

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Persistência Ambiental de Um Isolado Nativo de *Metarhizium* e Eficiência
no Controle de *Rhipicephalus microplus* em condições de Semi-campo**

EMILY MESQUITA DA SILVA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**PERSISTÊNCIA AMBIENTAL DE UM ISOLADO NATIVO
DE *Metarhizium* E EFICIÊNCIA NO CONTROLE DE
Rhipicephalus microplus EM CONDIÇÕES DE SEMI-CAMPO**

EMILY MESQUITA DA SILVA

Sob orientação da Professora
Patrícia Silva Gôlo

E coorientação da Doutora
Simone Quinelato Bezerra

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica

Fevereiro 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586p Silva, Emily Mesquita da, 1994-
Persistência ambiental de um isolado nativo de
Metarhizium e eficiência no controle de Rhipicephalus
microplus em condições de semi-campo / Emily Mesquita
da Silva. - 2019.
65 f.: il.

Orientadora: Patrícia Silva Gôlo.
Coorientadora: Simone Quinelato Bezerra.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2019.

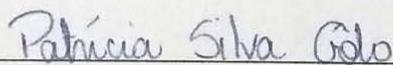
1. fungo entomopatogênico. 2. rizosfera
competente. 3. carrapato do boi. 4. controle
biológico. I. Gôlo, Patrícia Silva, 1987-, orient. II.
Bezerra, Simone Quinelato, 1980-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

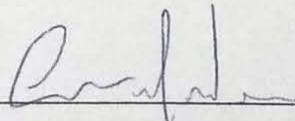
EMILY MESQUITA DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências
no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

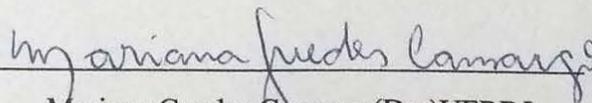
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/02/2019



Patrícia Silva Gôlo(Dra)UFRRJ



Caio Márcio de Oliveira Monteiro(Dr)UFG



Mariana Guedes Camargo(Dra)UFRRJ

“Vivemos em uma sociedade extremamente dependente da ciência e tecnologia, na qual pouquíssimos sabem alguma coisa sobre ciência e tecnologia. Isto é uma clara prescrição para o desastre.”
(Carl Sagan)

“Pela maior parte da História, ‘anônimo’ foi uma mulher.”
(Virginia Woolf)

“I am an architect of days that haven’t happened yet.”
(Jonh Mayer)

Dedico este trabalho a todo que me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui: pais,
família, amigos e LCM. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a cada um que colocou um tijolo na construção desses dois anos de trabalho. Aos meus pais, *Sandra Emília* e *José Nildo*! Nunca terei palavras para expressar o quanto sou grata pela minha formação pessoal e profissional. Vocês que fizeram tantos sacrifícios, que deixaram tantos sonhos de lado para fazerem os meus virarem realidade. Amo vocês mais do que tudo! É tudo por vocês! À minha família tão querida e que me deu tanto incentivo. Apareciam para aniversário surpresa em Seropédica, montaram metade das minhas casas, compartilharam da minha rotina...Obrigada!

Aos queridos amigos que ganhei durante a graduação com a 2012-2, em especial *Natan, Mayara, Conrado, Vanessa, Stephanie e Camilla (Salve Tillandsia!)*. Nossa jornada para nos tornarmos biólogos só foi memorável pela convivência com vocês! Não tem um dia que não tenha valido a pena. Para minha companheira de casa, *Raissa*! 6 anos dividindo os apertos de morar sozinha. Preparando o jantar- ou não. Gargalhando. Compartilhando com *Manuela, Maira, Isabella e Beatriz*. Obrigada Ray! Entramos na mesma turma da graduação, moramos juntas até o fim, seguimos na mesma turma de mestrado, ainda moramos juntas e o companherismo só cresce!

Ao melhor e mais acolhedor laboratório de todos! LCM, que alegria fazer parte dessa família! Muito obrigada *Mariana, Jéssica* (fechamento), *Caio* (vô), *Laura* (Dora aventureira), *Allan, Tháís, Julie, Ricardo, Maria, Samara, Keity, Adonis, Taiana e Fernanda*. Aos mais recentes irmãos científicos, *Victória, Yuri, Lohane*! Todas as conversas e discussões científicas acrescentaram muito mais do que imaginam. Sobre os experimentos só posso deixar mais agradecimentos, essa dissertação não estaria aqui se não fosse por vocês. À minha irmã científica *Amanda*, compartilhamos esses dois anos do início ao fim. Que surpresa boa foi você ter chegado ao laboratório! Obrigada pelo carinho! A gente deu as mãos sem nem perceber.

Às minhas orientadoras! Prof. *Patrícia S. Golo e Dr. Simone Quinelato*! Obrigada pela orientação em todas as áreas em que se era possível, por todos os conselhos, pela amizade e paciência e por enxergarem em mim além do que eu podia ver. Cada vez que nos reuníamos eu aprendia mais um pouco. Vocês são a prova de que nada pode nos parar, se a gente quiser continuar. Obrigada!

Obrigada à todas as mulheres ao meu redor, que me inspiraram sempre. Às amigas pessoais, mãe, minhas companheiras do LCM, orientadoras. Vocês que estiveram longe de casa, em outro estado. Que são mães e se dividem em mil. Que se depararam com doenças, deficiências e fragilidades, mas que ao invés de desistirem levantaram a cabeça e foram em frente duas vezes mais fortes. Vocês que precisam se provar melhores todos os dias apenas porque são mulheres. Todas as vezes que as coisas pareciam difíceis, eu pensava em vocês. Ter todas ao meu lado é um privilégio.

À Universidade Rural, só aqueles que já passaram por aqui entendem o quanto saímos pessoas melhores. Aos queridos da pós-graduação, *Tássia e Maristela* (e *Allan*) obrigada pela luz com a biologia molecular! Aos laboratórios LHV e LASAVE! Meninas da coleção (CCFF)...obrigada por toda a atenção! Amei ter passado um tempo com vocês! Aos funcionários da estação, especialmente ao Zeca pela preocupação com nossos bezerros (e meus vasos!!).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico *CNPq*, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro *FAPERJ*.

BIOGRAFIA

Emily Mesquita da Silva, filha de Sandra Emília de Mesquita da Silva e José Nildo da Silva, nasceu em 28 de outubro de 1994 na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

Em janeiro de 2013 iniciou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo-a em dezembro de 2016. Durante o período de 2013 à 2014 foi estagiária no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes. Em 2015 ingressou no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária, como bolsista FAPERJ de iniciação científica, onde permaneceu até o final da graduação. Durante a graduação participou de eventos científicos e publicou trabalhos em anais de eventos.

No ano de 2017 foi aprovada no processo de seleção do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, como aluna de mestrado sob a orientação da professora Patrícia Silva Gôlo. Ainda em 2017 participou de uma missão de estudo na Universidad Nacional de La Plata, na cidade de La Plata, Argentina. Durante a vida acadêmica participou e apresentou trabalhos em congressos, simpósios e cursos de aperfeiçoamento.

RESUMO

SILVA, Emily Mesquita da. **Peristência Ambiental de um Isolado Nativo de *Metarhizium* e Eficiência no Controle de *Rhipicephalus microplus* em Condições de Semi-campo.** 2019. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O controle biológico com fungos entomopatogênicos como uma alternativa no controle de artrópodes tem se solidificado através de resultados que comprovam a eficiência desses microorganismos contra diferentes artrópodes pragas. No entanto, as aplicações à campo ainda são desafiadas pela influência de fatores abióticos como temperatura, umidade e irradiação UV. A seleção de isolados nativos pode diminuir os efeitos negativos causados pelos fatores abióticos, uma vez que esses fungos tendem a ser mais tolerantes ao clima e microbiota local. Apesar da aplicação de fungos entomopatogênicos na agricultura ser uma atual estratégia de controle viável e efetiva, com a utilização de produtos registrados, o cenário na pecuária ainda não é uma realidade. Assim, o presente estudo objetivou conduzir a identificação taxonômica molecular do isolado nativo LCM S04 *Metarhizium* sp.; monitorar a persistência ambiental do isolado de *Metarhizium* sp. em condição de semi-campo; Avaliar a colonização de raízes de *Brachiaria brizantha*. Três grupos que continham dez vasos com *B. brizantha* foram formados: (1) vasos não tratados (CTR); (2) vasos tratados com emulsão de óleo mineral em água (CTROL); (3) vasos tratados com emulsão fúngica oleosa a base do isolado LCM S04. Além disso, cinco fêmeas de *Rhipicephalus microplus* foram adicionadas aos vasos dos respectivos grupos após os tratamentos, para avaliação da eficiência no controle do carrapato na fase não-parasitária. Amostras de solo e raízes dos vasos de cada grupo foram coletadas por cinco meses após os respectivos tratamentos e inoculadas em meio de cultura artificial seletivo, para analisar a persistência de fungos no solo e colonização das raízes. Dados climatológicos (temperatura ambiente, umidade e irradiação UV) também foram avaliados. As colônias recuperados foram submetidas a análises moleculares para confirmar a identidade do *Metarhizium* LCM S04. Os três grupos exibiram diferenças significativas ($P < 0,5$) entre si na recuperação de larvas de *R. microplus*. O grupo não tratado exibiu a maior média de larvas recuperadas (2596 ± 1103), seguido pelo grupo controle óleo (740 ± 465). O grupo tratado com fungo (LCM S04) teve apenas 11 larvas recuperadas (média de $1,37 \pm 3,88$). Durante os cinco meses após o tratamento, o isolado de *M. anisopliae* LCM S04 ainda podia ser reisolado das amostras de solo e raízes dos vasos tratados com emulsão fúngica. A densidade média de colônias deste fungo no solo dos vasos tratados variou de $0,46 \times 10^5$ a $1,1 \times 10^5$ unidades formadoras de colônia por grama, que aumentaram com o passar do tempo. As sequências dos fragmentos do gene *efl-α* dos isolados recuperados durante as coletas demonstraram alta similaridade com o LCM S04. Assim, o presente estudo evidenciou a eficiência de um isolado entomopatogênico nativo no controle de larvas de *R. microplus* após contato com fêmeas ingurgitadas, e a persistência do isolado em condição de semi-campo.

Palavras-chave: fungo entomopatogênico; rizosfera-competente; carrapato do boi

Apoio financeiro: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

ABSTRACT

SILVA, Emily Mesquita da. **Environmental Persistence of a Native *Metarhizium* Isolate and the efficiency on the *Rhipicephalus microplus* Control in Semi-field conditions.** 2019. 47p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Biological control with entomopathogenic fungi as an alternative in the control of arthropods has solidified through results that prove the efficiency of these microorganisms against different arthropod pests. However, applications in the field are still challenged by the influence of abiotic factors such as temperature, humidity and UV irradiation. The selection of native isolates may reduce the negative effects caused by abiotic factors, since these fungi tend to be more tolerant to local climate and site ecology. Despite the application of entomopathogenic fungi in agriculture is a current viable and effective control strategy, with the use of registered products, the scenario in livestock farming is not yet a reality. Thus, the present study aimed to conduct the molecular taxonomic identification of the native isolate LCM S04 *Metarhizium* sp.; to monitor the environmental persistence of the isolate of *Metarhizium* sp. in semi-field condition; To evaluate the colonization of *Brachiaria brizantha* roots. Three groups containing ten pots with *B. brizantha* were formed: (1) untreated pots (CTR); (2) pots treated with mineral oil emulsion in water (CTROL); (3) pots treated with oil fungal emulsion based on LCM S04 isolate. In addition, five *Rhipicephalus microplus* females were added to the pots of the respective groups after the treatments, to evaluate the efficiency in tick control in the non-parasitic phase. Soil and root samples of the pots from each group were collected during the five months after treatments and inoculated in a selective artificial culture medium to analyze the persistence of fungi in the soil and root colonization. Climatic data (ambient temperature, humidity and UV irradiation) were also evaluated. The recovered colonies were subjected to molecular analyzes to confirm the identity of *Metarhizium* LCM S04. The three groups showed significant differences ($P < 0.5$) among themselves in the recovery of *R. microplus* larvae. The untreated group exhibited the highest mean of recovered larvae (2596 ± 1103), followed by the oil control group (740 ± 465). The fungus treated group (LCM S04) had only 11 recovered larvae (mean of 1.37 ± 3.88). During the five months after treatment, *M. anisopliae* LCM S04 isolate could still be reisolated from the soil samples and roots of the fungal emulsion treated pots. The average colonies density of this fungus in the treated pots soil ranged from 0.46×10^5 to 1.1×10^5 colony forming units per gram, which increased over time. Sequences of the *ef1- α* gene fragments of the isolates recovered during the collections showed a high similarity to the S04 LCM. Thus, the present study evidenced the efficiency of a native entomopathogenic isolate in the control of *R. microplus* larvae after contact with engorged females, and the persistence of the isolate on soil and *B. brizantha* roots in semi-field condition.

Keywords: entomopathogenic fungus; rhizosphere-competent; cattle tick

Financial support: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Finance Code 001; National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados nas reações de amplificação dos genes	15
Tabela 2. Referência de isolados e suas respectivas informações de coleta e códigos de acesso disponíveis no “GeneBank”	16

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Área externa ao LCM onde os vasos com as gramíneas permaneceram durante todo o período experimental, com incidência direta de luz, chuva e calor.....9
- Figura 2:** Larvas de *Rhipicephalus microplus* no ápice das folhas de *Brachiaria brizantha* 60 dias após tratamentos do solo 14
- Figura 3:** Armazenamento e contagem das larvas de *Rhipicephalus microplus* coletadas. (A) Fragmentos do ápice da forrageira contendo larvas de *R. microplus* alocados em sacos plásticos para congelamento; (B) Contagem individual das larvas de *R. microplus* com auxílio de ponteira de 1000 μ L..... 14
- Figura 4:** Características morfológicas do isolado *Metarhizium* sp. LCM S04. (A) Pnto único de inóculo em meio de cultura BDA cultivado por 14 dias; (B) Microcultivo evidenciando conidióforos e conídios do isolado *Metarhizium* sp. LCM S04 em meio de cultura BDA por 5 dias 16
- Figura 5:** Dendograma de similaridade formado pelo método de “Neighbour-joining” da região EF1- α para alocação filogenética do isolado *Metarhizium anisopliae* LCM S04 coletado no solo do estado do Rio de Janeiro. Dendograma gerado através do modelo de “Kimura-2 parameter” utilizando análise de “bootstrap” com 1000 replicações. O isolado CBS 103.65 foi tillizado como “outgroup”17
- Figura 6:** Fêmeas, ovos e larvas de *Rhipicephalus microplus* em vasos cultivados com *Brachiaria brizantha*. (A) Fêmeas de *R. microplus*, do grupo tratado com emulsão fúngica, colonizadas por *Metarhizium anisopliae* LCM S04 realizando postura, 14 dias após tratamento do solo; (B) Ovos de *R. microplus* do grupo tratado com emulsão fúngica com presença de micélio, 11 dias após tratamento do solo; (C) Fêmeas de *R. microplus* do grupo não tratado (CTR), 27 dias após tratamento do solo e alocação das fêmeas nos vasos 18
- Figura 7:** Média e desvio padrão dos valores relativos à recuperação de larvas de *Rhipicephalus microplus* 60 dias após posicionamento das fêmeas nos vasos cultivados com *B. brizantha*, tratados ou não com a emulsão fúngica de *Metarhizium anisopliae* (LCM S04) Análise estatística foi realizada com teste Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferenças estatísticas..... 18
- Figura 8:** Amostras coletadas dos vasos do grupo tratado após inoculação do isolado *Metarhizium anisopliae* LCM S04 cultivadas por 21 dias. Placas refentes às 10 coletas realizadas durante cinco meses. Primeira coleta (A); Segunda coleta (B); Terceira coleta (C); Quarta coleta (D); Quinta coleta (E); Sexta coleta (F); Sétima coleta (G); Oitava coleta (H); Nona coleta (I); Décima coleta (J)..... 20
- Figura 9:** Unidades formadoras de colônia (UFC) de *Metarhizium anisopliae* LCM S04 reisoladas dos vasos tratados com emulsão fúngica durante cinco meses. A análise estatística foi realizada com teste Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls 21
- Figura 10:** Colônias fúngicas isoladas de amostras de solo do grupo tratado antes da inoculação do isolado *Metarhizium anisopliae* LCM S04 (26/01/18). Placas referentes aos dez

vasos que compõem o grupo. (A) Vaso 1; (B) Vaso 2; (C) Vaso 3; (D)Vaso 4; (E) Vaso 5; (F) Vaso 6; (G) Vaso 7; (H) Vaso 8; (I)Vaso 9; (J) Vaso 10..... 22

Figura 11: Colônias fúngicas isoladas de amostras de solo do grupo que não recebeu tratamento (CTR) antes do início do experimento. Placas referentes aos dez vasos que compõem o grupo. (A) Vaso 1; (B) Vaso 2; (C) Vaso 3; (D)Vaso 4; (E) Vaso 5; (F) Vaso 6; (G) Vaso 7; (H) Vaso 8; (I)Vaso 9; (J) Vaso 10..... 23

Figura 12: Colônias fúngicas isoladas de amostras de solo do grupotratado com emulsão oleosa (CTR OL) antes do tratamwnto. Placas referentes aos dez vasos que compõem o grupo. (A) Vaso 1; (B) Vaso 2; (C) Vaso 3; (D)Vaso 4; (E) Vaso 5; (F) Vaso 6; (G) Vaso 7; (H) Vaso 8; (I)Vaso 9; (J) Vaso 1024

Figura 13:Crescimento de colônias de *Metarhizium* sp. oriundas de raízes de *Bracharia brizantha* do grupo tratado com emulsão fúngica (LCM S04) inoculadas em meio de cultura seletivo CTC. Placas refentes às 10 coletas realizadas durante cinco meses. Primeira coleta (A); Segunda coleta (B); Terceira coleta (C); Quarta coleta (D); Quinta coleta (E); Sexta coleta (F); Sétima coleta (G); Oitava coleta (H); Nona coleta (I); Décima coleta (J). Seta indica a exteriorização de fungo diferente de *Metarhizium*..... 26

Figura 14: Colônias fúngicas observadas no grupos não tratado (CTR) e tratado com emulsão oleosa (CTROL) em CTC demonstrando crescimento de fungos saprófitas encontrados com maior frequência durante as coletas: (A) Placara referente à segunda coleta do grupo tratado com elusão oleosa (CTROL- vaso 6) evidenciando colônia do fungo *Aspergillus* sp. (seta); (B) Sexta coleta do grupo controle (CTR- vaso 8) com presença de colônias do fungo *Beauveria* sp.; (C) Quinta coleta do grupo controle (CTR- vaso 3) evidenciando colônia do fungo *Fusarium* sp. (seta); (D) Sétima coleta do grupo controle (CTR- vaso 2) com presença de colônias do fungo *Acremonium* sp.; (E) Quinta coleta do grupo tratado com emulsão oleosa (CTROL- vaso 4) com presença de colônias do fungo *Peacilomyces* sp 28

Figura 15: Colônias fúngicas observadas em ponto único de inóculo acondicionadas por 12 dias: (A) Colônia do fungo *Aspergillus* sp. cultivado em meio de cultura CYA à 37°C referente a coleta 2- vaso 6 (CTROL); (B) Colônia do fungo *Beauveria* sp. cultivado em meio BDA à 25°C referente a coleta 6- vaso 8 (CTR); (C) Colônia do fungo *Fusarium* sp. cultivado em meio BDA à 25°C referente a Coleta 5- vaso 3 (CTR); (D) Colônia do fungo *Fusarium* sp. cultivado em meio BDA à 25°C referente a coleta 2-vaso 7 (CTROL); (E) Colônia do fungo *Peacilomyces* sp. cultivado em meio BDA à 25°C referente a coleta 2- vaso 4 (CTROL) 29

Figura 16: Microcultivo em BDA dos isolados de fungos saprófitas encontrados nas amostras de solo com maior frequência. Observação em microscopia de luz convencional: (A)Estruturas fúngicas de *Peacilomyces* sp. Referente a coleta 2- vaso 4 (CTROL) (B)Estruturas fúngicas de *Acremonium* sp. Refrente as coletas: 2-vaso 5 (CTROL) e 7-vaso 2 (CTR). Barra = 50µm30

Figura 17: Microcultivo em MEA de isolados de fungos saprófitas encontrados nas amostras de solo com maior frequência do gênero *Aspergillus* sp.. Observação em microscopia de luz convencional: (A) Coleta 3- vaso 4 (CTR); (B) Coleta 2- vaso 6 (CTROL) Barra = 50 µm..... 30

Figura 18: Microcultivo em BDA dos isolados de fungos saprófitas encontrados nas amostras de solo com maior frequência. Observação em microscopia de luz convencional: (A)Estruturas fúngicas de *Beauveria* sp. refrente a coleta 6-vaso 8 (CTR);(B)Estruturas fúngicas de *Fusarium* sp. Referente as coletas: 2-vaso 7 (CTROL) e Coleta 5-vaso 3 (CTR). Barra = 50 µm..... 30

Figura 19: Medidas de intensidade de irradiação solar observadas de 290 a 400 nm, expressas em $\text{mW m}^{-2} \text{nm}^{-1}$, com base na irradiância ponderada por Quaité (QUAITE et al., 1992). As medições foram realizadas nos mesmos dias em que as coletas de solo, a cada 15 dias, totalizando 10 coletas. Barras de erro são desvios padrão de três medições diferentes realizadas a cada 2 minutos, começando às 13:00. * Na coleta de número coleta 2 não foi possível medir os dados devido às condições meteorológicas do dia..... 31

Figura 20: Temperaturas máxima, média e mínima monitoradas de Janeiro à Junho de 2018. As medições foram realizadas a cada 2 horas, diariamente. A linha vermelha indica a temperatura máxima; linha amarela mostra a temperatura média; linha cinza mostra a temperatura mínima. Os símbolos representam os dias de coleta32

Figura 21: Valores de umidade relativa máxima, média e mínima monitoradas de Janeiro à Junho de 2018.. As medições foram realizadas a cada 2 horas, diariamente. A linha azul indica a temperatura máxima; linha amarela indica a umidade média; linha cinza indica a umidade mínima. Os símbolos representam os dias de coleta..... 33

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 <i>Metarhizium</i> spp.....	2
2.2 <i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.3 <i>Metarhizium</i> spp. e o controle alternativo de <i>Rhipicephalus microplus</i>	4
2.4 Propriedades endofíticas de <i>Metarhizium</i> spp	6
2.5 Competência rizosférica de <i>Metarhizium</i> spp.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Local do experimento	8
3.2 Obtenção de <i>Rhipicephalus microplus</i>	8
3.3 Obtenção e manutenção do isolado fúngico	8
3.4 Cultivo de <i>Brachiaria brizantha</i>	8
3.5 Preparação da emulsão oleosa	9
3.6 Identificação do isolado <i>Metarhizium</i> sp. LCM S04	10
3.6.1 Análise morfológica do isolado <i>Metarhizium</i> sp. LCM S04	10
3.6.2 Análise molecular do isolado LCM S04	10
3.6.2.1 Extração de DNA	10
3.6.2.2 Amplificação do DNA por PCR	10
3.6.2.3 Purificação dos produtos de PCR	11
3.6.2.4 Sequenciamento do gene EF-1 α	11
3.7 Delineamento experimental do ensaio com fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i> em condições de semi-campo	13
3.8 Recuperação das larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	13
3.9 Persistência no solo do isolado LCM S04 <i>Metarhizium</i> sp. no solo.....	14
3.10 Colonização das raízes de <i>Brachiaria brizantha</i>	15
3.11 Identificação morfológica dos fungos saprófitas	15
3.12 Verificação das variações climáticas	16
3.13 Análise estatística.....	16

4.0 RESULTADOS	16
4.1 Identificação do isolado LCM S04 de <i>Metarhizium</i> sp.....	16
4.1.1 Características morfológicas do isolado LCM S04 de <i>Metarhizium</i> sp.....	16
4.1.2 Identificação taxonômica do isolado LCMS04.....	17
4.2 Recuperação de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
4.3 Persistência do isolado fúngico no solo tratado	20
4.4 Colonização endofítica do isolado LCMS04 em raízes de <i>Brachiaria brizantha</i> ..	26
4.5 Identificação morfológica dos fungos saprófitas	28
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

As interações ecológicas envolvendo *Metarhizium* spp. são responsáveis pelo seu grande potencial como agente biocontrolador de diversas espécies de artrópodes. Esse fungo entomopatogênico possui a habilidade de sobreviver em ambientes que contemplam diferentes características climáticas e ambientais. Além disso, existem espécies que se mantêm como saprófitas, rizosfera-competentes, patógenos de artrópodes e endofíticos.

Atualmente, o controle biológico utilizando fungos entomopatogênicos se mostra uma alternativa eficiente na agricultura, com produtos disponíveis para diversas pragas de importância econômica no mundo. Além do emprego no ambiente agrícola, estudos apontam o potencial destes agentes na pecuária. Trabalhos relacionados ao controle de carrapatos, como o carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*, já evidenciaram a eficiência do controle biológico em condições laboratoriais e à campo. Os prejuízos econômicos causados por *R. microplus* atingem principalmente regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil que concentra o maior rebanho bovino dentre os países produtores de carne e leite. Novas abordagens no controle deste carrapato se fazem necessárias, visto que já há relatos de resistências a bases químicas recentemente incorporadas em produtos acaricidas no mercado nacional.

A aplicação dos fungos entomopatogênicos pode ser realizada de maneira similar aos produtos químicos, possibilitando o tratamento do animal e/ou do ambiente que o mesmo está inserido. Este é um aspecto relevante no uso do controle biológico, pois torna-se de fácil manipulação. Além disso, é sabido que cerca de 95% da população do carrapato bovino se encontra nos solos das pastagens na forma de ovo e larva. Espécies nativas de fungos isoladas do solo tendem a ser naturalmente adaptadas às condições locais, com grandes chances de persistir no ambiente por um maior período de tempo. A aplicação de isolados na mesma região de onde foram coletados, e que possuem característica rizosfera-competente aumentam as perspectivas de sucesso do tratamento. Assim, uma mesma aplicação poderia atingir mais de uma geração do artrópode alvo.

Para algumas espécies de *Metarhizium*, pode-se estabelecer uma relação ecológica entre esses fungos e as plantas, quando presentes no mesmo ambiente. Essas características como fungo endofítico e rizosfera-competente pode significar uma outra forma dos fungos atingirem os artrópodes, e ainda proteger esses microrganismos de fatores como a radiação, temperatura e a umidade, quando estão em uma relação íntima com as plantas.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar taxonomicamente o isolado de *Metarhizium* sp. LCM S04 em nível de espécie; avaliar a virulência do isolado nativo de *Metarhizium* sp. LCM S04 na fase não parasitária de *R. microplus*, oriundo de uma colônia mantida na mesma região; monitorar a persistência de um isolado nativo de *Metarhizium* sp. LCM S04 no ambiente, após pulverização do mesmo no solo de vasos cultivados com *Bracharia brizantha*; avaliar se o isolado foi capaz de colonizar as raízes de *B. brizantha*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Metarhizium* spp.

O gênero *Metarhizium* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hypocreales: Clavicipitaceae) compreende espécies de fungos cosmopolitas, que podem ser encontradas em diferentes regiões e temperaturas (ROBERTS; ST LEGER, 2004). As espécies de *Metarhizium* estão envolvidas em diferentes relações ecológicas, visto que são encontradas e/ou reisoladas em diversos substratos e ambientes. Dentre as espécies de *Metarhizium* conhecidas atualmente, *Metarhizium pingshaense*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium robertsii*, e *Metarhizium brunneum* são as isoladas com maior frequência de artrópodes e dos solos (REHNER; KEPLER, 2017). Consequentemente, possuem adaptações para responder aos estímulos percebidos em cada situação, vivendo como saprófito, patógeno de artrópodes e nas raízes de plantas (LOVETT; ST LEGER, 2014).

Metarhizium anisopliae é capaz de expressar proteínas de adesão diferentes, em resposta ao ambiente em que está inserido (BARELLI et al., 2011; WYREBEK; BIDOCHKA, 2013). Wang e St Leger (2006) observaram que na presença de hemolinfa, *M. anisopliae* expressa MAD1 (*Metarhizium* adhesin-like protein 1) e quando nos exsudatos de raízes, MAD2 (*Metarhizium* adhesin-like protein 2). As adesinas são responsáveis pelo primeiro estágio da colonização do hospedeiro, proporcionando a adesão dos propágulos nos insetos e nas superfícies das plantas. Quando no solo, *M. robertsii* superexpressa uma proteína de choque térmico (Heat Shock Protein-HSP25), aumentando a termotolerância e a sobrevivência como saprófito (LIAO, 2013a). Por outro lado, em situações de temperaturas muito baixas, algumas espécies de *Metarhizium* ainda são capazes de sobreviverem e colonizarem seus hospedeiros através da expressão de CRP1 (cold response protein 1) e CRP2 (cold response protein 2) (FANG; ST LEGER, 2010). Essas proteínas são homólogas as proteínas de choque frio (Cold Shock Protein-CSPs) encontradas em outros microorganismos, como *Pseudomonas entomophila* (FANG; ST LEGER, 2010; LOVETT; ST LEGER, 2014).

Uma vez dentro do artrópode, *Metarhizium* spp. necessitam responder ao sistema imunológico do hospedeiro para dar continuidade à infecção. Wang e St Leger (2006) demonstraram a expressão do gene MCL1, que é responsável pela proteção dos corpos hifais de *Metarhizium*. Essa proteção impede o reconhecimento do fungo pelos hemócitos, dificultando os processos de fagocitose e encapsulação. Ainda na hemocele, *Metarhizium* spp. se utilizam de estratégias para reconhecer as pressões osmóticas sofridas na hemolinfa, através da expressão do gene Mos1 (WANG; DUAN; ST LEGER, 2008). Desta forma, é possível perceber a co-evolução que *Metarhizium* spp. passou ao longo do tempo, dispendo de estilos de vida multifuncionais (BARELLI et al., 2016).

A diversidade das espécies de *Metarhizium* encontradas pode variar de acordo com os substrato e com o grau de distúrbio humano na localidade. Garrido-Jurado et al. (2015), demonstraram que a diversidade de espécies é inversamente proporcional ao grau de manipulação que humanos empregam. *Metarhizium* spp. são encontradas em maior quantidade e diversidade em amostras de solo quando comparado à amostras de plantas, sendo *M. anisopliae* s.s a espécie mais recuperada (HERNÁNDEZ-DOMÍNGEZ; GUZMÁN-FRANCO 2017).

Atualmente, a identificação taxonômica de *Metarhizium* spp. é realizada com análises moleculares. No trabalho de Bischoff, Rehner e Humber (2009), espécies de *Metarhizium* que

pertencem ao complexo *Metarhizium anisopliae* foram reconhecidas ao nível de espécie, resultando na distinção de nove espécies. O estudo foi conduzido através de uma abordagem filogenética multigênica, que envolvia genes de β - tubulina, Ef-1 α , RPB1 e RPB2. Desta forma, espécies que anteriormente eram identificadas apenas como *M. anisopliae*, obtiveram uma identificação mais precisa. Atualmente, espécies identificadas como sendo pertencentes ao gênero *Metarhizium* são classificadas de acordo com Bischoff, Rehner e Humber (2009). Recentemente, Lopes et al. (2018) revelaram uma nova espécie do complexo *M. anisopliae* em que é possível perceber diferenças na morfologia dos conídios. No entanto, a análise multigênica permitiu a alocação de *M. alvesii* sp. nov., no complexo *M. anisopliae*.

2.2 *Rhipicephalus microplus*

O carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), é o principal ectoparasita do gado em áreas tropicais, incluindo o Brasil. Esse ectoparasito é oriundo de florestas da região asiática, que eram habitadas por bovinos e cervos, sendo posteriormente introduzido nas Américas (ESTRADA-PEÑA et al., 2006). Em um estudo realizado em Minas Gerais, Szabó et al. (2018) relataram infestação por *R. microplus* em todos os bovinos observados. A preferência pelos bovinos como hospedeiro principal, causa prejuízos para a economia brasileira, uma vez que a pecuária é uma das maiores fontes de renda do país. No Brasil, a perda é estimada em 3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2014). Os malefícios ocorrem devido as consequências que o parasitismo provoca, como o desconforto aos animais, a possibilidade de anemia, imunossupressão, redução do peso e do estado nutricional, do crescimento e da produção do gado bovino (HORN, 1983). As lesões causadas na pele dos animais podem ainda favorecer o aparecimento de infecções secundárias, com possíveis prejuízos na produção de couro (GONZÁLES; SERRA-FREIRE, 1992) além do surgimento de miíases (RECK et al., 2014a).

Rhipicephalus microplus também é vetor dos agentes patogênicos causadores da tristeza parasitária bovina (ALMEIDA et al., 2006). Essa doença é ocasionada pela associação de protozoários pertencentes ao gênero *Babesia* e a riquetsia *Anaplasma* sp. (AZEVEDO; ALVES; SALES, 2008). A transmissão de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* ocorre através dos repastos sanguíneos, uma vez que os micro-organismos podem estar presentes na saliva dos artrópodes (FURLONG; PRATA, 2005). Estudos recentes já demonstraram que *R. microplus* também pode ser capaz de transmitir micro-organismos como vírus (MARUYAMA et al., 2014; VILLA et al., 2017).

O ciclo biológico de *R. microplus* é caracterizado como monoxeno, e possui as fases parasitária e não-parasitária. Durante a fase parasitária, o carrapato permanece sobre o bovino para acasalamento e alimentação. Após o ingurgitamento da fêmea, a mesma se desprende e cai ao solo, iniciando a fase não-parasitária do ciclo (FURLONG; PRATA, 2005). Em seguida, a fêmea procura um local com condições adequadas para realizar a postura dos ovos, que passam pela fase larval e ninfal (FURLONG; PRATA, 2005). Posteriormente, as ninfas se fixam no hospedeiro e se tornam maduras sexualmente. No período durante a fase não-parasitária, em que a fêmea está no solo, a mesma fica exposta à inimigos naturais presentes no solo, tais como nematóides e micro-organismos, que são patogênicos aos carrapatos (CHAGAS, FURLONG; NASCIMENTO, 2001; VERÍSSIMO, 2013).

Atualmente, o principal problema envolvendo o controle das populações de *R. microplus* com o uso de acaricidas químicos, é a resistência as bases químicas (FULAR et al., 2018; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). Além disso, a contaminação do meio

ambiente com resíduos das bases (BANUMATHI et al., 2017) causa prejuízos, uma vez que não são decompostos na natureza. No decorrer das últimas décadas, têm-se a incorporação de novas bases químicas no mercado e os subsequentes relatos de resistência (RECK, et al., 2014b). Os métodos erroneamente empregados na aplicação das bases químicas, contribuem significativamente para o aumento da resistência aos produtos. Um dos fatores mais prejudiciais nesse aspecto é a utilização do mesmo produto químico por um longo período de tempo (ABBAS et al., 2014).

Reck et al. (2014b) publicaram o primeiro caso de resistência de *R. microplus* ao Fluazuron (benzoil-fenil-ureia), único ingrediente ativo sem relatos de resistência até o estudo. O mesmo trabalho ainda reportou a primeira população de *R. microplus* capaz de resistir à seis classes de acaricidas utilizadas no controle químico do carrapato no Brasil. Estudos com populações de carrapatos coletadas em diferentes ranchos no Sul do Brasil, demonstraram que aproximadamente 80% das amostras apresentam resistência múltipla para três ou mais compostos (KLAFKE et al., 2017).

2.3 *Metarhizium* spp. e o controle alternativo de *Rhipicephalus microplus*

Em razão aos problemas ocasionados pelo uso dos acaricidas químicos, alternativas para o controle de *R. microplus* são continuamente estudadas. O controle biológico com fungos entomopatogênicos tem seu potencial reconhecido principalmente na agricultura, onde as aplicações possuem êxito sobre diferentes artrópodes praga (BATTA, 2013; MASCARIN et al., 2018). Michereff et al. (2009) apresentaram uma revisão sobre o uso de micoinseticidas e micoaricidas no Brasil, apontando *Metarhizium* como base de 55% dos produtos disponíveis no mercado. Hoje, o maior programa de controle microbiano no mundo é efetuado com *Metarhizium anisopliae* sobre cigarrinhas (Cercopidae) da cana de açúcar (MASCARIN et al., 2018). No entanto, ainda não existe um produto comercial registrado no Brasil exclusivamente para o controle de carrapatos.

O projeto “Tick control” (www.tickproject.org) é desenvolvido nos EUA e visa a redução de doenças transmitidas por carrapatos. A iniciativa acontece através do uso de armadilhas que aplicam o produto químico Fironil em animais domésticos, juntamente com a aspersão do isolado *Metarhizium brunneum* F52 na vegetação. Esse isolado é atualmente comercializado como MET52 (Novozymes Biological, Franklinton, NC, USA). A aplicação de *M.brunneum* F52 reduziu significativamente o número de ninfas recuperadas de *Ixodes scapularis* em condições à campo, controlando em 73% (BHARADWAJ; STAFFORD, 2010). Fischhoff et al. (2017) observaram que esse isolado quando aplicado à campo não causou danos aos artrópodes não-alvo que compatilham o mesmo ambiente que carrapatos.

A ação de *Metarhizium* spp. sob os artrópodes acontece através da germinação do propágulo fúngico na cutícula do artrópode, levando a formação do tubo germinativo. Após a fixação do apressório sobre a cutícula, ocorrem uma série de reações enzimáticas juntamente com o aparato mecânico das estruturas fúngicas, que possibilitam a penetração do fungo dando continuidade ao processo de infecção. Uma vez dentro do artrópode, desenvolvem-se corpos hifais que se proliferam e resultam em um micélio, que liberam toxinas e metabólitos secundários. O alcance dessas estruturas nos órgãos do hospedeiro, ocasionam mudanças patológicas na hemocele, ação histolítica e bloqueio mecânico do sistema digestório, causando paralisias no funcionamento do seu corpo, o que acaba levando o animal a morte (ALVES, 1998; NASCIMENTO, 2003).

Em contrapartida a maioria dos estudos publicados utilizando conídios de *Metarhizium* spp., trabalhos já relatam vantagens no uso de outros propágulos para controle de insetos (MASCARIN; JARONSKI, 2016; ALKHAIBARI et al., 2017) e carrapatos (HARTELT et al., 2008; BERNARDO, et al., 2018). Bernardo et al. (2018) demonstraram ainda que a germinação de blastosporos (corpos hifais) na cutícula de *R. microplus* foi mais rápida quando comparada com conídios de mesmo isolado.

Além de insetos, *Metarhizium* spp. também possuem ação sobre ácaros e carrapatos (CHANDLER et al., 2000; CAMARGO, et al., 2016; BERNARDO et al., 2018; DE PAULO et al., 2018). Ángel-Sahagún et al. (2010) conduziram estudos em laboratório, e observaram maior virulência dos isolados de *Metarhizium* sp. quando comparados à isolados de *Isaria fumosorosea* para *R. microplus*. *M. anisopliae* foi capaz de reduzir a ovoposição de *R. microplus* em 55% quando em laboratório e apresentou uma eficiência superior à 60% sobre a vegetação infestada com larvas (OJEDA-CHI et al., 2010). Fernández-Salas et al. (2016) testaram 55 isolados de *M. anisopliae* e observaram virulência de nove isolados para fêmeas de *R. microplus* de populações resistentes e susceptíveis à carrapaticidas, através da redução da produção de ovos.

Quando aplicados à campo, os isolados de fungos entomopatogênicos sofrem ação de intempéries ambientais, que podem comprometer a viabilidade das unidades germinativas dos fungos (CAMARGO et al., 2012). O isolado *M. anisopliae* (E9) em laboratório demonstrou alta patogenicidade sobre *R. microplus*, entretanto, quando à campo as suspensões aquosas utilizadas para a pulverização da pastagem não foram estatisticamente eficientes (GARCIA et al., 2011). Sendo assim, os micro-organismos necessitam de uma proteção que objetiva aumentar seu potencial de ação, quando na natureza. Quando comparadas com suspensões aquosas, as oleosas apresentaram maior eficiência sobre o carrapato *Amblyoma variegatum* em diferentes condições experimentais (MARANGÁ et al., 2005). O fato da cutícula do artrópode ser lipofílica resulta no aumento da interação com a formulação oleosa, diferente das aquosas (PRIOR; JOLLANDS, 1988; JENKINS; GOETTEL, 1998). Além disso, o óleo é capaz de oferecer proteção contra a incidência da luz UV (MOORE; HIGGINS; LOMER, 1996). Deste modo, são adicionadas substâncias como adjuvantes e óleos, que irão resultar em uma formulação capaz de aumentar a eficácia dos micro-organismos. As formulações utilizadas podem ser líquidas ou sólidas, sendo também encontradas nas formas de cápsulas. Vemmer e Patel (2013) realizaram uma revisão abordando os principais métodos de encapsulação que visam o controle biológico.

As formulações oleosas evitam que conídios secos adicionados aos líquidos sofram danos em sua membrana plasmática ao serem embebidos na solução, fenômeno que ocorre nas formulações aquosas (FARIA; HAJEK; WRAIGHT, 2009). Cerca de um quarto dos micoinseticidas vendidos no Brasil são a base de óleo (MICHEREFF et al., 2009). Trabalhos realizados com testes à campo demonstraram eficiência de formulações de *Metarhizium* spp. a base de óleo sobre *R. microplus* (CAMARGO et al., 2014; 2016), *R. annulatus* (SAMISH et al., 2014), *R. evertsi evertsi* e *R. decoloratus* (KAAYA et al., 2011).

O conceito de um manejo integrado visando o uso de duas ou mais técnicas é abordado para pragas agrícolas, e também tem sido aplicado para carrapatos (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). Estudos já demonstram a eficácia de associações entre *Metarhizium* spp. e bases químicas comumente usadas nos produtos comerciais (WEBSTER et al., 2015; FIOROTTI et al., 2016).

2.4 Propriedades endofíticas de *Metarhizium* spp.

Algumas espécies de *Metarhizium* podem ser consideradas endofíticas (VIDAL; JABER, 2015; GREENFIELD et al., 2016), sendo capazes de colonizar plantas e manter interações diretas com os vegetais, sem causar nenhum dano aos mesmos. Esses micro-organismos podem penetrar nas plantas por meio de feridas no caso das raízes e/ou aberturas naturais como os estômatos nas folhas (AZEVEDO, 1998). Os micro-organismos endofíticos são classificados de duas formas, sendo considerados endofíticos verdadeiros/sistêmicos ou transitórios/não sistêmicos (WANI, 2015). Para Jaber e Ownley (2017), os endofíticos, principalmente os entomopatogênicos, agem como pesticidas que são liberados através das plantas. Ao permanecerem dentro dos vegetais, os micro-organismos dispõem de uma outra possibilidade de persistirem no ambiente protegidos das variáveis ambientais. Quando inoculados artificialmente, os fungos endofíticos podem se estabelecer através de diferentes técnicas de inoculação, como: pulverização na parte aérea (folhas), encharcamento do solo e imersão de sementes (VEGA 2018). O sucesso do estabelecimento da colonização pode estar diretamente relacionado ao tipo de inoculação utilizada (PARSA et al., 2013)

Análises do genoma de *Metarhizium* spp. evidenciaram que eles são filogeneticamente mais próximos de patógenos e endofíticos de plantas do que dos patógenos de animais (GAO et al., 2011). Gao et al. (2011) também observaram a presença de diversos genes compartilhados entre *Metarhizium* spp. e simbioses de plantas, sugerindo assim que a evolução tenha acontecido através de fungos associados a vegetais. Desta forma, alguns autores propuseram que os fungos endofíticos entomopatogênicos não deixaram de se associar a plantas, mas se tornaram patogênicos a insetos na busca por nutrientes (BARELLI et al., 2016).

Quando associados as plantas, *Metarhizium* spp. podem ainda oferecer benefícios para as mesmas. *Metarhizium robertsii* já foi relatado promovendo o crescimento de *Panicum virgatum* (gramínea) e *Phaseolus vulgaris* (feijões) (SASAN E BIDOCKA, 2012). Behie, Zelisko e Bidochka (2012) observaram *M. robertsii* agindo como transportador de nitrogênio para as mesmas espécies, através de insetos mortos presentes no solo. No entanto, além de oferecer nutrientes para as plantas, *Metarhizium* spp. podem receber nutrientes em troca. Behie et al. (2017), verificaram a assimilação de carbono derivado de *P. vulgaris* para *M. robertsii*. Além disso, Liao et al. (2017), demonstraram que *M. robertsii* possui vias metabólicas dependentes de auxina, hormônio responsável pelo crescimento das plantas. *M. robertsii* é capaz ainda de secretar esse hormônio sobre a cutícula de artrópodes (LIAO et al., 2017).

2.5 A competência rizosférica de *Metarhizium* spp.

A habilidade que microrganismos possuem de colonizar e se estabelecer na rizosfera de raízes em desenvolvimento tem sido definida como “rizosfera-competente” (ST LEGER, 2008). Algumas espécies de *Metarhizium* já foram reportadas demonstrando esse tipo de interação (HU; ST LEGER, 2002), podendo ainda expressar diferentes genes quando em contato com os exudatos das raízes (PAVA-RIPOLL et al., 2010). O gene MrINV foi caracterizado sendo expresso por *Metarhizium robertsii* nos exudatos das raízes, codificando a enzima invertase, responsável pela hidrólise da sacarose (LIAO et al., 2013b). As interações com as raízes das plantas conferem vantagens para a persistência dos microrganismos no solo. Dessa forma, o uso de um fungo entomopatogênico que é rizosfera-competente e que possui a capacidade de se propagar nas raízes, diminuiria a quantidade de inóculos necessários (BRUCK, 2010) em protocolos tratamento de solo, evitando as aplicações constantes de

inóculos no ambiente. Assim, o crescimento saprófito de *Metarhizium* spp. na rizosfera é uma forma de manter o fungo no ambiente, até que possa encontrar um hospedeiro (CORY; ERICSSON, 2009).

A relação da espécie fúngica com a espécie vegetal pode ser um fator determinante para a persistência do micro-organismo na rizosfera. Fisher et al. (2011) isolaram *Metarhizium brunneum*, *M. guizhouense*, *M. robertsii*, e *M. flavoviride* de três espécies de plantas diferentes, observando especificidades entre elas. Wang et al. (2011), obtiveram dois isolados modificados geneticamente de *M. robertsii* 2575 com mudanças relativas a patogenicidade e competência rizosférica, resultando em: (1) avirulento para insetos e (2) incapaz de se aderir as raízes. Quando no ambiente, o isolado que não podia se aderir as raízes persistiu por menos tempo quando comparado ao isolado que tinha baixa infectividade aos insetos e ao selvagem. Este resultado sugere que a relação com as plantas seria mais importante para a sobrevivência do fungo, do que a própria interação com os artrópodes hospedeiros.

Os estudos envolvendo o isolamento de espécies ocorrendo naturalmente nos ambientes são essenciais para a compreensão da biodiversidade dos micro-organismos presentes no solo (BRUCK, 2010). Hernández-Domínguez e Guzmán-Franco (2017), coletaram amostras de solo de cultivos de cana-de-açúcar e de gramíneas por aproximadamente um ano, e identificaram 80 isolados de *M. anisopliae* s.s.. Kabaluk, Li-Leger e Nam (2017) relacionaram a quantidade de insetos infectados com *Metarhizium brunneum* e a abundância do fungo presente nos solos coletados. Como resultado, verificaram que o maior número de insetos infectados eram provenientes de locais onde *M. brunneum* estava presente em maior quantidade, considerando-o como uma doença enzoótica.

Castro et al. 2016, realizaram um estudo sobre a persistência de dois isolados brasileiros de *M. anisopliae* e *M. robertsii* em uma plantação de morango durante um ano, após encharcamento de solo. O isolado de *M. robertsii* apresentou maior taxa de recuperação em comparação ao *M. anisopliae*. As amostras provenientes do solo demonstraram a persistência de ambos os isolados testados, nos grupos tratados e controle, sugerindo possível dispersão horizontal. Além disso, isolados nativos também foram encontrados em todos os grupos.

Nesse contexto, têm-se o solo como um dos principais substratos onde *Metarhizium* spp. podem ser encontradas, uma vez que grande parte é composto por raízes, que são capazes de oferecer nutrientes e habitat para a microbiota do solo (JARONSKI, 2007). Além disso, o solo oferece proteção para os micro-organismos, pois cria uma barreira física contra a incidência direta do sol, oferecendo ainda boas condições de temperatura e alta umidade (MASCARIN et al., 2018).

Enquanto se mantêm como saprófitas, *Metarhizium* spp. interagem com um ambiente complexo, visto que as comunidades de micro-organismos presentes no solo são muito diversas. Esses fungos competem por nutrientes em um ecossistema que possui desde bactérias à outras espécies de fungos (BARDEGETT; VAN DER PUTTEN, 2014). A aplicação de isolados entomopatogênicos em condições à campo implica na interação com uma microbiota já estabelecida no ambiente. Esses fatores bióticos e abióticos são de extrema relevância para entender as interações dentro do ambiente (SANTOYO et al., 2017), principalmente com aplicação de um novo organismo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

Os experimentos biológicos foram realizados no período de Janeiro à Junho de 2018, no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária (LCM), localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz (EEPPWON) (22° 45' 54.9" Sul e 43° 41' 57.2" Oeste), do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ. O clima local é classificado segundo Köppen como Aw, sendo considerado tropical com inverno seco. Seropédica tem uma temperatura média de 23,5°C e pluviosidade média anual de 1354 mm. As análises moleculares foram executadas no Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE), do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, IV/UFRRJ. As análises morfológicas dos isolados fúngicos foram efetuadas na Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos, localizada no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos, no Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/ RJ.

3.2 Obtenção de *Rhipicephalus microplus*

As fêmeas de *R. microplus* utilizadas nos experimentos foram oriundas de infestações artificiais (projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária, (CEUA/UFRRJ 037/2014) (Anexo) realizadas periodicamente em bezerros mantidos em baias localizadas na EEPPWON, do DPA, UFRRJ. Após 21 dias de infestação, as fêmeas ingurgitadas foram coletadas das baias, lavadas com água corrente e higienizadas superficialmente com hipoclorito de sódio à 0,05% por 3 minutos.

3.3 Obtenção do isolado fúngico

O isolado utilizado nos experimentos, *Metarhizium* sp. LCMS04, foi isolado de uma amostra de solo coletada no estado do Rio de Janeiro no município de Seropédica (latitude -22767646/ longitude -43678025). O isolado foi mantido na Coleção de Cultura do Laboratório de Controle Microbiano de Importância Médico Veterinária (LCM). O isolado foi selecionado baseado em testes realizados pelo grupo de pesquisa, que avaliaram a virulência para larvas de *R. microplus*, termotolerância e produção conidial (dados não publicados). O isolado LCM S04 está depositado na Coleção de Cultura de Fungos Filamentosos (CCFF), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a identificação IOC 4694.

3.4 Cultivo de *Brachiaria brizantha*

Vasos de polipropileno, com 21cm de altura × 24cm de largura × 24cm de comprimento, foram preenchidos com condicionador de solo (Natussolos do Brasil Ltda., Taubaté, SP, Brasil), areia e pedras não estéreis, para o cultivo de sementes de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandú (Wolf® sementes) e alocados na parte externa do LCM, onde foram irrigados diariamente e recebiam incidência de luz . Os vasos foram mantidos por 120 dias, e as forrageiras foram padronizadas em 35cm de altura, com auxílio de poda. Posteriormente, os vasos foram transferidos para uma área externa e livre de cobertura, cercada com cerca de

aramé para evitar a entrada de animais, na Estação W.O. Neitz (EEPPWON) onde foram conduzidos os experimentos em condições naturais.



Figura 1: Área externa ao LCM onde os vasos com as gramíneas permaneceram durante todo o período experimental, com incidência direta de luz, chuva e calor.

3.5 Preparação da emulsão fúngica oleosa

Através do cultivo em placas com BDA, os conídios obtidos foram suspensos em uma solução de água destilada estéril com monoleato de polioxietileno sorbitano (Tween[®] 80) a 0,1% (v/v), na concentração de 1×10^8 conídios/mL, que foram quantificadas com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico de acordo com Alves (1998).

Para produção de conídios em grande escala, em capela de fluxo laminar, uma alíquota de 10 mL da suspensão do isolado fúngico foi inoculada em sacos de polipropileno de $36 \times 40 \times 0,01$ cm, contendo 1kg de arroz parboilizado e 300 mL de solução peptonada a 0,5% previamente autoclavados (SANTI et al., 2011). O saco foi identificado e devidamente vedado com fita adesiva, sendo posteriormente armazenado em câmaras climatizadas à temperatura de 25 °C U.R. > 80% por 21 dias. Diariamente, todos os sacos eram agitados manualmente para a desintegração de agregados do substrato, melhor oxigenação e crescimento fúngico sobre o arroz. Após os 21 dias, os substratos totalmente colonizados foram colocados em estufa com temperatura de 28°C durante dois dias para redução da umidade.

O arroz colonizado fora transferido para um becker estéril e lavado com solução de Tween[®] 80 a 1% (Tween[®] 80 e água v/v). Em seguida, a suspensão foi peneirada para retirada de fragmentos de arroz, evitando possível entupimento do borrifador. A suspensão foi então quantificada com auxílio de câmara de Neubauer e ajustada para uma concentração de $1,1 \times 10^8$ conídios/mL. Para a viabilidade da suspensão, foi retirada uma alíquota de 10µL inoculada em uma placa de Petri com BDA e encubada à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ e avaliada segundo Alves (1998). Ao final, 100 mL de óleo mineral (Parafina) (Proquímios) foi

acrescentado em 900 mL de suspensão fúngica $1,1 \times 10^8$ conídios/mL para que se obtivesse uma emulsão oleosa à 10%, e a concentração de conídios atingisse $1,0 \times 10^8$ conídios/mL.

3.6 Identificação do isolado *Metarhizium* sp. LCM S04

3.6.1 Análise morfológica do isolado *Metarhizium* sp. LCM S04

O isolado de *Metarhizium* sp. LCM S04 foi cultivado em 23 mL de meio batata dextrose ágar (BDA) em placas de Petri (polipropileno 90×15 mm). As características macromorfológicas da colônia foram avaliadas através de uma amostra de conídios do isolado cultivado, que foi transferido para uma nova placa contendo BDA, na forma de ponto único de inóculo, realizado com auxílio de alça de platina no centro da placa e mantido em câmara climatizada regulada a $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ UR 80% por 14 dias. Posterior ao cultivo, foram observados o aspecto, reverso e coloração da colônia. O tamanho da colônia foi avaliado com o auxílio de um paquímetro (calípter digital Mitutoyo com resolução de 0,01 mm). Para análise das características micromorfológicas, foi realizado microcultivo em lâmina e lamínula (RIDDLE, 1950). Após cinco dias, as lâminas foram coradas com solução de Lactofenol com azul de algodão (Fluka®Analytical) (Sigma). As lâminas foram observadas sob microscopia de luz convencional (400x). As características macro e micromorfológicas foram avaliadas segundo Humber (2012) e Bischoff, Rehner e Humber (2009).

3.6.2 Análise molecular do isolado LCM S04

3.6.2.1 Extração de DNA

O isolado foi cultivado em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) em placas de Petri (polipropileno 90 × 15 mm) e mantido em câmara climatizada regulada a $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ UR 80% por 14 dias. Após o cultivo, os conídios foram removidos do meio de cultura com auxílio de lâminas de bisturi estéreis, congelados com nitrogênio líquido e mascerados em cadinho de porcelana e pistilo. O DNA foi extraído com DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, o DNA extraído foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) e ajustado para a concentração de 15ng/μL.

3.6.2.2 Amplificação do DNA por PCR

O gene EF1-α (fator de alongação 1-alfa) foi utilizado para a identificação. Os “*primers*” utilizados foram desenvolvidos pela Invitrogen (Tabela 1), e suspensos para a concentração final de 100 μM. As soluções estoque de cada *primer* foram diluídas para a concentração final de 10 μL. As reações para amplificação foram executadas em termociclador de modelo Eppendorf Mastercycler® pro S, com volume final de 25 μL. As reações continham: 2,5 μL de tampão 10×, MgCl₂ (1,5mM), dNTP (0,4mM), 0,4 μM cada *primer*, 2 U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), 15 ng de DNA e água ultrapura (Invitrogen) para completar o volume final da reação.

A reação de PCR para EF1-α foi realizada com uso de “*Touchdown*” segundo ciclo composto por: desnaturação à 94°C por cinco minutos, seguidos de dez ciclos com amplificações em três partes (45s à 94°C para desnaturação, 45s à 66°C para anelamento reduzindo 1°C a cada ciclo e 1:30 min à 72°C para extensão) e 36 ciclos adicionais com a amplificação em três partes com a temperatura de anelamento de 56°C e por fim um ciclo de 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese a 75V por 60

minutos em gel de agarose 1,5% usando tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1× e marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder (Invitrogen). Foram utilizados 10 µL de produto de PCR com 1,5 µL de tampão de amostra 6 ×. Os géis foram corados com Brometo de Etídeo, visualizado por luz UV e revelado pelo fotodocumentador L. Pix Touch® (Loccus Biotecnologia).

Tabela 1: Iniciadores (“primers”) utilizados nas reações de amplificação do gene EF-1 α .

<i>Primer</i>	Sequência (5’ para 3’)	Pares de base
EF1T	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	20
EF2T	GGARGTACCAGTSATCATGTT	21

3.6.2.3 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos amplificados foram excisados do gel de acordo com o peso molecular das bandas e purificados utilizando o kit Wizard®SV Gel e PCR Clean-up System (Promega), de acordo com informações fornecidas pelo fabricante. Após purificação, as amostras foram quantificadas através de um gel de agarose a 2% usando tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1× e marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). O gel foi submetido a eletroforese a 75 V por 60 minutos, corado com brometo de etídeo, visualizado por luz UV e revelado pelo fotodocumentador L. Pix Touch® (Loccus Biotecnologia).

3.6.2.4 Sequenciamento do gene EF-1 α

As amostras purificadas foram enviadas ao setor de sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, de acordo com as recomendações disponibilizadas no endereço eletrônico <http://genoma.ib.usp.br/?pageid=979>. Os “primers” utilizados foram os mesmos da reação de PCR. Os sequenciamentos foram realizados no aparelho ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies – Applied Biosystems) utilizando BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Os “primers” utilizados foram os mesmos utilizados na reação de PCR. Os cromatogramas foram editados pelo DNA Baser Assembler v5. (DNA Sequence Assembler, Heraclio BioSoft). Sequências consenso do gene EF1- α foram selecionadas de diferentes espécies de *Metarhizium* do banco de dados “GenBank”(2018) (Tabela 2). As sequências foram alinhadas pelo método de alinhamento progressivo Clustal W, e o dendrograma foi construído usando o algoritmo baseado no método de “Neighbor-joining” usando o modelo Kimura 2-parameter e analisado por bootstrap com 1000 repetições, usando o programa Mega 7.0.

Tabela 2: Referência de isolados e suas respectivas informações de coleta e códigos “GeneBank”

Espécies	Código da coleção	Substrato/hospedeiro	País	Código GeneBank
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ESALQ 6	<i>Deios flavopicta</i>	Brasil	AY445082.1
<i>Metarhizium anisopliae</i>	ARSEF 7450	Coleoptera	Austrália	KY616802.1
<i>Metarhizium pingshaense</i>	MAFF 635007	<i>Curculio sikkimensis</i>	Japão	LC200442.1
<i>Metarhizium brunneum</i>	ARSEF 2107	Coleoptera	EUA	EU248855.1
<i>Metarhizium brunneum</i>	ARSEF 4179	Soil	Austrália	EU248854.1
<i>Metarhizium robertsii</i>	ARSEF 7501	Coleoptera	Austrália	EU248849.1
<i>Metarhizium robertsii</i>	ART 500	<i>Melolontha melolontha</i>	Suíça	KR706490.1
<i>Metarhizium majus</i>	ARSEF 1946	Coleoptera	Filipinas	EU248867.1
<i>Metarhizium majus</i>	ARSEF 2808	Coleoptera	Filipinas	EU248871.1
<i>Metarhizium guizhouense</i>	ARSEF 6238	Lepidoptera	China	EU248857.1
<i>Metarhizium guizhouense</i>	ARSEF 5714	Lepidoptera	República Popular da China	EU248856.1
<i>Metarhizium frigidum</i>	ARSEF 7445	Isoptera	Austrália	KJ398818.1
<i>Metarhizium acridum</i>	ARSEF 7486	Orthoptera	Nigéria	EU248845.1
<i>Metarhizium acridum</i>	ARSEF 324	Orthoptera	Austrália	EU248844.1
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	CBS 103.65	Solo sob <i>Brassica napus</i>	Alemanha	KJ398786.1

ARSEF: Serviço de Pesquisa Agrícola Coleção de fungos entomopatogênicos, USDA, NY, EUA; ART: Estação de Pesquisa Reckenholz-Tänikon de Agroscope, Reckenholzstrasse Zürich, Suíça; CBS: Centro de Biodiversidade Fúngica Centraalbureau voor Schimmelcultuur, Utrecht, Holanda; ESALQ: Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, USP, SP, BR; MAFF: Ministério da Agricultura, Florestas e Pescas, Tóquio, Japão;

3.7 Delineamento experimental do ensaio com fêmeas de *Rhipicephalus microplus* em condição de semi-campo

Os vasos foram separados entre os grupos de forma homogênea, de acordo com cobertura vegetal, irrigados e identificados para posterior tratamento. Três grupos foram formados, com 10 vasos cada: Grupo controle (CTR) que não recebeu tratamento; Grupo Controle Óleo (CTR OL), onde cada vaso foi tratado com 86 mL de emulsão oleosa contendo 1% de Tween 80® e 10% óleo mineral (v/v); Grupo LCM S04 onde cada vaso foi tratado com 86 mL de uma emulsão fúngica oleosa, a base do isolado LCM S04 *Metarhizium* sp., 1% de Tween 80® e 10% óleo mineral (v/v), na concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/mL ($1,5 \times 10^7$ conídios/cm²). A aplicação dos respectivos tratamentos foi realizada com auxílio de borrifadores, a fim de que a pulverização fosse homogênea sobre toda a superfície do solo. Após o tratamento, grupos de cinco fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* de peso homogêneo foram posicionadas em cada vaso para posterior avaliação da recuperação de larvas de cada grupo.

3.8 Recuperação das larvas de *Rhipicephalus microplus*

Sessenta dias após o posicionamento das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* nos vasos, o ápice das folhas de *B. brizantha* que continham larvas (Figura 2), foram cortados e acondicionados em sacos de polietileno para congelamento e posterior contagem do número total de larvas presentes em cada vaso (Figura 3). As larvas foram congeladas por 24 horas a -10°C, retiradas das folhas com auxílio de um pincel, e contadas individualmente sobre uma superfície branca. Os vasos foram vistoriados até que se não observasse larvas nas forrageiras.

Para avaliar a eficácia do tratamento na recuperação de larvas de *R. microplus*, foi realizado cálculo segundo Bittencourt et al., (2003), eficácia (%) = $(A-B)/A \times 100$, onde A: média de larvas no grupo controle (CTR) e B: média de larvas no grupo tratado com emulsão fúngica.



Figura 2: Larvas de *Rhipicephalus microplus* no ápice das folhas de *Brachiaria brizantha* 60 dias após tratamentos do solo.

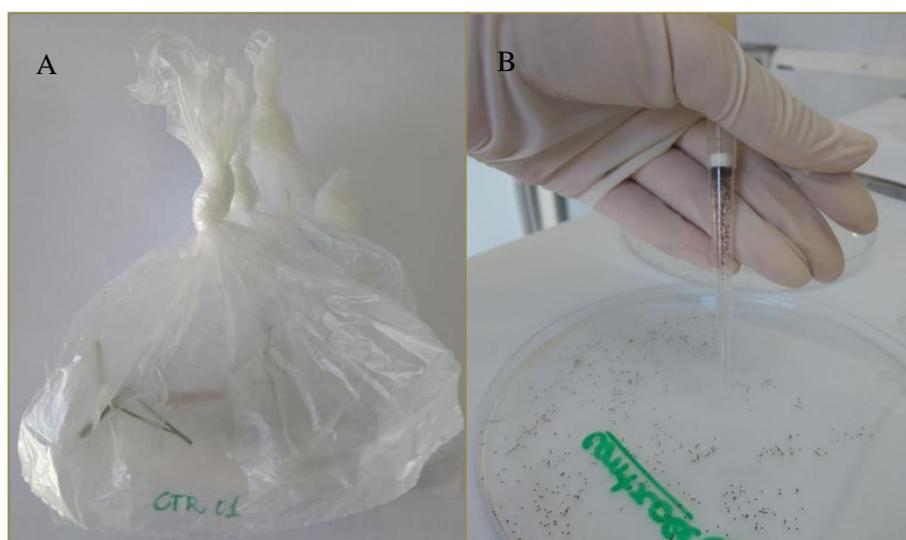


Figura 3: Armazenamento e contagem das larvas de *Rhipicephalus microplus* coletadas. (A) Fragmentos do ápice da forrageira contendo larvas de *R. microplus* alocados em sacos plásticos para congelamento; (B) Contagem individual das larvas de *R. microplus* com auxílio de ponteira de 1000µL

3.9 Persistência no solo do isolado LCM S04 *Metarhizium* sp. no solo

Previamente ao tratamento do solo com o respectivo tratamento, amostras de solo foram coletadas de cada vaso para análise dos fungos presentes no solo. Posterior ao tratamento, trinta dias após o início do experimento, amostras de solo foram coletadas dos vasos de cada grupo (tratado ou não), a cada 15 dias durante o período de coleta (Fevereiro à Junho 2018,

totalizando 10 coletas), para avaliação da persistência do isolado LCM S04 no ambiente. As amostras de solo de cada vaso foram compostas de três subamostras de pontos distintos. Em microtubos de 1,5 mL foram colocados 0,35g de cada amostra de solo, acrescidos de 1 mL de água destilada estéril com surfactante Tween 80® à 0,01%, sendo posteriormente agitados em aparelho tipo vortex por um minuto (FERNANDES et al., 2010). Foram retirados 50 µL da suspensão para inoculação em placas com meio de cultura artificial seletivo para fungos entomopatogênicos CTC (BDA acrescido de Cloranfenicol, Tiabendazol e Cicloheximida) (FERNANDES et al., 2010) e espalhados com auxílio da Alça de Drigalski. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada 25° ± 1°C UR 80% sendo avaliadas a cada sete dias por um período de 21 dias. Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônia (UFC) de cada placa foram contabilizadas por grama de solo.

As colônias de *Metarhizium* sp. reisoladas das amostras de solo de cada coleta foram caracterizadas morfológicamente, baseadas na aparência da colônia, cor e formato dos conídios (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009; HUMBER, 2012;). As colônias morfológicamente semelhantes obtidas de cada coleta foram consideradas um mesmo isolado. As análises moleculares foram realizadas para isolados de *Metarhizium* sp. reisolados de cada uma das dez coletas do grupo tratado. Colônias de *Metarhizium* sp. eventualmente encontradas em amostras dos grupos controle também foram analisadas molecularmente. As análises seguiram a metodologia descrita no item 3.4, para o gene EF-1 α .

3.10 Colonização das raízes de *Bracharia brizantha*

Juntamente com as coletas de amostras de solo, três amostras de raízes foram retiradas para analisar a colonização da raiz da planta pelo isolado LCM S04. As raízes foram retiradas de pontos diferentes de cada vaso, esterilizadas superficialmente e inoculadas em meio de cultura artificial CTC, seletivo para fungos entomopatogênicos. A esterilização superficial das raízes foi realizada segundo Parsa et al. (2013), imergindo as raízes em hipoclorito de sódio 0,5% por dois minutos, seguido de dois minutos em álcool 70% e dois minutos em água destilada estéril (3x). As placas de Petri contendo CTC foram acondicionadas a 25°C ± 1°C, UR 80% sendo avaliadas com 21 dias. Colônias de *Metarhizium* reisoladas das amostras das raízes de cada coleta foram caracterizadas segundo item 3.10. Análises moleculares foram realizadas para isolados de *Metarhizium* reisolados das coletas de número 1, 4 à 10 do grupo tratado. As análises seguiram metodologia descrita no item 3.4, para o gene EF1 α .

3.11 Identificação morfológica dos fungos saprófitas

As amostras de solo cultivadas em CTC derivadas dos grupos controle que apresentaram crescimento de fungos saprófitas, foram submetidos a análises morfológicas para identificação. As placas com isolamento dos respectivos grupos foram avaliadas, e as colônias encontradas com maior frequência foram repicadas em três tipos de meio de cultura: Batata Dextrose Ágar (BDA) (Difco); Cызapek com extrato de levedura ágar (CYA) (Difco); Extrato de Malte Ágar (MEA) (Difco), para a identificação a nível de gênero (BARNETT; HUNTER, 1972; KENDRICK et al. 1980 e MCGINNIS, 1980), visto que cada espécie necessita de componentes nutricionais diferentes para melhor crescimento. Após verificação do melhor meio para desenvolvimento dos fungos, os mesmos foram submetidos a técnica de microcultivo sob lâmina e lamínula (RIDDELL, 1950) e mantidas em 25 ± 1°C UR 80% para posterior análise das estruturas fúngicas sob microscopia de luz convencional e confirmação dos aspectos morfológicos segundo chave de identificação.

3.12 Verificação das variações climáticas

As variações de temperatura e umidade foram monitoradas através do posicionamento do aparelho HOBO® H8 data loggers (Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA) alocado no exato local onde os vasos foram posicionados (área externa da EPPWON). As variáveis foram aferidas durante todo o período do experimento (Janeiro à Junho de 2018) a cada 2h. Os dados referentes à irradiação ultravioleta foram coletados no comprimento de onda de 290 à 400 nm, (UVA e UVB), nos dias concomitantes às coletas de solo (quinzenalmente, totalizando 10 coletas), com uso de espectrorradiômetro (US oceanic system B2000 + RAD). As medidas foram expressas em $mW m^{-2} nm^{-1}$, com base na irradiância ponderada por Quaité (QUAITE et al., 1992).

3.13 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa BioEstat 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados relativos a recuperação das larvas de *Rhipicephalus microplus* e das unidades formadoras de colônia foram submetidos à análise descritiva e, em seguida, feita a avaliação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram classificados como não paramétricos, e foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste Student-Newman-Keuls. Os gráficos foram elaborados utilizando o programa GraphPad® Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

4 RESULTADOS

4.1 Identificação do isolado LCM S04 de *Metarhizium* sp.

4.1.1 Características morfológicas do isolado LCM S04 de *Metarhizium* sp.

A colônia do isolado apresentou crescimento zonado, aspecto pulverulento e presença de micélio na superfície. O diâmetro da colônia é de aproximadamente 53 cm, com conídios de coloração esverdeada e forma cilíndrica (Figura 4). As características descritas são compatíveis com as da literatura para a espécie (HUMBER, 2012).

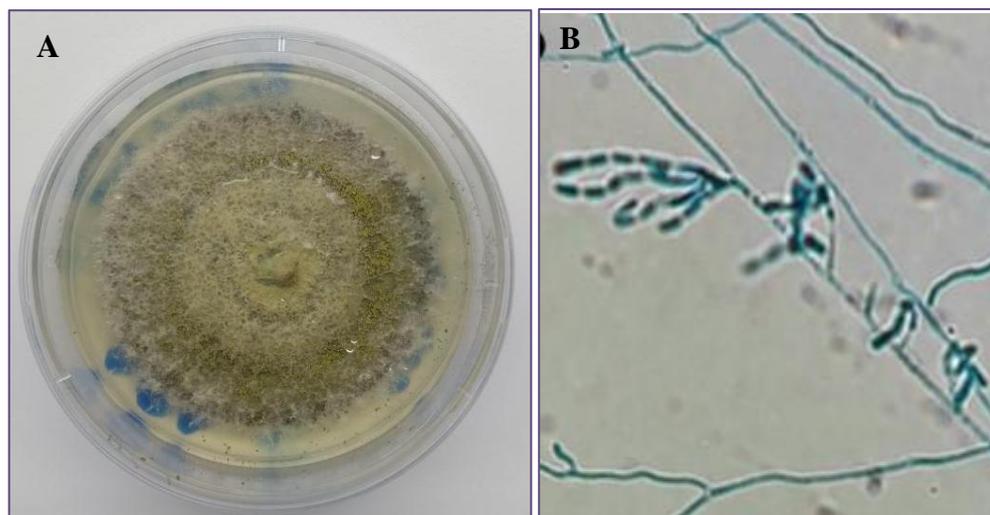


Figura 4: Características morfológicas do isolado *Metarhizium* sp. LCM S04. (A) Ponto único de inóculo em meio de cultura BDA cultivado por 14 dias; (B) Microcultivo evidenciando conidióforos e conídios do isolado *Metarhizium* sp. LCM S04 em meio de cultura BDA por 5 dias.

4.1.2 Identificação taxonômica do isolado LCMS04

O alinhamento das sequências e as subsequentes análises filogenéticas das sequências da região de 5'-TEF1 do isolado LCM S04 foram comparadas com diferentes espécies de *Metarhizium* com sequências depositadas no “Genbank” (Tabela 2). As análises revelaram que o isolado LCM S04 possui similaridades com *Metarhizium anisopliae*, sendo agrupado no mesmo clado que isolados dessa espécie (Figura 5).

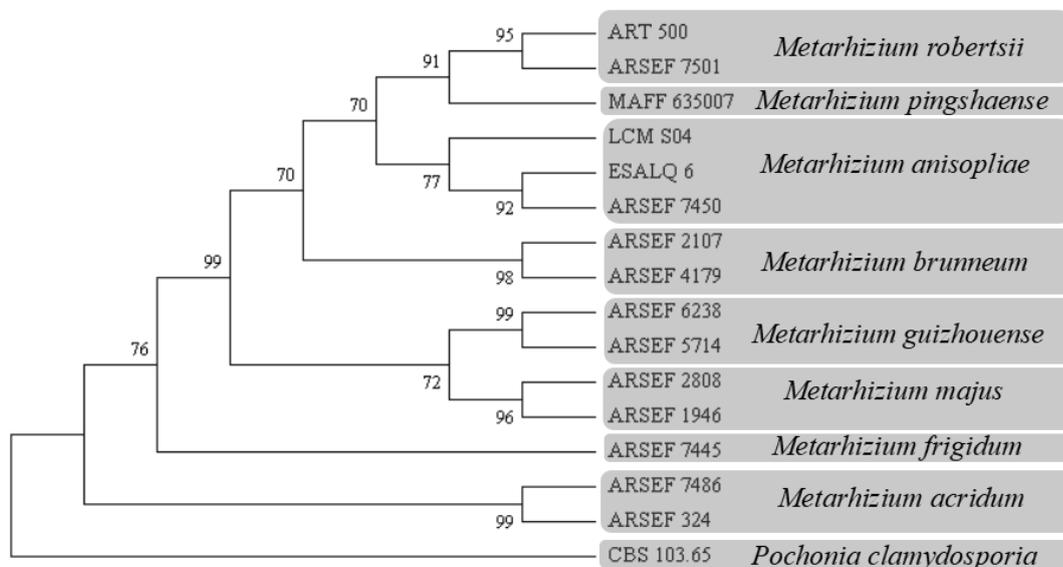


Figura 5: Dendrograma de similaridade formado pelo método de “Neighbour-joining” da região EF1-α para alocação filogenética do isolado *Metarhizium anisopliae* LCM S04 coletado no solo do estado do Rio de Janeiro. Dendrograma gerado através do modelo de “Kimura-2 parameter” utilizando análise de “bootstrap” com 1000 replicações. O isolado CBS 103.65 foi utilizado como “outgroup”.

4.2 Recuperação de larvas de *Rhipicephalus microplus*

Durante os 60 dias após o tratamento do solo, foi possível observar fêmeas e ovos do grupo tratado com emulsão fúngica (LCM S04) colonizados por *Metarhizium* nos vasos (Figura 6a e b), e fêmeas do grupo controle (CTR) fazendo postura (Figura 6c). Posteriormente ao enrijecimento da cutícula das larvas e do alcance das mesmas ao ápice das forrageiras, as larvas foram coletadas e contabilizadas. O grupo não tratado (CTR) apresentou a maior média (2596 ± 1103), seguido pelo grupo controle óleo (CTR OL) (740 ± 465). Para o grupo LCM S04, apenas 11 larvas foram recuperadas dos 10 vasos tratados (1.37 ± 3.88) (Figura 7). As médias dos grupos foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). O cálculo de eficácia demonstrou que o tratamento com emulsão oleosa teve controle 70%, porém o tratamento com emulsão fúngica atingiu 99,9% de eficácia.



Figura 6: Fêmeas, ovos e larvas de *Rhipicephalus microplus* em vasos cultivados com *Brachiaria brizantha*. (A) Fêmeas de *R. microplus*, do grupo tratado com emulsão fúngica, colonizadas por *Metarhizium anisopliae* LCM S04 realizando postura, 14 dias após tratamento do solo; (B) Ovos de *R. microplus* do grupo tratado com emulsão fúngica com presença de micélio, 11 dias após tratamento do solo; (C) Fêmeas de *R. microplus* do grupo não tratado (CTR), 27 dias após tratamento do solo e alocação das fêmeas nos vasos.

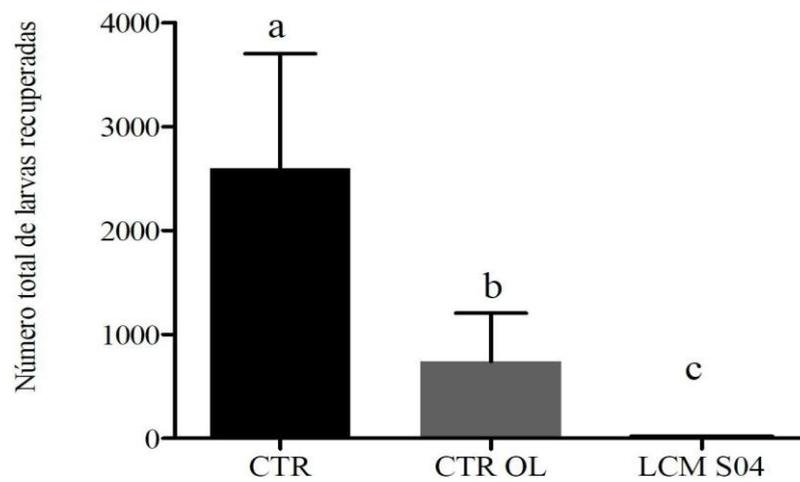


Figura 7: Média e desvio padrão dos valores relativos à recuperação de larvas de *Rhipicephalus microplus* 60 dias após posicionamento das fêmeas nos vasos cultivados com *B. brizantha*, tratados ou não com a emulsão fúngica de *Metarhizium anisopliae* (LCM S04). Análise estatística foi realizada com teste Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferenças estatísticas.

4.3 Persistência do isolado fúngico no solo tratado

Nas coletas realizadas após o tratamento, foi possível reisolar colônias de *Metarhizium* em abundância das amostras de solo do grupo tratado durante todas as coletas (Figura 8). No entanto, o número de unidades formadoras de colônias apresentaram variações entre as coletas. As coletas de número dois e três demonstraram as menores recuperações de UFC por grama ($P < 0,05$) (Figura 9). As colônias se apresentavam em menor número nas primeiras coletas, tendo um aumento no número das unidades formadoras de colônias nos últimos meses.

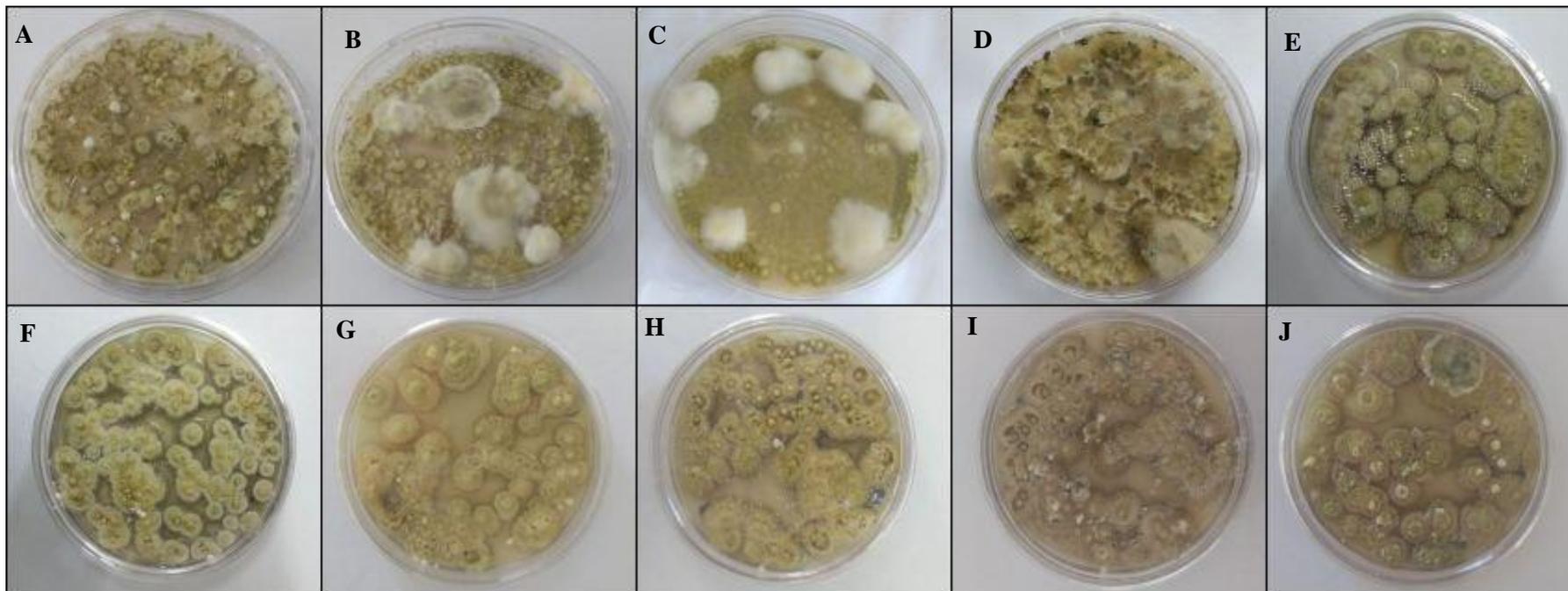


Figura 8: Amostras coletadas dos vasos do grupo tratado após inoculação do isolado *Metarhizium anisopliae* LCM S04 cultivadas por 21 dias. Placas referentes às 10 coletas realizadas durante cinco meses. Primeira coleta (A); Segunda coleta (B); Terceira coleta (C); Quarta coleta (D); Quinta coleta (E); Sexta coleta (F); Sétima coleta (G); Oitava coleta (H); Nona coleta (I); Décima coleta (J).

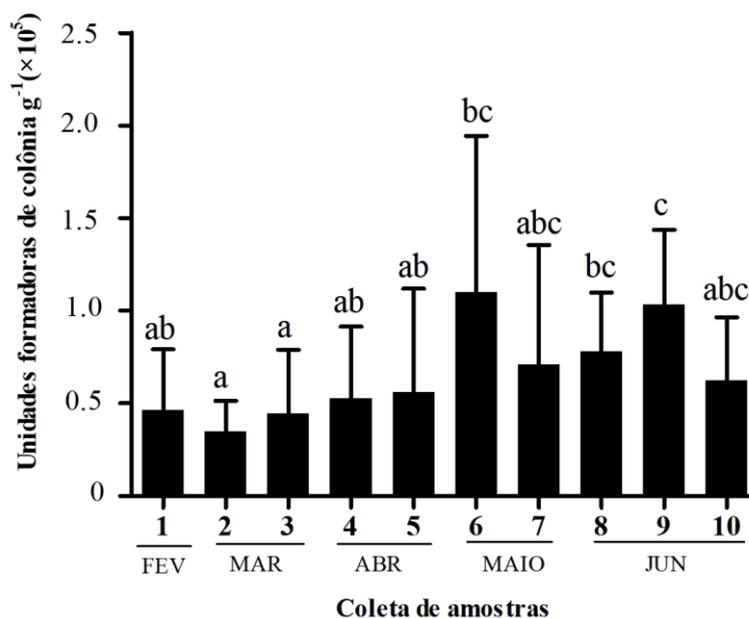


Figura 9: Unidades formadoras de colônia (UFC) de *Metarhizium anisopliae* LCM S04 reisoladas dos vasos tratados com emulsão fúngica durante cinco meses. A análise estatística foi realizada com teste Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls.

Em geral, apenas um isolado de *Metarhizium* (morfologicamente semelhante) era encontrado nas amostras do grupo tratado com emulsão fúngica por coleta. Assim, uma amostra por coleta foi selecionada para o sequenciamento (dez isolados). Quando colônias morfologicamente diferentes eram identificadas em uma mesma coleta, eram consideradas como um isolado diferente. Portanto, 13 isolados de *Metarhizium* foram identificados oriundos das amostras do grupo tratado (um isolado encontrado em cada uma das dez coletas, e três colônias/isolados fenotipicamente distintos, detectados nas coletas 1, 9 e 10). As amostras de solo coletadas anteriormente ao tratamento demonstraram heterogeneidade na população de fungos saprófitas presente no solo de todos os grupos (figura 10, 11 e 12). Além disso, como esperado, amostras do grupo controle eventualmente demonstraram crescimento de colônias de *Metarhizium*, uma vez que o solo utilizado não foi previamente esterilizado.

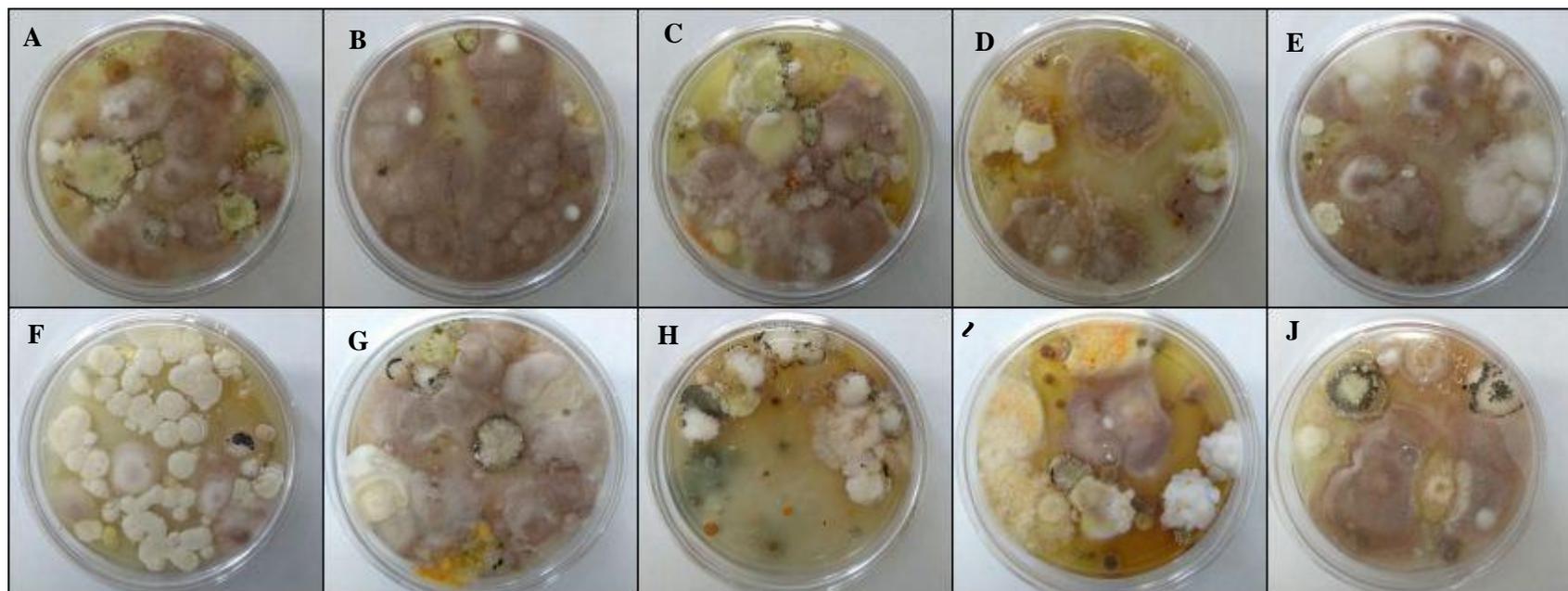


Figura 10: Colônias fúngicas isoladas de amostras de solo do grupo tratado com emulsão fúngica antes da inoculação do isolado *Metarhizium anisopliae* LCM S04 (26/01/18). Placas referentes aos dez vasos que compõem o grupo. (A) Vaso 1; (B) Vaso 2; (C) Vaso 3; (D) Vaso 4; (E) Vaso 5; (F) Vaso 6; (G) Vaso 7; (H) Vaso 8; (I) Vaso 9; (J) Vaso 10.

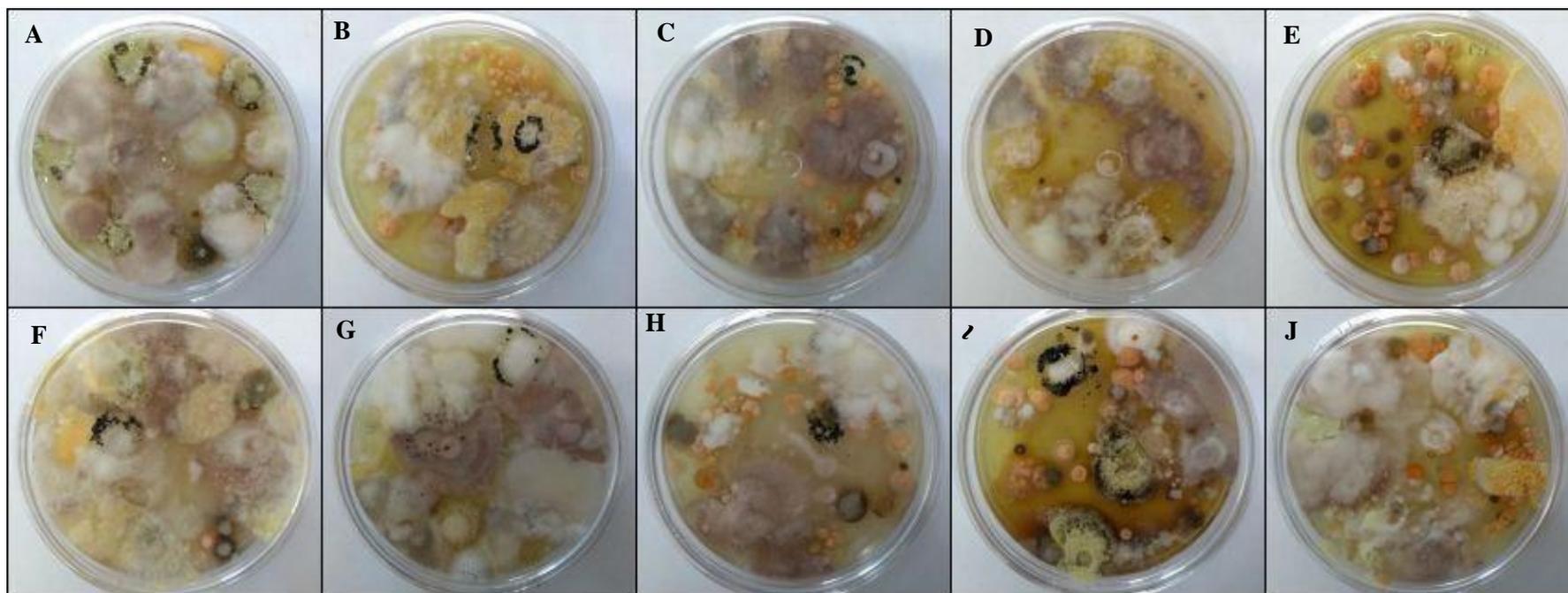


Figura 11: Colônias fúngicas isoladas de amostras de solo do grupo que não recebeu tratamento (CTR) antes do início do experimento (26/01/18). Placas referentes aos dez vasos que compõem o grupo. (A) Vaso 1; (B) Vaso 2; (C) Vaso 3; (D)Vaso 4; (E) Vaso 5; (F) Vaso 6; (G) Vaso 7; (H) Vaso 8; (I)Vaso 9; (J) Vaso 10.

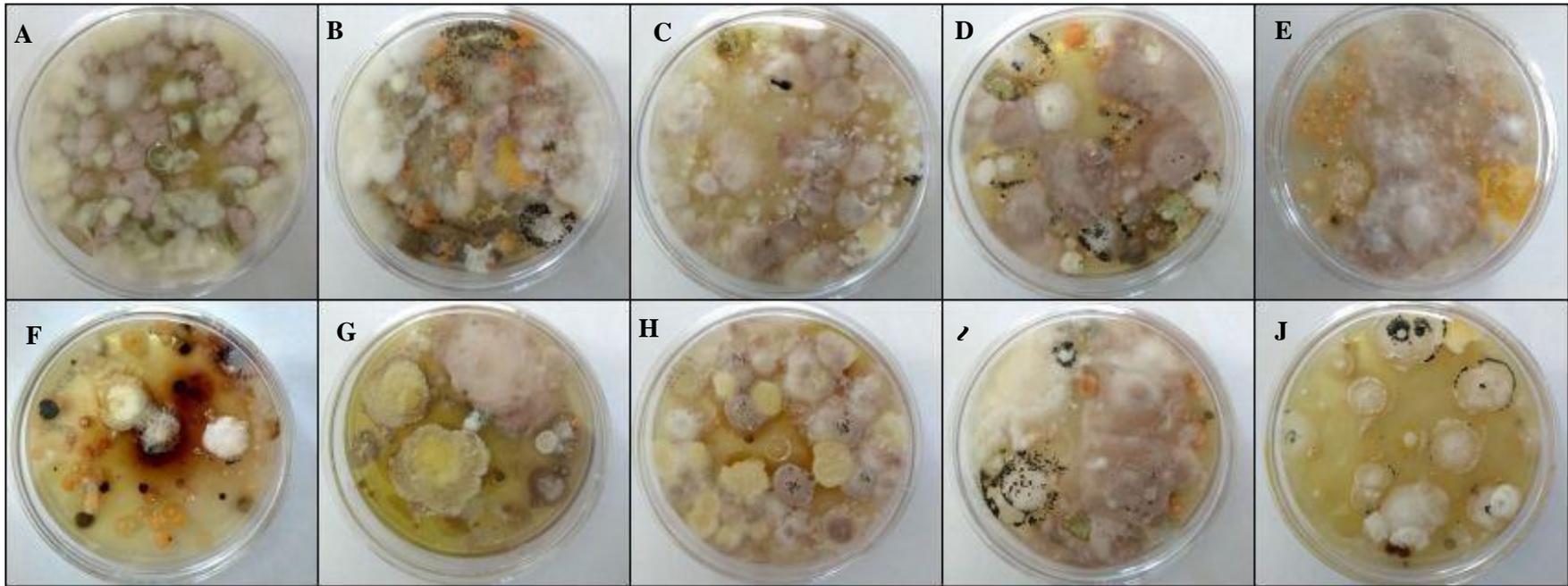


Figura 12: Colônias fúngicas isoladas de amostras de solo do grupo tratado com emulsão oleosa (CTR OL) antes do tratamento (26/01/18). Placas referentes aos dez vasos que compõem o grupo. (A) Vaso 1; (B) Vaso 2; (C) Vaso 3; (D) Vaso 4; (E) Vaso 5; (F) Vaso 6; (G) Vaso 7; (H) Vaso 8; (I) Vaso 9; (J) Vaso 10.

A análise molecular da região do gene *Ef1- α* das amostras referentes ao grupo tratado com emulsão fúngica (LCM S04) e dos grupos controle (CTR e CTR OL) foram comparadas à sequência do isolado LCM S04 *M. anisopliae* utilizado no tratamento do vaso. O fragmento da região do gene *Ef1- α* referente ao isolado LCM S04 *M. anisopliae*, utilizado nas análises continha 665 pb. Normalmente, a região das amostras reisoladas das coletas apresentavam fragmentos de tamanho menor. Os fragmentos menores foram alinhados com o fragmento do isolado LCM S04, e as bases excedentes foram descartadas. Nas amostras do solo tratado com emulsão fúngica (LCM S04): dois isolados foram identificados na coleta número 1; os fragmentos de *ef1- α* foram 98% (569 pb num fragmento de 579 pb) e 96% semelhantes (581 pb num fragmento de 599 pb) ao LCM S04. Os isolados das coletas números 2, 3 e 4 tinham 100% de similaridade com LCM S04 (558 pb de 558 pb, 628 pb de 628 pb e 653 pb de 653 pb, respectivamente). Isolados das coletas 5, 6, 7 e 8 foram 98%, 98,8%, 99,8% e 97,5% similares (575 pb de 582 pb, 583 pb de 590 pb, 650 pb de 651 pb e 568 pb de 582 pb respectivamente) ao LCM S04. Dois isolados foram detectados na coleta número 9 com 99,6% e 98,4% (586 pb de 588 e 582 pb de 591) de similaridade quando comparadas ao LCM S04. A coleta 10 também mostrou dois isolados morfológicamente diferentes com 97,5% e 97,5% (553 de 567 e 568 pb de 582, respectivamente) de similaridade.

Seis colônias de *Metarhizium* sp. morfológicamente diferentes foram identificadas nas amostras de solo dos grupos controle (coletas 6, 7 e 9 no solo do grupo tratado com emulsão oleosa (CTR OL) e na coleta 9 no solo do grupo não tratado (CTR)). Análises do solo do grupo controle de óleo (CTR OL) das coletas 6 e 7 demonstraram 100% e 99% de similaridade (654 pb de 654 pb e 616 pb de 622 pb). Foram identificados três isolados de amostras de solo da coleta 9: I: 97,7% semelhantes (572 pb de 582), II: 96,7% semelhantes (542 pb de 560 pb) e III: 68,5% semelhantes (412 pb em 601 pb). Apenas um isolado foi reisolado do grupo não tratado (coleta 9) demonstrando 98,9% de similaridade (645 pb de 652 pb).

4.4 Colonização endofítica do isolado LCMS04 em raízes de *Brachiaria brizantha*

As amostras de raízes inoculadas no meio CTC também demonstraram crescimento de *Metarhizium* durante todas as coletas do grupo tratado com emulsão fúngica (LCM S04), sugerindo colonização da raiz de *B. brizantha* (Figura 13). O isolado nativo se manteve no ambiente radicular e foi capaz de manter colonização sob variações das condições ambientais. Colônias de outros fungos endofíticos também se exteriorizaram de raízes em todas as coletas. Amostras de raízes de ambos os grupos controle também mostraram crescimento de *Metarhizium*. As colônias de *Metarhizium* foram detectadas nas coletas 1, 8 e 9 de amostras do grupo não tratado (CTR); e na coleta 8 no solo do grupo controle de óleo (CTR OL). As sequências dos isolados fúngicos das amostras de raiz do grupo tratado com LCM S04 foram de 93,7 a 99,6% semelhantes à sequência de LCM S04 mantida em laboratório. Colônias da coleta um tiveram 93,7% de similaridade (543 pb em 579); coleta quatro 95,2% (522 pb em 548); coleta cinco 99,8% (563 pb em 564); coleta seis 98,9% (559 pb em 656); coleta sete 99,4% (574 bp em 577); coleta oito 97,4% (567 pb em 582); coleta nove 99,6% (584 pb em 584); coleta dez 97,8% (582 bp em 595). Colônias de fungos naturalmente endofíticos também demonstraram exteriorização das raízes.

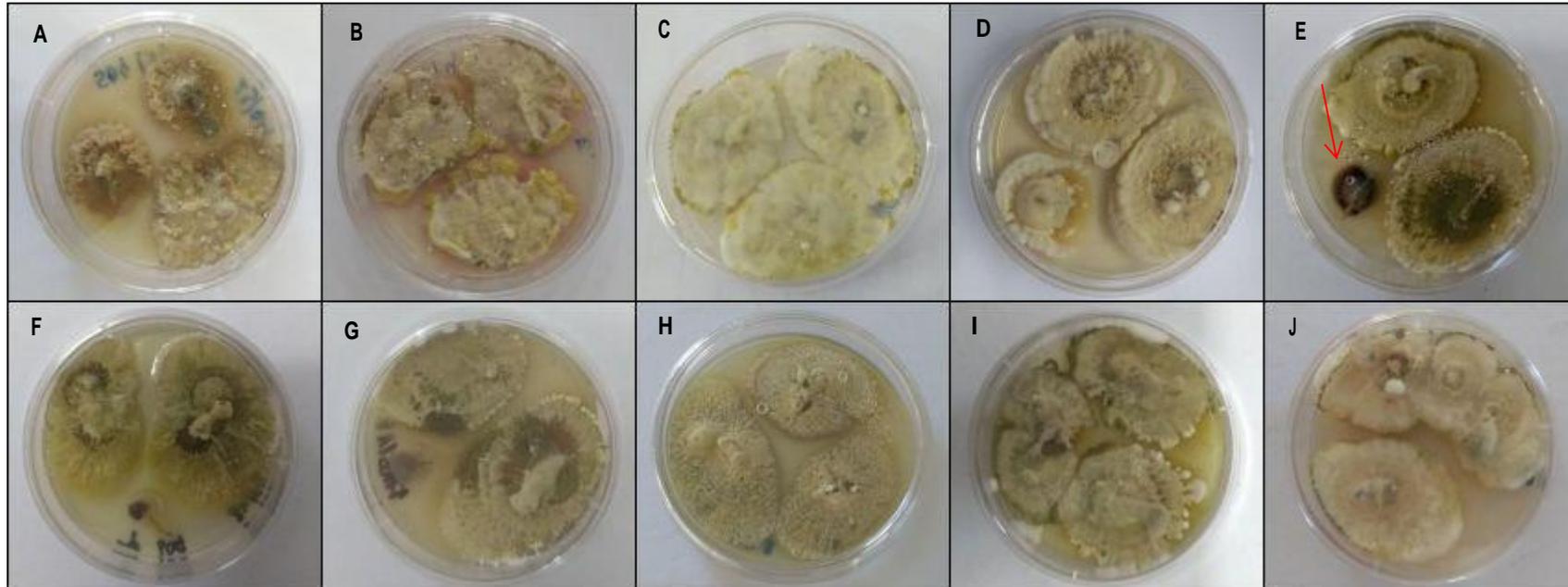


Figura 13: Crescimento de colônias de *Metarhizium* sp. oriundas de raízes de *Bracharia brizantha* do grupo tratado com emulsão fúngica (LCM S04) inoculadas em meio de cultura seletivo CTC cultivadas por 21 dias. Placas referentes às 10 coletas realizadas durante cinco meses. Primeira coleta (A); Segunda coleta (B); Terceira coleta (C); Quarta coleta (D); Quinta coleta (E); Sexta coleta (F); Sétima coleta (G); Oitava coleta (H); Nona coleta (I); Décima coleta (J). Seta indica a exteriorização de fungo diferente de *Metarhizium*.

4.5 Identificação morfológica dos fungos saprófitas

As amostras de solo coletadas, que não tiveram contato com a emulsão fúngica (controles e amostras coletadas antes do tratamento) apresentaram uma grande diversidade de fungos saprófitas (Figura 10,11, 12 e 14). Assim, apenas os fungos que cresciam com mais frequência nas placas de meio de cultura CTC, em pelo menos 40% das coletas, durante o período de coleta foram caracterizados a nível de gênero. Dentre as amostras dos grupos não tratado (CTR) e tratado com emulsão oleosa (CTROL), foi possível identificar a presença de fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Beauveria* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Peecilomyces* sp. (Figura 15, 16, 17 e 18).

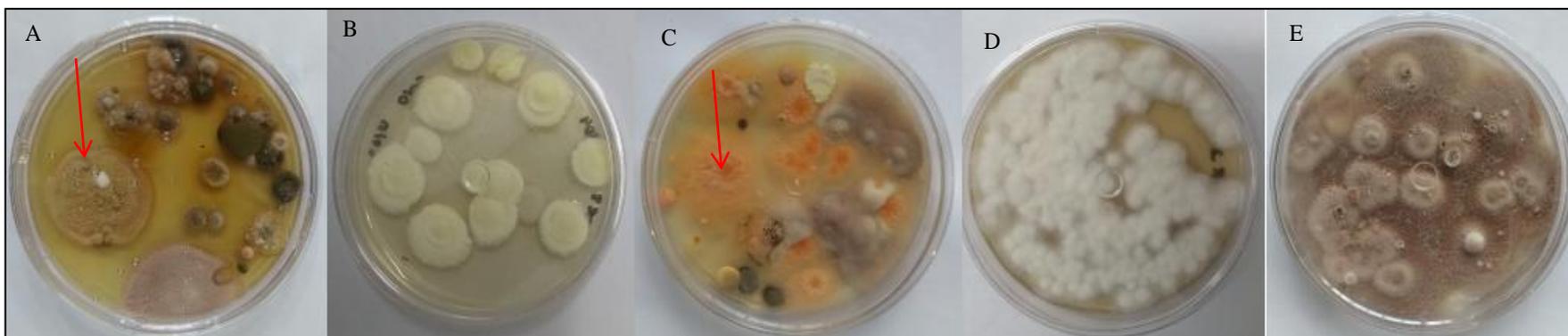


Figura 14: Colônias fúngicas observadas nos grupos não tratado (CTR) e tratado com emulsão oleosa (CTROL) em CTC demonstrando crescimento de fungos saprófitas encontrados com maior frequência durante as coletas: (A) Placaca referente à segunda coleta do grupo tratado com emulsão oleosa (CTROL- vaso 6) evidenciando colônia do fungo *Aspergillus* sp. (seta); (B) Sexta coleta do grupo controle (CTR- vaso 8) com presença de colônias do fungo *Beauveria* sp.; (C) Quinta coleta do grupo controle (CTR- vaso 3) evidenciando colônia do fungo *Fusarium* sp. (seta); (D) Sétima coleta do grupo controle (CTR- vaso 2) com presença de colônias do fungo *Acremonium* sp.; (E) Quinta coleta do grupo tratado com emulsão oleosa (CTROL- vaso 4) com presença de colônias do fungo *Peecilomyces* sp.

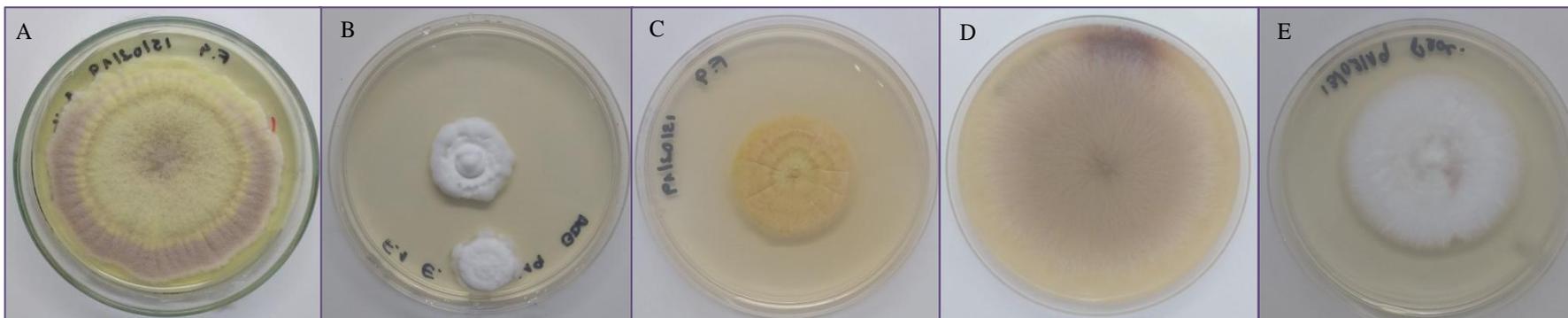


Figura 15: Colônias fúngicas observadas em ponto único de inóculo acondicionadas por 12 dias: (A) Colônia do fungo *Aspergillus* sp. cultivado em meio de cultura CYA à 37°C referente a coleta 2- vaso 6 (CTROL); (B) Colônia do fungo *Beauveria* sp. cultivado em meio BDA à 25°C referente a coleta 6- vaso 8 (CTR); (C) Colônia do fungo *Fusarium* sp. cultivado em meio BDA à 25°C referente a Coleta 5- vaso 3 (CTR); (D) Colônia do fungo *Fusarium* sp. cultivado em meio BDA à 25°C referente a coleta 2-vaso 7 (CTROL); (E) Colônia do fungo *Peacilomyces* sp. cultivado em meio BDA à 25°C referente a coleta 2- vaso 4 (CTROL).

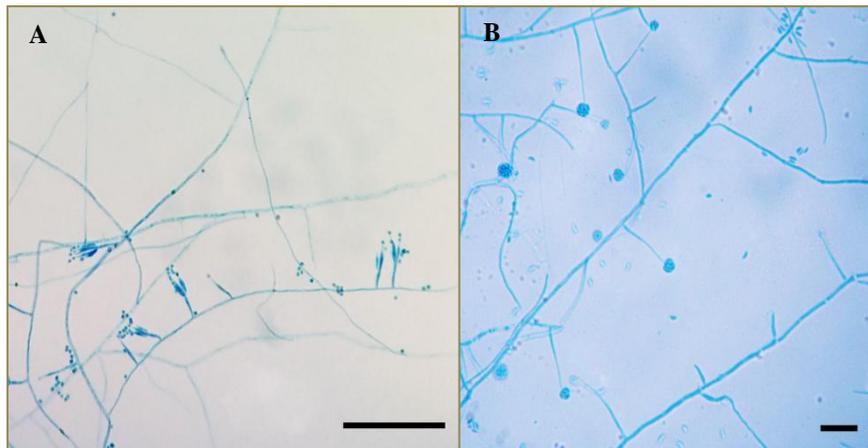


Figura 16: Microcultivo em BDA dos isolados de fungos saprófitas encontrados nas amostras de solo com maior frequência. Observação em microscopia de luz convencional: (A)Estruturas fúngicas de *Peacilomyces* sp. Referente a coleta 2-vaso 4 (CTROL) (B)Estruturas fúngicas de *Acremonium* sp. Refrente as coletas: 2-vaso 5 (CTROL) e 7-vaso 2 (CTR). Barra = 50µm.

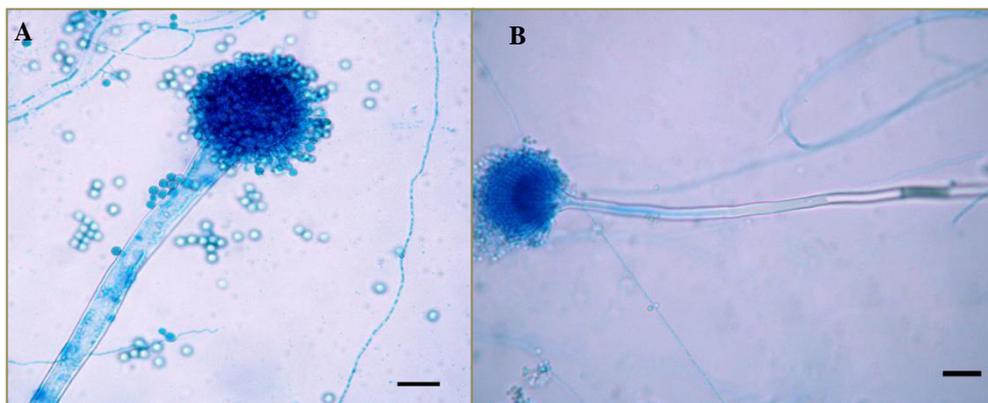


Figura 17: Microcultivo em MEA de isolados de fungos saprófitas encontrados nas amostras de solo com maior frequência do gênero *Aspergillus* sp.. Observação em microscopia de luz convencional: (A) Coleta 3- vaso 4 (CTR); (B) Coleta 2- vaso 6 (CTROL) Barra = 50 µm.

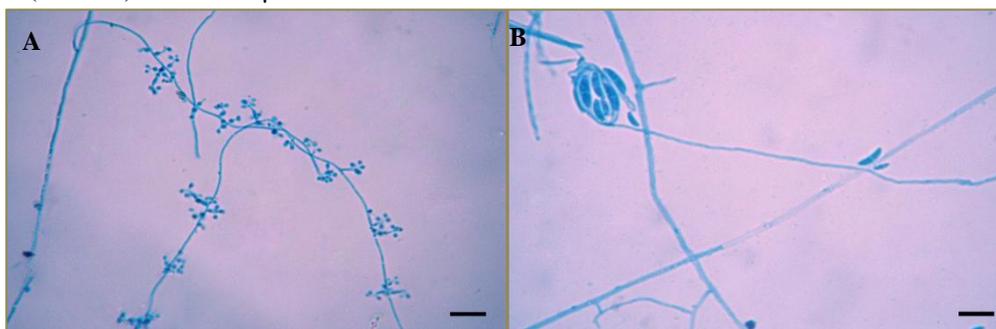


Figura 18: Microcultivo em BDA dos isolados de fungos saprófitas encontrados nas amostras de solo com maior frequência. Observação em microscopia de luz convencional: (A)Estruturas fúngicas de *Beauveria* sp. referente a coleta 6-vaso 8 (CTR);(B)Estruturas fúngicas de *Fusarium* sp. Referente as coletas: 2-vaso 7 (CTROL) e Coleta 5-vaso 3 (CTR). Barra = 50 µm.

4.6 Variações climáticas durante o ensaio biológico

Durante o período do estudo, a irradiação UV-B (e um mínimo de UV-A), apresentou o valor máximo de 573 e mínimo de 157 $\text{mW m}^{-2} \text{nm}^{-1}$ (Figura19).

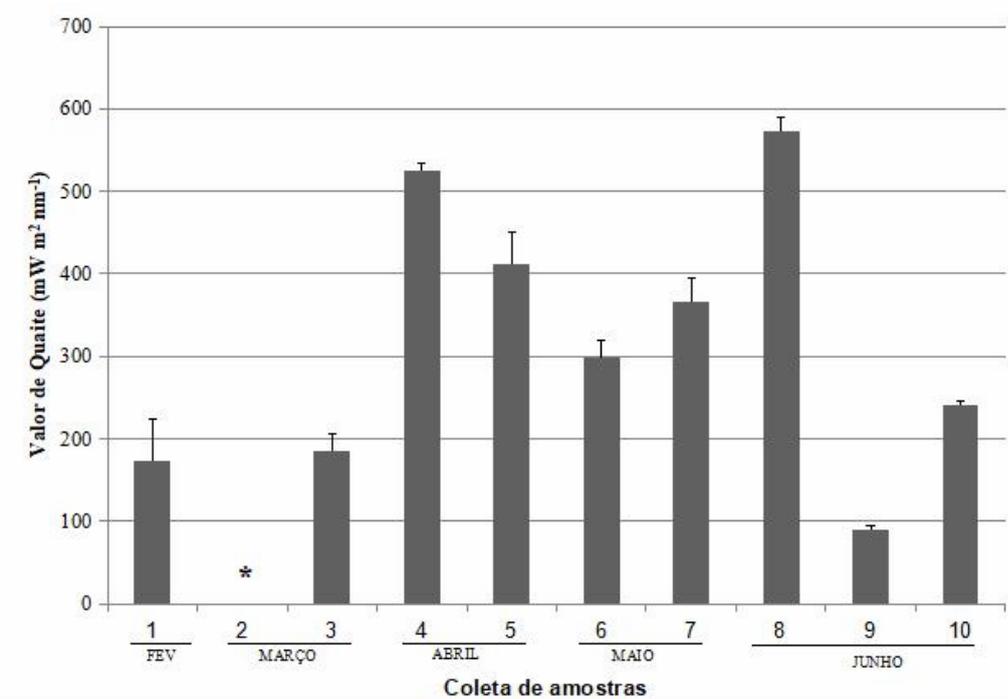


Figura 19: Medidas de intensidade de irradiação solar observadas de 290 a 400 nm, expressas em $\text{mW m}^{-2} \text{nm}^{-1}$, com base na irradiância ponderada por Quaito (QUAITE et al., 1992). As medições foram realizadas nos mesmos dias em que as coletas de solo, a cada 15 dias, totalizando 10 coletas. Barras de erro são desvios padrão de três medições diferentes realizadas a cada 2 minutos, começando às 13:00. * Na coleta de número coleta 2 não foi possível medir os dados devido às condições meteorológicas do dia.

Os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar monitoradas durante o período do experimento, foram $25,8^{\circ}\text{C}$ e $77,9\%$ respectivamente. A temperatura mínima 11°C e a máxima atingiu 49°C (Figura 20). A umidade relativa do ar teve máxima de 100% e mínima de 26% (Figura 21.). O período de estudo abrangeu as estações do verão, outono e inverno. Foi possível perceber que a temperatura máxima demonstrada foi verificada no verão, enquanto que a temperatura mínima foi observada no inverno.

Temperatura °C

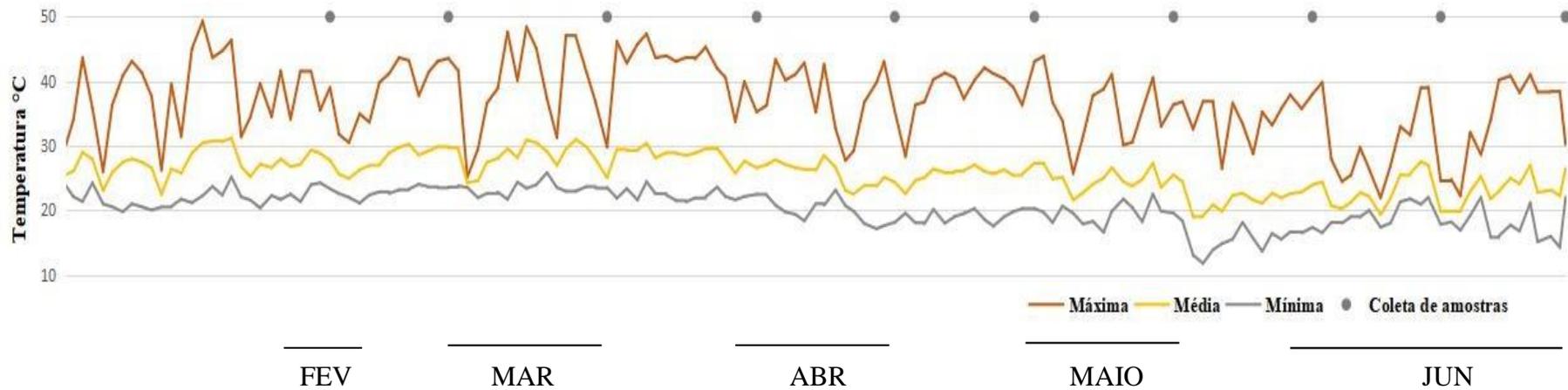


Figura 20: Temperaturas máxima, média e mínima monitoradas de Janeiro à Junho de 2018. As medições foram realizadas a cada 2 horas, diariamente. A linha vermelha indica a temperatura máxima; linha amarela mostra a temperatura média; linha cinza mostra a temperatura mínima. Os símbolos representam os dias de coleta.

Umidade Relativa (%)

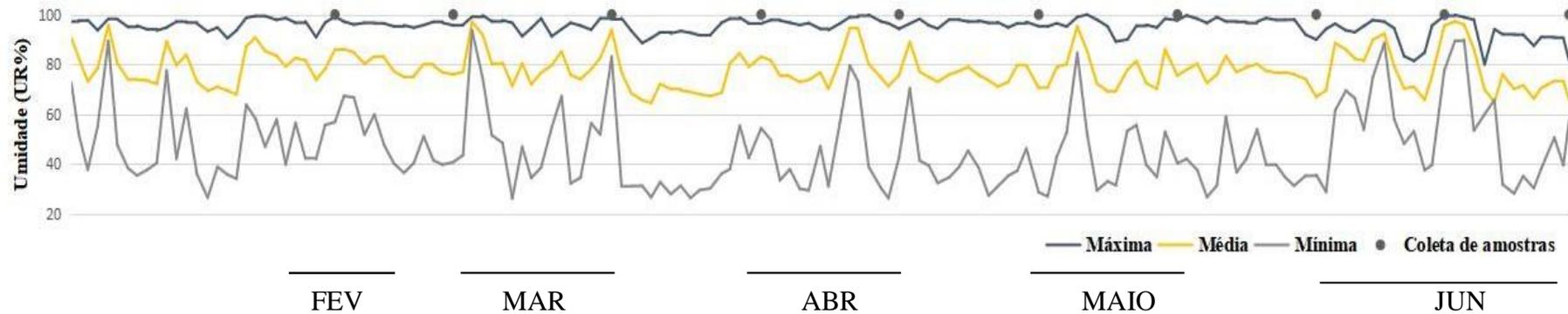


Figura 21: Valores de umidade relativa máxima, média e mínima monitoradas de Janeiro à Junho de 2018.. As medições foram realizadas a cada 2 horas, diariamente. A linha azul indica a temperatura máxima; linha amarela indica a umidade média; linha cinza indica a umidade mínima. Os símbolos representam os dias de coleta.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez o impacto de um isolado nativo de *Metarhizium anisopliae* no solo, sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* em condição de semi-campo. *Metarhizium anisopliae* LCM S04 reduziu significativamente as larvas de *R. microplus* recuperadas de vasos com *Brachiaria brizantha*, aproximadamente 60 dias após o tratamento e alocação das fêmeas de *R. microplus*. Esses resultados corroboram a eficácia de um estudo prévio contra larvas, e sugere que também poderia ter afetado outras fases não parasitárias deste carrapato (ou seja, fêmeas e ovos ingurgitados completos). Após a alocação das fêmeas de *R. microplus* nos solo tratado com emulsão fúngica (grupo LCM S04), foi possível observar a presença de micélio fúngico na postura de ovos 11 dias depois do tratamento. Além disso, havia presença de *Metarhizium* sobre a superfície do carrapato 14 dias na após o tratamento, no mesmo grupo. Assim, sugere-se que a quantidade reduzida de larvas recuperadas de vasos tratados com emulsão fúngica possa refletir uma interferência negativa na capacidade reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, bem como a diminuição da eclosão de larvas, e não apenas a mortalidade larval. Vasos tratados com emulsão de óleo mineral à 10% apresentaram menor recuperação larval quando comparados ao grupo não tratado. Apesar disso, a recuperação larval média do controle óleo foi significativamente maior do que o grupo tratado com fungo. Isto sugere um efeito negativo do óleo em carrapatos de *R. microplus*. Samish et al. (2014) relataram resultados semelhantes contra *R. annulatus* usando *M. brunneum*; Segundo esses autores, o óleo poderia sufocar o carrapato bloqueando os espiráculos respiratórios. Além disso já foi relatado o efeito tóxico de alguns óleos sobre as larvas de *R. microplus* (CAMARGO et al., 2012).

O sucesso do isolado nativo *Metarhizium anisopliae* LCM S04 contra *R. microplus* em condições de campo pode estar atribuído, além da patogenicidade, ao fato do isolado estar geograficamente adaptado à região, e a microbiota do solo. Além disso, em estudos prévios, o isolado também apresentou resultados que demonstram tolerância ao calor. Assim, este fato também pode ser atribuído à sua eficiência no controle do carrapato, uma vez que o microorganismo pôde se manter viável. Garcia et al., (2011) conduziram um estudo onde o isolado *M. anisopliae* E9 demonstrou efeito patogênico sobre *R. microplus* em estudos in vitro, no entanto, quando à campo o mesmo resultado não foi evidenciado. A adaptação ao ambiente em que o isolado é aplicado, é principalmente importante na viabilidade do propágulo em razão da influência que as variáveis ambientais representam. Sugere-se também que o microclima proporcionado pela cobertura da forrageira influenciou as taxas de umidade do solo, a temperatura do solo e a sombra, contribuindo para condições ambientais ótimas para o fungo entomopatogênico.

O tratamento do ambiente/pastagem infestado pode ser uma importante estratégia de controle, uma vez que 95% da população de *R. microplus* se encontra na fase não-parasitária do ectoparasito (POWEL; REID, 1982). Ao mesmo tempo, o mesmo ambiente pode oferecer condições favoráveis para o desenvolvimento fúngico. O solo se apresenta como um ambiente escuro, úmido e favorável para fungos entomopatogênicos (JARONSKI, 2007). As mesmas condições de umidade são necessárias para que a fêmea se abrigue da incidência direta do sol e inicie a digestão de componentes presentes no sangue e converta em ovos (FURLONG; PRATA, 2005). Assim, o carrapato e o fungo compartilham as mesmas condições ótimas de temperatura e umidade para o desenvolvimento. O desenvolvimento de pesquisas envolvendo espécies de carrapato são extremamente necessárias, visto que estudos relacionados ao controle

biológico são principalmente direcionados à insetos (BRODEUR et al., 2018). Como consequência, uma lista de produtos biológicos baseados em agentes microbianos registrados no mundo, não abordam produtos para carrapatos (VAN LENTEREN et al., 2018).

A densidade de UFC em cada coleta exibiu um considerável desvio padrão. De fato, a cobertura de gramíneas uma vez homogênea entre os vasos no início do experimento, tornou-se mais heterogênea ao longo dos meses. Sugere-se então que a variação de UFC recuperada de diferentes vasos do grupo tratado com emulsão fúngica pode estar relacionada com a cobertura da forrageira, uma vez que quanto menor a cobertura, mais exposto a calor e irradiação UV os fungos na superfície do solo estarão. Também é interessante observar que as maiores taxas de recuperação de *Metarhizium* do solo ocorreram quando a temperatura tendeu a ser mais amena (isto é, outono e inverno), em contraste com as taxas de recuperação mais baixas observadas durante o verão (Figura 9). Durante as estações de outono e inverno, foi possível observar condições ótimas de temperatura e umidade para o desenvolvimento fúngico. As altas temperaturas encontradas no início do experimento, no verão, podem ser responsáveis pelo atraso na germinação (KEYSER et al., 2014) e possivelmente ocasionar menores taxas de desenvolvimento fúngico.

A fonte de novos fungos entomopatogênicos é notavelmente importante. O solo representa um reservatório natural abundante para fungos, incluindo espécies do gênero *Metarhizium* (ROCHA et al., 2013). No presente estudo, o isolado de *Metarhizium* LCM S04 coletado em amostra de solo foi identificado como *M. anisopliae* s.s.. Essa identificação corrobora com um estudo realizado no Brasil por Rezende et al. (2015), onde os autores demonstraram a abundância de *M. anisopliae* em habitats naturais e agrícolas. A espécie *M. anisopliae* foi também o mais amplamente distribuído geograficamente.

A identidade dos isolados de *Metarhizium* reisolados de amostras de solo foi avaliada com base na similaridade da sequência consenso do fragmento do gene EF1- α entre a colônia recuperada e do isolado LCM S04 mantida no laboratório. O ideal seria usar um marcador molecular (como GFP) para garantir a identidade do isolado usado no experimento, no entanto, isso envolveria o uso de um fungo geneticamente modificado no ambiente. Todas os isolados recuperados do solo tratado com fungo mostraram alta similaridade com o LCM S04 ($\geq 96\%$ de similaridade, com a maioria dos isolados acima de 98% de similaridade). Algumas coletas de vasos do grupo controle também exibiram colônias de *Metarhizium*; e sua semelhança com o LCM S04 sugeriu contaminação por dispersão horizontal. As colônias de *Metarhizium* semelhantes ao LCM S04 foram detectadas não no início do experimento, mas quando a concentração de fungos nos vasos tratados foi maior (isto é, coletas 6, 7 e 9), sugerindo que poderia ser um resultado de contaminação através da dispersão pelo vento, atividade de artrópodes do solo e/ou pela chuva, conforme relatado por Pilz et al. (2011) e Castro et al. (2016). Em uma coleta, amostras de vasos de controle também mostraram uma colônia de *Metarhizium* com baixa similaridade a LCM S04 (similaridade de 68,5%), sugerindo que este poderia ser um isolado nativo de *Metarhizium*.

A presença de fungos saprófitas nas placas dos grupos que não tiveram contato com a emulsão fúngica, revelou que o LCM S04 não foi prejudicado pela microbiota já estabelecida, uma vez que conseguiu persistir durante todo o período de coleta. Curiosamente, o uso de um solo não estéril não diminuiu a densidade de conídios ao longo do tempo. Apesar disso, a microbiota local pode ter limitado o crescimento de *Metarhizium*, uma vez que a média de unidade formadoras de colônia do isolado LCM S04 não foi superior à $1,1 \times 10^5$ (maior densidade fúngica detectada na coleta 6). Esse fenômeno também foi descrito por Jaronski (2007), onde o autor compara a persistência de fungos entomopatogênicos com um estudo de vida útil do micro-organismo, influenciado pela temperatura e umidade do solo. O meio de

cultura utilizado (CTC) é seletivo para fungos entomopatogênicos, assim o crescimento majoritário de *Metarhizium* em placas do grupo tratado pode ser um resultado do favorecimento em relação à seleção de nutrientes. Nas amostras dos grupos não tratado e tratado com emulsão oleosa também foram identificadas colônias de outro fungo entomopatogênico, *Beauveria* sp. Tomer et al. (2018) também relatou a recuperação de fungos saprófitas usando um meio seletivo para EPF. De fato, vasos do grupo tratado (LCM S04) foram aspergidos com uma alta concentração de *Metarhizium*, conseqüentemente aumentando a taxa de recuperação nas amostras de solo.

A persistência fúngica durante o período de coleta pode também ter sido influenciada positivamente pela colonização das raízes de *B. brizantha*. As relações entre *Metarhizium* e as plantas são também descritas por Sasan e Bidochka (2012), no entanto, este é o primeiro relato de colonização de raízes de *B. brizantha* por *Metarhizium*. Análises da região EF1- α de colônias de *Metarhizium* recuperadas de raízes de *B. brizantha* sugerem um estabelecimento do isolado dentro do tecido vegetal. O isolado LCM S04 pôde ser reisolado até a última coleta, cinco meses após o tratamento dos vasos. Greenfield et al. (2016) relataram a colonização de raízes de mandioca (*Manihot esculenta*) por *M. anisopliae* por quase dois meses após a inoculação fúngica no solo em condições controladas. *Metarhizium* já é considerado um fungo com o estilo de vida multifuncional agindo como um patógeno artrópode, saprófita, endófitico, além de promover o crescimento vegetal (CAMARGO et al., 2016; LACEY et al., 2015, LOVETT; ST LEGER, 2015; ENKERLI, 2016). Essas características parecem colocar este fungo em uma posição ecológica vantajosa na medida em que ele pode crescer e competir na rizosfera, mas também pode escapar do ambiente competitivo e de alto estresse do solo, infectando um hospedeiro artrópode (ST LEGER, 2008). Além disso já foi relatado a troca de nutrientes entre *Metarhizium* e espécies de plantas (BEHIE et al., 2012; 2017). Alguns autores já sugerem que as reações de *Metarhizium* com as plantas é filogeneticamente mais antiga do que com artrópodes (BARELLI et al., 2016).

No presente estudo, um isolado de *M. anisopliae* oriundo do solo foi usado para controlar uma população de carrapatos de *R. microplus* estabelecida na mesma área. Essa estratégia pode ter contribuído para os resultados positivos no controle de carrapatos. A persistência de fungos entomopatogênicos no ambiente pode ser considerada uma forma reduzir o número de aplicações de fungos no campo (BRUCK, 2010) tendo possivelmente um efeito negativo sobre as futuras gerações de pragas de artrópodes. Essa característica também pode representar a diminuição nos custos da aplicação de um produto biológico. Essa persistência no solo referente aos fungos entomopatogênicos representa uma característica fundamental para o sucesso do controle biológico de artrópodes-pragas presentes no solo, principalmente para os estágios de vida não parasitária de carrapatos de *R. microplus* (ovos, larvas não alimentadas e fêmeas ingurgitadas). Durante esse período, os artrópodes e os microorganismos estão presentes no ambiente e expostos as condições abióticas. A densidade de *Metarhizium* (UFC) no solo, relatada aqui, fornece informações cruciais sobre a quantidade de fungos necessária no solo para controlar as fases não parasitárias de *R. microplus*.

6 CONCLUSÃO

O uso do isolado nativo de *Metarhizium* LCM S04 em emulsão oleosa à 10%, permitiu a persistência do fungo em vasos com *Brachiaria brizantha*, mesmo sob altas temperaturas e irradiação UV. A identificação taxonômica molecular revelou a nível de espécie o isolado nativo como *Metarhizium anisopliae*. O tratamento do solo com a emulsão fúngica reduziu

significativamente o número de larvas recuperadas dos vasos com *B. brizantha*, 60 dias após o tratamento. O isolado de *M. anisopliae* LCM S04 pôde ser reisolado de amostras de solo e raízes durante cinco meses, de Fevereiro à Junho de 2018 em condição de semi-campo. Tolerar condições abióticas adversas e ainda manter a virulência são atributos necessários para o sucesso de um agente de controle biológico, especialmente para a fase não parasitária de *R. microplus*. Assim, a seleção de isolados nativos poderia melhorar a estratégia de controle biológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M.A.; COLWELL, D.D.; GILLEARD, J.; acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p.6-20, 2014.
- ADAMEK, L. Submerge cultivation of the fungus *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.). **Folia microbiologica**, v. 10, p. 255-257, 1965.
- ALKHAIBARI, A.M.; CAROLINO, A.T.; BULL, J.C.; SAMUELS, R.I.; BUTT, T.M. Differential Pathogenicity of *Metarrhizium* Blastospores and Conidia Against Larvae of Three Mosquito Species. **Journal Of Medical Entomology** v. 54, p.696-704, 2017.
- ALMEIDA, M. B.; TORTELLI, F. P. Y.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J. L. M.; SOARES, M. P.; FARIAS, N. A. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978 a 2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 26, p. 237-242, 2006.
- ÁNGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; PESCADOR-RUBIO, A.; SKODA, S.R.; CRUZ-VÁZQUEZ C., LORENZONI, A.Z.; GALINDO-VELASCO E.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H.; FOSTER, J.E. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus=Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions **Veterinary Parasitology** v. 170, p.278-286 2010.
- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: S. B. Alves edit. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: FEALQ, p.21-37, 1998.
- AZEVÊDO, D.M.M.R.; ALVES, A.A.; SALES, R.O. Principais Ecto e Endoparasitas que Acometem Bovinos Leiteiros no Brasil: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.2, p. 43 – 55, 2008.
- AZEVEDO, J.L Microorganismos endofíticos. IN: MELO, I.S; AZEVEDO, J.L edit **Ecologia microbiana**. Jaguariuna: Embrapa-CNPMA,1998. cap 4, p. 117-137, 1998.
- BANUMATHI, B.; VASEEHARAN, B.; RAJASEKAR, P.; PRABHU, N.M.; RAMASAMY, P.; MURUGAN, K.; CANALE, A.; BENELLI, G. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – A review. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p.102-110, 2017.
- BARDGETT, R.D.; VAN DER PUTTEN, W.H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. **Nature**, v. 515, p. 505, 2014.
- BARELLI, L.; MOONJELY, S.; BEHIE, S.W.; BIDOCHKA, M.J. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. **Plant Molecular Biology**, v. 90, p.657-664, 2016.
- BARELLI, L.; PADILLA-GUERRERO, I.; BIDOCHKA, M.J.. Differential expression of insect and plant specific adhesin genes, Mad1 and Mad2, in *Metarrhizium robertsii*. **Fungal Biology**, v. 115, p.1174-1185, 2011.

- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 3Ed, Burgess Publishing Co.: Minneapolis, 1972.
- BATTA S, Y.A. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. **Crop Protection**, v. 44, p. 128-134, 2013.
- BEHIE, S.W.; ZELISKO, P.M.; BIDOCHKA, M.J. Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants. **Science** v. 336, 2012.
- BEHIE, S.W.; MOREIRA, C.C.; SEMENTCHOUKOVA, I.; BARELLI, L.; ZELISKO, P.M.; BIDOCHKA, M.J. Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. **Nature Communications**, v.8, p.14245-14250, 2017.
- BENELLI, G. Tools to fight ticks: A never-ending story? News from the front of green acaricides and photosensitizers. **Asian Pacific Journal Of Tropical Disease**, v. 6, p.656-659, 2016.
- BENJAMIN, E. O.; GRABENWEGER, G.; STRASSER, H. WESSELER, J. The socioeconomic benefits of biological control of western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* and wireworms *Agriotes* spp. in maize and potatoes for selected European countries. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 125, p. 273-285, 2018.
- BERNARDO, C. C.; BARRETO, L.P.; SILVA, C.R.S.; LUZ, C.; ARRUDA, W.; FERNANDES, E.K.K. Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks And Tick-borne Diseases**, v. 9, p.1334-1342, 2018.
- BHARADWAJ, A.; STAFFORD , K.C. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strain F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 47, p. 862-867, 2010.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S.A.; HUMBER R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia** v. 101, p.512-530, 2009.
- BRODEUR, J.; ABRAM, P.K.; HEIMPEL, G.E.; MESSING, R.H. Trends in biological control: public interest, international networking and research direction. **BioControl**, v. 63, p. 11-26, 2018.
- BRUCK, D. J.; DONAHUE, K. M.. Persistence of *Metarhizium anisopliae* incorporated into soilless potting media for control of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus* in container-grown ornamentals. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 95, p.146-150, 2007.
- BRUCK, D. J. Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: implications for pest management. **Biological Control**, v. 32, p.155-163, 2005.
- BRUCK, D.J. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. **Biocontrol**, v. 55, p.103-112, 2010.
- BUGEME, D.M.; KNAPP, M.; BOGA, H.I.; WANJOYA, A.K.; MANIANIA, N.K. Influence of temperature on virulence of fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* and

Beauveria bassiana to the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **Mycopathologia**, v. 167, p. 221-227, 2009.

CAMARGO M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology** v. 188, p.140-147, 2012.

CAMARGO, M. G.; MARCIANO A. F.; SÁ, F.A.; PERINOTTO, W.M.S.; QUINELATO, S.; GÔLO, P.S.; ÂNGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p.271-276, 2014.

CAMARGO, M.; NOGUEIRA, M.R.S.; MARCIANO, A.F.; PERINOTTO, W.M.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; SCOTT, F.B.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38-42, 2016.

CASTRO, T., MAYAYERHOFER, J., ENKERLI, J., EILENBERG, J., MEYLING, N. V., MORAL, R.A. DEMÉTRIO, C.G.B., & DELALIBERA Jr, I. Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 233, p.361-369, 2016.

CHAGAS, A. C. S.; FURLONG, J.; NASCIMENTO, C. B. Comportamento e ecologia de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens* no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, p. 188-191, 2001.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal Biocontrol of Acari. **Biocontrol Science And Technology** v. 10, p.357-384, 2000.

CORY, J. S.; ERICSSON, J. D.. Fungal entomopathogens in a tritrophic context. **Biocontrol**, v. 55, p.75-88, 2009.

COSSÍO-BAYÚGAR, R.; MARTÍNEZ-IBAÑEZ, F.; AGUILAR-DÍAZ, H.; MIRANDA-MIRANDA, E. Pyrethroid Acaricide Resistance Is Proportional to P-450 Cytochrome Oxidase Expression in the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*. **BioMed research international**, v.2018, p.1-6, 2018.

DE PAULO, J.F.; CAMARGO, M. G.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; MARCIANO, A. F.; FREITAS, M. C.; SILVA, E. M.; GÔLO, P.S.; SPADACCI-MORENA, D.D.; ÂNGELO, I.C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Rhipicephalus microplus* infected by *Metarhizium*: unveiling hemocyte quantification, GFP-fungi virulence, and ovary infection. **Parasitology Research**, v.117, p.1847-1856, 2018.

DUARTE, G. F.; RODRIGUES, J.; FERNANDES, É. K.; HUMBER, R. A.; LUZ, C. New insights into the amphibious life of *Biomphalaria glabrata* and susceptibility of its egg masses to fungal infection. **Journal of invertebrate pathology**, v.125, p.31-36, 2015.

- DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data **Mycological Research** v. 104, p. 134-150, 2000.
- ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATOOUR, A.; CAMICAS, J.-L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM R.; WALKER, A.R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and latin America. **Experimental And Applied Acarology**, v. 38, p.219-235, 2006.
- FALVO, M. L.; ALBORNOZ, P.M.; RODRIGUES, J.; LÓPEZ LASTRA, C. C.; GARCÍA, J.J.; FERNANDES, É. K.; LUZ, C. Effect of UV-B Irradiation on Water-Suspended *Metarhizium anisopliae* sl (Hypocreales: Clavicipitaceae) Conidia and Their Larvicidal Activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v.55, p.1330-1333, 2018.
- FANG, W.; ST. LEGER, R. J. RNA binding proteins mediate the ability of a fungus to adapt to the cold. **Environmental microbiology**, v. 12, p. 810-820, 2010.
- FARIA, M.R.; HAJEK, A.E.; WRAIGHT, S.P. Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae* **Biological Control** v. 51 346-354, 2009.
- FERNANDES, E. K.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.E.N.; FOSTER, R.N.; ROBERTS, D.W. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, p.197-205, 2010.
- FERNANDES, É.K.K.; RANGELS, D.E.; BRAGA, G.U.; ROBERTS, D.W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current genetics**, v. 61, p. 427-440, 2015.
- FERNÁNDEZ-SALAS, A.; ALONSO-DÍAZ, M.A.; ALONSO-MORALES, R. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.C.; CERVANTES-CHÁVEZ, J.A. Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Medical and veterinary entomology**, v.31, p.36-43, 2016.
- FIOROTTI, J. P.; FERREIRA, J. R. T.; MARCIANO, A. F.; de FREITAS, M. C.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; CAMARGO, M. G.; ANGELO, I.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; GÔLO, P.S. Association between *Metarhizium anisopliae* sensu lato and cypermethrin to control *Rhipicephalus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.38, P.66-74, 2016.
- FISCHHOFF, I.R.; KEESING, F.; OSTFELD, R.S. The tick biocontrol agent *Metarhizium brunneum* (= *M. anisopliae*)(strain F52) does not reduce non-target arthropods. **PloS one**, v. 12, p. e0187675, 2017.
- FISHER, J. J.; REHNER, S. A.; BRUCK, D. J.. Diversity of rhizosphere associated entomopathogenic fungi of perennial herbs, shrubs and coniferous trees. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 106, p.289-295, 2011.
- FULAR, A.; SHARMA, A.K.; KUMAR, S.; NAGAR, G.; CHIGURE, G.; RAY, D. D.; GHOSH, S. Establishment of a multi-acaricide resistant reference tick strain (IVRI-V) of *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v.9, p.1184-1191, 2018.

- FURLONG, J.; PRATA, M.C.A. Conhecimento básico para controle do carrapato-dos-bovinos. In: FURLONG, J. (Org.). **Carrapatos: problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 2005.,MNB p. 9-20.
- GAO, Q.; JIN, K.; YING, S. H.; ZHANG, Y.; XIAO, G.; SHANG, Y.; PENG, G. Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **Plos Genetics**, v. 7, e1001264., 2011.
- GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J.; MOCHI, D.A.; SIMI, L.D.; CARVALHO, W.M.; TSURUTA, S.A.; BARBOSA, J.C.. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.267-273, 2011.
- GARRIDO-JURADO, I.; FERNÁNDEZ-BRAVO, M.; CAMPOS, C.; QUESADA-MORAGA, E. Diversity of entomopathogenic Hypocreales in soil and phylloplanes of five Mediterranean cropping systems. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 130, p.97-106, 2015.
- GARRIDO-JURADO, I.; RUANO, F.; CAMPOS, M.; QUESADA-MORAGA, E. Effects of soil treatments with entomopathogenic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. **Biological Control** v. 59, p.239-244, 2011.
- GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H.N.; BILHASSI, T.B.; PORTILHO, A.I.; OKINO, C.H.; MARCONDES, C.R.; OLIVEIRA, M.C.S. Estimates of repeatability and correlations of hemoparasites infection levels for cattle reared in endemic areas for *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 250, p.78-84, 2018.
- GREENFIELD, M.; GOMÉZ-JIMÉNEZ, M.I.; ORTIZ, V.; VEGA, F.E.; KRAMER, M.; PARSA, S.. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. **Biological Control**, v. 95, p.40-48, 2016.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.
- GONZÁLES, J. C.; SERRA-FREIRE, N. M. O couro dos bovinos no Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. **A Hora Veterinária**, v. 12, p. 14-6, 1992.
- HARTELT, K.; WURST, E.; COLLATZ, J.; ZIMMERMANN, G.; KLEESPIES, R.G.; OEHME, R.M.; KIMMIG, P.; STEIDLE, J.L.M.; MACKENSTEDT, U. Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments. **International Journal Of Medical Microbiology**, v. 298, p.314-320, 2008.
- HEDIMBI, M.; KAAYA, G.P.; SINGH, S.; CHIMWAMUROMBE, P.M.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; SAMISH, M. Protection of *Metarhizium anisopliae* conidia from ultraviolet radiation and their pathogenicity to *Rhipicephalus evertsi evertsi* ticks. **Experimental And Applied Acarology**, v. 46, p.149-156, 2008.
- HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, C.; GUZMÁN-FRANCO, A.W. Species Diversity and Population Dynamics of Entomopathogenic Fungal Species in the Genus *Metarhizium*—a Spatiotemporal Study. **Microbial Ecology** v. 74, p.194-206, 2017.

- HORN, S. C.; DUBIN, L. C.; SEVERO, J. E. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil. **BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. SECRETARIA DE DEFESA SANITÁRIA ANIMAL. Boletim de Defesa Sanitária Animal** v.2, 1983.
- HU, G.; ST LEGER, R.J. Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere Competent. **Applied and Environmental Microbiology** v. 68, p.6383-6387, 2002.
- HUMBER, R.A. Identification of entomopathogenic fungi. In: **Manual of techniques in invertebrate pathology**, p.151-187, 2012.
- JABER, L.R.; OWNLEY, B. H.. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? **Biological Control**, v. 116, p.36-45, 2017.
- JARONSKI, S.T. Soil ecology of the entomopathogenic ascomycetes: a critical examination of what we (think) we know **Use of Entomopathogenic Fungi in Biological management of pests**. Kerala: Research Signpost. p. 91-143, 2007.
- JENKINS, N.E.; GOETTEL, M.S. Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. **The Memoirs Entomology Society of Canada**, v. 171, p. 37-48, 1997.
- KAAYA, G. P.; SAMISH, M.; HEDIMBI, M.; GINDIN, G.; GLAZER, I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. **Experimental and applied acarology**, v. 55, p. 273-281, 2011.
- KABALUK, T.; LI-LEGER, E.; NAM, S.; *Metarhizium brunneum* – An enzootic wireworm disease and evidence for its suppression by bacterial symbionts. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 150, p.82-87, 2017.
- KENDRICK, B. **The fifth kingdom**. Waterloo, Ontario: Mycologue Publications, 1985.
- KEYSER, C.A FERNANDES, É.K., RANGEL, D.E., ROBERTS, D. W. Heat-induced post-stress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy?. **Journal of invertebrate Pathology**, v. 120, p. 67-73, 2014.
- KLAFKE, G.;WEBSTER, A.; DALL AGNOL, B.; PRADEL, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L.H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M.F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, F.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J.R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, p. 73-80, 2017.
- LIAO, X.; FANG, W.; LIN, L.; LU, H.; ST LEGER, R. *Metarhizium robertsii* Produces an Extracellular Invertase (MrINV) That Plays a Pivotal Role in Rhizospheric Interactions and Root Colonization. **Plos One**, v. 8, e7818, 2013b.
- LIAO, X.; LOVETT, B., FANG; W., ST LEGER; R. *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in Arabidopsis and enhances virulence to insects. **Microbiology**, v. 163, p.980-991, 2017.
- LIAO, X.; LU, H.; FANG, W.; ST LEGER, R.J. Overexpression of a *Metarhizium robertsii* HSP25 gene increases thermotolerance and survival in soil. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 98, n. 2, p.777-783, 22 nov. 2013a.

- LOPES, R. B.; SOUZA, D.A.; ROCHA, L.F.N.; MONTALVA, C.; LUZ, C.; HUMBER, R.A; FARIA, M. *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 151, p.165-168, 2018.
- LOVETT, B.; ST LEGER, R.J. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. **Current Genetics**, v. 61, p.253-261, 2014.
- MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 32, p.1-26, 2016.
- MASCARIN, G.M.; LOPES, R.B.; DELALIBERA, I.J.; FERNANDES, E.K.K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal Of Invertebrate Pathology**, 2018.
- MARANGÁ, R. O., KAAAYA, G.P., MUEKE, J.M, HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, v. 159, p.527-532, 2005.
- MARUYAMA, S. R.; CASTRO-JORGE, L. A.; RIBEIRO, J.M.C.; GARDINASSI, L. G.; GARCIA, G. R.; BRANDÃO, L. G.; RODRIGUES, A.R.; OKADA, M.I.; ABRÃO, E.P.; FERREIRA, B.R.; FONSECA, B. A. L. D. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109(1), p.38-50, 2014.
- MENT, D.; CHURCHILL, A.C.L.; GINDIN, G.; BELAUSOV, E.; GLAZER, I.; REHNER, S.A.; ROT, A.; DONZELLI, B.G.G; Resistant ticks inhibit *Metarhizium* infection prior to haemocoel invasion by reducing fungal viability on the cuticle surface. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 6, p. 1570-1583, 2012.
- McGINNIS, M.R. . **Laboratory handbook of medical mycology**. New York: Academic Press, 1980.
- MICHEREFF, M.F.; FARIA, M.; WRAIGHT, S.P.; SILVA, K.F.A.S. MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? **Arquivos do instituto biológico** v.76, p.769-779, 2009.
- MILNER, R.J.; SAMSON, P.; MORTON R. Persistence of Conidia of *Metarhizium anisopliae* in Sugarcane Fields: Effect of isolate and formulation on persistence over 3.5 years, **Biocontrol Science and Technology** v.13, p. 507-516, 2003.
- MOORE, D.; BRIDGE, P.D.; HIGGINS, P.M.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, v. 122, p. 605-616, 1993.
- MOORE, D.; HIGGINS, P. M.; LOMER, C. J.. Effects of Simulated and Natural Sunlight on the Germination of Conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and Interactions with Temperature. **Biocontrol Science And Technology**, v. 6, p.63-76, 1996.
- NASCIMENTO, F.S.B. **Ação de *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae*,**

***Metarhizium anisopliae* var. *Acridum*, *Beauveria bassiana* e parâmetros biológicos após passagem em *Rhipicephalus sanguineus*.** Dissertação (Mestrado). Recife: UFPE, 2003.

OJEDA-CHI, M.M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology** v. 150, p. 348-354, 2010.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F.E. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: Towards Endophytic biological control. **Journal of Visualized Experiments**, v. 74, 2013.

PASCOAL, J.O.; SIQUEIRA, S.M.; COSTA MAIA, R.; SZABÓ, M.P.J.; YOKOSAWA, J. Detection and molecular characterization of Mogiana tick virus (MGTV) in *Rhipicephalus microplus* collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2018.

POWELL, R. T.; REID, T. J. Project tick control. **Queensland Agricultural Journal**, v. 108, p. 279-300, 1982.

PAVA-RIPOLL, M.; ANGELINE, C.; FANG, W.; WANG, S.; POSADA, F.J.; ST LEGER., R. The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. **Microbiology**, v. 157, p.47-55, 2010.

POLAR, P.; KAIRO, M.P.K.; PETERKIN, D.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S. Assessment of Fungal Isolates for Development of a Myco-Acaricide for Cattle Tick Control. **Vector-borne And Zoonotic Diseases** v. 5, p.276-284, 2005.

PRIOR, C.; JOLLANDS, P. Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytesplutus* (Coleoptera : Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52 p. 66–72, 1988.

QUAITE, F.E.; SUTHERLAND, B.M.; SUTHERLAND, J.C. Action spectrum for DMA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. **Nature**, v. 358, p. 576, 1992.

REHNER, S.A.; KEPLER, R. M.. Species limits, phylogeography and reproductive mode in the *Metarhizium anisopliae* complex. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 148, p.60-66, 2017.

RECK, J.; KLAFKE, G.M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U.A.; CORASSINI, V.B.; VARGAS, R.; SANTOS, V.J.S.; MARTINS, J.R.S. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, , v. 201, p.128-136, 2014b.

RECK, J.; MARKS, F.S.; RODRIGUES, R.O.; SOUZA, U.A.; WEBSTER, A.; LEITE, R.C.; GONZALES, J.C.; KLAFKE, G.M.; MARTINS, J.R. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle?. **Preventive veterinary medicine**, v. 113, p. 59-62, 2014a.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p.265-270, 1950.

- ROBERTS, D.W.; ST. LEGER, R.J. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. **Advances In Applied Microbiology** p.1-70, 2004.
- RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, v. 117, p.3-29, 2018.
- SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S.; GLAZER, I.; GINDIN, G. Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology** v. 206, p.258-266, 2014.
- SANTI, L.; SILVA, L. A. D.; SILVA, W. O. B.; CORRÊA, A. P. F.; RANGEL, D. E .N.; CARLINI, C. R.; SCHRANK, A. Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, p. 2297-2303, 2011.
- SANTOYO, G; PACHECO, C.H., SALMERÓN, J.H., LEÓN, R.H. The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. **Spanish journal of agricultural research**, v. 15, p. 13, 2017.
- SASAN, R.K.; BIDOCHKA, M.J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal Of Botany**, v. 99, p.101-107, 2012.
- ST LEGER, R. J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 98, p.271-276, 2008.
- STEINWENDER, B. M.; ENKERLI, J.; WIDMER, F.; EILENBERG, J.; KRISTENSEN, H.L.; BIDOCHKA, M.J.; MEYLING, N. V. Root isolations of *Metarhizium* spp. from crops reflect diversity in the soil and indicate no plant specificity. **Journal Of Invertebrate Pathology**, v. 132, p.142-148, 2015.
- SZABÓ, M.P.J.; MARTINS, M.M.; CASTRO, M.B.; PACHECO, R.C.; TOLESANO-PASCOLI, G.V.; SANTOS, K.T.; MARTINS, T.F.; SOUZA, L.G.A.; MAY-JÚNIOR, J.A.; YOKOSAWA, J.; LABRUNA, M.B. Ticks (Acari: Ixodidae) in the Serra da Canastra National Park in Minas Gerais, Brazil: species, abundance, ecological and seasonal aspects with notes on rickettsial infection. **Experimental and Applied Acarology**, p.1-17, 2018.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society** v. 66, p. 407–411, 1976.
- VAN LENTEREN, J.C.; BOLCKMANS, K., KOHL., J., RAVENSBERG, W.J., URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 63, p. 39-59, 2018.
- VEGA, F.E. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. **Mycologia**, v. 110, p. 4-30, 2018.
- VEMMER, M.; PATEL, A.V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents **Biological Control** v. 67, p.380-389, 2013.
- VERÍSSIMO, C.J. Controle biológico do carrapato do boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. **Revista de Educacao Continuada em Medicina Veterinaria e**

Zootecnia do CR MV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 11, p. 14 – 23, 2013.

VIDAL, S.; JABER, L. R. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. **Current Science**, v. 109, p. 46-54, 2015.

VILLA, E.C.; MARUYAMA, S. R.; MIRANDA-SANTOS, I. K.; PALACIOS, G.; LADNER, J. T. Complete Coding Genome Sequence for Mogiana Tick Virus, a Jingmenvirus Isolated from Ticks in Brazil. **Genome announcements**, v. 5(18), e00232-17, 2017.

VILLARREAL, J.P.V.; SANTOS, P.R.; SILVA, M.A.M.P.; AZAMBUJA, R.H.M.; GONÇALVES, C.L.; ESCAREÑO, J.J.H.... Evaluation of phytotherapy alternatives for controlling *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in vitro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, p.299-306, 2017.

WANG, C.; DUAN, Z.; LEGER, R. J. St.. MOS1 Osmosensor of *Metarhizium anisopliae* Is Required for Adaptation to Insect Host Hemolymph. **Eukaryotic Cell**, v. 7, p.302-309, 2008.

WANG, S.; O'BRIEN, T.R.; PAVA-RIPOLL, M.; ST. LEGER, R. Local adaptation of an introduced transgenic insect fungal pathogen due to new beneficial mutations. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, p.20449-20454, 2011.

WANG, C.; ST LEGER, R. J.. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 103, p.6647-6652, 2006.

WANI, Z.A.; ASHRAFI, N.; MOHIUDDIN, T.; RIYAZ-UI-HASSAN, S.. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 99, p.2955-2965, 2015.

WEBSTER, A.; RECK J.; SANTI, L.; SOUZA, U. A.; DALL'AGNOL, B.; KLAFKE, G. M.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; MARTINS, J.R.; SCRHANK, A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 207, p.302-308, 2015.

WHO- World Health Organization. Global Solar UV index: A Practical Guide. Geneva, Switzerland. **World Health Organization**, 2002.

WYREBEK, M.; BIDOCHKA, M. J.. Variability in the Insect and Plant Adhesins, Mad1 and Mad2, within the Fungal Genus *Metarhizium* Suggest Plant Adaptation as an Evolutionary Force. **Plos One**, v. 8, n. 3, e59357, 2013.

ZIMMERMANN, G. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 40, p. 36-40, 1982.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 879-920, 2007.



Comissão de Ética
no Uso de Animais
INSTITUTO DE VETERINÁRIA - UFRRJ

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 037/2014

intitulado “**MANUTENÇÃO DE COLÔNIA DE RHIPICEPHALUS MICROPLUS VISANDO A AVALIAÇÃO DO EFEITO DE FUNGOS ACARIPATOGÊNICOS NO SEU CONTROLE**” encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Parasitologia Animal, Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 14 de julho de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador CEUA-IV

BR 465, Km 7 – Campus da UFRRJ

Seropédica – Rio de Janeiro – CEP: 23.890-000

Telefone: (021) 2682-3051 E-mail:
ceua.iv.ufrri@gmail.com

Seropédica 14 de
julho de 2014