Juliana Vital, Natália Câmara e Natália Ferreira foi maravilhoso conhecer vocês.

Ao médico terapeuta Dr. Robson Miranda Costa que me ofereceu imensurável auxílio no desenvolvimento de saúde mental melhorando minha qualidade de vida nesse período de doutoramento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Referências	7
CAPÍTULO 2 – CICLO DE VIDA E POTENCIAL DE PREDÇÃO DO ÁCARO PREDADOR <i>Protogamasellopsis zaheri</i> SOBRE O NEMATOIDE-DAS-GALHAS <i>Meloidogyne incognita</i> E O NEMATOIDE DE VIDA LIVRE <i>Rhabditella axei</i>	11
2.1. Introdução	13
2.2. Material e Métodos	15
2.3. Resultados e Discussão	20
Referências	26
CAPÍTULO 3 – CONTROLE BIOLÓGICO DO NEMATOIDE-DAS-GALHAS (<i>Meloidogyne incognita</i>) EM CULTIVO DE TOMATE (<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. MICRO-TOM) COM ÁCARO PREDADOR <i>Protogamasellopsis zaheri</i> (MESOSTIGMATA: RHODACARIDAE)	31
3.1. Introdução	33
3.2. Material e Métodos	34
3.3. Resultados e Discussão	38
Referências	41
CAPÍTULO 4 – SELETIVIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS AO ÁCARO PREDADOR <i>Protogamasellopsis zaheri</i> (MESOSTIGMATA: RHODACARIDAE)	45
4.1. Introdução	47
4.2. Material e Métodos	48
4.3. Resultados e Discussão	52
Referências	57
CAPÍTULO 5 – MODELLING THE BIOLOGICAL CONTROL OF TOMATO ROOT- KNOT NEMATODE BY PREDATORY MITES IN THE PRESENCE OF AN ALTERNATIVE PREY	63
5.1. Introduction.....	65
5.2. Materials and methods	66

5.3. Results and Discussion71

5.4. Conclusions.....74

Literature cited.....75

**POTENCIAL DO ÁCARO PREDADOR *Protogamasellopsis zaheri*
(RHODACARIDAE) NO CONTROLE DO FITONEMATOIDE
Meloidogyne incognita (MELOIDOGYNIDAE)**

RESUMO – O nematoide-das-galhas, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White), é um dos mais importantes fitonematoides no mundo devido sua alta capacidade de parasitismo em diversos cultivos agrícolas e seu difícil controle. O controle biológico com ácaros predadores edáficos vem se mostrando uma opção no manejo de fitonematoides. O ácaro predador *Protogamasellopsis zaheri* Abo-Shnaf, Castilho & Moraes (Mesostigmata: Rhodacaridae), encontrado em diferentes regiões do Brasil, tem se mostrado promissor como agente de controle de *M. incognita* em laboratório. O objetivo da presente tese foi verificar o potencial do ácaro predador *P. zaheri* no manejo do fitonematoide, *M. incognita*, por meio de estudos em laboratório e casa de vegetação. Os objetivos específicos foram: 1) avaliar o ciclo de vida do predador ao se alimentar de ovos do fitonematoide, e verificar se é uma presa adequada ao seu desenvolvimento e reprodução; 2) avaliar o potencial de predação do predador sobre juvenis de segundo estágio (J2) do fitonematoide e sobre o nematoide de vida livre *Rhabditella axei* (Cobbold); 3) avaliar o potencial do predador como agente de controle biológico de *M. incognita* em tomateiro cultivado em casa-de-vegetação, com ou sem a liberação conjunta de *R. axei*; 4) verificar, em condições de laboratório, se produtos fitossanitários empregados em diferentes cultivos agrícolas são seletivos ou prejudiciais ao predador; e (5) prever possíveis variações no potencial do predador no controle do fitonematoide sob diferentes cenários de período de liberação e suplementação com nematoide de vida livre. Os resultados obtidos demonstraram que: 1) O predador foi capaz de completar o seu ciclo de vida e se reproduzir ao se alimentar de ovos de *M. incognita*; 2) Uma fêmea de *P. zaheri* predou em média cerca de 318 J2 de *M. incognita* ou 72 machos adultos de *R. axei* por dia; 3) A liberação de *P. zaheri* em tomateiro infestados pelo parasito diminuiu a população de *M. incognita* em até 51%. A maior média de produção de frutos de tomate por planta foi observada no grupo de plantas em que o predador foi liberado juntamente com o nematoide de vida livre; 4) Dentre os produtos fitossanitários testados, os herbicidas Hexazinona, Indaziflam e Flumioxazina, e os inseticidas *Bacillus thuringiensis* (microbiológico) e Tiametoxam foram seletivos ao ácaro predador; 5) O cenário combinando uma única liberação precoce de *P. zaheri* com uma inoculação tardia de *R. axei*, duas semanas após, foi predito como o mais eficiente ao manejo do parasita assim como liberações periódicas do predador. O presente estudo adicionou novo suporte ao potencial de *P. zaheri* como agente de controle de *M. incognita*, principalmente quando utilizado nematoide vida livre como alimento suplementar para esse ácaro predador.

Palavras-chave: Ácaro de solo, controle biológico, dinâmica populacional, Mesostigmata, nematoide de vida livre, seletividade

**POTENTIAL OF THE PREDATORY MITE *Protogamasellopsis zaheri*
(RHODACARIDAE) IN THE CONTROL OF THE PLANT PARASITIC NEMATODE
Meloidogyne incognita (MELOIDOGYNIDAE)**

ABSTRACT – The root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White), is one of the most important nematodes in the world due to its high capacity of parasitism in several agricultural crops and its difficult control. The biological control of plant-parasitic nematode with edaphic predatory mites has been proving to be an option. The predatory mite *Protogamasellopsis zaheri* Abo-Shnaf, Castilho & Moraes (Mesostigmata: Rhodacaridae), found in different parts of Brazil, has shown promise as a control agent for *M. incognita* in laboratory studies. The aim of this thesis was to verify the potential of the predatory mite *P. zaheri* in the management of the plant-nematode *M. incognita* through laboratory and greenhouse studies. The specific objectives were: 1) to evaluate the life cycle of the predator when feeding on *M. incognita* egg's and determine if it is a suitable prey for its development and reproduction; 2) to assess the predation potential of the predator on second-stage juveniles of *M. incognita* (J2) and the free-living nematode *Rhabditella axei* (Cobbold); 3) to evaluate the potential of the predator as a biological control agent of *M. incognita* in tomato plants grown in a greenhouse, with or without the simultaneous release of *R. axei*; 4) to verify, under laboratory conditions, whether phytosanitary products used in different agricultural crops are selective or harmful to the predator; and 5) to predict possible variations in the potential of the predator for controlling the plant-parasitic nematode under different scenarios of release period and supplementation with free-living nematodes. The results demonstrated that: 1) The predator was able to complete its life cycle and reproduce when feeding on *M. incognita* eggs; 2) A female *P. zaheri* preyed on average about 318 J2 of *M. incognita* or 72 adult males of *R. axei* per day; 3) The release of *P. zaheri* in tomato plants infested by *M. incognita* decreased the population of the nematode by up to 51%. The highest average production of tomato fruits per plant was observed in the group of plants in which the predator was released together with the free-living nematode; 4) Among the tested phytosanitary products, the herbicides Hexazinone, Indaziflam, and Flumioxazin, and the insecticides *Bacillus thuringiensis* (microbiological) and Thiamethoxam were selective to the predator mite; 5) The scenario combining a single early release of *P. zaheri* with a late inoculation of *R. axei*, two weeks later, was predicted to be the most efficient for nematode management, as well as periodic releases of the predator. This study provided additional evidence to support the potential of *P. zaheri* as a biological control agent of *M. incognita*, especially when supplemented with free-living nematodes as a food source for this predatory mite.

Keywords: Soil mite, biological control, population dynamics, Mesostigmata, free-living nematode, selectivity

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

Os fatores que limitam o aumento de produtividade na produção agrícola são diversos, desde condições climáticas adversas, variedades não adaptadas, baixa fertilidade do solo, até a ocorrência de pragas e doenças. O grupo dos nematoides parasitas de plantas (fitonematoides) é um desses importantes limitadores do aumento de produtividade, provocando prejuízos econômicos significativos em uma grande variedade de cultivos agrícolas (Sikora e Fernández, 2005; Dias et al., 2010).

Os fitonematoides causam danos em praticamente todas as partes do mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais onde as condições ambientais e as práticas dentro dos sistemas de cultivos agrícolas favorecem o desenvolvimento destes (Luc et al., 2005). Já foram identificadas mais de quatro mil e cem espécies de fitonematoides (Decraemer & Hunt, 2006), das quais 15% estão associadas à cultivos agrícolas. Estima-se que os fitonematoides comprometam 12,3% da produção agrícola mundial, com perdas monetárias entre 80 e 121 bilhões de dólares ao ano (Nicol et al., 2011; Nilusmas et al., 2020).

Dentre os fitonematoides de importância agrícola, as espécies de *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae), conhecidas como nematoides-das-galhas, estão entre as mais importantes na agricultura mundial (Jones et al., 2013). Esse é o grupo de nematoides que parasita a maior gama de plantas cultivadas, possuindo mais de três mil espécies de plantas hospedeiras (Castagnone-Sereno, 2006). Cerca de 90% dos danos causados por estes nos trópicos são atribuídos ao *M. arenaria* (Neal), *M. incognita* (Kofoid & White) e *M. javanica* (Treub) (Castagnone-Sereno, 2006).

Os nematoides-das-galhas causam desarranjo no sistema radicular da planta, formando galhas e comprometendo a adequada absorção de água e nutrientes. Além disso, o aumento da atividade metabólica nas células gigantes (nutridoras) mobiliza produtos fotossintéticos da parte aérea para as raízes (Hofmann & Grundler, 2007), culminando em perdas na produtividade e na qualidade dos produtos agrícolas (Greco e Vito, 2009). Os sintomas típicos de meloidoginose na parte aérea incluem plantas mal desenvolvidas, murcha nos horários mais quentes

do dia, clorose nas folhas e nos casos mais agressivos podem levar a morte da planta, causando falhas no estande.

Os nematoides-das-galhas estão entre as pragas agrícolas de mais difícil controle, por essa ampla gama de plantas hospedeiras, alta capacidade reprodutiva, além da frequência de populações mistas e presença de diferentes raças. Esses fatores dificultam a seleção de cultivares resistentes ou tolerantes que aliem resistência e produtividade, além de limitar as opções de plantas para a rotação de cultivos (Williams-Woodward e Davis, 2001; Pinheiro et al., 2019).

O controle químico com o uso de produtos fitossanitários da classe dos nematicidas sintéticos é uma das medidas amplamente adotadas no manejo de fitonematoides (Chen et al., 2020). Alguns nematicidas aplicados em tratamento de sementes apresentam resultados favoráveis ao desenvolvimento de determinadas culturas, podendo diminuir perdas de produtividade (Grigolli e Asmus, 2015). No entanto, é um investimento de alto custo e ainda não se comprovou a existência de nematicidas com potencial em controlar significativamente a população de nematoides na área durante todo o ciclo de cultivo, sendo importante o emprego do manejo integrado de fitonematoides (Grigolli e Asmus, 2015). Além disso, o uso de alguns nematicidas vem sendo reavaliado devido ao perigo que oferecem à saúde e ao meio ambiente (Chitwood, 2003; Dong e Zhang, 2006; Pinheiro et al., 2019).

No Brasil, para algumas das hortaliças cultivadas não existem produtos nematicidas (a exceção dos microbiológicos) registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esse fator aumenta o risco de uso indiscriminado desses produtos, os quais geralmente são altamente tóxicos e com um período residual longo em relação ao ciclo das hortaliças cultivadas. Devido a muitas das hortaliças produzidas serem consumidas *in natura*, isso aumenta os riscos de contaminação pelo consumidor final quando tratadas indiscriminadamente com tais produtos. (Pinheiro et al., 2019).

Outras medidas conhecidas para o manejo de fitonematoides são a rotação de cultivos com espécies antagônicas, a solarização do solo, o pousio do solo, a limpeza de máquinas e equipamento agrícolas e o uso de variedades resistentes (Sikora et al., 2022). No entanto, todas elas têm suas limitações, seja de ordem

operacional, temporal ou financeira, que restringem a adoção pelos produtores (Westphal, 2011).

Esse difícil controle dos fitonematoides aumenta a necessidade do desenvolvimento de outros métodos de controle que sejam mais eficientes e sustentáveis, além da integração com os já existentes, de maneira a garantir a viabilidade da produção agrícola em áreas infestadas. O controle biológico é um método promissor ao manejo de nematoide-das-galhas, visto que no Brasil o seu registro não é feito por cultura, e pode ser empregado com maior segurança. Dentre as vantagens do controle biológico de fitonematoides frente ao controle químico está uma maior viabilidade econômica e ambiental, preservando o equilíbrio do meio ambiente (Nunes et al., 2010). O controle biológico é feito por organismos antagônicos, ou seja, inimigos naturais, que podem ser predadores, parasitoides ou patógenos, também referidos como agentes de controle biológico (van Lenteren et al., 2012; van Lenteren et al., 2018). Dentre os agentes de controle biológico presentes na mesofauna edáfica com potencial no manejo de nematoides no solo estão os ácaros predadores Mesostigmata (Manwaring et al., 2015; Walter e Stirling, 2018; Rossini et al., 2022; Rueda-Ramírez et al., 2023)

Os ácaros são uns dos mais abundantes artrópodes do solo, exercendo importante papel nas interações da biota do solo (Koehler, 1999). Diversas famílias de ácaros são compostas por predadores, com destaque para ácaros da ordem Mesostigmata que são predominantemente edáficos e correspondem a 20% do total de espécies de ácaros descritas no mundo (Castilho et al., 2015). A coorte Gamasina dentro da ordem Mesostigmata constitui-se por diversas famílias de ácaros predominantemente predadores, estando estes organismos no topo da cadeia alimentar da mesofauna edáfica (Ruf & Beck, 2005). Os nematoides são um importante recurso alimentar para os ácaros predadores, de qualidade nutricional significativa para várias espécies que com frequência incluem nematoides em sua dieta, aumentando o número de ovos postos e/ou se desenvolvendo mais rapidamente (Walter, 1988; Castilho et al., 2015; Rueda-Ramírez et al., 2023).

Estudos recentes avaliaram o uso de ácaros predadores como agentes de controle biológico no manejo de fitonematoides, e os resultados apontam para um potencial em sua utilização (Azevedo et al., 2020; Heikal, 2020; Manwaring et al.,

2020; Yang et al., 2020; Rossini et al., 2022). Uma das vantagens para utilização de ácaros predadores Mesostigmata como agentes de controle biológico de fitonematoides é o tamanho diminuto destes que possibilita o acesso aos pequenos canais e poros do solo, o rápido tempo de geração (geralmente ovo-adulto em menos de dez dias), e a facilidade de produção em larga escala para uso no controle biológico aplicado (Walter, 1988; Castilho et al., 2015; Navarro-Campos et al., 2016; Barbosa e Moraes, 2016).

Um dos exemplos são os ácaros da família Rhodacaridae (Mesostigmata), que foram relatados como potenciais predadores de nematoides (Castilho et al., 2015). Espécies de *Protogamasellopsis* (Rhodacaridae) foram associadas a raízes de citros, na Florida, EUA, possivelmente se alimentando de nematoides ali presentes (Walter et al., 1993). Castilho et al. (2009) obtiveram resultados promissores estudando o potencial de predação de *Protogamasellopsis zaheri* Abo-Shnaf, Castilho & Moraes (Rhodacaridae) (citado como *Protogamasellopsis posnaniensis* Wisniewski & Hirschmann) sobre o nematoide de vida livre *Rhabditella axei* (Cobbold) (Nematoda: Rhabditidae), com alta taxa de oviposição ($6,3 \pm 0,3$ ovos por dia) e sobrevivência (98%), indicando que nematoides podem ser um alimento adequado para essa espécie de ácaro predador.

Em relação aos fitonematoides, *P. zaheri* demonstrou potencial no manejo de *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) (Nematoda: Pratylenchidae) em plantas de soja, onde reduziu aproximadamente 60% do parasitismo em teste em casa de vegetação (Castilho, R.C., dados não publicados). Prado (2018) estudou o ciclo de vida de *P. zaheri* quando alimentado com o segundo estágio juvenil (J2) de *M. incognita*, obtendo boa taxa de oviposição (mais de dois ovos por dia) e alta sobrevivência (96%), com taxa finita de crescimento de 1,17. Além disso, Prado (2018) observou uma mortalidade de cerca de 68% em *M. incognita* em testes *in vitro*, quando liberado *P. zaheri* em solo autoclavado.

Esses estudos demonstraram várias características para um potencial de *P. zaheri* como agente de controle biológico de *M. incognita*. A primeira é que o ácaro predador pode controlar justamente a forma infectiva (J2), evitando que altas populações do fitonematoide infectem as raízes. O ciclo de vida relativamente curto e a reprodução partenogênica telítoca (Castilho et al., 2009), permitem à população

de *P. zaheri* aumentar conforme aumenta a população do fitonematoide, dentro de um curto período de tempo. Aliado a isso, a alta mobilidade do ácaro é outro fator interessante pois permite não restringir seu forrageamento ao ponto de liberação, podendo buscar seu alimento em outra região da raiz com maior disponibilidade de alimento (Castilho et al., 2015). Outro aspecto favorável ao uso deste organismo como agente de controle biológico é a possibilidade de sua produção em larga escala ser viável e com custos relativamente baixos, permitindo liberações periódicas para o manejo de pragas (Castilho et al., 2009).

Outro fator importante relacionado a *P. zaheri* é a habilidade em utilizar recursos alimentares alternativos, como por exemplo nematoide de vida livre, geralmente muito abundantes nos solos. Essa característica pode possibilitar que *P. zaheri* se mantenha no sistema durante os períodos em que a população de fitonematoides esteja escassa. Além disso, grande parte os nematoides de vida livre são bacteriófagos (van den Hoogen et al., 2019) e se nutrem de microrganismos presentes no solo, contribuem para a mineralização do nitrogênio, possivelmente auxiliando na nutrição das plantas (Navarro-Campos et al., 2016; Snyder, 2019; Aldebron et al., 2020; Rueda-Ramírez et al., 2023).

Em solos agrícolas produtivos os nematoides bacteriófagos são predominantes (McSorley et al., 2008), isso porque as bactérias podem representar de 70 a 90% da biomassa em solos cultivados (Lavelle e Spain, 2001). Sendo assim, o uso de nematoides de vida livre como recurso alimentar de ácaros predadores pode ser útil ao controle biológico conservativo ou aplicado (Navarro-Campos et al., 2016; Azevedo et al., 2019, 2020). Do ponto de vista do controle conservativo, um manejo agrícola que aumente o aporte de matéria orgânica no solo, como a adubação orgânica, pode sustentar a cadeia alimentar de microrganismos decompositores, nematoides bacteriófagos e ácaros predadores, também podendo favorecer o controle biológico natural de organismos alvo pelo aumentando da abundância de predadores (McSorley et al., 2008; Stirling, 2021). Do ponto de vista do controle biológico aplicado, nematoides de vida livre poderiam ser multiplicados e usados como recurso alimentar para produção em larga escala de ácaros predadores, ou possibilitar a liberação preventiva de ácaros predadores adicionando

esses organismos como presas alternativas para os manter presentes na área de controle.

Em agroecossistemas os ácaros predadores têm grandes chances de contato com os produtos fitossanitários, seja pelo contato direto quanto expostos aos produtos no momento da aplicação, ou residual por seu caminhar em superfícies tratadas, ou ingerindo presas contaminadas (Huguier et al., 2015). O uso de produtos fitossanitários dentro de um sistema de manejo integrado de pragas e doenças requer informações sobre possíveis efeitos adversos nesses organismos não-alvo (Cabrera et al., 2021). A seleção de produtos fitossanitários com o mínimo de efeito sobre os inimigos naturais de pragas é componente chave para o controle biológico conservativo (Schmidt-Jeffris et al., 2021). No entanto, em relação a organismos edáficos, principalmente ácaros predadores, poucos estudos foram realizados para verificar o efeito de produtos fitossanitários (Cabrera et al., 2004; Duarte et al., 2020; Barroso et al., 2021; Gonçalves, 2021). No processo regulatório de avaliação de produtos fitossanitários da União Europeia, o ácaro *Gaeolaelaps aculeifer* (Canestrini) (Mesostigmata: Laelapidae) (citado como *Hypoaspis aculeifer*) é o único organismo edáfico predador contemplado no estudo de risco a organismos não-alvo (Huguier et al., 2015). *Geolaelaps aculeifer* é considerado apropriado para fins de testes ecotoxicológicos, pois é um predador generalista, possui um tempo de geração curto (possibilitando testes de efeito subletal em até 14 dias), é facilmente multiplicado em laboratório, tem ampla distribuição, e representatividade ecológica (em termos de abundância e papel na rede trófica do solo) (Huguier et al., 2015; Smit et al., 2012).

Sendo assim, o objetivo da presente tese foi verificar o potencial do ácaro predador *P. zaheri* no manejo do fitonematoide, *M. incognita*, por meio de estudos realizados em laboratório e casa de vegetação. Os objetivos específicos foram: 1) avaliar o ciclo de vida do predador ao se alimentar de ovos do fitonematoide, e verificar se é uma presa favorável ao seu desenvolvimento e reprodução; 2) avaliar o potencial de predação do predador sobre juvenis de segundo estágio (J2) do fitonematoide e sobre o nematoide de vida livre *R. axei*; 3) avaliar o potencial do predador como agente de controle biológico de *M. incognita* em tomateiro cultivado em casa-de-vegetação, com ou sem a liberação conjunta de *R. axei*; 4) verificar, em

condições de laboratório, se produtos fitossanitários de diferentes classes (fungicida, regulador de crescimento, herbicida e inseticida) empregados em diferentes cultivos agrícolas são seletivos ou prejudiciais ao predador; e (5) prever possíveis variações na eficiência do controle biológico de *M. incognita* exercido por *P. zaheri* sob diferentes cenários de liberação do predador e do nematoide de vida livre, por meio de um modelo de dinâmica populacional.

Referências

Aldebron C, Jones MS, Snyder WE, Blubaugh CK (2020) Soil organic matter links organic farming to enhanced predator evenness. **Biological Control** 146:104278.

Azevedo LH, Leite LG, Chacon-Orozco JG, Moreira MFP, Ferreira MP, González-Cano LM, Borges V, Rueda-Ramírez D, Moraes GJ, Palevsky E (2019) Free living nematodes as alternative prey for soil predatory mites: An interdisciplinary case study of conservation biological control. **Biological Control** 132:128–134.

Azevedo LH, Moreira MFP, Pereira GG, Borges V, Moraes GJ, Inomoto MM, Vicente M, Siqueira Pinto M, Peres LP, Rueda-Ramírez D, Carta L, Meyer SLF, Mowery J, Bauchan G, Ochoa R, Palevsky E (2020) Combined releases of soil predatory mites and provisioning of free-living nematodes for the biological control of root-knot nematodes on ‘Micro Tom tomato’. **Biological Control** 146:104280.

Barbosa MFC, Moraes GJ (2016) Potential of astigmatid mites (Acari: Astigmatina) as prey for rearing edaphic predatory mites of the families Laelapidae and Rhodacaridae (Acari: Mesostigmata). **Experimental and Applied Acarology** 69:289–296.

Barroso G, Pazini JB, Iost Filho FH, Barbosa DPL, Paiva ACR, Matioli TF, Yamamoto PT (2022) Are pesticides used to control thrips harmonious with soil-dwelling predatory mite *Cosmolaelaps sabelis* (Mesostigmata: Laelapidae)? **Journal of Economic Entomology** 115:151–159.

Cabrera AR, Cloyd RA, Zaborski ER (2004) Effects of greenhouse pesticides on the soil-dwelling predatory mite *Stratiolaelaps scimitus* (Acari: Mesostigmata: Laelapidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology** 97:793-799.

Castagnone-Sereno P (2006) Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. **Heredity** 96:282–289.

Castilho RC, Moraes GJ, Silva ES, Silva LO (2009) Predation potential and biology of *Protogamasellopsis posnaniensis* Wisniewski & Hirschmann (Acari: Rhodacaridae). **Biological Control** 48:164–167.

Castilho RC, Venancio R, Narita JPZ (2015) Mesostigmata as biological control agents, with emphasis on Rhodacaroidea and Parasitoidea. In: Carrillo D, Moraes

GJ, Peña JE (Eds.) **Prospects for Biological Control of Plant Feeding Mites and Other Harmful Organisms** Florida: Springer, p. 1–31.

Chen J, Li QX, Song B (2020) Chemical nematicides: recent research progress and outlook. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 6:12175–12188.

Chitwood DJ (2003) Nematicides. In: Plimmer JR (Ed.) **Encyclopedia of Agrochemicals**. Vol. 3. New York, NY: John Wiley & Sons, p. 1104–1115.

Decraemer W, Hunt DJ (2006) Structure and classification. In: Perry RN, Moens M (Eds.) **Plant Nematology**. Wallingford: CABI, p. 3–32.

Dias WP, Garcia A, Silva JFV, Carneiro GES (2010) Nematoides em soja: identificação e controle. Brasília: EMBRAPA, **Circular Técnica** 76:1–8.

Dong LQ, Zhang KQ (2006) Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil** 288:31–45.

Duarte AF, Pazini JB, Duarte JLP, Silva LR, Cunha US (2020) Compatibility of pesticides used in strawberry crops with predatory mites *Stratiolaelaps scimitus* (Womersley) and *Cosmolaelaps brevistilis* (Karg). **Ecotoxicology** 29:148–155.

Gonçalves AFM (2021) *Macrocheles embersoni* (Mesostigmata: Macrochelidae): criação em laboratório e efeito da vinhaça e de produtos químicos. 57 p. Dissertação [Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola)] – UNESP, Jaboticabal.

Greco N, di Vito M (2009) Population dynamics and damage levels. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (Eds.) **Root-knot Nematodes**. Wallingford: CABI, p.246–274.

Grigolli JFJ, Asmus GL (2015) Manejo de nematoides na cultura da soja. In: Lourenção ALF, Grigolli JFJ, Melotto AM, Pitol C, Gitti DC, Roscoe R (Eds.) **Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014**. Maracaju, MS: Fundação MS. p.194-203.

Heikal HM (2020) *Parasitus fimetorum* and *Macrocheles muscaedomesticae* (Acarina:Parasitidae, Macrochelidae) as natural predators of the root knot nematode, *Meloidogyne javanica* Treub. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 30:1–7.

Hofmann J, Grundler F (2022) Identification of reference genes for qRT-PCR studies of gene expression in giant cells and syncytia induced in *Arabidopsis thaliana* by *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. **Nematology** 9:317–323.

Huguier P, Manier N, Owojori OJ, Bauda P, Pandard P, Römbke J (2015) The use of soil mites in ecotoxicology: a review. **Ecotoxicology** 24:1–18.

Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, Perry RN (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology** 14:946–61.

Koehler HH (1999) Predatory mites (Gamasina, Mesostigmata). **Agriculture, Ecosystems & Environment** 74:395–410.

Lavelle P, Spain AV (2001) **Soil Ecology**. New York: Kluwer Academic Publishers. 654 p.

Luc M, Bridge J, Sikora RA (2005) Reflections on nematology in subtropical and tropical agriculture. In: Luc M, Sikora RA, Bridge J (Eds.) **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CABI. p. 1–10.

Manwaring M, Nahrung HF, Wallace H (2020) Attack rate and prey preference of *Lasioseius subterraneus* and *Protogamasellus mica* on four nematode species. **Experimental and Applied Acarology** 80:29–41.

McSorley R, Wang KH, Church G (2008) Suppression of root-knot nematodes in natural and agricultural soils. **Applied Soil Ecology** 1:291–298.

Navarro-Campos C, Wäckers FL, Pekas A (2016) Impact of factitious foods and prey on the oviposition of the predatory mites *Gaeolaelaps aculeifer* and *Stratiolaelaps scimitus* (Acari: Laelapidae). **Experimental and Applied Acarology** 70:69–78.

Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, Nijs L den, Hockland S, Maafi ZT (2011) Current Nematode Threats to World Agriculture. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (Eds.) **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**. Dordrecht: Springer, p. 21–43.

Nilusmas S, Mercat M, Perrot T, Djian-Caporalino C, Castagnone-Sereno P, Touzeau S, Calcagno V, Mailleret L (2020) Multi-seasonal modelling of plant-nematode interactions reveals efficient plant resistance deployment strategies. **Evolutionary Applications** 13:2206–2221.

Nunes HT, Carlos Monteiro A, William A, Pomela V (2010) Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum Agronomy** 32:403–409.

Pinheiro JB, Castro e Melo RA, Ragassi CF (2019) Manejo de nematoides em hortaliças sob plantio direto. Brasília: EMBRAPA, **Circular técnica** 171, p.01–22.

Prado TJ (2018) **Biologia e potencial do ácaro predador *Protogamasellopsis zaheri* (Mesostigmata: Rhodacaridae) como agente de controle do nematoide de galha *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae)**. 32 p. Tese (Doutorado em Agronomia (Entomologia Agrícola) – UNESP, Jaboticabal.

Rossini LACJ, Prado TJ, Ferreira RJ, Soares PLM, Moraes GJ, Castilho RC (2022) Suitability of the soybean cyst nematode as prey to *Protogamasellopsis zaheri* (Acari: Mesostigmata: Rhodacaridae). **Biological Control** 170:104905.

Rueda-Ramírez D, Rios-Malaver D, Varela-Ramírez A, Moraes GJ (2022) Biology and predation capacity of *Parasitus bituberosus* (Acari: Mesostigmata: Parasitidae) on *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), and free-living nematodes as its complementary prey. **Pest Management Science** 75:1819–1830.

Ruf A, Beck L (2005) The use of predatory soil mites in ecological soil classification and assessment concepts, with perspectives for oribatid mites. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 62:290–299.

Sikora RA, Desaeger J, Molendijk L (Edts) (2022) **Integrated Nematode Management: State-of-the-art and visions for the future**. Wallingford: CABI 498p.

Sikora RA, Fernández E (2005) Nematode parasites of vegetables. In.: Luc M, Sikora RA, Bridge J (Eds.) **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CABI. p. 319–392.

Smit CE, Moser T, Römbke J (2012) A new OECD test guideline for the predatory soil mite *Hypoaspis aculeifer*. Results of an international ring test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 82:56–62.

Snyder WE (2019) Give predators a complement: Conserving natural enemy biodiversity to improve biocontrol. **Biological Control** 135:73–82.

Taylor AL, Sasser J (1978) Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). **International Nematology Project**. Raleigh: North Carolina State University. p. 111.

van Lenteren JC (2012) The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl** 57:1–20.

van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl** 63:39–59.

Walter DE (1988) Nematophagy by soil arthropods from the shortgrass steppe, Chihuahuan desert and Rocky Mountains of the central United States. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 24(1–3):307–16.

Walter DE, Kaplan DT, Davis EL (1993) Colonization of greenhouse nematode cultures by nematophagous mites and fungi. **Journal of Nematology** 25:189–94.

Westphal A (2011) Sustainable approaches to the management of plant-parasitic nematodes and disease complexes. **Journal of Nematology** 43:122–125.

Williams-Woodward JL, Davis RF (2001) *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* reproduction on Dwarf Hollies and Lantana. **Journal of Nematology** 33:332–337.

Yang SH, Wang D, Chen C, Xu CL, Xie H (2020) Evaluation of *Stratiolaelaps scimitus* (Acari: Laelapidae) for controlling the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae). **Scientific Reports** 10:5645.

CAPÍTULO 2 – Ciclo de vida e potencial de predação do ácaro predador *Protogamasellopsis zaheri* sobre o nematoide-das-galhas *Meloidogyne incognita* e o nematoide de vida livre *Rhabditella axei*

RESUMO – Espécies de *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae), conhecidas como nematoides-das-galhas, causam enormes prejuízos à agricultura mundial, sendo parasitas de diversas plantas. O controle químico desses nematoides tem apresentado limitações, por isso a necessidade da utilização de outros métodos de controle. O controle biológico com ácaros predadores Mesostigmata pode ser um método a ser explorado. *Protogamasellopsis zaheri* Abo-Shnaf, Castilho & Moraes (Mesostigmata: Rhodacaridae) é considerado um promissor agente de controle biológico de fitonematoides, já sendo verificado seu desenvolvimento tendo juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) como alimento. Levando em consideração que os estágios de ovo e J2 de *Meloidogyne* spp. são as formas acessíveis aos ácaros predadores, o objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial de *P. zaheri* como agente de controle biológico de *M. incognita* por meio de experimentos que possibilitaram (1) avaliar o ciclo de vida de *P. zaheri* ao se alimentar de ovos de *M. incognita*, e verificar se é uma presa adequada ao seu desenvolvimento e reprodução; (2) e avaliar o potencial de predação do ácaro sobre *M. incognita* e sobre o nematoide de vida livre *Rhabditella axei* (Cobbold) (Nematoda: Rhabditidae). Esse nematoide de vida livre tem se mostrado um alimento adequado para criação de ácaros predadores em laboratório, além de servir como alimento suplementar em campo, aumentando a eficiência do manejo de pragas quando liberado junto com os ácaros predadores. *Protogamasellopsis zaheri* foi capaz de completar o seu ciclo de vida e se reproduzir ao se alimentar de ovos de *M. incognita*. O período de ovo à adulto durou em média $13,8 \pm 0,1$ dias, as fêmeas adultas sobreviveram por $38,2 \pm 2,1$ dias e apresentaram fecundidade de $34,8 \pm 1,6$ ovos/fêmea. A população de *P. zaheri* apresentou crescimento populacional diário de 14% (Taxa finita de aumento, $\lambda = 1,14$) e produção de 0,13 fêmeas por fêmea por dia (taxa intrínseca de crescimento populacional, $r_m = 0,13$), duplicando a população em número a cada cinco dias (TD=5,4) tendo ovos de *M. incognita* como alimento. Uma fêmea de *P. zaheri* predou em média cerca de 318,7 J2 de *M. incognita* ou 72 machos adultos de *R. axei* por dia.

Palavras-chave: Controle biológico, fitonematoide, ácaro edáfico, biologia

2.1. Introdução

Os nematoides-das-galhas, *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae), são parasitos de plantas que causam enormes prejuízos à agricultura mundial (Jones et al., 2013). Esse grupo de fitonematoides possui mais de três mil espécies de plantas hospedeiras e atacam diversos cultivos agrícolas nas mais diversas regiões do mundo, com maiores danos nas regiões tropicais e subtropicais (Castagnone-Sereno, 2006; Moens et al., 2009). As espécies de maior importância são *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White), *M. javanica* (Treub), *M. arenaria* (Neal) e *M. hapla* Chitwood, principalmente devido aos prejuízos econômicos que causam nos mais diferentes cultivos (Moens et al., 2009).

Os nematoides-das-galhas são endoparasitos sedentários, sendo os juvenis de segundo estágio (J2) a forma livre e infectante, que eclodem dos ovos, buscam ativamente por seu hospedeiro e penetram nas raízes. Na raiz, os J2 migram intercelularmente, se movem para a zona de diferenciação do cilindro vascular e iniciam a formação de um sítio de alimentação permanente, que consiste em células gigantes que mobilizam os produtos fotossintéticos. A partir de então o nematoide torna-se sedentário, e passa a absorver nutrientes dessas células. O nematoide passa por três ecdises até a emergência do adulto. Nas formas adultas, o macho é vermiforme e deixa as raízes, enquanto as fêmeas continuam no sítio de alimentação se nutrindo e seu corpo passa a aumentar e a adquirir um formato de pera, com a região posterior dilatada. As fêmeas deixam seus ovos no exterior das raízes envoltos por uma matriz gelatinosa que os protegem (Abad et al., 2009).

O método de controle mais empregado para os *Meloidogyne*, historicamente, é o químico, composto pela aplicação de nematicidas sintéticos no solo ou em tratamento de sementes. Porém, alguns nematicidas foram banidos do mercado devido alta toxicidade a organismos não alvos, incluindo humanos (Chen et al., 2020; Haydock et al., 2013). (Chen et al., 2020). Além disso, o uso frequente do mesmo nematicida na mesma área de cultivo pode levar a uma aparente redução da eficiência de controle pela degradação microbiana do produto (NRAC, 2018). Aplicações contínuas de um mesmo nematicida sintético em doses subletais levou ao desenvolvimento de populações resistentes em condições de laboratório e casa de

vegetação (Meher et al., 2009). Ainda não foi observado em condições de campo populações de nematoides resistentes a nematicidas sintéticos (NRAC, 2018). Por isso a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de controle no manejo de fitonematoides (Dong e Zhang, 2006; Nilusmas, 2020).

Estudos sobre a supressividade de solos aos fitonematoides tem mostrado a importância de um solo vivo, rico em organismos antagonistas a esses parasitas (Stirling, 2021). Dentre os organismos antagonistas estão os ácaros predadores Mesostigmata que estão no topo da cadeia alimentar da mesofauna do solo e se alimentam de nematoides (Castilho et al., 2015; Walter e Stirling, 2018). Muitos estudos têm demonstrado a possível efetividade do uso de ácaros predadores Mesostigmata no manejo de *Meloidogyne*, como por exemplo, *Stratiolaelaps scimitus* (Womersley) (Laelapidae), *Blattisocius dolichus* Ma (Blattisociidae), *Protogamasellus mica* (Athias-Henriot) (Ascidae) e *Neoseiulus barkeri* Hughes (Phytoseiidae) (Zhou et al., 2012; Xu et al., 2014; Azevedo et al., 2020b; Manwaring et al., 2020; Yang et al., 2020).

No Brasil, Rhodacaridae tem sido uma das famílias mais encontradas em estudos de diversidade de ácaros Mesostigmata edáficos (Azevedo et al., 2020a; Barros et al., 2021; Castro et al., 2021). Os ácaros dessa família são conhecidos por habitarem camadas mais profundas do solo (Lindquist et al., 2009; Castilho et al., 2015), coincidindo com o local de maior ocorrência de fitonematoides. Por isso, espécies de Rhodacaridae podem ser candidatas no manejo de *Meloidogyne*, por habitarem locais próximos a ocorrência desses fitonematoides (Prado, 2023).

Espécies de *Protogamasellopsis* (Rhodacaridae) foram encontrados associadas a raízes de citros, na Florida, EUA, possivelmente se alimentando de nematoides (Walter e Kaplan, 1990). Castilho et al. (2009) obtiveram resultados promissores estudando o potencial de predação de *Protogamasellopsis zaheri* Abo-Shnaf, Castilho & Moraes (Rhodacaridae) (citado como *Protogamasellopsis posnaniensis* Wisniewski & Hirschmann) sobre o nematoide de vida livre *Rhabditella axei* (Cobbold) (Nematoda: Rhabditidae). Prado (2018) estudou o ciclo de vida de *P. zaheri* quando alimentado com o J2 de *M. incognita*, obtendo boa taxa de oviposição e alta taxa de sobrevivência. Porém, nesse estudo não foi verificado a capacidade de predação, nem a possibilidade do mesmo se alimentar dos ovos do fitonematoide.

Levando em consideração que os estágios de ovo e J2 de *Meloidogyne* spp. são as formas acessíveis aos ácaros predadores no solo, o objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial de *P. zaheri* como agente de controle biológico de *M. incognita* por meio de experimentos que possibilitaram (1) avaliar o ciclo de vida de *P. zaheri* ao se alimentar de ovos de *M. incognita*, e verificar se é uma presa favorável ao seu desenvolvimento e reprodução; (2) e avaliar o potencial de predação do ácaro sobre *M. incognita* e sobre o nematoide de vida livre *R. axei*. *Rhabditella axei* é um nematoide bacteriófago, facilmente multiplicado em laboratório e tem se mostrado um alimento adequado para criação de ácaros predadores, além de servir como alimento suplementar em campo, aumentando a eficiência do controle biológico de pragas quando liberado junto com os ácaros predadores (Azevedo et al., 2019, 2020b).

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Espécimes

Os espécimes de *M. incognita*, raça 4, foram oriundos de uma população coletada a partir de raízes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) no município de Barreiras, estado da Bahia, e mantidos em casa de vegetação do laboratório de Nematologia (LabNema) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal. A identificação da espécie e raça do nematoide foi realizada no LabNema, com base nos caracteres morfológicos da configuração perineal (Taylor e Netscher, 1974), na morfologia da região labial dos machos, no fenótipo isoenzimático de esterase e na seleção de planta hospedeira (Eisenback et al., 1985; Eisenback e Hirschmann, 1981; Eisenback e Triantaphyllou, 1991). Ovos de *M. incognita* foram extraídos de raízes de algodoeiro infectados três meses antes do início da montagem do presente estudo. Para a extração dos ovos do nematoide das raízes utilizou-se a técnica de Hussey e Barker (1973), com adaptação de Bonetti e Ferraz (1981). As raízes do algodoeiro foram lavadas delicadamente e cortadas em pedaços de 1,0 cm, sendo trituradas em liquidificador com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. As raízes trituradas foram lavadas com água corrente e peneiradas num conjunto de duas peneiras acopladas, a superior de 250 mesh (aberturas de 0,041 mm) e a inferior de 500 mesh (aberturas de 0,025 mm). Os ovos

dos nematoides que ficaram retidos na peneira inferior foram coletados e reservados para serem utilizados no experimento I. Para obtenção de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, ovos extraídos das raízes foram alocados em uma câmara de eclosão. A câmara de eclosão correspondeu a uma placa de Petri contendo uma tela de plástico em sua base sobre a qual foi colocado lenço de papel folha dupla onde foi depositada a suspensão de ovos. Os J2s de *M. incognita* recém eclodidos foram recuperados das câmaras de eclosão após 48 h em incubadora BOD a 27°C e na ausência de luz para serem utilizados no experimento II.

Os espécimes de *R. axei* foram obtidos de uma criação estoque do Laboratório de Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, iniciada em 2016. Essa criação originou-se de espécimes coletados de área de pastagem em Piracicaba – SP, Brasil. A criação foi mantida em potes plásticos de 500mL, oferecendo vagens picadas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) como substrato para seu desenvolvimento. A identificação da espécie foi confirmada pelo Dr. Lynn Carta, pesquisador do laboratório de Biologia e Diversidade Genética em Micologia e Nematologia, departamento de agricultura dos Estados Unidos das Américas (USDA-ARS), Beltsville, MD, EUA.

Os espécimes de *P. zaheri* foram obtidos de uma criação estoque do Laboratório de Acarologia, ESALQ/USP, iniciada em 2014 a partir de espécime coletada de substrato de cultivo de cogumelo *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann em Piracicaba – SP, Brasil. A criação foi mantida de acordo com uma adaptação da metodologia de Freire e Moraes (2007), em potes plásticos de 500mL, tendo como substrato vermiculita umedecida. Os predadores foram alimentados semanalmente com o ácaro *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Astigmatina: Acaridae), em diversos estágios de desenvolvimento, criados sobre ração comercial para cães. As identificações das espécies de ácaros foram realizadas com base nos caracteres morfológicos (Castilho et al., 2012; Colloff, 2009).

As criações dos ácaros e do nematoide de vida livre foram mantidas em ambiente climatizado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $95 \pm 5\%$ UR e na ausência de luz.

2.2.2. Experimento I: Biologia de *Protogamasellopsis zaheri* alimentado com ovos de *Meloidogyne incognita*

A unidade experimental correspondeu a uma placa de Petri plástica (1,2 cm altura x 2,5 cm diâmetro), cuja base foi coberta com uma camada de 0,5 cm de uma mistura de gesso e carvão ativado na proporção 9:1, mantida sempre úmida (Abbatiello, 1965). No centro da unidade experimental foi colocada uma pequena porção de fios de algodão onde foi depositada a dieta (ovos de *M. incognita*), coberto com um pequeno pedaço de lamínula para evitar seu ressecamento. A unidade experimental foi vedada com filme plástico transparente para evitar a fuga dos ácaros. Todo o experimento foi mantido em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $95 \pm 5\%$ UR e na ausência de luz.

Para iniciar o experimento, 160 fêmeas adultas de *P. zaheri* foram transferidas para oito placas de Petri (20 ácaros por placa) de 1,5 cm de altura e 9,0 cm de diâmetro cujas bases foram cobertas com uma camada da mistura de gesso e carvão ativado, conforme mencionado acima. As placas de Petri foram observadas 6 h depois, transferindo cada ovo do predador individualmente para uma unidade experimental (descrita acima). O experimento iniciou com 48 ovos.

Em cada uma dessas unidades experimentais foram inoculadas diariamente cerca de 500 ovos de *M. incognita*, em 20 μL de suspensão, depositados sobre os fios de algodão, com o auxílio de uma pipeta automática. A base das unidades experimentais foi umedecida diariamente com água destilada até o ponto de saturação, também com o auxílio de uma pipeta.

A duração de cada estágio de desenvolvimento e a sobrevivência do ácaro predador foram avaliadas a cada 6 h a partir do isolamento do ovo até a emergência do adulto. A partir da emergência do adulto as observações foram feitas a cada 24 h avaliando a oviposição e a sobrevivência de cada fêmea. Por se tratar de uma espécie com partenogênese telítoca (Castilho et al., 2009), o acasalamento não foi realizado. Durante a avaliação da oviposição por fêmea, os ovos eram contados e retirados da unidade experimental. Destes ovos, cem (100) foram alocados para os testes de taxa de eclosão e razão sexual da prole.

2.2.3. Experimento II: Teste de predação e oviposição

Este teste foi realizado seguindo a metodologia proposta por Furtado et al. (2007) e adaptado por Castilho et al. (2009) para ácaros edáficos. A unidade experimental correspondeu a uma placa de Petri plástica (1,2 cm altura x 2,5 cm diâmetro), cuja base foi coberta com uma camada de 0,5 cm de ágar 5%, similar aos trabalhos realizados por Chen et al. (2013) e Xu et al. (2014). Um pequeno pedaço (0,5 cm) de uma mistura de gesso e carvão ativado, na proporção 9:1, foi colocado no centro da unidade experimental sobre o ágar já solidificado, para servir de superfície para oviposição do ácaro. A unidade experimental foi vedada com filme de plástico transparente para evitar a fuga dos ácaros. Todo o experimento foi mantido em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $95 \pm 5\%$ UR e na ausência de luz.

Os nematoides, separadamente, foram inoculados sobre o ágar. Em cada unidade experimental foram inoculados 200 machos de *R. axei* ou 500 J2 de *M. incognita*. Esse número de presas foi definido através de pré-testes, para que o ácaro predador tivesse um número bem superior de presas do que consome diariamente. No presente experimento foi importante adicionar apenas os machos de *R. axei* pois as fêmeas poderiam se reproduzir o que dificultaria estimar o consumo. Em relação ao *M. incognita*, foi escolhido J2 como presa, pois devido ao teste anterior, juntamente com o estudo de Prado (2018), supõe-se ser a fase mais adequada ao ácaro predador.

Uma única fêmea adulta de *P. zaheri* foi liberada por unidade experimental, com o auxílio de um pincel. A taxa de predação e a oviposição de *P. zaheri* foi avaliada a cada 24 h por três dias consecutivos. Para isso, inicialmente os ovos do ácaro predador foram contabilizados e retirados da unidade experimental. Posteriormente a unidade experimental foi enxaguada com água potável sobre uma placa de Petri de vidro por três vezes, assim como o ágar foi retirado e lavado de ambos os lados, sendo os nematoides retirados do meio aquoso por sucção, com o auxílio de uma ponteira de 200 μL , e contabilizados. Devido a esse processo, diariamente as fêmeas do ácaro predador foram transferidas para uma nova unidade experimental contendo a quantidade inicial de nematoides. Para ambas as presas foi realizado um tratamento controle em que os nematoides foram inoculados, porém não foi liberado o ácaro predador, para verificar a mortalidade natural da presa na unidade experimental. Para cada tratamento foram realizadas 40 repetições. As inoculações e as avaliações foram feitas sob estereomicroscópio Leica® M165C.

2.2.4. Análise Estatística

No experimento I, os parâmetros de tabela de vida (Henderson e Southwood, 2016) avaliados foram: R_0 = taxa de reprodução líquida (Eq.1); T = tempo médio entre gerações (Eq. 2); r_m = taxa intrínseca de aumento em número (Eq. 3); TD = tempo levado para dobrar a população em dias (Eq. 4); λ = taxa finita de aumento em dias (Eq. 5). Os cálculos para estimar os parâmetros foram realizados conforme descrito por Maia et al. (2000) usando o programa estatístico SAS® OnDemand for Academics (SAS Institute, 2021).

$$R_0 = \sum (l_x m_x) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$T = (\sum l_x m_x x) / (\sum l_x m_x) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$r_m = \ln(R_0) / T \quad (\text{Eq. 3})$$

$$TD = \ln(2) / r_m \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\lambda = e^{r_m} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde, m_x é o número médio de ovos do sexo feminino postos por fêmea em cada data de oviposição e l_x é o índice de sobrevivência acumulado até a idade x .

No experimento II, foi analisado se os dados de oviposição atendiam aos pressupostos de normalidade e de homoscedasticidade por meio do teste de Shapiro-Wilk e o teste de homogeneidade de variâncias de Levene; ao atender os pressupostos, foi realizado teste t de student, comparando dois grupos com amostras independentes (dieta composta por *R. axei* ou *M. incognita*); ambos os testes foram realizados por meio do software estatístico RStudio utilizando funções “shapiro.test()”, “leveneTest()” (pacote car) e “t.test”, respectivamente. Como o parâmetro de interesse é o número de presas consumidas o valor da mortalidade corrigida (M_c) foi aplicado para cada espécie de nematoide presa. A mortalidade corrigida dos nematoides foi calculada segundo a Fórmula de Abbott (1925) (Eq. 6). A eficiência de conversão de alimento ingerido (ECI) em prole foi calculada segundo fórmula proposta por Omkar e Pervez (2004) (Eq. 7).

$$M_c (\%) = (Pf_x - Pf_y) / Pf_x \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde, M_c é a mortalidade corrigida, Pf_x é a população final de nematoides recuperada no controle, e Pf_y é a população final de nematoides recuperada no tratamento.

$$ECI = (n_P / n_C) \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde, *ECI* é a eficiência de conversão de alimento ingerido em prole, n_P é o número de ovos produzidos por fêmea e n_C é o número de nematoides consumido por fêmea.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Experimento I: Biologia de *Protogamasellopsis zaheri* alimentado com ovos de *Meloidogyne incognita*

Protogamasellopsis zaheri foi capaz de completar o seu ciclo de vida e se reproduzir ao se alimentar de ovos de *M. incognita* (Tabela 1). A larva eclodiu do ovo em média após $4,0 \pm 0,1$ dias de incubação, teve longevidade média de $1,4 \pm 0,1$ dias e taxa de sobrevivência de 91,7%. O estágio de protoninfa durou em média $4,1 \pm 0,1$ dias, com taxa de sobrevivência de 90,9%. O estágio de deutoninfa durou em média $4,3 \pm 0,2$ dias, com taxa de sobrevivência de 95,2%. O período de ovo à adulto durou em média $13,8 \pm 0,2$ dias. A fêmea adulta emergiu em média $9,6 \pm 0,2$ dias após a eclosão da larva, com 79,2% dos indivíduos atingindo a fase adulta.

O tamanho e a pigmentação do ácaro foram aumentando e se intensificando a cada estágio sucessivo, passando de uma coloração branco leitosa na fase de larva para marrom claro na fase adulta. Ao final de cada estágio imaturo houve um período de pré-ecdise em que o ácaro se manteve em repouso absoluto e não se alimentou. Nesse período pré-ecdise, os ácaros ficavam com o primeiro par de pernas e os palpos esticados para a região anterior do corpo.

Todas as fases de desenvolvimento de *P. zaheri*, exceto o período de pós-oviposição, foram mais curtos com J2 (Prado, 2018) do que com ovos de *M. incognita* como alimento. Apesar do período de oviposição do ácaro predador ter sido mais longo com ovos de *M. incognita* como alimento, a fecundidade foi menor do que quando oferecido J2 (Prado, 2018). Esses resultados indicam que a fase J2 de *M. incognita* foi mais adequada para o desenvolvimento e reprodução de *P. zaheri*. As populações de *P. zaheri* e *M. incognita* do presente estudo e do estudo de Prado (2018) foram provenientes das mesmas colônias.

No presente estudo, o período de ovo a adulto em *P. zaheri* ($13,8 \pm 0,2$ dias) foi maior do que o observado por Rossini et al. (2022) quando alimentados com ovos

Tabela 1. Duração dos diferentes estágios de desenvolvimento (dias \pm EP) [n] e parâmetros reprodutivos de *Protogamasellopsis zaheri* alimentado com ovos ou juvenis de segunda estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $95 \pm 5\%$ RH e no escuro.

Parâmetro	Tipo alimento	
	Ovos Média \pm EP [n]	J2 (Prado, 2018) Média \pm EP [n]
Ovo	4,0 \pm 0,1 [48]	3,5 \pm 0,1 [43]
Larva	1,4 \pm 0,1 [48]	1,0 \pm 0,2 [43]
Protoninfa	4,1 \pm 0,1 [44]	2,6 \pm 0,3 [42]
Deutoninfa	4,3 \pm 0,2 [40]	2,8 \pm 0,4 [42]
Ovo-adulto	13,8 \pm 0,2 [38]	9,9 \pm 0,6 [42]
Pré-oviposição	2,7 \pm 0,1 [38]	1,9 \pm 0,5 [42]
Oviposição	33,3 \pm 0,6 [38]	23,3 \pm 4,7 [39]
Pós-oviposição	4,4 \pm 0,7 [38]	4,5 \pm 2,7 [39]
Longevidade	38,2 \pm 1,18 [38]	29,7 \pm 0,62 [39]
Parâmetros reprodutivos		
Fecundidade ^a	34,8 \pm 1,6 [38]	44,2 \pm 1,52 [39]
Viabilidade ovos (F1)	91% [100]	89% [200]
% fêmeas	100 [38]	100 [39]
% fêmeas (F1)	100 [91]	100 [178]

^aNúmero total de ovos produzidos por fêmeas durante todo o ciclo de vida.

ou J2 do nematoide de cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe (Nematoda: Heteroderidae) (9,1 e 9,7 dias respectivamente). No entanto, *P. zaheri* apresentou fecundidade (34,8) um pouco maior quando alimentado com ovos de *M. incognita* do que com ovos ou J2 de *H. glycines*, com aproximadamente 30 e 31 ovos por fêmeas, respectivamente (Rossini et al., 2022).

O período de ovo a adulto de *P. zaheri* ao se alimentar com ovos de *M. incognita* também foi maior do que o observado por Castilho et al. (2009) ao alimentar *P. zaheri* com ácaros adultos *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Astigmatina: Acaridae) (cerca de 8,6 dias), uma presa padrão usada para a manutenção de ácaros predadores em laboratório. Além disso, Castilho et al. (2009) observaram que fêmeas de *P. zaheri* alimentada com *T. putrescentiae* ovipositaram em média 106,4 ovos por fêmea durante seu ciclo reprodutivo, fecundidade muito maior do que o observado quando alimentadas com *M. incognita*.

As fêmeas adultas de *P. zaheri* apresentaram uma longevidade maior (38,2 dias) quando alimentadas com ovos de *M. incognita* do que observado por Prado (2018) quando alimentadas com J2 de *M. incognita* (29,7 dias) e do observado por Rossini et al. (2022) quando alimentadas com ovos (25,3 dias) e J2 (26,0 dias) de *H. glycines*. A maior diferença na longevidade de adultos está no período de oviposição, 33,3 dias no presente estudo, comparado aos 23,3 dias em Prado (2018) e 20,5 quando alimentado com ovos e 21,4 quando alimentado com J2 em Rossini et al. (2022).

Ao comparar estudos da biologia de *P. zaheri* com diferentes presas observa-se existir um trade-off entre expectativa de vida e fecundidade. A literatura sobre dietas restritivas é dominada por exemplos de correlação entre aumento da expectativa de vida e diminuição da fecundidade, mas os mecanismos deste efeito não são conhecidos (Adler et al., 2013). Este trade-off já foi observado para ácaro predador Mesostigmata (Lee et al., 2020). Uma das hipóteses é que exista uma realocação adaptativa de recursos da reprodução para a sobrevivência pois quando os recursos são escassos, o investimento em reprodução não compensa (Adler et al., 2013). Contudo nos experimentos com *P. zaheri* não houve restrição calórica, todas as presas foram ofertadas *ad libitum* o que sugere que tal trade-off esteja relacionado a qualidade nutricional de suas presas.

Os parâmetros biológicos determinados neste estudo indicam que a população de *P. zaheri* ao se alimentar exclusivamente de ovos de *M. incognita* foi capaz de aumentar a uma taxa de aproximadamente 24 vezes (Taxa de reprodução líquida, $R_0 = 23,9$) a cada 25 dias (Tempo médio de geração, $T = 24,6$), com crescimento populacional diário de 14% (Taxa finita de aumento, $\lambda = 1,14$) e produção de 0,13 fêmeas por fêmea por dia (taxa intrínseca de crescimento populacional, $r_m = 0,13$), com potencial em duplicar a população em número a cada cinco dias ($TD = 5,4$). Os valores dos parâmetros de tabela de vida e fertilidade demonstraram um crescimento populacional de *P. zaheri* mais lento quando alimentadas com ovos de *M. incognita* do que com J2 de *M. incognita* (Prado, 2018), ovos e J2 de *H. glycines* (Rossini, 2022), e adultos de *T. putrescentiae* (Castilho et al., 2009).

O ciclo de vida de outras espécies de ácaros Mesostigmata também foram estudadas com *M. incognita* como alimento, porém sempre oferecendo a fase de J2.

Yang et al. (2020) observaram que uma população de *S. scimitus* apresentou uma taxa diária de crescimento populacional de 18% e produção de 0,17 fêmeas por fêmea por dia com J2 de *M. incognita* como alimento. Zhou et al. (2012) observaram uma taxa de crescimento de 20%, produção de 0,18 fêmeas por fêmea por dia, fecundidade de 41,1 ovos e longevidade de adultos de cerca de 35 dias em uma população de *N. barkeri* alimentada com J2 de *M. incognita*. Esses dados foram muito próximos ao encontrado no presente estudo para *P. zaheri*, porém *N. barkeri* são ácaros que vivem na camada mais superficial do solo ou folheto e predam na parte aérea da planta, limitando seu uso no controle biológico de nematoides-das-galhas que vivem na rizosfera (McMurtry et al., 2013; Wu et al., 2014).

Ácaros Acaridae (Astigmatina) também já foram estudados como potenciais predadores de *M. incognita*. Abou El-Atta e Osman (2016) observaram que *T. putrescentiae* foi capaz de sobreviver e se reproduzir ao se alimentar de massa de ovos de *M. incognita*, com crescimento populacional diário de 34% ($\lambda = 1,34$) e taxa intrínseca de crescimento populacional de 0,29 ($rm = 0,29$). Abou El-Atta et al. (2014) observaram que *Sancassania berlesei* (Michael) foi capaz de se desenvolver e reproduzir sobre *M. incognita* ($rm = 0,23$). Apesar desses trabalhos indicarem que ácaros Acaridae consomem esses nematoides, o seu uso como agentes de controle biológico tem riscos, pois podem causar alergias cutâneas e respiratórias em humanos, além de serem problemas em produtos armazenados.

2.3.2. Experimento II: Teste de predação e oviposição

Protogamasellopsis zaheri se alimentou das duas espécies de nematoides, consumindo diariamente um maior número de J2 de *M. incognita* se comparado com machos de *R. axei* (Tabela 2). No tratamento controle foi observada mortalidade de cerca de 2% de *M. incognita* e cerca de 11% de *R. axei*. Sendo assim, levando em consideração a mortalidade corrigida (Abbott, 1925), em média, uma fêmea de *P. zaheri* predou cerca de 318,7 J2 de *M. incognita* e 72,1 adultos de *R. axei*.

As médias de consumo diário do ácaro predador não foram comparadas estatisticamente devido às diferentes biomassas dos organismos testados como presas. Adultos machos de *R. axei* medem cerca de 900 a 1.550 μm (Rakhshanpour et al., 2012) e J2 de *M. incognita* medem cerca de 200 a 380 μm (Kaur & Attri, 2013).

Tabela 2. Predação (número de nematoides predados por fêmea por dia), oviposição (número de ovos produzidos por fêmea por dia) e sobrevivência (%) de *Protogamasellopsis zaheri* alimentada com juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* ou adulto macho (♂) de *Rhabditella axei*, a $25\pm 1^\circ\text{C}$, $95\pm 5\%$ UR e no escuro, durante 3 dias.

Presa	Predação (\pm EP)¹	Oviposição (\pmEP)²	ECI³	Sobrevivência
<i>M. incognita</i>	318,7 \pm 21,1	2,1 \pm 0,2 b	0,66%	100%
<i>R. axei</i>	72,1 \pm 3,6	5,1 \pm 0,3 a	7,07%	100%

¹Aplicado a mortalidade corrigida pela Fórmula de Abbott (1925). ²Homogeneidade da variância (Levene): $p= 0,19$; normalidade (Shapiro-Wilk): $p= 0,41$; teste t de Student: $p<0,001$. ³Eficiência de conversão de número de presas ingeridas em número de ovos produzidos (Omkar e Pervez, 2004).

Apesar de *P. zaheri* ser capaz de se reproduzir ao se alimentar de ambos os nematoides separadamente, a taxa de oviposição foi significativamente maior quando alimentado com *R. axei*, comparado a *M. incognita* (Tabela 2). Esses dados sugerem uma maior eficiência de conversão de presa consumida (ECI) em prole quando se alimenta de *R. axei* do que com *M. incognita* (Tabela 2).

Yang et al. (2020) estudaram a predação de *S. scimitus* sobre J2 de *M. incognita* em condições experimentais similares (base de água ágar 5% e densidade inicial de presa com 500 juvenis), e observaram uma média de consumo de 193 nematoides por ácaro predador. No presente estudo observamos uma voracidade maior de *P. zaheri* do que o observado para *S. scimitus*, apesar do primeiro ser um ácaro menor, com idiossoma medindo cerca de 550 μm em comparação a cerca de 630 μm de *S. scimitus* (Womersley, 1956; Abo-Shnaf et al., 2013).

Protogamasellopsis zaheri apresentou maior voracidade do que *B. dolichus* e *N. barkeri* sobre J2 de *M. incognita*, ao comparar o presente estudo com os conduzidos por Xu et al. (2014) e Zhou et al. (2012) em condições similares. Xu et al. (2014) observaram que fêmeas de *B. dolichus* consumiram em média 48 J2 por dia quando disponibilizados 300 juvenis por unidade experimental, uma capacidade de predação de aproximadamente 15% da observada em *P. zaheri*. Zhou et al. (2012) observaram que *N. barkeri* consumiram em média 60 juvenis por dia, porém, como já citado acima, é pouco provável que este ácaro ataque os nematoides na rizosfera das plantas.

A média de oviposição diária de *P. zaheri* quando se alimentou de J2 de *M. incognita* no presente estudo foi muito próxima ao observado por Rossini et al. (2022) para essa mesma espécie de ácaro predador quando alimentada com J2 de *H. glycines* (cerca de dois ovos). Além disso, ambos os trabalhos mostram que a fecundidade diária de *P. zaheri* é maior quando se alimenta de *R. axei* do que com os fitonematoides. Castilho et al. (2009) e Rossini et al. (2022) também estudaram a predação de *P. zaheri* sobre o nematoide de vida livre *R. axei* e observaram uma taxa de oviposição média de 6,3 e 3,6 ovos por fêmea por dia, respectivamente. A média de oviposição diária de *R. axei* por *P. zaheri* no presente estudo está num valor intermediário entre o valor observado por estes dois trabalhos. A variabilidade pode estar relacionada com o vigor da população do ácaro predador assim como do nematoide presa, visto que ambos os experimentos foram realizados em condições controladas na mesma faixa de temperatura e umidade.

Azevedo et al. (2018) estudaram a fecundidade de *Macrocheles embersoni* Azevedo, Castilho & Berto (Macrochelidae) sobre *R. axei* e observaram que uma fêmea oviposita em média 5,4 ovos por dia, valor muito próximo ao observado no presente estudo para *P. zaheri*. Tais resultados sugerem o potencial de *R. axei* como presa para viabilizar a multiplicação de ácaros predadores edáficos em laboratório e seu uso como alimento alternativo no controle biológico aplicado (Azevedo et al., 2018 ; Azevedo et al. 2019).

Nematoides de vida livre devem ser um dos alimentos preferidos de ácaros predadores Mesostigmata edáficos no ambiente natural. Heidemann et al. (2014) constataram por meio de análise molecular do conteúdo estomacal que cerca de 83% dos indivíduos de *Pergamasus septentrionalis* (Oudemans) (Parasitidae) consumiram o nematoide de vida livre *Plectus* spp. em seu ambiente natural.

Complementando Prado (2018), o presente estudo demonstrou a capacidade *P. zaheri* de preda os estágios mais jovens de *M. incognita*, e completar o seu ciclo de vida. Este ácaro predador foi selecionado para este estudo por possuir características morfológicas que lhe permitem viver sob a superfície do solo, onde estão os *M. incognita*. Embora os resultados obtidos no estudo não possam ser extrapolados para concluir sobre a capacidade do predador de controlar *M. incognita* em campo, esse é o primeiro passo para essa determinação. Os resultados obtidos e

a importância econômica de *M. incognita* justificam a realização de pesquisas complementares e mais complexas, para avaliar a eficiência do predador em condições de semi-campo e campo.

Referências

- Abad P, Castagnone-Sereno P, Rosso MN, Engler JA, Favery B (2009) Invasion, feeding and development. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (Eds.) **Root-knot Nematodes**. Wallingford: CABI, p.163–181.
- Abbatiello MJ (1965) A culture chamber for rearing soil mites. **Turtox News** 43:162–164.
- Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology** 18:265–267.
- Abo-Shnaf RIA, Castilho RC, Moraes GJ (2013) Two new species of Rhodacaridae (Acari: Mesostigmata) from Egypt and a key to the species of the family from the Mediterranean region. **Zootaxa** 3718:28–38.
- Abou El-Atta DAEM, Osman MA (2016) Development and reproductive potential of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) on plant-parasitic nematodes and artificial diets. **Experimental and Applied Acarology** 68:477–483.
- Abou El-Atta DAEM, Ghazy NA, Osman MA (2014) Effects of temperature on the life-history traits of *Sancassania (Caloglyphus) berlesei* (Acari: Astigmatina: Acaridae) feeding on root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae). **Experimental and Applied Acarology** 64:299–307.
- Adler MI, Cassidy EJ, Fricke C, Bonduriansky R (2013) The lifespan-reproduction trade-off under dietary restriction is sex-specific and context-dependent. **Experimental Gerontology** 48:539–548.
- Azevedo EB, Azevedo LH, Moreira GF, Santos FA, Carvalho MAF, Sarmiento RA, Castilho RC (2020a) Diversity of soil gamasine mites (Acari: Mesostigmata: Gamasina) in an area of natural vegetation and cultivated areas of the cerrado biome in northern Brazil. **Diversity** 12(9):331.
- Azevedo LH, Ferreira MP, Castilho RC, Cançado PHD, Moraes GJ (2018) Potential of *Macrocheles* species (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae) as control agents of harmful flies (Diptera) and biology of *Macrocheles embersoni* Azevedo, Castilho and Berto on *Stomoxys calcitrans* (L.) and *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Biological Control** 123:1–8.
- Azevedo LH, Leite LG, Chacon-Orozco JG, Moreira MFP, Ferreira MP, González-Cano LM, Borges V, Rueda-Ramírez D, Moraes GJ, Palevsky E (2019) Free living nematodes as alternative prey for soil predatory mites: An interdisciplinary case study of conservation biological control. **Biological Control** 132:128–134.

Azevedo LH, Moreira MFP, Pereira GG, Borges V, Moraes GJ, Inomoto MM, Vicente M, Siqueira Pinto M, Peres LP, Rueda-Ramírez D, Carta L, Meyer SLF, Mowery J, Bauchan G, Ochoa R, Palevsky E (2020b) Combined releases of soil predatory mites and provisioning of free-living nematodes for the biological control of root-knot nematodes on 'Micro Tom tomato'. **Biological Control** 146:104280.

Barros ARA, Azevedo EB, Silva ES, Castilho RC, Moraes GJ (2021) Diversity of edaphic Gamasina mites (Acari: Mesostigmata) in different ecosystems of the Caatinga biome in northeast Brazil. **Systematic and Applied Acarology** 26:1301–1313.

Bonetti J, Ferraz J (1981) Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira** 6:553.

Castagnone-Sereno P (2006) Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes and their ability to overcome plant resistance genes. **Heredity** 96:282–289.

Castilho RC, Moraes GJ, Silva ES, Silva LO (2009) Predation potential and biology of *Protogamasellopsis posnaniensis* Wisniewski & Hirschmann (Acari: Rhodacaridae). **Biological Control** 48:164–167.

Castilho RC, Moraes GJ, Halliday B (2012) Catalogue of the mite family Rhodacaridae Oudemans, with notes on the classification of the Rhodacaroidea (Acari: Mesostigmata). **Zootaxa** 3471:1–69.

Castilho RC, Venancio R, Narita JPZ (2015) Mesostigmata as biological control agents, with emphasis on Rhodacaroidea and Parasitoidea. In: Carrillo D, Moraes GJ, Peña JE (Eds.) **Prospects for Biological Control of Plant Feeding Mites and Other Harmful Organisms**. Florida: Springer, 1–31.

Castro MC, Azevedo EB, Britto EPJ, Barreto MR, Pitta RM, Castilho RC, Moraes GJ (2021) Gamasina mite communities (Acari: Mesostigmata) in grain production systems of the southwestern Brazilian Amazon. **Systematic and Applied Acarology** 26:1–14.

Chen YL, Xu CL, Xu XN, Xie H, Zhang BX, Qin HG, Zhou WQ, Li DS (2013) Evaluation of predation abilities of *Blattisocius dolichus* (Acari: Blattisociidae) on a plant-parasitic nematode, *Radopholus similis* (Tylenchida: Pratylenchidae). **Experimental and Applied Acarology** 60:289–298.

Colloff MJ (Eds.) (2009) **Dust mites**. Dordrecht: Springer, 583p.

Chen J, Li QX, Song B (2020). Chemical nematicides: recent research progress and outlook. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 68:12175–12188.

Demite PR, Moraes GJ, McMurtry JA, Denmark HA, Castilho, RC (2022) **Phytoseiidae Database**. Disponível em: www.lea.esalq.usp.br/phytoseiidae (acesso 01/12/2022).

Dong LQ, Zhang KQ (2006) Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil** 288:31–45.

Eisenback JD, Sasser J, Carter C (1985) Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne*

spp.). In.: Sasser JN, Carter CC (Eds.) **An advanced treatise on *Meloidogyne*: Biology and control**. North Carolina: North Carolina State University, p.95–112.

Eisenback JD, Triantaphyllou HH (1991) Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In.: Nickle WR (Eds.). **Manual of Agricultural Nematology**. Flórida, EUA: CRC Press, p.191–274.

Eisenback JD, Hirschmann H (1981) Identification of *Meloidogyne* species on the basis of head shape and, stylet morphology of the male. **Journal of nematology** 13: 513–521.

Freire RAP, Moraes GJ (2007) Mass production of the predatory mite *Stratiolaelaps scimitus* (Womersley) (Acari: Laelapidae). **Systematic and Applied Acarology** 12:117–119.

Furtado IP, Moraes GJ, Kreiter S, Tixier MS, Knapp M (2007) Potential of a Brazilian population of the predatory mite *Phytoseiulus longipes* as a biological control agent of *Tetranychus evansi* (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae). **Biological Control** 42:139–147.

Heidemann K, Ruess L, Scheu S, Maraun M (2014) Nematode consumption by mite communities varies in different forest microhabitats as indicated by molecular gut content analysis. **Experimental and Applied Acarology** 64:49–60.

Henderson PA, Southwood TRE (2016) **Ecological methods**. 4th Edition. USA: Wiley-Blackwell, 656 p.

Hussey R, Barker K (1973) A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter** 57:1025–1028.

Jones JT, Haegeman A, EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, Perry RN (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology** 4:946–961.

Kaur H, Attri R (2013) Morphological and morphometrical characterization of *Meloidogyne incognita* from different host plants in four districts of Punjab, India. **Journal of Nematology** 45:122–127.

Lee MH, Fan QH, Yu L, Zhang ZQ (2020) Caloric restriction extends lifespan of mothers at the expense of offspring survival in a predatory mite (*Neoseiulus cucumeris*). **Systematic and Applied Acarology** 25:1948–1962.

Lindquist EE, Krantz GW, Walter DE (2009) Order Mesostigmata. In: Krantz GW, Walter DE (Eds) **Manual of Acarology**. 3ed. Texas: Tech University Press, p.124–232.

Maia ADHN, Luiz AJB, Campanhola C (2000) Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife technique: Computational aspects. **Journal of Economic Entomology** 93:511–518.

Manwaring M, Nahrung HF, Wallace H (2020) Attack rate and prey preference of *Lasioseius subterraneus* and *Protogamasellus mica* on four nematode species. **Experimental and Applied Acarology** 80:29–41.

Meher HC, Gajbhiye VT, Chawla G, Singh G (2009) Virulence development and genetic polymorphism in *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood after prolonged exposure to sublethal concentrations of nematicides and continuous growing of resistant tomato cultivars. **Pest Management Science** 65:1201–1207.

Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (Eds.) **Root-knot Nematodes**. Wallingford: CABI, p.1-17.

Nilusmas S, Mercat M, Perrot T, Djian-Caporalino C, Castagnone-Sereno P, Touzeau S, Calcagno V, Mailleret L (2020) Multi-seasonal modelling of plant-nematode interactions reveals efficient plant resistance deployment strategies. **Evolutionary Applications** 13(9):2206–2221.

NRAC (Nematicide Resistance Action Committee). 2018. Nematicide resistance risk statement. IRAC-Online. <https://www.irc-online.org/documents/nematicide-resistance-risk-statement/?ext=pdf>. Acesso em fevereiro 2023.

Omkar, Pervez A (2004) Functional and numerical responses of *Propylea dissecta* (Col., Coccinellidae). **Journal of Applied Entomology** 128:140–146.

Prado TJ (2018) **Biologia e potencial do ácaro predador *Protogamasellopsis zaheri* (Mesostigmata: Rhodacaridae) como agente de controle do nematoide de galha *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae)**. 32 p. Dissertação [Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola)] – UNESP, Jaboticabal.

Rakhshanpour A, Youssefi MR, Marhaba Z, Aryaiepour M, Mobedi I, Kia EB, Rahimi MT (2012) The morphological and morphometric study of *Rhabditis axei* from *Atherurus macrourus* (Asiatic Brush-tailed Porcupine). **Global Veterinaria** 8:305–307.

Rossini LACJ, Prado TJ, Ferreira RJ, Soares PLM, Moraes GJ, Castilho RC (2022) Suitability of the soybean cyst nematode as prey to *Protogamasellopsis zaheri* (Acari: Mesostigmata: Rhodacaridae). **Biological Control** 170:104905.

Stirling GR (2021) Surrounding the swollen roots of sweetpotato with a decomposing band of an organic amendment enhances nematode-suppressive services and reduces damage caused by root-knot nematode. **Australasian Plant Pathology** 50:151–168.

Taylor DP, Netscher C (1974) An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica** 20:268–269.

Walter DE, Kaplan DT (1990) Antagonists of plant-parasitic nematodes in Florida citrus. **Journal of Nematology** 22:567-573.

Walter DE, Stirling GR (2018) Microarthropods in Australian sugarcane soils: A survey with emphasis on the Mesostigmata as potential regulators of nematode populations. **Acarologia** 58:673-682.

Womersley H (1956) On some new Acarina-Mesostigmata from Australia, New Zealand and New Guinea. **Zoological Journal of the Linnean Society** 42:505–599.

Xu CL, Chen YL, Xu XN, Wang DW, Xie H, Wang ED, Li DS, Zhang BX, Qin HG (2014) Evaluation of *Blattisocius dolichus* (Acari: Blattisociidae) for biocontrol of root-knot

nematode, *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae). **BioControl** 59: 617–624.

Yang SH, Wang D, Chen C, Xu CL, Xie H (2020) Evaluation of *Stratiolaelaps scimitus* (Acari: Laelapidae) for controlling the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae). **Scientific Reports** 10: 5645.

Zhou W, Xu C, Xu X, Zhang B, Qin H, Wang E, Li D, Xie H (2012) The predatory mite *Neoseiulus barkeri* (Acari: Phytoseiidae), a new biocontrol approach for plant-parasitic nematode, and associated development and reproduction. **Chinese Journal of Biological Control** 28:484–489.

CAPÍTULO 3 – Controle biológico do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne incognita*) em cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) com ácaro predador *Protogamasellopsis zaheri* (Mesostigmata: Rhodacaridae)

Resumo – O nematoide-das-galhas, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White), é considerado um dos mais importantes fitonematoides da agricultura mundial, assim como um dos de mais difícil controle. O controle biológico com ácaros predadores edáficos vem se mostrando uma opção no manejo destes parasitos. O ácaro predador *Protogamasellopsis zaheri* Abo-Shnaf, Castilho & Moraes (Mesostigmata: Rhodacaridae), encontrado em diferentes regiões do Brasil, tem se mostrado promissor como agente de controle biológico de *M. incognita* em laboratório. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de *P. zaheri* como agente de controle biológico de *M. incognita* em plantas de tomate (cv. Micro-Tom) em casa-de-vegetação, com e sem a liberação conjunta do nematoide de vida livre *Rhabditella axei* (Cobbold), para servir como alimento suplementar ao predador. A unidade experimental correspondeu a um vaso (415 mL) contendo 350 mL de solo, e uma planta de tomateiro. Quatro tratamentos foram comparados: 1) Controle positivo – sem infestação de *M. incognita* e sem liberação de outros organismos; 2) Controle negativo – Infestação única de 2.000 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* e sem liberação de outros organismos; 3) Infestação única de 2.000 J2 de *M. incognita* e liberação semanal de 40 adultos de *P. zaheri* (15 liberações no total); 4) Infestação única de 2.000 J2 de *M. incognita*, e liberação semanal de 30,000 *R. axei* e de 40 adultos de *P. zaheri* (15 liberações no total). O experimento foi delineado em cinco blocos ao acaso onde cada bloco agrupou 6 repetições de cada um dos tratamentos, totalizando 30 unidades experimentais por tratamento. As unidades foram mantidas em uma casa-de-vegetação climatizada, a 27°C e 70% de umidade relativa. A liberação de *P. zaheri* diminuiu a população de *M. incognita* em 32% e 51% (tratamento 3 e 4, respectivamente) em relação ao tratamento em que as plantas foram infestadas com o fitonematoide e nenhum organismo foi liberado (Controle negativo). Os melhores resultados na produção de frutos de tomate foram observados no grupo de plantas em que o predador foi liberado juntamente com o nematoide de vida livre, sugerindo um possível efeito benéfico da liberação deste nematoide. O presente estudo adicionou novo suporte ao potencial de *P. zaheri* como agente de controle biológico no manejo de *M. incognita*, principalmente quando utilizado nematoide de vida livre como alimento suplementar para esse ácaro predador.

Palavras-chave: Ácaro de solo, controle biológico, fitonematoides, mesofauna, serviços ecossistêmicos

3.1. Introdução

Os fitonematoides causam perdas econômicas em praticamente todas as partes do mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais onde as condições ambientais e as práticas dentro dos sistemas de cultivos agrícolas favorecem o desenvolvimento destes parasitas de plantas (Luc et al., 2005; Mesa-Vale et al., 2020). O cultivo do tomate é uma das culturas mais afetadas negativamente pelos fitonematoides, com perdas que já chegaram a US\$5.5 bilhões por ano (Sasser e Freckman, 1987; Nicol et al., 2011).

Dentre os fitonematoides de importância agrícola, os *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae), conhecidos como nematoides-das-galhas, são os que parasitam a maior gama de plantas cultivadas (Williams-Woodward e Davis, 2001; Jones et al., 2013). Cerca de 90% dos danos causados por estes nos trópicos são atribuídos ao *Meloidogyne arenaria* (Neal), *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) e *Meloidogyne javanica* (Treub) (Castagnone-Sereno, 2006). No Brasil, os nematoides-das-galhas são encontrados em cerca de 45% das áreas com produção de hortícolas, incluindo cultivos de tomate, sendo a frequência de *M. incognita* nestes cultivos estimada em cerca de 70% (Rosa et al., 2013).

O ciclo de vida do nematoide-das-galhas inicia-se com os ovos que são depositados pela fêmea numa matriz gelatinosa, geralmente sobre as galhas. O desenvolvimento embrionário resulta na formação de um juvenil (J1), no interior do ovo. Após a eclosão, o juvenil de segundo estágio (J2) constitui a forma infectiva de plantas (Jones et al. 2013; Nilusmas et al. 2019). Os ovos e os J2 são as formas mais vulneráveis ao controle, antes que o nematoide penetre na raiz da planta hospedeira, justamente por ficarem expostos no ambiente, mais sujeitos às medidas de controle.

Os fitonematoides em geral estão entre as pragas agrícolas de mais difícil controle, sendo o uso de produtos químicos a opção mais utilizada. No entanto, ainda não existem nematicidas com potencial de reduzir significativamente a população de nematoides a níveis que justifiquem a não utilização de outras medidas de controle (Grigolli e Asmus, 2015). O sucesso do controle em áreas infestadas depende de um conjunto de medidas adicionais, como rotação de cultura e pousio, visando

principalmente reduzir o nível populacional e impedir sua multiplicação destes (Oliveira et al., 2009).

O controle biológico é outro método de controle que pode ser explorado no manejo de fitonematoides, incluindo o uso de ácaros predadores edáficos Mesostigmata (Stirling et al., 2017; Prado, 2018; Azevedo et al., 2020a; Yang et al., 2020; Manwaring et al., 2020). No Brasil, um exemplo é o ácaro predador *Protogamaseopsis zaheri* Abo-Shnaf, Castilho & Moraes (Mesostigmata: Rhodacaridae), encontrado em diferentes partes do país (Azevedo et al., 2020; Barros et al., 2021). Em laboratório, este predador tem apresentado bom desempenho biológico ao se alimentar de ovos e J2 de *M. incognita* (Prado, 2018; Capítulo 2 da presente Tese), e também do nematoide-de-cisto, *Heterodera glycines* Ichinohe (Nematoda: Heteroderidae) (Rossini et al., 2022). No entanto, o potencial deste ácaro predador no manejo de fitonematoides em condições de semi-campo ou campo não foi avaliado.

Em laboratório, *P. zaheri* também tem se mostrado capaz de se desenvolver quando alimentado com o nematoide de vida livre *Rhabditella axei* (Cobbold) (Rhabditidae) (Castilho et al., 2009; Capítulo 2 da presente Tese). Este último tem se mostrado um alimento adequado para a criação de ácaros predadores em laboratório, além de servir como alimento suplementar em campo, melhorando a eficiência no manejo de pragas e doenças quando liberado juntamente com certos ácaros predadores (Azevedo et al., 2019, 2020b; Rueda-Ramírez et al., 2023).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de *P. zaheri* como agente de controle biológico de *M. incognita* em plantas de tomate (cv. Micro-Tom) em casa-de-vegetação, com e sem a liberação conjunta de *R. axei*.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Espécimes

Os espécimes de *M. incognita* foram oriundos de uma população coletada a partir de raízes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) no município de Barreiras, estado da Bahia, e mantidos em casa de vegetação do laboratório de Nematologia (LabNema) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade

Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal. A identificação da espécie de nematoide foi realizada no LabNema, com base nos caracteres morfológicos da configuração perineal (Taylor e Netscher, 1974), na morfologia da região labial dos machos, no fenótipo isoenzimático de esterase e na seleção de planta hospedeira (Eisenback et al., 1985; Eisenback e Hirschmann, 1981; Eisenback e Triantaphyllou, 1991). Ovos de *M. incognita* foram extraídos de raízes de algodoeiro infectados três meses antes do início da montagem do presente estudo. Para a extração dos ovos do nematoide das raízes utilizou-se a técnica de Hussey e Barker (1973), com adaptação de Bonetti e Ferraz (1981). As raízes do algodoeiro foram lavadas delicadamente e cortadas em pedaços de 1,0 cm, sendo trituradas em liquidificador com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. As raízes trituradas foram lavadas com água corrente e peneiradas num conjunto de duas peneiras acopladas, a superior de 250 mesh (aberturas de 0,041 mm) e a inferior de 500 mesh (aberturas de 0,025 mm). Os ovos dos nematoides que ficaram retidos na peneira inferior foram coletados. Para obtenção de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, ovos recuperados da extração foram alocados em uma câmara de eclosão. A câmara de eclosão correspondeu a uma placa de Petri contendo uma tela de plástico em sua base sobre a qual foi colocado lenço de papel folha dupla onde foi depositada a suspensão de ovos. Os J2s de *M. incognita* recém eclodidos foram recuperados das câmaras de eclosão após 48 h em incubadora BOD a 27°C e na ausência de luz. Os J2 recuperados foram reservados para inoculação das plantas no presente experimento.

Os espécimes de *R. axei* foram obtidos de uma criação estoque do Laboratório de Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, iniciada em 2016. Essa criação originou-se de espécimes coletados de área de pastagem em Piracicaba – SP, Brasil. A criação foi mantida em potes plásticos de 500mL, oferecendo vagens picadas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) como substrato para seu desenvolvimento. A identificação da espécie foi confirmada pelo Dr. Lynn Carta, pesquisador do laboratório de Biologia e Diversidade Genética em Micologia e Nematologia, departamento de agricultura dos Estados Unidos das Américas (USDA-ARS), Beltsville, MD, EUA.

Os espécimes de *P. zaheri* foram obtidos de uma criação estoque do Laboratório de Acarologia, ESALQ/USP, iniciada em 2014 a partir de espécime coletada de substrato de cultivo de cogumelo *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann em Piracicaba – SP, Brasil. A criação foi mantida de acordo com uma adaptação da metodologia de Freire e Moraes (2007), em potes plásticos de 500mL, tendo como substrato vermiculita umedecida. Os predadores foram alimentados semanalmente com o ácaro *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Astigmatina: Acaridae), em diversos estágios de desenvolvimento, criados sobre ração comercial para cães. As identificações das espécies de ácaros foram realizadas com base nos caracteres morfológicos (Castilho et al., 2012; Colloff, 2009).

As criações dos ácaros e do nematoide de vida livre foram mantidas em ambiente climatizado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $95 \pm 5\%$ UR e na ausência de luz.

3.2.2. Procedimento experimental

A unidade experimental correspondeu a um vaso de polipropileno de 415 mL, contendo 350 mL de solo autoclavado, formado por uma mistura de latossolo vermelho escuro e areia média (1:3 em volume), e com uma planta de tomateiro, (*Lycopersicon esculentum* P. Miller cv. Micro-Tom). As mudas de tomateiro foram transplantadas no trigésimo dia após a semeadura, quando o primeiro par de folhas verdadeiras já estava totalmente formado.

O experimento foi composto por quatro tratamentos: 1) Controle positivo – Sem infestação de *M. incognita* e sem liberação de outros organismos; 2) Controle negativo – Infestação única de 2.000 J2 de *M. incognita* e sem liberação de outros organismos; 3) Infestação única de 2.000 J2 de *M. incognita* e liberação semanal de 40 adultos de *P. zaheri* (15 liberações no total); 4) Infestação única de 2.000 J2 de *M. incognita*, e liberação semanal de 30.000 *R. axei* e de 40 adultos de *P. zaheri* (15 liberações no total).

A inoculação da suspensão (4 mL) com 2.000 J2 de *M. incognita* por vaso foi realizada através de uma pipeta volumétrica, no terceiro dia após o transplante das mudas. A primeira liberação dos ácaros predadores e dos nematoides de vida livre ocorreu no mesmo dia da inoculação de *M. incognita*. Os ácaros predadores foram liberados nas plantas com auxílio de um pincel. A inoculação de *R. axei* foi realizada

em uma suspensão de 5 mL do meio de criação, contendo cerca de 30.000 nematoides (definido em pré-testes). Para evitar que os ácaros predadores fugissem dos vasos foi aplicada uma fina camada de cola entomológica em toda a borda. Essa barreira também ajudou a evitar que outros artrópodes entrassem na unidade experimental.

Cada planta foi nutrida semanalmente com 20 mL de solução nutritiva do tipo Hoagland e Arnon (1950) durante a fase vegetativa, e diariamente durante a fase reprodutiva. Diariamente também foi realizada a irrigação das plantas, à capacidade de campo do solo. As plantas foram mantidas em uma casa-de-vegetação climatizada, a 27°C e 70% de umidade relativa do ar de 70%.

Ao final do experimento (110 dias após o transplântio) foi avaliado o número de ovos, juvenis e adultos de *M. incognita* no sistema radicular e no solo de cada vaso. Para isso, os nematoides foram extraídos das raízes pela técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Bonetti e Ferraz (1981), e foram extraídos do solo pela técnica de Jenkins (1964). Antes de coletar a amostra, todo o solo extraído do vaso foi misturado para homogeneizá-lo. A população de nematoides das raízes e dos solos foi contada em uma câmara de Peters sob um microscópio de 10x.

Foi avaliado o peso dos frutos maduros de cada planta aos 90, 100 e 110 dias após o transplântio. Em cada colheita cada fruto maduro foi retirado da planta e pesado individualmente em balança analítica.

3.2.3. Análise estatística

O experimento foi delineado em blocos ao acaso, com cinco blocos e seis repetições de cada tratamento por bloco, totalizando 30 repetições por tratamento. Cada repetição correspondeu a um vaso (unidade experimental). Os blocos corresponderam a cinco diferentes posições dentro da casa de vegetação que diferiam quanto à exposição a luz solar, umidade relativa do ar e ventilação.

O número de nematoides por vaso foi ajustado ao Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM), com estrutura de erro binomial negativa e link de log. O peso fresco de frutos de tomate produzido por planta foi ajustado ao Modelo Linear de Efeito Misto (LMM), com distribuição normal. Ambos os modelos consistiram em tratamento como fator fixo e bloco como fator aleatório. Comparações post-hoc entre os grupos foram feitas usando Teste de Tukey (Zuur et al., 2016). Ambas as análises foram realizadas

usando o pacote lme4 no software R® (Bates et al., 2015). Verificações apropriadas foram feitas para avaliar a validade do modelo suficiente (Hartig e Lohse, 2022).

3. Resultados e Discussão

O número de *M. incognita* foi menor (qui-quadrado p-value < 0,05) nos tratamentos em que o ácaro predador *P. zaheri* foi liberado, sem ou com o nematoide de vida livre (tratamento 3 – 2302 ± 329 e tratamento 4 – 1677 ± 233, respectivamente), e foi maior no tratamento em que unicamente *M. incognita* foi inoculado sem a liberação de outros organismos (tratamento 2, controle negativo – 3416 ± 693). *Meloidogyne incognita* não foi recuperado no tratamento em que este não foi inoculado e outros organismos não foram liberados (tratamento 1, controle positivo).

O peso de frutos por planta foi menor (qui-quadrado p-value < 0,05) no tratamento em que apenas *M. incognita* foi inoculado (tratamento 2, controle negativo) do que nos demais tratamentos (Figura 1). Entre os tratamentos inoculados com *M. incognita* e com a liberação do ácaro predador (tratamento 3 e 4), o peso dos frutos foi maior no tratamento em que o nematoide de vida livre foi inoculado (tratamento 4) do que na sua ausência (tratamento 3), apesar de ambos não terem diferido significativa do tratamento onde as plantas não foram inoculadas com *M. incognita* (tratamento 1, controle positivo).

A liberação de *P. zaheri* diminuiu a população de *M. incognita* em 32% (tratamento 3) e 51% (tratamento 4) em relação ao tratamento em que o mesmo não foi liberado. O controle da população de nematoides exercida pelo ácaro pode ser um fator responsável pela diminuição das perdas potenciais causadas pelo fitopatógeno ao tomateiro, que resultou em maior produção de frutos de tomate (em peso) em torno de 32% (tratamento 4) e 20% (tratamento 3) em relação ao controle negativo (tratamento 2). Estes resultados sugerem que *P. zaheri* seja capaz de controlar a população de *M. incognita* em condições de semi-campo, complementado conhecimento prévio sobre a capacidade de predação do ácaro sobre este nematoide em condições de laboratório (Prado, 2018). Isto também é compatível com os resultados do capítulo 2 da presente tese, em que cada fêmea deste predador se

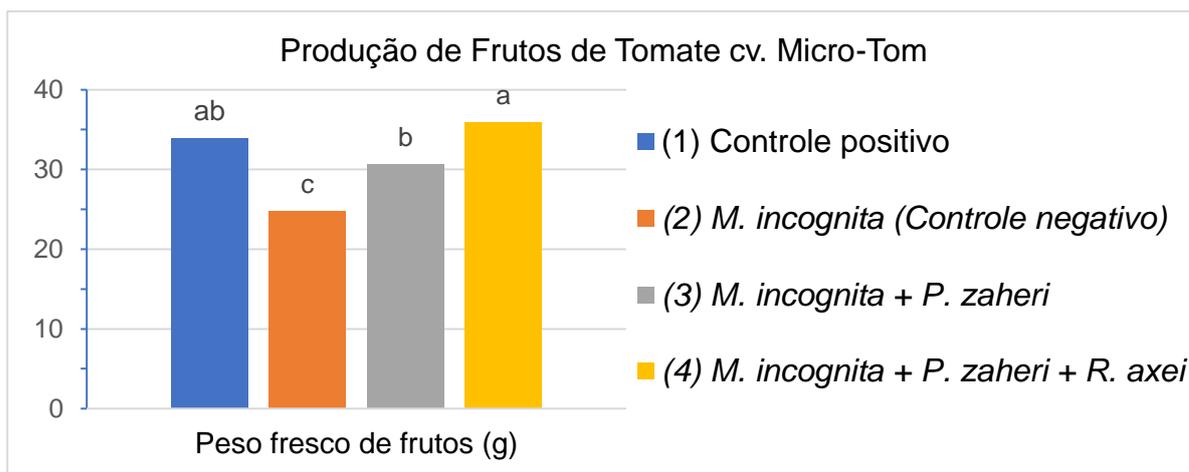


Figura 1. Média do peso total (em gramas) dos frutos frescos por planta do tomateiro Micro-Tom. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

mostrou capaz de predar em média 318 J2 desse *M. incognita* por dia, além de completar seu ciclo de vida tendo ovos e J2 como alimento, com alta sobrevivência.

Os melhores resultados na produção de frutos de tomate foram observados no grupo de plantas em que o predador foi liberado juntamente com o nematoide de vida livre, sugerindo um possível efeito benéfico da liberação deste nematoide. Esta resposta pode estar ligada ao papel do nematoide de vida livre como alimento suplementar ao ácaro predador, resultando na redução dos danos causados pelo parasitismo de *M. incognita* ao tomateiro. No Capítulo 2 da presente tese verificou-se que cada fêmea deste predador conseguiu predar até 72 adultos do nematoide de vida livre por dia, além de apresentar maior oviposição do que quando alimentado com J2 de *M. incognita*.

Em outros estudos também já foi observado que o fornecimento de alimento alternativo ao ácaro predador pode favorecer o manejo de pragas e doenças. Azevedo et al. (2020b) verificaram que a liberação do ácaro predador *Stratiolaelaps scimitus* (Womersley) (Mesostigmata: Laelapidae) em conjunto com o mesmo nematoide de vida livre avaliado no presente estudo resultou na redução do número de galhas de *M. incognita* no mesmo hospedeiro do presente estudo.

A liberação do nematoide de vida livre além de efeitos indiretos sobre a população de fitonematoides podem trazer outras vantagens para o desenvolvimento das plantas. Azevedo et al. (2020b) verificaram que o uso do nematoide de vida livre proporcionou um aumento da taxa de macronutrientes (principalmente nitrogênio e

potássio) nas folhas dos tomateiros. Os nematoides de vida livre são conhecidos por contribuir para a mineralização do nitrogênio nos solos (Neher, 2010; Buchan et al., 2013; Rueda-Ramírez et al., 2023), favorecendo assim as plantas. A maioria desses nematoides são bacteriófagos, e sua presença no ambiente indica também a presença de bactérias que podem ser promotoras de crescimento de plantas, ao proporcionar, por exemplo, a solubilização de potássio no solo (Parmar e Sindhu, 2013; Rueda-Ramírez et al., 2023).

Protogamasellopsis zaheri foi selecionado para o presente estudo por possuir características morfológicas (corpo mais estreito e com os escudos divididos) que lhe permitem viver sob a superfície do solo, onde *M. incognita* também é encontrado exposto boa parte de sua vida. Os Rhodacaridae são comumente encontrados abaixo da superfície do solo (Lindquist et al., 2009; Castilho et al., 2015). Além disso, foi observado que as fêmeas de *P. zaheri* frequentemente depositam seus ovos sobre as galhas de *M. incognita* nas raízes da planta (Prado, 2018). Esse comportamento possivelmente favorece o maior contato do predador com as raízes parasitadas e, conseqüentemente, com os ovos do fitonematoide, alimento favorável ao predador (Prado, 2018, Capítulo 2 da presente tese).

No presente estudo, a primeira liberação de *P. zaheri* ocorreu no dia da inoculação do fitonematoide, quando os tomateiros já estavam transplantados. Em condições de campo, é possível que maior eficiência de controle possa ser obtida com a liberação do predador em áreas de cultivo com histórico da incidência do nematoide-das-galhas em períodos de entressafra. Isso possibilitaria a redução da população do fitonematoide antes que este ataque o cultivo, principalmente se presas alternativas estiverem presentes.

O presente estudo demonstrou a habilidade de *P. zaheri* em reduzir a população de *M. incognita*, principalmente quando o nematoide de vida livre é utilizado como alimento suplementar para esse ácaro predador. Os resultados obtidos no presente trabalho são promissores e justificam a realização de pesquisas complementares e mais complexas, incluindo estudos em condições de campo. Além disso, é importante desenvolver estudos para otimizar sua aplicação, considerando aspectos como o número de predadores e o momento mais adequado para a liberação.

Referências

- Azevedo EB, Azevedo LH, Moreira GF, Santos FA, Carvalho MAF, Sarmiento RA, Castilho RC (2020a) Diversity of soil gamasine mites (Acari: Mesostigmata: Gamasina) in an area of natural vegetation and cultivated areas of the Cerrado biome in Northern Brazil. **Diversity** 12(9):331.
- Azevedo LH, Leite LG, Chacon-Orozco JG, Moreira MFP, Ferreira MP, González-Cano LM, Borges V, Rueda-Ramírez D, Moraes GJ, Palevsky E (2019) Free living nematodes as alternative prey for soil predatory mites: An interdisciplinary case study of conservation biological control. **Biological Control** 132:128–134.
- Azevedo LH, Moreira MFP, Pereira GG, Borges V, Moraes GJ, Inomoto MM, Vicente M, Siqueira Pinto M, Peres LP, Rueda-Ramírez D, Carta L, Meyer SLF, Mowery J, Bauchan G, Ochoa R, Palevsky E (2020b) Combined releases of soil predatory mites and provisioning of free-living nematodes for the biological control of root-knot nematodes on ‘Micro Tom tomato’. **Biological Control** 146:104280.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. **Journal of Statistical Software** 67: 1–48.
- Bonetti J, Ferraz J (1981) Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira** 6:553.
- Buchan D, Gebremikael AT, Ameloot N, Sleutel S, Neve S (2013) The effect of free-living nematodes on nitrogen mineralisation in undisturbed and disturbed soil cores. **Soil Biology & Biochemistry** 60:142–155.
- Castagnone-Sereno P (2006) Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes and their ability to overcome plant resistance genes. **Heredity** 96:282–289.
- Castilho RC, Moraes GJ, Silva ES, Silva LO (2009) Predation potential and biology of *Protogamasellopsis posnaniensis* Wisniewski & Hirschmann (Acari: Rhodacaridae). **Biological Control** 48:164–167.
- Castilho RC, Moraes GJ, Halliday B (2012) Catalogue of the mite family Rhodacaridae Oudemans, with notes on the classification of the Rhodacaroidea (Acari: Mesostigmata). **Zootaxa** 3471:1–69.
- Castilho RC, Venancio R, Narita JPZ (2015) Mesostigmata as biological control agents, with emphasis on Rhodacaroidea and Parasitoidea. In: Carrillo D, Moraes GJ, Peña JE (Eds.) **Prospects for Biological Control of Plant Feeding Mites and Other Harmful Organisms**. Florida: Springer, p.1–31.
- Colloff MJ (Eds.) (2009) **Dust mites**. Dordrecht: Springer, 583p.
- Eisenback JD, Sasser J, Carter C (1985) Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: Sasser JN, Carter CC (Eds.) **An advanced treatise on Meloidogyne: Biology and control**. North Carolina: North Carolina State University, p.95–112.

Eisenback JD, Triantaphyllou HH (1991) Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In.: Nickle WR (Eds.). **Manual of Agricultural Nematology**. Flórida, EUA: CRC Press, p.191–274.

Eisenback JD, Hirschmann H (1981) Identification of *Meloidogyne* species on the basis of head shape and, stylet morphology of the male. **Journal of nematology** 13: 513–521.

Freire RAP, Moraes GJ (2007) Mass production of the predatory mite *Stratiolaelaps scimitus* (Womersley) (Acari: Laelapidae). **Systematic and Applied Acarology** 12:117–119.

Grigolli JFJ, Asmus GL (2015) Manejo de nematoides na cultura da soja. In: Lourenção ALF, Grigolli JFJ, Melotto AM, Pitol C, Gitti DC, Roscoe R (Eds.) **Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014**. Maracaju, MS: Fundação MS. p.194-203.

Hartig F, Lohse L (2022) DHARMA: residual diagnostics for hierarchical (multi-level/mixed) regression models. **R Package** 0.4.6.

Hoagland DR, Arnon DL (1950) The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley, **California Agriculture Experiment Station**, Bulletin 347, 32 p.

Hussey R, Barker K (1973) A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter** 57:1025–1028.

Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter** 48:692.

Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, Perry RN (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology** 4:946–961.

Lindquist EE, Krantz GW, Walter DE (2009) Order Mesostigmata. In: Krantz GW, Walter DE (Eds) **Manual of Acarology**, 3ed. Texas: Tech University Press, 124-232.

Luc M, Sikora RA, Bridge J (2005) **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CABI Publishing. 629 p.

Manwaring M, Nahrung HF, Wallace H (2020) Attack rate and prey preference of *Lasioseius subterraneus* and *Protogamasellus mica* on four nematode species. **Experimental and Applied Acarology** 80:29–41.

Mesa-Valle CM, Garrido-Cardenas JA, Cebrian-Carmona J, Talavera M, Manzano-Agugliaro F (2020) Global Research on Plant Nematodes. **Agronomy** 10(8):1148.

Neher DA (2010) Ecology of plant and free-living nematodes in Natural and Agricultural Soil. **Annual Review of Phytopathology** 48:371–394.

Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, Nijs L, Hockland S, Maafi ZT (2011) Current Nematode Threats to World Agriculture. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (Eds) **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**. Dordrecht: Springer. p. 21–43.

Nilusmas S, Mercat M, Perrot T, Djian-Caporalino C, Castagnone-Sereno P, Touzeau S, Calcagno V, Mailleret L (2020) Multi-seasonal modelling of plant-nematode interactions reveals efficient plant resistance deployment strategies. **Evolutionary Applications** 13:2206–2221.

Oliveira CD, Braz LT, Santos JM, Banzatto DA, Oliveira PR (2009) Resistência de pimentas a nematoides de galha e compatibilidade enxerto/porta-enxerto entre híbridos de pimentão e pimentas. **Horticultura Brasileira** 27:520–526.

Parmar P, Sindhu SS (2013) Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: Influence of nutritional and environmental conditions. **Journal of Microbiology Research** 3:25-31.

Prado TJ (2018) **Biologia e potencial do ácaro predador *Protogamasellopsis zaheri* (Mesostigmata: Rhodacaridae) como agente de controle do nematoide de galha *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae)**. 32 p. Dissertação [Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola)] – UNESP, Jaboticabal.

Rosa JMO, Westerich JN, Wilcken SRS (2013) Nematoides das galhas em áreas de cultivo de olerícolas no estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira** 37:1–2.

Rossini LACJ, Prado TJ, Ferreira RJ, Soares PLM, Moraes GJ, Castilho RC (2022) Suitability of the soybean cyst nematode as prey to *Protogamasellopsis zaheri* (Acari: Mesostigmata: Rhodacaridae). **Biological Control** 170:104905.

Rueda-Ramírez D, Palevsky E, Ruess L (2023) Soil nematodes as a means of conservation of soil predatory mites for biocontrol. **Agronomy** 13(1):32.

Sasser JN, Freckman DW (1987) A world perspective on Nematology: the role of the society. In: Veech JA, Dickson DW (Eds.) **Vistas on Nematology**. Maryland: Hyattsville. p. 7–20.

Stirling GR, Stirling A, Walter DE (2017) The mesostigmatid mite *Protogamasellus mica*, an effective predator of free-living and plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology** 49:327–333.

Taylor DP, Netscher C (1974) An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica** 20:268–269.

Williams-Woodward JL, Davis RF (2001) *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* reproduction on Dwarf Hollies and Lantana. **Journal of Nematology** 33:332–337.

Yang SH, Wang D, Chen C, Xu CL, Xie H (2020) Evaluation of *Stratiolaelaps scimitus* (Acari: Laelapidae) for controlling the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae). **Scientific Reports** 10:5645.

Zuur AF, Ieno EN, Freckleton R (2016) A protocol for conducting and presenting results of regression-type analyses. **Methods in Ecology and Evolution** 7:636–645.

CAPÍTULO 4 – Seletividade de produtos fitossanitários ao ácaro predador *Protogamasellopsis zaheri* (Mesostigmata: Rhodacaridae)

RESUMO – Nos solos, os ácaros predadores podem desempenhar serviços ecológicos por meio da regulação da população de pragas. *Protogamasellopsis zaheri* Abo-Shnaf, Castilho & Moraes (Mesostigmata: Rhodacaridae) demonstrou potencial de predação sobre tripes, ácaro dos bulbos, nematoide de vida livre, nematoides-das-galhas e nematoide-de-cisto. Ao se utilizar um ácaro predador em condições de campo, o mesmo estará sujeito a todo manejo realizado na área, como a utilização de produtos fitossanitários. Os produtos fitossanitários são insumos agrícolas amplamente empregados por agricultores visando a proteção dos cultivos agrícolas, seja para o manejo de pragas, doenças e plantas daninhas. Visando a utilização de *P. zaheri* no manejo integrado de pragas e doenças, o objetivo desse estudo foi verificar, em condições de laboratório, se produtos fitossanitários empregados em diferentes cultivos agrícolas podem afetar este predador, influenciando suas taxas de mortalidade, oviposição e fertilidade. O experimento foi composto por 19 tratamentos, sendo 18 produtos fitossanitários de diferentes classes (fungicida, regulador de crescimento, herbicida e inseticida), e um controle em que foi pulverizada apenas água destilada. A concentração da cada calda pulverizada através de Torre de Potter correspondeu à maior concentração indicada na bula do produto comercial. Diariamente, durante cinco dias, foi avaliado o efeito letal e subletal de cada produto ao predador, sendo contabilizada a sobrevivência e oviposição dos adultos, além da viabilidade dos ovos. Os produtos fitossanitários mais prejudiciais ao predador foram os herbicidas 2,4D e Clomazone e o inseticida Fipronil + Alfa-Cipermetrina, que provocaram mortalidade total. Os produtos não prejudiciais foram os herbicidas Hexazinona, Indaziflam e Flumioxazina, e os inseticidas *Bacillus thuringiensis* (biológico) e Tiametoxam. Estudos complementares em condições de campo são necessários para avaliar a persistência e efeito residual dos produtos fitossanitários sobre o ácaro predador, principalmente com aqueles que foram classificados como prejudiciais.

Palavras-chave: Controle biológico, compatibilidade, efeito letal, efeito sub-letal, manejo integrado de pragas, mortalidade

4.1. Introdução

Diversos organismos presentes nos agroecossistemas fornecem uma variedade de serviços relacionados com o seu papel ecológico, como a ciclagem de nutrientes, polinização, e regulação de pragas e doenças. Essas ações são designadas como serviços ecossistêmicos, gerando um grande valor à produção agrícola, e com pouco custo ao produtor (Bardgett e van der Putten, 2014).

Nos solos, os artrópodes geralmente são os organismos mais abundantes e diversos, em especial os microartrópodes que fazem parte da mesofauna, como os ácaros (Lindquist et al., 2009; Faber e Wensem, 2012). Entre os ácaros, algumas espécies de predadores desempenham serviços ecológicos por meio da regulação da população de pragas, com destaque para as famílias Laelapidae, Parasitidae, Macrochelidae, Ascidae, e Rhodacaridae (Castilho et al., 2015; Rueda-Ramírez et al., 2019; Azevedo et al., 2015, 2018, 2019, 2020; Rossini et al., 2022). Algumas espécies de ácaros predadores edáficos já são comercializadas e utilizadas no controle biológico aplicado (van Lenteren, 2012; van Lenteren et al., 2018; Knapp et al., 2018).

Os Rhodacaridae são comumente encontrados abaixo da superfície do solo (Lindquist et al., 2009; Castilho et al., 2015). Em laboratório, *Protogamasellopsis zaheri* Abo-Shnaf, Castilho & Moraes (Mesostigmata: Rhodacaridae) demonstrou potencial de predação sobre tripes, ácaro dos bulbos, nematoide de vida livre, nematoides-das-galhas e nematoide-de-cisto (Castilho et al., 2009; Prado, 2018; Rossini et al., 2022; Capítulo 2 da presente tese). Em casa de vegetação, a liberação de *P. zaheri* em plantas de tomate cultivadas em vasos diminuiu a população de *M. incognita* em até 51%, e mitigou as perdas potenciais de produção de frutos causados pelo fitonematoide (Capítulo 3 da presente tese).

Ao se utilizar um ácaro predador em condições de campo, o mesmo estará sujeito a todo manejo realizado na área, como a utilização de produtos fitossanitários. Os produtos fitossanitários são insumos agrícolas empregados por agricultores visando a proteção dos cultivos. Eles são utilizados para o controle de artrópodes pragas (inseticidas e acaricidas), doenças (fungicidas e nematicidas) e plantas daninhas (herbicidas). Os reguladores de crescimento também são insumos comumente empregados visando o desenvolvimento mais uniforme e vigoroso das

plantas. Estes produtos fitossanitários são comercializados na forma de produtos formulados, e embora seu emprego seja com o objetivo de melhorar os cultivos agrícolas, também podem trazer efeitos adversos a organismos não alvos.

Em um agroecossistema, ácaros predadores têm grandes chances de contato com os produtos fitossanitários, seja pelo contato direto quanto expostos aos produtos no momento da aplicação, ou residual por seu caminhar em superfícies tratadas, ou ingerindo presas contaminadas (Huguier et al., 2015; Smit et al., 2012). Este contato pode ter efeitos negativos sobre sua biologia e comportamento (Pozzebon et al., 2011; Natal-da-Luz et al., 2019). O uso de produtos fitossanitários dentro de um sistema de manejo integrado requer informações sobre possíveis efeitos adversos nestes organismos não alvos. No entanto, em relação a organismos edáficos, principalmente ácaros predadores, poucos estudos foram realizados para verificar o efeito de produtos fitossanitários (Cabrera et al., 2004; Duarte et al., 2020; Barroso et al., 2022). No processo regulatório de avaliação de produtos fitossanitários da União Européia, o ácaro *Gaeolaelaps aculeifer* (Canestrini) (Mesostigmata: Laelapidae) (citado como *Hypoaspis aculeifer*) é o único organismo edáfico predador contemplado no estudo de risco a organismos não alvos (Huguier et al., 2015). Este ácaro é um bom modelo por diversas características que o tornam adequado aos fins de testes ecotoxicológicos, pois é um predador generalista facilmente criado em laboratório, com tempo de geração curto e tem ampla distribuição (Huguier et al., 2015; Smit et al., 2012).

Visando a utilização de *P. zaheri* no manejo de pragas e doenças, o objetivo deste estudo foi verificar, em condições de laboratório, se produtos fitossanitários empregados em diferentes cultivos agrícolas podem afetar este ácaro predador, influenciando suas taxas de mortalidade, oviposição e fecundidade. Essas informações poderão auxiliar na atuação e/ou manutenção deste organismo benéfico nos agrossistemas, dando preferência ao uso de produtos seletivos.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Espécimes

Os espécimes de *P. zaheri* foram obtidos de uma criação estoque do Laboratório de Acarologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, iniciada em 2014 a partir de espécime coletada de substrato de cultivo de cogumelo *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann em Piracicaba – SP, Brasil. A criação foi mantida de acordo com uma adaptação da metodologia de Freire e Moraes (2007), em potes plásticos de 500mL, tendo como substrato vermiculita umedecida. Os predadores foram alimentados semanalmente com o ácaro *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Astigmatina: Acaridae), em diversos estágios de desenvolvimento, criados sobre ração comercial para cães. As identificações das espécies de ácaros foram realizadas com base nos caracteres morfológicos (Castilho et al., 2012; Colloff, 2009).

Os espécimes de *R. axei* (presa ofertada ao predador durante o experimento) foram obtidos de uma criação estoque do Laboratório de Acarologia da ESALQ/ USP, iniciada em 2016. Essa criação originou-se de espécimes coletados de área de pastagem em Piracicaba – SP, Brasil. A criação foi mantida em potes plásticos de 500mL, oferecendo vagens picadas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) como substrato para seu desenvolvimento. A identificação da espécie foi confirmada pelo Dr. Lynn Carta, pesquisador do laboratório de Biologia e Diversidade Genética em Micologia e Nematologia, departamento de agricultura dos Estados Unidos das Américas (USDA-ARS), Beltsville, MD, EUA.

4.2.2. Procedimento experimental

O experimento foi composto por 19 tratamentos, sendo 18 produtos fitossanitários de diferentes classes (fungicida, regulador de crescimento, herbicida e inseticida) (Tabela 1), e um controle em que foi pulverizada apenas água destilada. A concentração da calda pulverizada de cada tratamento correspondeu à maior concentração indicada para pulverização terrestre na bula do produto comercial (MAPA, 2022), independente do cultivo e organismo alvo.

A unidade de aplicação correspondeu a uma placa de Petri de vidro onde foram colocados 10 fêmeas adultas de *P. zaheri* (recém emergidas), com o auxílio de um pincel e sob microscópio estereoscópio, momentos antes da pulverização. Para cada

tratamento foram utilizadas sete unidades de aplicação, totalizando 70 fêmeas adultas.

As aplicações foram realizadas no Laboratório de Acarologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal. Os produtos fitossanitários foram pulverizados sobre os ácaros com o uso de uma Torre de Potter, sob uma pressão constante de 15 lb/pol². Cada unidade de aplicação foi pulverizada com 2,0 mg da diluição/cm², seguindo recomendações da “International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants” (IOBC) (Hassan et al., 1994; van de Veire et al., 1996).

Imediatamente após cada pulverização, as unidades de aplicação foram vedadas com plástico filme para evitar a fuga dos ácaros. Além disso, foi colocado um pedaço de algodão umedecido com água destilada sobre o plástico filme de cada unidade de aplicação, para manutenção da umidade no ambiente. Os ácaros permaneceram nessas unidades por duas horas após a pulverização, na ausência de luz, período que puderam caminhar pela superfície tratada.

Após esse período de duas horas, cada ácaro foi individualizado em uma unidade experimental, que consistia de uma placa de Petri plástica (1,2 cm altura X 2,5 cm diâmetro interno), cuja base foi coberta com uma camada de 0,5 cm de altura com mistura de gesso e carvão ativado, na proporção 9:1, mantida sempre úmida através da adição de água destilada (Abbatiello, 1965). Os ácaros foram alimentados diariamente com *R. axei* (*ad libitum*). As unidades experimentais foram mantidas em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR, e ausência de luz.

Para verificar o efeito letal e subletal dos produtos fitossanitários sobre os ácaros, foi avaliada diariamente, durante cinco dias consecutivos, a sobrevivência de cada indivíduo. Os ácaros foram considerados mortos se não exibissem nenhuma reação ao ser tocado com um pincel de cerdas finas. A oviposição também foi avaliada diariamente, considerando o número de ovos/ fêmea viva/ 24 h. Os ovos ovipositados pelo predador foram mantidos em outras unidades experimentais, semelhantes às citadas acima, por cinco dias, para determinar sua viabilidade.

Os produtos fitossanitários foram classificados quanto à toxicidade, conforme os padrões da IOBC (Bakker et al., 1992) para testes de laboratório: classe 1: $E\% < 30\%$ (não prejudicial); classe 2: $30\% \leq E\% \leq 79\%$ (levemente prejudicial);

Tabela 1. Produtos fitossanitários testados em laboratório sobre *Protogamasellopsis zaheri*.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Grupo químico	%IA (formulação)¹	Dose²
Fungicida				
Piraclostrobina + Epoconazol	Opera	Estrobilurina + Triazol	13,3+ 5,0(SE)	1000
Reguladores de Crescimento				
Trinexapaque-Etílico	Moddus	Ácido dioxociclohexanocarboxílico	25,0(EC)	1200
Sulfometurom-Metílico	Curavial	Sulfoniluréia	75,0(WG)	2000
Herbicidas				
Sulfentrazona	Boral	Triazolona	50,0(SC)	700
Hexazinona	Hexazinone Nortox	Triazinona	25,0(SL)	1000
Indaziflam	Alion	Alquilazinas	50,0(SC)	100
Glifosato	Roundup Original	Glicina substituída	44,5(SL)	3000
Flumioxazina	Flumyzin	Ciclohexenodicarboximida	50,0(WP)	250
Clomazone	Gamit	Isoxazolidinona	50,0(EC)	2000
Tebutiurum	Spike	Ureia	50,0(SC)	800
2,4-D	2,4-D Nortox	Ácido ariloxialcanóico	80,6(SL)	1750
Inseticida Biológico				
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. kurstaki, HD-1	Dipel	Inseticida microbiológico	3,36(SC)	667
Inseticidas				
Clorantraniliprole	Altacor	Diamidas antranílicas	35,0(WG)	225
Dinotefuram + Piriproxifem	Maxsan	Neonicotinoide + Éter piridiloxipropílico	10,0+ 2,5(EW)	833
Tiametoxam	Actara	Neonicotinoide	25,0(WG)	2000
Etiprole	Curbix	Fenilpirazol	20,0(SC)	3000
Tiametoxam + Lambda-Cialotrina	Engeo Pleno	Neonicotinoide + Piretróide	14,1+ 10,6(SC)	1000
Fipronil + Alfa-Cipermetrina	Regent Duo	Fenilpirazol + Piretróide	18,0+ 12,0(SC)	1500

¹Concentração em %: SC= suspensão concentrada, WG= granulado dispersível, EW= emulsão de óleo em água, EC= concentrado emulsionável, SL= concentrado solúvel, SE= suspo-emulsão; ²ml ou g de produto comercial para 100 litros de calda.

classe 3: $79\% < E\% < 99\%$ (moderadamente prejudicial); classe 4: $E\% \geq 99\%$ (prejudicial).

Para chegar nessa classificação, foi calculado o efeito total ($E\%$) (Eq. 1) dos produtos, com base na mortalidade corrigida (M_c) pela fórmula de Abbott (1925) (Eq. 2) e o efeito total na reprodução (E_R) (Eq. 3)

$$E\% = 100\% - (100 - M_c(\%)) \times E_R \quad \text{Eq. 1}$$

$$M_c(\%) = (Pf_x - Pf_y) / Pf_x \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde Pf_x é a população final de ácaros no controle e Pf_y é a população final no tratamento.

$$E_R = R_y / R_x \quad \text{Eq. 3}$$

Onde R_y são o número de ovos viáveis dividido pelo número de fêmeas vivas no tratamento, R_x é o número de ovos viáveis dividido pelo número de fêmeas vivas no controle.

Para os cálculos utilizou-se os resultados obtidos até 120 h (5 dias) após a pulverização.

4.2.3. Análise estatística

Os valores de mortalidade corrigida (M_c) e viabilidade de ovos foram submetidas ao teste de Friedman, para detectar diferenças nos tratamentos, e ao teste de Durbin-Conover, para comparações múltiplas post hoc, ambos por meio do programa estatístico JAMOVI (2022) construído sobre linguagem estatística R (2022).

Os valores de fecundidade foram submetidos ao teste GLM, para detectar diferenças nos tratamentos, e ao teste de Tukey, para comparações múltiplas post hoc, ambos por meio do programa estatístico SAS (2022).

4.3. Resultados e Discussão

O fungicida Piraclostrobina + Epoxiconazol foi levemente prejudicial ao ácaro predador (Classe 2), com mortalidade corrigida de 48% (Tabela 2). A viabilidade de ovos foi cerca de 70% da obtida no controle. Estes resultados estão muito próximos aos observados em *M. embersoni* para este mesmo fungicida (Gonçalves, 2021). No entanto, este efeito sobre essas espécies difere um pouco do que já foi observado

Tabela 2. Efeito letal, subletal e classificação de produtos fitossanitários sobre fêmeas de *Protogamasellopsis zaheri*, ao final de 120 horas, em laboratório.

Ingrediente ativo	M_c (%)^a	R^b	E_R^c	E%^d	Classe
Controle	0 a	17,4 ± 4,7 a	0	-	-
Fungicida					
Piraclostrobina + Epoxiconazol	48 cde	12,7 ± 7,4 ab	0,73	62	2
Reguladores de Crescimento					
Trinexapaque-Etílico	39 bcde	16,2 ± 5,7 a	0,93	43	2
Sulfometurom-Metílico	40 bcd	15,7 ± 4,5 a	0,90	46	2
Herbicidas					
Sulfentrazona	27 abc	16,3 ± 4,7 a	0,93	32	2
Hexazinona	14 ab	17,2 ± 4,9 a	0,99	15	1
Indaziflam	13 ab	16,1 ± 4,9 a	0,93	20	1
Glifosato	69 de	18,0 ± 4,0 a	1,03	69	2
Flumioxazina	2 a	14,0 ± 6,9 a	0,80	22	1
Clomazone	100 f	-	-	100	4
Tebutirom	77 de	11,7 ± 4,7 a	0,67	85	3
2,4-D	100 f	-	-	100	4
Inseticida Biológico					
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	2 a	17,0 ± 6,8 a	0,98	4	1
Inseticidas					
Clorantniliprole	46 cde	8,9 ± 5,9 b	0,51	72	2
Dinotefuram + Piriproxifem	45 cde	10,9 ± 5,0 ab	0,62	65	2
Tiametoxam	12 a	16,4 ± 5,2 a	0,94	6	1
Etiprole	37 abc	12,8 ± 5,8 ab	0,73	53	2
Tiametoxam + Lambda-Cialotrina	94 e	9,8 ± 6,2 b	0,56	96	3
Fipronil + Alfa Cipermetrina	100 f	-	-	100	4

^aM_c = mortalidade corrigida (Abbott, 1925); ^bR = número total de ovos dividido pelo número total de fêmeas; ^cE_R = efeito na reprodução; ^dE% = efeito total; Classe = Classificação toxicológica [classe 1: E% < 30% (não prejudicial), classe 2: 30% ≤ E% ≤ 79% (levemente prejudicial), classe 3: 79% < E% < 99% (moderadamente prejudicial) e classe 4: E% ≥ 99% (prejudicial)].

com fungicidas e outros ácaros predadores. O fungicida Azoxistrobina + Difenconazole não foi prejudicial (Classe 1) aos ácaros predadores edáficos

Stratiolaelaps scimitus (Womersley) (Laelapidae) e *Cosmolaelaps brevistilis* (Karg) (Laelapidae) (Duarte et al., 2020). Os ingredientes ativos deste último fungicida são dos mesmos grupos químicos do utilizado no presente estudo. Efeito não prejudicial de fungicidas sobre ácaros predadores também já foram observados em fitoseídeos, que em sua maioria são predadores na parte aérea das plantas (Hassan et al., 1994; Dittillo et al., 2016). No entanto, não foi possível diferenciar se o efeito prejudicial do fungicida à *P. zaheri* está associado ao ingrediente ativo do grupo do Triazol (Epoconazol) ou Estrobilurina (Piraclostrobina), ou ao efeito sinérgico deles, principalmente pelos fungicidas não apresentarem um local de ação conhecido em ácaros.

Os reguladores de crescimento (Trinexapaque-Etílico e Sulfometurom-Metílico) também foram levemente prejudiciais ao ácaro predador (Classe 2), com efeito total de 43 e 46%. Este efeito foi similar para *M. embersoni* (Gonçalves, 2021). Estes produtos são utilizados principalmente nos cultivos de cana-de-açúcar e não era esperado algum nível de efeito prejudicial já que não são empregados visando o controle de organismos no sistema. O presente trabalho chama a atenção para a necessidade de mais estudos para entender os efeitos de reguladores de crescimento em predadores.

Em relação aos herbicidas, 2,4D e Clomazone foram prejudiciais ao ácaro predador (Classe 4), causando mortalidade total dos adultos. Tebutiurom também causou alta mortalidade ($M_c = 77\%$), sendo moderadamente prejudicial (Classe 3). Glifosato também causou alta mortalidade ($M_c = 66\%$), porém sem efeitos subletais sobre reprodução, sendo classificado como levemente prejudicial ao ácaro predador (Classe 2). O herbicida Boral causou leve mortalidade, sem efeitos subletais, sendo classificado como levemente prejudicial, próximo ao limiar inferior ($E\% = 32$). Os herbicidas não prejudiciais à *P. zaheri* foram Indaziflan, Hexazinona e Flumioxazina, com leve ou nenhum efeito sobre a viabilidade dos ovos, podendo ser empregados no manejo de plantas daninhas sem comprometer as formas adultas do ácaro predador na área.

Os resultados com 2,4D e Clomazone diferem ao observado em *M. embersoni*, em que estes herbicidas, e também o Flumioxazina, não foram prejudiciais, além de estimularem a oviposição deste ácaro predador (Gonçalves, 2021). Já Hexazinona foi

considerado moderadamente prejudicial ao *M. embersoni*. Em relação ao Glifosato, Bernard et al. (2010) não observaram efeito significativo na mortalidade e fertilidade do ácaro predador *Euseius victorensis* (Womersley) (Phytoseiidae). De modo geral, em relação aos herbicidas, poucos são os estudos sobre o efeito destes sobre a mesofauna edáfica, porém estes resultados indicam que existe uma variação nos efeitos dos produtos entre as diferentes espécies corroborando com Schmidt-Jeffris et al. (2021).

O inseticida biológico *B. thuringiensis* foi seletivo a *P. zaheri*, sem efeitos na reprodução e viabilidade de ovos, sendo considerado não prejudicial. Bernard et al. (2010) também não observaram efeito significativo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* na mortalidade e fertilidade do ácaro predador *E. victorensis*. No entanto, este biológico foi levemente prejudicial a *M. embersoni*, com mortalidade próxima de 30% (Gonçalves, 2021). A possibilidade de ampla variação de resultados pode ser devido a vários fatores inerentes à atividade tóxica de *B. thuringiensis*, tais como a estabilidade da pró-toxina, solubilização dos cristais, processo proteolítico, ausência e alterações dos receptores específicos (Garcia et al., 1982, Fiuza et al., 1996, Peyronnet et al., 1997), além do efeito do material utilizado na formulação dos produtos.

Em relação aos inseticidas sintéticos, Fipronil + Alfa-Cipermetrina foi o mais prejudicial ao predador, causando a mortalidade total de fêmeas, o que impossibilitou o cálculo do efeito subletal na reprodução. Este inseticida também foi altamente prejudicial ao *M. embersoni* (Gonçalves et al., 2021). Alguns estudos demonstraram que o uso apenas de Fipronil também foi prejudicial a outros ácaros predadores, como para *Neoseiulus longispinosus* (Evans) (Phytoseiidae), com alta mortalidade (96%), sendo classificado como moderadamente prejudicial (Kongchuensin e Takafuji, 2006).

O inseticida Tiametoxan + Lambda-Cialotrina também causou alta mortalidade ($M_c = 94\%$), e promoveu um efeito sub-letal significativo, reduzindo o número de ovos por fêmea e sua viabilidade, sendo classificado como moderadamente prejudicial ao *P. zaheri*. Este mesmo efeito foi causado em *M. embersoni* (Gonçalves et al., 2021). O uso apenas de Lambda-Cialotrina foi prejudicial a *Galendromus occidentalis* (Nesbitt) (Phytoseiidae), causando alta mortalidade e redução da fertilidade e viabilidade de ovos (Beers e Schmidt, 2014).

É possível que o efeito prejudicial de Tiametoxan + Lambda-Cialotrina ao *P. zaheri* seja devido a Lambda-Cialotrina, este neonicotinoide quando aplicado de forma isolada e em maior concentração foi considerado não prejudicial a *P. zaheri*. Os neonicotinoides têm pouca ação de contato e precisam ser ingeridos pela praga alvo e, portanto, são mais específicos (Tomizawa e Casida, 2005; Stecca et al., 2017). Duarte et al. (2020) estudaram o efeito residual de inseticidas contendo ambos os ingredientes ativos separadamente (Lambda-Cialotrina e Tiametoxan) sobre duas espécies de ácaros predadores edáficos e observaram que Lambda-Cialotrina afetou negativamente *S. scimitus* (E%= 97,9%) e *C. brevistilis* (E%= 83,9%), causando alta mortalidade e baixa viabilidade de ovos, enquanto que o Tiametoxan não foi prejudicial (E%= 6,4 e 0,0, respectivamente).

Os dois inseticidas que causaram a maior mortalidade de *P. zaheri* contém ingredientes ativos (Alfa-Cipermetrina e Lambda-Cialotrina) que são do grupo químico dos piretroides. Os piretroides são moduladores do canal de sódio e causam a despolarização das células nervosas do sistema nervoso central e periférico, causando hiperexcitação, irritabilidade, inibição da atividade alimentar e morte de artrópodes (Hall e Thacker, 1993). Os piretroides são moléculas lipofílicas e tem alta afinidade com a cutícula dos artrópodes, agindo basicamente por contato direto, penetram seu corpo em alta taxa e causam efeito de choque (Hall e Thacker 1993).

Os inseticidas Clorantraniliprole, Etiprole e Dinotefuram + Piriproxifem foram levemente prejudiciais à *P. zaheri* (Classe 2). Clorantraniliprole causou mortalidade corrigida de 46% e efeito negativo significativo na reprodução, sendo o tratamento que causou menor fertilidade de fêmea e menor viabilidade de ovos, mostrando um efeito sub-letal expressivo sobre o ácaro. Dinotefuram + Piriproxifem causou mortalidade corrigida de 45% em fêmeas adultas e reduziu significativamente a viabilidade de ovos. Cheng et al. (2018) e Cabrera et al. (2004) observaram que o neonicotenoide Dinotefuram não apresentou risco ao *Amblyseius cucumeris* (Oudemans) (Phytoseiidae) e *S. scimitus*, respectivamente. Entretanto, Franco et al. (2017) e Kaplan et al. (2012) observaram que Piriproxifem foi levemente prejudicial as fêmeas de *Euseius concordis* (Chant) e *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Phytoseiidae), respectivamente.

O presente trabalho mostra variações no efeito dos produtos sobre *P. zaheri* e o observado por outros autores em outras espécies de ácaros predadores. Essa variação de efeito de produtos fitossanitários em ácaros Mesostigmata já foi constatada em uma meta-análise realizada por Schmidt-Jeffris et al. (2021) e em acaricidas testados por Bergeron et al. (2020) em espécies próximas, contidas na mesma família e até entre espécies do mesmo gênero. Este trabalho reafirma a importância de um estudo do efeito de produtos fitossanitários em ácaros predadores direcionado para a espécie de interesse visando a seleção de produtos não prejudiciais ao predador.

Deve ser levado em consideração que os efeitos destes produtos no presente estudo foram determinados de acordo com testes realizados com o pior cenário possível, conduzidos em laboratório por meio de bioensaios em condições artificiais. Para um melhor entendimento, são necessários testes mais complexos em condições de semi-campo e campo (Hassan et al., 1985; Samsøe-Petersen, 1990). Por exemplo, Deltametrina, também do grupo dos piretroides, não foi prejudicial ao ácaro predador *G. aculeifer* quando testado em dois diferentes tipos de solos naturais típicos da África e um solo artificial padrão pela OECD (2016), porém apresentou risco de toxicidade crônica em solo representativo da Europa (LUFA 2.3) (Kamoun et al., 2018). Por isso, é importante a realização de estudos complementares (sequenciais) sobre persistência e efeito residual dos produtos sobre o ácaro, assim como efeito letal e subletal em condições de campo, principalmente com aqueles classificados como levemente ou moderadamente prejudiciais ao ácaro predador em condições de laboratório, pois tais estudos fornecerão maiores critérios em sua classificação. Além disso, é necessário conhecer os cenários envolvidos para auxiliar na tomada de decisão de um manejo integrado de pragas, doenças e plantas daninhas visando a preservação do ácaro predador no solo.

Referências

- Abbatiello MJ (1965) A culture chamber for rearing soil mites. **Turtox News** 43:162–164.
- Abbott WS (1925) A Method of Computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology** 18:265–267.

Azevedo EB, Azevedo LH, Moreira GF, Santos FA, Carvalho MAF, Sarmiento RA, Castilho RC (2020) Diversity of soil gamasine mites (Acari: Mesostigmata: Gamasina) in an area of natural vegetation and cultivated areas of the cerrado biome in northern Brazil. **Diversity** 12(9):331.

Azevedo LH, Emberson RM, Esteca FCN, Moraes GJ (2015) Macrochelid mites (Mesostigmata: Macrochelidae) as biological control agents. In: Carrillo D, Moraes GJ, Peña JE (Eds.) **Prospects for Biological Control of Plant Feeding Mites and Other Harmful Organisms**. Florida: Springer, p. 103–132.

Azevedo LH, Ferreira MP, Castilho RC, Cançado PHD, Moraes GJ (2018) Potential of *Macrocheles* species (Acari: Mesostigmata: Macrochelidae) as control agents of harmful flies (Diptera) and biology of *Macrocheles embersoni* Azevedo, Castilho and Berto on *Stomoxys calcitrans* (L.) and *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Biological Control** 123:1–8.

Azevedo LH, Leite LG, Chacon-Orozco JG, Moreira MFP, Ferreira MP, González-Cano LM, Borges V, Rueda-Ramírez D, Moraes GJ, Palevsky E (2019) Free living nematodes as alternative prey for soil predatory mites: An interdisciplinary case study of conservation biological control. **Biological Control** 132:128–134.

Bakker FM, Grove AB, Blümel S, Calis J, Oomen P (1992) Side-Effect test for phytoseiids and their rearing methods. **IOBC/WPRS Bulletin** 15:61–81.

Bardgett RD, van der Putten WH (2014) Belowground biodiversity and ecosystem functioning. **Nature** 515(7528):505–511.

Barroso G, Pazini JB, Iost Filho FH, Barbosa DPL, Paiva ACR, Matioli TF, Yamamoto PT (2022) Are pesticides used to control thrips harmonious with soil-dwelling predatory mite *Cosmolaelaps sabelis* (Mesostigmata: Laelapidae)? **Journal of Economic Entomology** 115:151–159.

Beers EH, Schmidt RA (2014) Impacts of orchard pesticides on *Galendromus occidentalis*: Lethal and sublethal effects. **Crop Protection** 56:16–24.

Bergeron PE, Schmidt-Jeffris RA (2020) Not all predators are equal: miticide non-target effects and differential selectivity. **Pest Management Science** 76:2170–2179.

Bernard MB, Cole P, Kobelt A, Horne PA, Altmann J, Wratten SD, Yen AL (2010) Reducing the impact of pesticides on biological control in Australian vineyards: Pesticide mortality and fecundity effects on an indicator species, the predatory mite *Euseius victoriensis* (Acari: Phytoseiidae). **Journal of Economic Entomology** 103:2061–2071.

Cabrera AR, Cloyd RA, Zaborski ER (2004) Effects of greenhouse pesticides on the soil-dwelling predatory mite *Stratiolaelaps scimitus* (Acari: Mesostigmata: Laelapidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology** 97:793-799.

Castilho RC, Moraes GJ, Silva ES, Silva LO (2009) Predation potential and biology of *Protogamasellopsis posnaniensis* Wisniewski & Hirschmann (Acari: Rhodacaridae). **Biological Control** 48:164–167.

Castilho RC, Moraes GJ, Halliday B (2012) Catalogue of the mite family Rhodacaridae Oudemans, with notes on the classification of the Rhodacaroidea (Acari: Mesostigmata). **Zootaxa** 3471:1–69.

Castilho RC, Venancio R, Narita JPZ (2015) Mesostigmata as biological control agents, with emphasis on Rhodacaroidea and Parasitoidea. In: Carrillo D, Moraes GJ, Peña JE (Eds.) **Prospects for Biological Control of Plant Feeding Mites and Other Harmful Organisms**. Florida: Springer, p. 1–31.

Cheng S, Lin R, Zhang N, Yuan S, Zhou X, Huang J, Ren X, Wang S, Jiang H, Yu C (2018) Toxicity of six insecticides to predatory mite *Amblyseius cucumeris* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae) in- and off-field. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 161:715–720.

Colloff MJ (Eds.) (2009) **Dust mites**. Dordrecht: Springer, 583p.

Ditillo JL, Kennedy GG, Walgenbach JF (2016) Effects of insecticides and fungicides commonly used in tomato production on *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). **Journal of Economic Entomology** 109:2298–2308.

Duarte AF, Pazini JB, Duarte JLP, Silva LR, Cunha US (2020) Compatibility of pesticides used in strawberry crops with predatory mites *Stratiolaelaps scimitus* (Womersley) and *Cosmolaelaps brevistilis* (Karg). **Ecotoxicology** 29:148–155.

Faber JH, van Wensem J (2012) Elaborations on the use of the ecosystem services concept for application in ecological risk assessment for soils. **Science of The Total Environment** 415:3–8.

Fiuzza LM, Nielsen-Leroux C, Gozé E, Frutos R, Charles JF (1996) Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry I toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology** 62:1544–1549.

Franco AA, Zanardi OZ, Jacob CRO, Oliveira MBR, Yamamoto PT (2017) Susceptibility of *Euseius concordis* (Mesostigmata: Phytoseiidae) to pesticides used in citrus production systems. **Experimental and Applied Acarology** 73:61–77.

Garcia MA, Simões M, Habib MEM (1982) Possible reasons of resistance in larvae of *Spodoptera frugiperda* (Abbot & Smith, 1797) infected by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Revista de Agricultura** 57:215–222.

Gonçalves AFM (2021) **Macrocheles embersoni (Mesostigmata: Macrochelidae): criação em laboratório e efeito da vinhaça e de produtos químicos**. 57 p. Dissertação [Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola)] – UNESP, Jaboticabal.

Hall FR, Thacker JRM (1993) Laboratory studies on effects of three permethrin formulations on mortality, fecundity, feeding, and repellency of the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). **Journal of Economic Entomology** 86:537–543.

Hassan SA, Bigler F, Blaisinger P, Bogenschütz H, Brun J, Chiverton P, Dickler E, Easterbrook MA, Edwards PJ, Englert WD, Firth SI, Huang P, Inglesfield C, Klingauf F, Kühner C, Ledieu MS, Naton E, Oomen PA, Overmeer WPJ, Plevoets P, Reboulet JN, Rieckmann W, Samsose-Petersen L, Shires SW, Stäubli A, Stevenson J, Tuset

JJ, Vanwetswinkel G, Van Zon AQ (1985) Standard methods to test the side-effects of pesticides on natural enemies of insects and mites developed by the IOBC/WPRS Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms". **EPPO Bulletin** 15:214–255.

Hassan SA, Bigler F, Bogenschotz H, Boller E, Brun J, Calis JNM, Coremans-Pelseneer J, Duso C, Grove A, Heimbach U, Helyer N, Hokkanen H, Lewis, F. Mansour GB, Moreth L, Polgar L, Samsøe-Petersen L, Sauphanor B, Stäubli A, Sterk G, Vainio A, van de Veire M, Viggiani G, Vogt H (1994) Results of the sixth joint pesticide testing programme of the IOBC/WPRS working group "Pesticides and Beneficial Organisms". **Entomophaga** 39:107–119.

Huguier P, Manier N, Owojori OJ, Bauda P, Pandard P, Römbke J (2015) The use of soil mites in ecotoxicology: a review. **Ecotoxicology** 24:1–18.

JAMOVI (2022) The jamovi project (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Kamoun IJ, Jegede OO, Owojori OJ, Bouzid J, Gargouri R, Römbke J (2018) Effects of deltamethrin, dimethoate, and chlorpyrifos on survival and reproduction of the collembolan *Folsomia candida* and the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* in two African and two European soils. **Integrated Environmental Assessment and Management** 14:92–104.

Kaplan P, Yorulmaz S, Ay R (2012) Toxicity of insecticides and acaricides to the predatory mite *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae). **International Journal of Acarology** 38:699–705.

Knapp M, van Houten Y, van Baal E, Groot T (2018) Use of predatory mites in commercial biocontrol: Current status and future prospects. **Acarologia** 58:72–82.

Kongchuensin M, Takafuji A (2006). Effects of some pesticides on the predatory mite, *Neoseiulus longispinosus* (Evans) (Gamasina: Phytoseiidae). **Journal of the Acarological Society of Japan** 15:17–27.

Lindquist EE, Krantz GW, Walter DE (2009) Order Mesostigmata. In: Krantz GW, Walter DE (Eds) **Manual of Acarology**, 3ed. Texas: Tech University Press, p.124–232.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2022) AGROFIT Sistema de agrotóxicos fitossanitários (consulta aberta).

Natal-da-Luz T, Gevaert T, Pereira C, Alves D, Arena M, Sousa JP (2019) Should oral exposure in *Hypoaspis aculeifer* tests be considered in order to keep them in tier I test battery for ecological risk assessment of PPPs? **Environmental Pollution** 244:871–876.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development (2016) Test no. 226: Predatory mite (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) reproduction test in soil. Paris: OECD 2:1–26.

Peyronnet O, Vachon V, Brousseau R, Baines D, Schwartz JL, Laprade R (1997) Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. **Applied and Environmental Microbiology** 63:1679–1684.

Pozzebon A, Duso C, Tirello P, Ortiz PB (2011) Toxicity of thiamethoxam to *Tetranychus urticae* Koch and *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari Tetranychidae, Phytoseiidae) through different routes of exposure. **Pest Management Science** 67:352–359.

Prado TJ do (2018) **Biologia e potencial do ácaro predador *Protogamasellopsis zaheri* (Mesostigmata: Rhodacaridae) como agente de controle do nematoide de galha *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae)**. 32 p. Dissertação [Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola)] – Unesp, Jaboticabal.

R (2022) R Core Team: A Language and environment for statistical computing (Version 4.1) [Computer software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>.

Rossini LACJ, Prado TJ, Ferreira RJ, Soares PLM, de Moraes GJ, Castilho RC (2022) Suitability of the soybean cyst nematode as prey to *Protogamasellopsis zaheri* (Acari: Mesostigmata: Rhodacaridae). **Biological Control** 170:104905.

Rueda-Ramírez D, Rios-Malaver D, Varela-Ramírez A, Moraes GJ (2022) Biology and predation capacity of *Parasitus bituberosus* (Acari: Mesostigmata: Parasitidae) on *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), and free-living nematodes as its complementary prey. **Pest Management Science** 75:1819–1830.

Samsøe-Petersen L (1990) Sequences of standard methods to test effects of chemicals on terrestrial arthropods. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 19:310–319.

Schmidt-Jeffris RA, Beers EH, Sater C (2021) Meta-analysis and review of pesticide non-target effects on phytoseiids, key biological control agents. **Pest Management Science** 77:4848–4862

Stecca CS, Silva DM, Bueno AF, Pasini A, Denez MD, Andrade K (2017) Selectivity of insecticide use in soybean crop to the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Semina: Ciências Agrárias** 38:3469–3480.

Tomizawa M, Casida JE (2005) Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 45:247–268.

van de Veire M, Sterk G, van der Staij M, Ramakers PMJ, Tirry L (1996) Sequential testing scheme for the assessment of the side-effects of plant protection products on the predatory bug *Orius laevigatus*. **BioControl** 47:101–113.

van Lenteren JC (2012) The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl** 57:1–20.

van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl** 63:39–59.

CAPÍTULO 5 – Modelling the biological control of tomato root-knot nematode by predatory mites in the presence of an alternative prey

ABSTRACT – Root-knot nematodes (RKN, *Meloidogyne* spp.) are major pests of the tomato crop. Several predatory mites (PM) species have proven to be good candidates for the development of biological control strategies against these plant-parasitic nematodes. Recent studies have shown that soil supplementation with non-parasitic, free-living nematodes (FLN), as alternative prey for PM, could improve the biological control of RKN. To investigate the effects of direct (predation) and indirect (apparent competition) interactions between pest and non-pest nematodes sharing a common predator on pest control, we developed a stage-structured population dynamic model. This model was parametrized using experimental data and information from the literature for the case of a tomato pot and the species *Meloidogyne incognita* (RKN), *Rabditella axei* (FLN) and *Protogamasellopsis zaheiri* (PM). We simulated five scenarios over a 110-days growing season by varying PM release rates (no PM, single release, weekly release) and the presence-absence of FLN. Our results confirmed the potential of PM as biocontrol agents and highlighted the effect of the timing of FLN inoculation. The scenario combining a single early release of PM with a delayed inoculation of FLN two weeks later provided satisfactory control, at the same level as the weekly mite releases. We also detected apparent competition between the two nematode species when FLN were inoculated early on. Our model can guide the design of RKN management strategies. The next steps in development should include interactions with tomato plants (gall formation and indirect effects on nematodes and mites) as well as soil effects on the three species.

Keywords: *Meloidogyne*, free-living nematodes, Mesostigmata, supplementary food, population dynamics, apparent competition

¹Este capítulo corresponde ao artigo científico aceito para publicação na revista Acta Horticulturae - International Symposium on Sustainable Control of Pests and Diseases.

5.1. Introduction

Among plant-parasitic nematodes, the root-knot nematodes (RKN), *Meloidogyne* spp., are major pests, particularly in tomato cultivation where they are responsible for 20% yield losses per year worldwide, with significant economic damage (Nicol et al., 2011; Jones et al., 2013). Management of RKN has been mainly based on nematicide chemical treatments. However, in some countries widely used nematicides, such as methyl bromide and aldicarb have been banned or restricted due to their harmful effects on the environment and human health (European Commission, 2000; Dong and Zhang, 2006; Nilusmas et al., 2020). Therefore, there is an increasing requirement for developing non-chemical alternative methods for RKN management (Hussey and Janssen, 2002; Huang et al., 2016; Forghani and Hajihassani, 2020).

RKNs are obligate sedentary endoparasites but females release egg masses outside the roots. The juvenile second stage (J2) is the infective form, which penetrates the roots (Jones et al., 2013; Nilusmas et al., 2020). After reaching the vascular cylinder, salivary secretions from J2 induce a specialized feeding site where the nematode spends the rest of its life. Thus, there is a time window during the early stages of development when natural enemies foraging in the soil can predate RKN. Several Mesostigmata mites are predators belonging to the top of the edaphic mesofauna food chain (Castilho et al., 2015). Recent studies have evaluated the potential of these predatory mites (PM) as biological control agents of plant-parasitic nematodes (Chen et al., 2013; Xu et al., 2014; Stirling et al., 2017; Azevedo et al., 2020; Manwaring et al., 2020; Yang et al., 2020).

Additionally, studies showed that supplementing the soil with alternative prey for predatory mites, such as non-parasitic free-living nematodes (FLN) might improve RKN biological control (Azevedo et al., 2019, 2020). This alternative resource would allow the predator to survive during RKN parasitic phase or when RKN is at low density. It is also expected that apparent competition results from the indirect interaction between the two nematode prey species sharing a common predator. In this case, the prey populations behave as if they were competing for the same resource (Chailleux et al., 2014).

In this study, we present a stage-structured model that simulates the population dynamics of two nematode species, a plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (RKN) and a bacterivore non-pest nematode *Rabditella axei* (FLN), and their predator *Protogamasellopsis zaehri* (PM) at the scale of a tomato plant root system in greenhouse conditions, during the whole growing season. We investigated whether the addition of an alternative prey (1) improves the biological control of RKN and (2) suggests adapting PM release strategies.

2.2. Materials and methods

We developed a time-continuous stage-structured population model of two nematode prey species – one shared predatory mite (fig 1). As regards the biological assumptions, RKN and FLN do not participate in the same trophic group and do not compete for resources. Apparent competition will rest upon their indirect interactions through PM predation. For RKN, we distinguished three stages corresponding to an early stage of development exposed to predation outside the root, a juvenile endoparasitic stage, and an adult endoparasitic and reproductive stage. We simulated FLN development as a two-stage process with juveniles maturing in adults. The population of predatory mites was modelled as two immature stages followed by two adult reproductive stages, all active predators except the first. Following Gurney and Nisbet (1998), we formulated our model with delay-differential equations predicting the dynamics of the different stages for each species (table 1). This approach applies the same vital rates to every individual within a development stage (equation 1). In order to consider the limited capacity of a growing pot (FLN) and of tomato roots (RKN), female fecundity was constrained by the total population density for FLN and the population density of endoparasitic stages for RKN, respectively (equation 2). We also applied a density dependent inhibition to PM fecundity as a simple way to account for the con-specific cannibalism on the early stages of Mesostigmata predatory mites (Rasmy et al. 2004; Costa and Anjos, 2020). We assumed that the shared biocontrol agent PM exhibits a multispecies functional response type 3 (Costa and Anjos, 2020; equation 3). Predation rates added to natural death rate for all FLN nematodes and the exposed stage of RKN. This model was run in R (Core Team, 2021) (Rstudio version

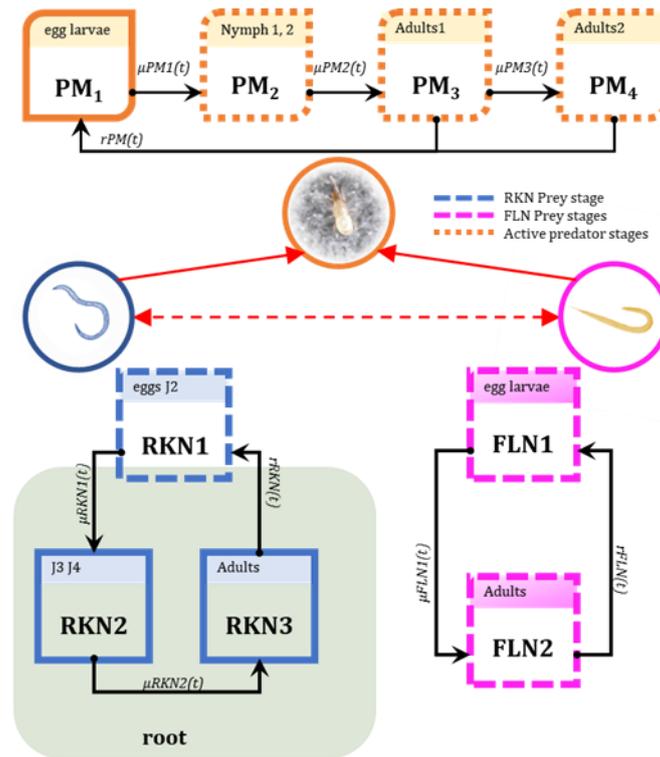


Figure 1. Model structure for nematodes (root-knot nematode RKN, free-living nematode FLN) – predatory mite (PM) populations dynamics. Each box represents a development stage with $\mu_{XY}(t)$ and $r_X(t)$ the maturation and reproduction rates of species X in stage Y at time t respectively (death rates not shown for simplicity). Circles depict species interactions either direct (predation, red continuous lines arrow) or indirect (apparent competition, red broken lines arrow). The second and third stages of RKN are protected in the root and are not subject to predation. Broken line boxes in the nematodes' life cycle correspond to prey stages and in predatory mite's life cycle correspond to the active predator stages.

2021.09.2) using the package stagePop whose code is based on the formulation by Gurney and Nisbet (Kettle and Nutter, 2015). Model output variables were the daily density of each stage for each species throughout the simulation period.

The model parameterization was based on PM life tables (Do Prado, unpublished; Rossini et al, 2022), data from experimental setups from 2017 to 2021 and information from the literature (table 2). The carrying capacity for RKN depends on host plant quality (van den Hoogen et al. 2019). The population of bacteriophage nematodes increases with soil organic matter that feeds their bacteria food sources (Thoden et al., 2011; van den Hoogen et al. 2019). We set the parameter values corresponding to a rather poor soil, close to commercial units with vermiculite

substrate, with low carrying capacity for FLN but good properties for PM foraging. The reference experiment was carried out in an automated greenhouse kept at 27°C in Unesp facilities (Jaboticabal-SP, Brazil). Tomato plants Micro-Tom grown in pots with 350mL of soil were either kept free of RKN infestation or inoculated once with 2000 J2 of *M. incognita*. Infested pots were randomly affected to 3 treatments: no release of PM or forty *P. zaheri* released each week with or without 30000 *R. axei* (FLN). In this experiment, predatory mites significantly reduced the nematode population in the soil after 110 days, thus limiting the loss of tomatoes. We also observed that the addition of FLN increased the final population of the predatory mites.

We simulated the population dynamics of RKN, FLN and PM in 5 scenarios: a control situation (RKN alone) and pest control situations comparing a single versus weekly release of predators, with and without the addition of an alternative prey (FLN). The initial populations densities mimicked those of the reference experiment. The simulation period was set at 110 days corresponding to the length of the crop cycle. We were therefore mainly interested in the transient population dynamics over this period and not in the long-term behaviour of the theoretical model.

Table 1. Model equations for nematode preys-predatory mites populations dynamics. The continuous-time stage-structured model is based on the delay-differential approach (Gurney and Nisbet, 1998; Kettle and Nutter, 2015)

General equation (1):

$$\frac{dN_{x,y}(t)}{dt} = \mu_{x,y-1}(t) + [r_{x,adult}(t) \cdot N_{x,adult}(t)]_{if\ y=1} + i_{x,y}(t) - \mu_{x,y+1}(t) - \theta_{x,y}(t)$$

Where $N_{x,y}(t)$ is the number of individuals of species x in stage y at time t . The vital rates of species are kept constant within a stage but may vary from one stage to the other. The maturation rate μ represents the number of individuals that move to the next stage. These surviving individuals have reached the duration d of the previous stage. The reproduction rate r applies only to the first stage (eggs, $y = 1$) and the recruitment depends on the number of breeding adults at that time. The immigration rate i is used to initiate the populations of nematodes and simulate the timing of predator releases. The mortality rate θ includes the natural mortality for all species but also death by predation for the two nematode species. Prey predation rates were calculated as a multispecies functional response of predatory mites (equation 3).

Reproductive function (2):

$$r_{x,comp}(t) = \beta_x(t) \cdot \exp\left(-\frac{N_{x,comp}(t)}{K_x}\right)$$

Where β is the maximum fecundity rate and the exponential term adds a dependency on the current density of competing stages $comp(t)$ (see text), controlled by the parameter K . For nematode species, β is a parameter. In the case of the predatory mite species however, $\beta(t)$ represents the numerical response to the eaten preys and varies over time t . For simplicity, only nematode species were distinguished as different types of prey with ξ_{RKN} and ξ_{FLN} the conversion efficiencies for any stage of RKN and FLN nematodes to PM offspring, respectively.

Prey predation rate with a multispecies functional response (3):

$$f_{x_{nem},y}(t) = \frac{\alpha_{x_{nem}} \cdot N_{x_{nem},y}^2(t) \cdot \sum_{z=2,3,4} \gamma_z \cdot N_{PM,z}(t)}{1 + \alpha_{RKN} \cdot h_{RKN} \cdot N_{RKN,1}^2(t) + \alpha_{FLN} \cdot h_{FLN} \cdot [N_{FLN,1}^2(t) + N_{FLN,2}^2(t)]}$$

and $y = 1$ if $x_{nem} = RKN$; $y = 1$ or 2 if $x_{nem} = FLN$

Where $N_{PM,z}(t)$ is the total number of mites in predatory stages ($z=2,3,4$) at time t . Parameter γ_z sets the proportion of the stage duration that is active (excluding molt for stage 2). We assumed a similar contribution to predation from the different predatory stages. Only stage 1 of RKN can feed predatory mites while the two FLN stages are attacked. Parameters α and h can be interpreted as nematode-specific attack rate and prey manipulation time, respectively.

Table 2. Model parameter values

Per capita maximum fecundity rates	eggs.day ⁻¹
β_{RKN}	10 ^{1,2}
β_{FLN}	16.7 ^{3,4,5}
Natural mortality rates for each species and stage	death.day ⁻¹
$\Theta_{RKN,1}$	0.010 ^{1,2}
$\Theta_{RKN,2}$	0.025 ^{1,2}
$\Theta_{RKN,3}$	0.125 ^{1,2}
$\Theta_{FLN,1}$	0.125 ^{3,4,5}
$\Theta_{FLN,2}$	0.500 ^{3,4,5}
$\Theta_{PM,1}$	0*
$\Theta_{PM,2}$	0.005*
$\Theta_{PM,3}$	0*
$\Theta_{PM,2}$ and $\Theta_{PM,3}$ in case of starvation (no prey)	0.06 ⁶
$\Theta_{PM,4}$	0.350*
Predatory mite functional response (type 3)	
h_{RKN} manipulation time on RKN stage 1 (in days)	0.006271*
h_{FLN} manipulation time on FLN stage 1 or 2 (in days)	0.010813*
γ_z proportion of RKN stage duration that is active	0.62 (z=2); 1 (z=3,4)
α_{RKN} attack rate on RKN stage 1	0.00579*
α_{FLN} attack rate on FLN stage 1 or 2	0.00790*
Density-dependent parameters for reproduction	Number of individuals
K_{RKN}	2353*
K_{FLN}	1000*
K_{PM}	139*
Conversion efficiency from nematode prey to PM	PM egg per eaten
ξ_{RKN}	0.006270*
ξ_{FLN}	0.069444*
Development times for each species and stage	Days
$d_{RKN,1}$	5.00 ^{1,2}
$d_{RKN,2}$	14.00 ^{1,2}
$d_{FLN,1}$	4.004 ^{3,4,5}
$d_{M,1}$	4.52*
$d_{M,2}$	5.40*
$d_{M,3}$	15.00*
Initial prey densities and predator release rates	Number of individuals
i_{RKN}	2000 once
i_{FLN2}	0 or 30000 once
i_{PM}	40 once or weekly

* Experimental data not published; ¹Dutta et al., 2011; ²Simon, 2014; ³Hague, 1963; ⁴Cliff and Anderson, 1980; ⁵Hirao and Ehlers, 2009; ⁶Rossini et al., 2022

5.3. Results and Discussion

In the absence of predation, the simulated RKN population cycled twice during the growing season (Fig. 2A). The parasitic stages peaked at about 35,000 individuals per growing pot after 30 and 78 days. The cycles resulted from the initial structure of the population, which consisted only of stage 1 individuals, but also from the density dependency that limits reproduction (equation 2) to periods when the density of RKN in the roots remains low to relatively moderate.

According to our model, whatever the scenario simulated, the predatory mites were always able to significantly decrease the population density of RKN in the rhizosphere and thus in the tomato roots, even if PM only attacks the free-living stage (egg-J2). The cyclic behavior of the RKN population disappeared, but the simulated dynamics varied greatly between the scenarios (Fig. 2B-E). When PM was introduced once at the beginning of the simulation, predation kept the pest population at very low levels for more than two months (Fig. 2B). However, in the absence of prey, the predatory mites almost disappeared at the end of this period, allowing the RKN population to reach very high densities (more than 17,000 free individuals) during the last month of the growing season. Adding a high number of FLN nematodes to the system at the start led to an inverse situation (Fig. 2C). During the first days and according to the multispecies functional response (equation 3), predatory mites neglected RKN preys to the benefit of the more abundant FLN. This allowed the parasitic stages to peak at a moderate density of about 1500 individuals. Thus, the two nematode species were involved in an indirect relationship of apparent competition, at the expense of FLN. The PM population reached high densities in response to FLN predation. The numerical response of PM was amplified by its tenfold higher conversion efficiency from FLN preys than from RKN (table 2). At the highest densities (maximum of 445 individuals on day 11), the rate of increase of the PM population was greatly reduced by intraspecific competition with only 4-5% of fecundity achieved (equation 2). However, the PM population remained large enough to control the pest and even eliminate it almost entirely over the last 70 days. In the absence of alternative FLN prey, a scenario of weekly releases maintained RKN under strong control by predatory mites throughout the simulated growing season (Fig. 2D). The PM

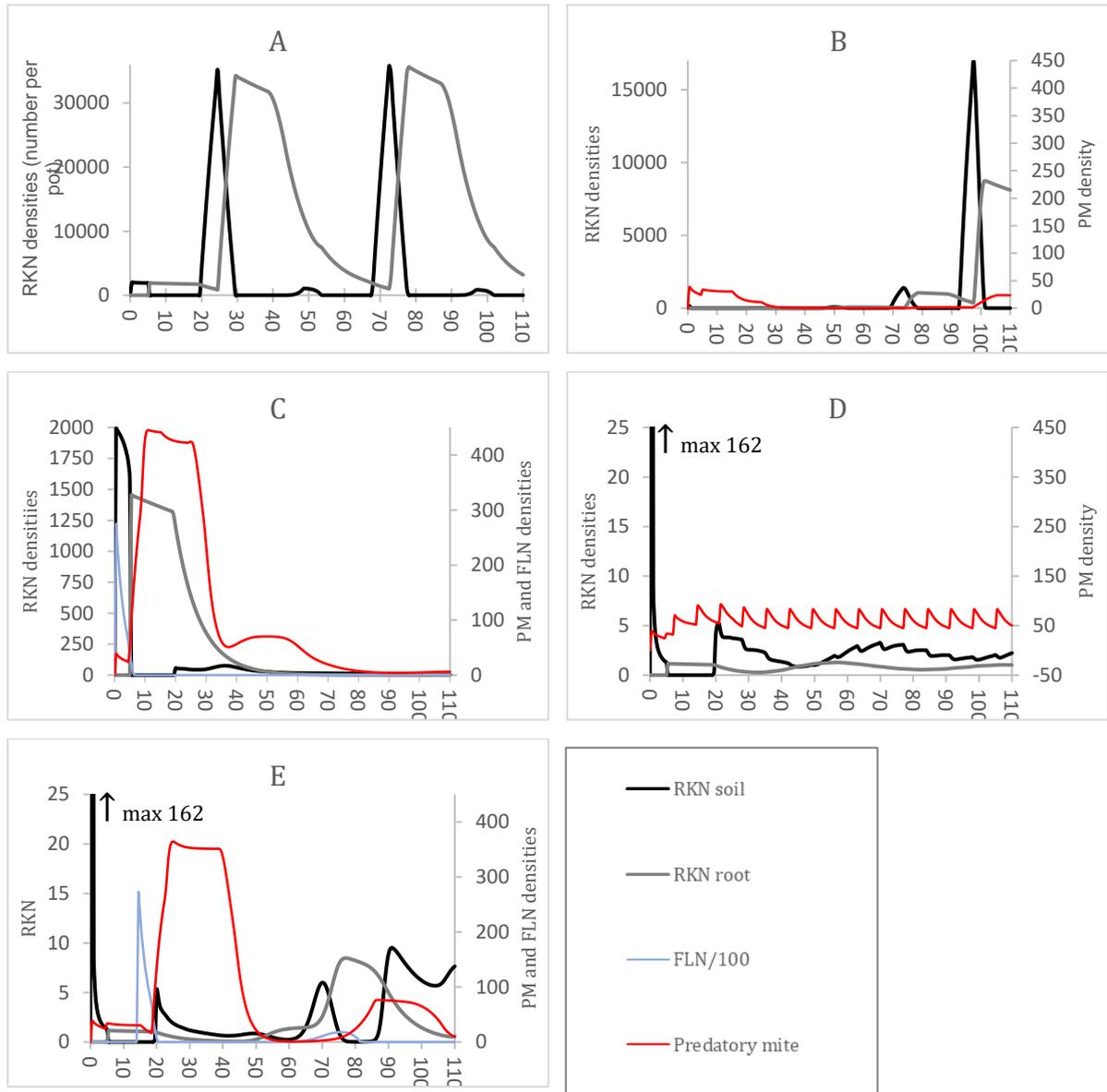


Figure 2. Simulation results for five scenarios of RKN management strategies. The population dynamics are the daily densities of nematodes and mites in a tomato growing pot. Stages densities were summed per species, except for RKN, whose free-living stage (RKN soil, exposed to predation) is represented separately from the parasitic stages (RKN root, not exposed to predation). The simulation started with 2000 RKN individuals. The FLN densities are divided by 100. Scenarios: A = no PM and no FLN (control); B = 40 PM single release at the beginning and no FLN; C = 40 PM single release and 30000 FLN at the beginning; D = 40 PM weekly release and no FLN; E = 40 PM single release at the beginning and 30000 FLN two weeks later.

population remained at densities ranging from 45 to 93 individuals, much higher than with a single initial release.

This strategy would require a time-consuming intervention in the greenhouse each week and the purchase and management of many biological control agents, even if it allows maintaining the pest at very low densities in the growing pots (less than 5 individuals in our simulation). Such a strategy may be uncompetitive due to its unsustainable cost. Comparable results were obtained by simulating an early but single release of predatory mites with a delayed inoculation of FLN nematodes after 2 weeks (Fig. 2E). In this case, the pest population was rapidly depleted by PMs that switched to FLN preys after their inoculation. As can be seen from the comparison with the same starting situation but without FLN inoculation (Fig. 2B), the PM population then benefited from this additional resource to peak at about 360 individuals after 28 days. The RKN density remained unnoticed until the beginning of the third month when a new generation appeared. However, the same happened for FLN resulting in a new peak of predatory mites of 76 individuals around day 88. This was sufficient to successfully control RKN (less than 10 pests per pot) until the end of the season, in contrast to what was observed in the absence of FLN (Fig. 2B).

According to our simulations, the provision of an alternative prey to support the PM population in the rhizosphere could be a more interesting strategy than repeated releases of this biocontrol agent. This corroborates our experimental data, where more predatory mites were recovered from pots where FLN was offered compared to pots without alternative food (2.3 times more). Moreover, our results correspond well with those of Azevedo et al (2019) on housefly predation by soil predatory mites in presence-absence of FLN. Azevedo et al (2020) also conducted an experiment very similar to the one we modelled. They used the predatory mite *Stratiolaelaps scimitus* Berlese (Mesostigmata: Laelapidae) to control *M. incognita* (RKN) in presence-absence of FLN (the FLN nematode and its Culture Medium) on Micro-Tom tomato plants grown in pots. They found that the abundance of galls was lowest in the combined FLN and predator treatment. In addition, pots that had not been treated with PM but had been colonised by the accidental spread of predatory mites reached a final PM abundance equal or even higher than that measured in pots receiving weekly releases. Thus, both experimental and modelling results suggest that the

predator release strategy should be adapted in the presence of an alternative prey. The right setting can be quite subtle, as shown in our scenario with an inoculation of FLN from the start (Scenario C). In this configuration, the predatory mites would neglect pests in favour of more profitable and abundant non-pest prey species (apparent competition), which could cause a transient increase in crop damage. It should be noted, however, that our model captures only a small part of the main direct and indirect interactions that may govern the system dynamics. For example, Azevedo et al (2020) observed a direct effect of FLN on plant physiology that could translate into an indirect effect on RKN pests and their predators. Another aspect that requires attention is the effect of the soil type on these organisms. We parametrized the model to simulate a soil that is very favourable to the activity of predatory mites but poor in the organic matter necessary for FLN-type bacteriophage nematodes. Thus, the next steps in the development of the model will be to integrate the interactions between the nematode pest (RKN) and the plant on the one hand and to refine the effect of the soil on the different species considered on the other.

5.4 Conclusions

We developed and parametrized a stage-structured population model simulating the interactions between a pest nematode (RKN), a biological control agent (PM) and an alternative food source (FLN) in a tomato pot. We simulated five contrasted scenarios and our results confirmed the high potential of PM to successfully control RKN. In one scenario, we demonstrated a transient apparent competition between the two nematode species sharing a common predator. The inoculation of the soil with FLN was predicted to favour pest control but its timing may affect the system dynamics. Despite the simplifications of the model, our simulation results confirmed the experimental observations made on similar systems (reference experiment, Do Prado unpublished; Azevedo et al., 2019, 2020). Therefore, this model has the potential to explore a wide spectrum of biological control strategies and contribute to both system understanding and RKN management strategies.

Both experimental results and simulation outputs converge to make the improvement of biological control a major pillar of an integrated management strategy

for RKN. This could be achieved by maintaining the predatory mite population in the soil through the availability of FLN as an alternative food source. A compromise will then have to be found between the soil requirements for the plant, the FLN and the predatory mites, which must retain their ability to explore the rhizosphere, while soil suppressiveness must be optimized against RKN.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Doctoral program (140945/2018-0) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Programa Institucional de Internacionalização (CAPES - PrInt) (001 -88887.194785/2018-00), Brazil, and was part of a BIOTA / FAPESP (2017/12004-1).

2.5 Literature cited

Azevedo, L.H., Leite, L.G., Chacon-Orozco, J.G., Moreira, M.F.P., Ferreira, M.P., Gonzales-Cano, L.M., Borges, V., Rueda-Ramírez, D., de Moraes, G.J., and Palevsky, E. (2019) Free living nematodes as alternative prey for soil predatory mites: An interdisciplinary case study de conservation biological control. *Biological Control* 132, 128-134 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.007>.

Azevedo, L.H., Moreira, M., Pereira, G.G., Borges, V., De Moraes, G.J., Inomoto, M., Vicente, M.H., de Siqueira Pinto, M., Peres, L.E., Rueda-Ramírez, D., Carta, L.K., Meyer, S.L., Mowery, J.D., Bauchan, G., Ochoa, R., and Palevsky, E. (2020) Combined releases of soil predatory mites and provisioning of free-living nematodes for the biological control of root-knot nematodes on 'Micro Tom tomato'. *Biological Control* 146, 104280 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104280>.

Castilho, R.D., Venancio, R., and Narita, J.P. (2015) Mesostigmata as biological control agents, with emphasis on Rhodacaroidea and Parasitoidea. In *Prospects for biological control of plant feeding mites and other harmful organisms*, ed. by Carrillo D, de Moraes G, Peña JE, (Springer), 19, 1-31 https://doi.org/10.1007/978-3-319-15042-0_1.

Chailleux, A., Mohl, E.K., Alves, M.T., Messelink, G.J., and Desneux, N. (2014) Natural enemy-mediated indirect interactions among prey species: potential for enhancing biocontrol services in agroecosystems. *Pest Manag. Sci.* 70, 1769-1779 <https://doi.org/10.1002/ps.3916>.

Chen, Y.L., Xu, C.L., Xu, X.N. et al. (2013) Evaluation of predation abilities of *Blattisocius dolichus* (Acari: Blattisociidae) on a plant-parasitic nematode, *Radopholus*

similis (Tylenchida: Pratylenchidae). Exp. Appl. Acarol. 60, 289-298 <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9650-x>.

Cliff, G.M., and Anderson, R.C. (1980) Development of *Pelodera strongyloides* (Schneider, 1860) Schneider, 1866 (Nematoda: Rhabditidae) in Culture. J. Helminthol. 54, 135-146.

Costa, M.I.S. and Anjos, L. (2020) The occurrence of apparent competition and apparent mutualism in a modeled greenhouse system with two non-competing pests and a shared biocontrol agent. Neotropical Entomology 49(6):874–881 <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00820-8>.

Dong, L.Q., Zhang, K.Q. (2006) Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. Plant Soil 288, 31-45 <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9009-3>.

Dutta, T.K, Powers, S.J., Kerry, B.R., Gaur, H.S. and Curtis, R.H.C. (2011) Comparison of host recognition, invasion, development and reproduction of *Meloidogyne graminicola* and *M. incognita* on rice and tomato. Nematology 13, 509-520 <https://doi.org/10.1163/138855410X528262>.

European Commission (2000) Regulation (EC) no 2037/2000 of the European Parliament and of the Council of 29 June 2000 on substances that deplete the ozone layer. Official Journal of the European Communities. Legislation 244, 1–24.

Forghani, F. and Hajihassani, A. (2020) Recent Advances in the Development of Environmentally Benign Treatments to Control Root-Knot Nematodes. Front. Plant Sci. 11:1125, 1-13 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01125>.

Gurney, W.S.C. and Nisbet, R.M. (1998) Ecological Dynamics. Oxford University Press. New York Oxford.

Hague, N.G.M. (1963) The influence of *Rhabditis (rhabditella) axei* (rhabditinae) on the development of *Stomoxys calcitrans*. Nematologica 9, 181-184.

Hirao, A., and Ehlers, R.U. (2009) Effect of temperature on the development of *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) in liquid culture. Appl Microbiol Biotechnol. 84, 1061-1067 <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2035-3>.

Huang, W.K., Cui, J.K., Liu, S.M., Kong, L.A., Wu, Q.S., Peng, H., He, W.T., Sun, J.H., and Peng, D.L. (2016) Testing various biocontrol agents against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in cucumber plants identifies a combination of *Syncephalastrum racemosum* and *Paecilomyces lilacinus* as being most effective. Biological Control 92, 31-37 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.008>.

Hussey, R.S., and Janssen, G.J.W. (2002) Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* Species. In Plant resistance to parasitic nematodes, ed. by Starr JL, Cook R and Bridge J, (CABI), 43-60 <https://doi.org/10.1079/9780851994666.0043>.

Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., et al. (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Mol Plant Pathol. 14, 946-61 <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>.

Kettle, H. and Nutter, D. (2015) StagePop: modelling stage-structured populations in R. Methods in Ecology and Evolution. 6(12), 1484-1490 <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12445>.

- Manwaring, M., Nahrung, H.F. and Wallace, H. (2020) Attack rate and prey preference of *Lasioseius subterraneus* and *Protogamasellus mica* on four nematode species. *Experimental and Applied Acarology* 80(1):29–41 <https://doi.org/10.1007/S10493-019-00456-3>.
- Mcsorley, R. (2011) Overview of organic amendments for management of plant-parasitic nematodes, with case studies from Florida. *J Nematol.* 43, 69-81.
- Nicol, J.M., Turner, S.J., Coyne, D.L., Nijs, L., Hockland, S., and Maafi, Z.T. (2011) Current nematode threats to world agriculture. In *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions* ed. by Jones J, Gheysen G, Fenoll C. (Springer, Dordrecht), 21-43 https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_2.
- Nilusmas, S., Mercat, M., Perrot, T., Djian-Caporalino, C., Castagnone-Sereno, P., Touzeau, S., et al. (2020) Multi-seasonal modelling of plant-nematode interactions reveals efficient plant resistance deployment strategies. *Evol Appl.* 13, 2206-21 <https://doi.org/10.1111/eva.12989>.
- R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rasmy, A.H., Abou-El-Ella, G.M. and Hussein, H.E. (2004) Cannibalism and interspecific predation of the phytoseiid mite, *Amblyseius swirskii*. *J Pest Sci* 77, 23–25 <https://doi.org/10.1007/s10340-003-0022-5>.
- Rossini, L.A.C.J., Prado, T.J., Ferreira, R.J., Soares, P.L.M., Moraes, G.J. de, Castilho, R.C. (2022) Suitability of the soybean cyst nematode as prey to *Protogamasellopsis zaheri* (Acari: Mesostigmata: Rhodacaridae). *Biological Control.* 170, 1-5 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104905>.
- Simon, A.S. (2014) Variation in Life Cycle of *Meloidogyne Incognita* in Different Months in Indian Condition. *Int. J. Sci. Res.* 3:4, 2286-2288 <https://www.ijsr.net/archive/v3i7/MjJwNzE0MDM%3D.pdf>.
- Stirling, G.R., Stirling, A.M., and Walter, D.E. (2017) The mesostigmatid mite *Protogamasellus mica*, an effective predator of free-living and plant-parasitic nematodes. *J Nematol.* 49, 327-333 <https://doi.org/10.21307/jdenem-2017-080>.
- Thoden, T.C., Korthals, G.W., and Termorshuizen, A.J. (2011) Organic amendments and their influences on plant-parasitic and free-living nematodes: a promising method for nematode management? *Nematology*, 13(2), 133-153 <https://doi.org/10.1163/138855410X541834>.
- van den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D. et al. (2019) Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* 572, 194-198 <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1418-6>.
- Wilbur, H.M. (1980) Complex Life Cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:1, 67-93.
- Xu, C.L., Chen, Y.L., Xu, X.N., Wang, D.W., Xie, H., Wang, E.D., Li, D.S., Zhang, B.X., and Qin, H.G. (2014) Evaluation of *Blattisocius dolichus* (Acari: Blattisociidae) for biocontrol of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae). *BioControl* 59, 617-624 <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9581-z>.

Yang, S.H., Wang, D., Chen, C., Xu, C.L., and Xie, H. (2020) Evaluation of *Stratiolaelaps scimitus* (Acari: Laelapidae) for controlling the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Heteroderidae). *Sci Rep* 10, 1-8 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62643-2>.