

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

*Avaliação in vitro dos efeitos de Isaria farinosa, I. fumosorosea, Paecilomyces lilacinus e Lecanicillium lecanii sobre Boophilus microplus.*

**Isabele da Costa Angelo**

**2007**





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

***AVALIAÇÃO in vitro DOS EFEITOS DE *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* E *Lecanicillium lecanii* SOBRE *Boophilus microplus****

**ISABELE DA COSTA ANGELO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Animal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2007

595.42

A584a

T

Angelo, Isabele da Costa, 1981-  
Avaliação in vitro dos efeitos de Isaria farinosa, I.  
fumosorosea, Paecilomyces lilacinus e Lecanicillium  
lecanii sobre Boophilus microplus / Isabele da Costa  
Angelo. - 2007.

49 f. : il.

Orientadora: Vânia Rita Elias  
Pinheiro Bittencourt.

Dissertação (mestrado) -  
Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Instituto de  
Veterinária.

Bibliografia: f. 42-49.

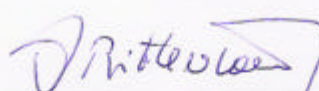
1. Boophilus microplus -  
Controle biológico - Teses. 2.  
Fungos entomopatogênicos - Teses.  
I. Bittencourt, Vânia Rita Elias,  
1959. II. Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Instituto  
de Veterinária. III. Título.

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


**ISABELE DA COSTA ANGELO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.


TESE APROVADA EM 26 / 02 / 2007.



Vânia Rita Elías Pinheiro Bittencourt, PhD. UFRRJ  
(Orientador)



Márcia Cristina de Azevedo Prata, PhD. EMBRAPA



Áurea Maria Lage de Moraes, Dra. FIOCRUZ

Dedico este trabalho aos meus pais  
Josemar e Maria de Fátima,, aos  
meus avós Florival e Valentina,, aos  
meus irmãos Leonardo , Josemar Jr.  
e Dafni e ao meu pequeno Gabriel.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter guiado meus passos nesta longa caminhada. A professora e orientadora *Vânia Rita Elias Bittencourt* por ter me deixado fazer parte de seu grupo de pesquisa, compartilhado seus conhecimentos, confiado no meu trabalho e por muitas vezes ter dito palavras de conforto nos momentos de desespero; à minha grande família por todo o amor concedido; a grande amiga *Ana Paula Rodrigues de Moraes*, que me acompanha pessoalmente e profissionalmente desde o início da graduação, compartilhando minhas alegrias e tristezas; ao querido *Wagner Gitahy Leira*, que por muitos fins de semana me ajudou no laboratório, e que durante muitos anos me incentivou, me fazendo acreditar em um futuro promissor, confiando sempre no meu potencial; ao grande amigo *Marcos Pinheiro Franque*, que esteve sempre disposto a me ajudar, me estimulando em todos os dias de nossos estudos; aos amigos *Éverton Kort Kamp Fernandes* e *Thiago Campanharo Bahiense* pelos momentos de descontração no laboratório, pela amizade conquistada em pouco tempo e pelos ensinamentos teóricos e práticos compartilhados; ao sempre presente *Wendell Marcelo de Souza Perinotto*, que acompanhou meus experimentos e que certamente contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho; a mais nova amiga *Andréia Loureiro Musso Terra*, que recentemente chegou ao laboratório, mas que já é muito especial; ao querido professor *Carlos Luiz Massard*, que sempre esteve presente, contribuindo direta ou indiretamente para a realização deste trabalho; a Dra *Áurea Maria Lage de Moraes* e Dra *Gisela Lara da Costa* pela colaboração na identificação dos isolados dos fungos e pela atenção disponibilizada; a todos os funcionários da Estação Experimental W. O. Neitz que contribuíram para a manutenção dos animais nos estábulos; a CAPES pelo auxílio financeiro que foi primordial para a execução deste trabalho e aos colegas e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

## **BIOGRAFIA**

Isabele da Costa Angelo, filha de Josemar Angelo e Maria de Fátima da Costa Angelo, nasceu em 12 de junho de 1981, na cidade do Rio de Janeiro – RJ.

Cursou o ensino fundamental no Colégio Peri, sendo o último ano na Escola Municipal Dr. Jair Tavares de Oliveira, ambos no município do Rio de Janeiro, tendo concluído em dezembro de 1994. Em 1995, ingressou no ensino médio no Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - CTUR, em Seropédica, concluindo o curso técnico em Agropecuária em dezembro de 1997.

Em setembro de 1999 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído em outubro de 2004. Durante esses anos foi estagiária na Clínica Veterinária Andresa, em Campo Grande, RJ; no Departamento de Reprodução Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e no Laboratório de Controle Microbiano da mesma instituição. Foi, pelo período de um ano, bolsista de Iniciação Científica PIBIC-CNPq, apresentando trabalhos em congressos e simpósios, e publicou dois trabalhos científicos em periódico indexado.

Em março de 2005 iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Parasitologia Animal, ao nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



## RESUMO

ANGELO, Isabele da Costa. **Avaliação *in vitro* dos efeitos de *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* e *Lecanicillium lecanii* sobre *Boophilus microplus***. 2007. 37p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

*Boophilus microplus* é um ectoparasito que causa grandes perdas na pecuária mundial. A utilização exclusiva de produtos químicos no controle de carrapatos, associada ao manejo inadequado tem conduzido o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes, e a contaminação dos produtos de origem animal e do ambiente pelos seus resíduos. O uso de fungos entomopatogênicos no controle de artrópodes tem se tornado uma abordagem cada vez mais atrativa. Inúmeros trabalhos comprovam experimentalmente a patogenicidade dos fungos sobre diversas espécies de carrapatos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* de *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* e *Lecanicillium lecanii* sobre fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas de *B. microplus*. Os fungos foram repicados em meio de cultura extrato de malte, e mantidos em câmara climatizada sob temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  e umidade relativa de 80% por quinze dias. Suspensões conidiais foram preparadas a partir do crescimento do fungo, cujos conídios foram adicionados a solução de água destilada e Tween 0,1%. As concentrações  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  formaram os grupos tratamento, juntamente com o grupo controle, constituído por água destilada estéril e Tween 0,1%. O tratamento constituiu-se de um mililitro da concentração conidial testada, e cada grupo foi formado por 10 repetições. Os parâmetros de avaliação observados para demonstrar o efeito dos fungos sobre o carrapato foram as alterações biológicas de fêmeas ingurgitadas, viabilidade de ovos tratados e percentual de mortalidade de larvas, acompanhado a cada cinco dias até o 20º dia após infecção. Os resultados mostraram que *L. lecanii* causou alterações nos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas, diminuindo o período de postura, o índice nutricional, o índice de produção de ovos, e aumentando o período de incubação. *Isaria farinosa* mostrou redução no período da postura e no índice nutricional de fêmeas ingurgitadas. *P. lilacinus* foi o único fungo capaz de reduzir o período de eclosão das larvas provenientes da infecção de fêmeas ingurgitadas. *I. fumosorosea* reduziu o índice nutricional e foi o único isolado que causou alteração significativa no período de eclosão de larvas provenientes da infecção de ovos. Diferentes concentrações dos entomopatógenos reduziram o potencial reprodutivo das fêmeas ingurgitadas dos grupos tratados. Os isolados de *I. fumosorosea* e *L. lecanii* apresentaram maior potencial de controle para fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*. Todos os isolados testados mostraram patogenicidade para larvas não alimentadas de *B. microplus* após infecção *in vitro*.

Palavras-chave: *Boophilus microplus*, Controle biológico, Entomopatógenos.

## ABSTRACT

ANGELO, Isabele da Costa. *In vitro* evaluation of the effects of *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* and *Lecanicillium lecanii* toward *Boophilus microplus*. 2007. 37p. Dissertation (Master Science in Veterinary Parasitology, Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

*Boophilus microplus* is an ectoparasite which causes great economic losses around the world. The exclusive use of acaricides and the inadequate management have conducted the development of resistance in ticks' populations, environmental and food contamination by acaricides and their residues. The use of entomopathogenic fungi to arthropods control has shown interesting responses. Several studies have proved the pathogenicity of fungi toward various ticks' species. The aim of the present study was to evaluate the effect of *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* and *Lecanicillium lecanii* toward engorged females, eggs and larvae of *B. microplus* tick. The isolates were cultured on malt extract medium at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and 80% of relative humidity for 15 days. Conidial suspensions were prepared in Tween 80 water solution (0.1% v/v). There were 4 treatment groups according to the following conidial concentrations:  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . The control group was made up of water and Tween 80 only (0.1% v/v). Treatment was based on immersion of the specimen in 1 mL of the conidial suspension. Each treatment group was made up of 10 repetitions. Changes in biology of engorged females, eggs' viability and larvae mortality, were observed every 5 days up to the 20<sup>th</sup> day after treatment. The results have shown that *L. lecanii* changed biological parameters in engorged females through the reduction in posture period, nutritional rate, eggs' production rate, and increase of incubation period. *Isaria farinosa* has shown reduction in posture period and in nutritional rate. *Paecilomyces lilacinus* was the unique isolate able to reduce the eclosion period of larvae from infected females. *Isaria fumosorosea* has reduced the nutritional rate and was the unique isolate that changed significantly in eclosion period when eggs were infected. Conidial concentrations reduced reproduction capacity of engorged females. The isolates of *I. fumosorosea* and *L. lecanii* have presented major potential to control *B. microplus* engorged females. All tested isolates have shown pathogenicity toward unfed larvae of *B. microplus* after *in vitro* infection.

Key-words: *Boophilus microplus*, Biological control, Entomopathogens

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características macromorfológicas das colônias dos entomopatógenos. **A:** Colônia de *Lecanicillium lecanii*; **B:** Reverso da colônia de *L. lecanii*; **C:** Colônia de *Isaria farinosa*; **D:** Reverso da colônia de *I. farinosa*; **E:** Colônia de *I. fumosorosea*; **F:** Reverso da colônia de *I. fumosorosea*; **G:** Colônia de *Paecilomyces lilacinus*; **H:** Reverso da colônia de *P. lilacinus*..... 17
- Figura 2.** Isolados dos entomopatógenos observados sob microscopia óptica. Barras = 10 µm. **A e B:** Fiálides solitárias de *Lecanicillium lecanii*; **C:** Fiálide solitária e conídios em cadeia de *Isaria farinosa* em aumento de 400×; **D:** Fiálides com porção basal dilatada - *I. farinosa*; **E:** Fiálide com porção basal globosa - *I. fumosorosea*; **F:** Conidióforo de *I. fumosorosea*; **G:** Fiálide solitária de *Paecilomyces lilacinus* em aumento de 400×; **H :** Fiálide com porção basal dilatada, apresentando um “pescoço”na extremidade - *P. lilacinus* em aumento de 1000×..... 18
- Figura 3.** Ritmo de postura diária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*..... 22
- Figura 4.** Ritmo de postura diária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^6$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*..... 22
- Figura 5.** Ritmo de postura diária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*..... 23
- Figura 6.** Ritmo de postura diária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*..... 23
- Figura 7.** Ritmo de eclosão acumulada de larvas de *Boophilus microplus* a partir do tratamento de ovos com a concentração  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus* sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%..... 31
- Figura 8.** Ritmo de eclosão acumulada de larvas de *Boophilus microplus* a partir do tratamento de ovos com a concentração  $10^6$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus* sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%..... 31

<b>Figura 9.</b> Ritmo de eclosão acumulada de larvas de <i>Boophilus microplus</i> a partir do tratamento de ovos com a concentração $10^7$ conídios $\text{ml}^{-1}$ dos isolados CG 420 de <i>Lecanicillium lecanii</i> , CG 198 de <i>Isaria farinosa</i> , CG 202 de <i>I. fumosorosea</i> e CG 36 de <i>Paecilomyces lilacinus</i> sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	32
<b>Figura 10.</b> Ritmo de eclosão acumulada de larvas de <i>Boophilus microplus</i> a partir do tratamento de ovos com a concentração $10^8$ conídios $\text{ml}^{-1}$ dos isolados CG 420 de <i>Lecanicillium lecanii</i> , CG 198 de <i>Isaria farinosa</i> , CG 202 de <i>I. fumosorosea</i> e CG 36 de <i>Paecilomyces lilacinus</i> sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	32
<b>Figura 11.</b> Percentual de mortalidade das larvas de <i>Boophilus microplus</i> tratadas com a concentração $10^5$ conídios $\text{ml}^{-1}$ dos isolados CG 420 de <i>Lecanicillium lecanii</i> , CG 198 de <i>Isaria farinosa</i> , CG 202 de <i>I. fumosorosea</i> e CG 36 de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , demonstrado em diferentes dias pós-tratamento.....	35
<b>Figura 12.</b> Percentual de mortalidade das larvas de <i>Boophilus microplus</i> tratadas com a concentração $10^6$ conídios $\text{ml}^{-1}$ dos isolados CG 420 de <i>Lecanicillium lecanii</i> , CG 198 de <i>Isaria farinosa</i> , CG 202 de <i>I. fumosorosea</i> e CG 36 de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , demonstrado em diferentes dias pós-tratamento.....	36
<b>Figura 13.</b> Percentual de mortalidade das larvas de <i>Boophilus microplus</i> tratadas com a concentração $10^7$ conídios $\text{ml}^{-1}$ dos isolados CG 420 de <i>Lecanicillium lecanii</i> , CG 198 de <i>Isaria farinosa</i> , CG 202 de <i>I. fumosorosea</i> e CG 36 de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , demonstrado em diferentes dias pós-tratamento.....	36
<b>Figura 14.</b> Percentual de mortalidade das larvas de <i>Boophilus microplus</i> tratadas com a concentração $10^8$ conídios $\text{ml}^{-1}$ dos isolados CG 420 de <i>Lecanicillium lecanii</i> , CG 198 de <i>Isaria farinosa</i> , CG 202 de <i>I. fumosorosea</i> e CG 36 de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , demonstrado em diferentes dias pós-tratamento.....	37
<b>Figura 15.</b> Fêmeas de <i>Boophilus microplus</i> pertencentes ao grupo controle, 10 dias após tratamento.....	40
<b>Figura 16.</b> Fêmeas de <i>Boophilus microplus</i> pertencentes ao grupo tratado com a concentração $10^8$ conídios $\text{ml}^{-1}$ de <i>Lecanicillium lecanii</i> , 10 dias após o tratamento.....	40
<b>Figura 17.</b> Fêmeas de <i>Boophilus microplus</i> pertencentes ao grupo tratado com a concentração $10^8$ conídios $\text{ml}^{-1}$ de <i>Isaria farinosa</i> , 10 dias após o tratamento.....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Isolados de fungos entomopatogênicos, suas respectivas espécies, seus hospedeiros ou substratos, sua origem e ano de recebimento da cultura no Cenargen.....	10
<b>Tabela 2.</b> Concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> utilizadas para o tratamento de fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas não alimentadas de <i>Boophilus microplus</i> .....	12
<b>Tabela 3.</b> Características macromorfológicas dos entomopatógenos <i>Paecilomyces</i> , <i>Isaria</i> e <i>Lecanicillium</i> utilizados nos bioensaios.....	15
<b>Tabela 4.</b> Valores médios, em gramas, do peso de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	19
<b>Tabela 5.</b> Valores médios, em dias, do período de pré-postura de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	20
<b>Tabela 6.</b> Valores médios, em dias, do período de postura de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	21
<b>Tabela 7.</b> Valores médios do período de incubação da postura de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	24
<b>Tabela 8.</b> Valores médios do período de eclosão de larvas provenientes do tratamento de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> com diferentes concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	25
<b>Tabela 9.</b> Valores médios do índice nutricional de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	26
<b>Tabela 10.</b> Valores médios do índice de produção de ovos de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	27

<b>Tabela 11.</b> Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> , mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	27
<b>Tabela 12.</b> Valores médios do percentual de eclosão de larvas oriundas do tratamento de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> em relação aos diferentes tratamentos e mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	28
<b>Tabela 13.</b> Percentual de eclosão de larvas de <i>Boophilus microplus</i> após tratamento de ovos com diferentes concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidos sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	29
<b>Tabela 14.</b> Percentual de eclosão de larvas de <i>Boophilus microplus</i> após tratamento de ovos com diferentes concentrações de conídios de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	33
<b>Tabela 15.</b> Percentual de mortalidade das larvas não alimentadas de <i>Boophilus microplus</i> no 10º dia após o tratamento com as diferentes concentrações de conídios dos fungos entomopatogênicos <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	34
<b>Tabela 16.</b> Percentual de mortalidade das larvas não alimentadas de <i>Boophilus microplus</i> no 15º dia após o tratamento com as diferentes concentrações de conídios dos fungos entomopatogênicos <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	34
<b>Tabela 17.</b> Percentual de mortalidade das larvas não alimentadas de <i>Boophilus microplus</i> no 20º dia após o tratamento com as diferentes concentrações de conídios dos fungos entomopatogênicos <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> mantidas sob temperatura de $27 \pm 1$ °C e umidade relativa = 90%.....	35
<b>Tabela 18.</b> Valores das concentrações letais (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ) dos isolados de <i>Lecanicillium</i> , <i>Isaria</i> e <i>Paecilomyces</i> obtidos através da avaliação do percentual de mortalidade de larvas não alimentadas de <i>Boophilus microplus</i> nos diferentes dias de observação.....	38

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1	O carrapato <i>Boophilus microplus</i> .....	3
2.2	Métodos de Controle Realizados para <i>B. microplus</i> .....	4
2.3	Controle Microbiano – Uma Alternativa para o Controle de Carrapatos.....	4
2.4	<i>Verticillium lecanii</i> – Classificação Atual e sua Utilização no Controle de Artrópodes .....	7
2.5	<i>Paecilomyces</i> sp - Classificação Atual e sua Utilização no Controle de Artrópodes .....	8
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>10</b>
3.1	Localização do Experimento .....	10
3.2	Obtenção e Manutenção dos Isolados Fúngicos .....	10
3.3	Avaliação Morfológica dos Isolados .....	10
3.4	Preparo das Suspensões Fúngicas .....	11
3.5	Viabilidade dos Conídios .....	11
3.6	Delineamento Experimental .....	11
3.7	Obtenção de <i>Boophilus microplus</i> .....	12
3.8	Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> .....	12
3.9	Bioensaio com Ovos de <i>Boophilus microplus</i> .....	14
3.10	Bioensaio com Larvas não Alimentadas de <i>Boophilus microplus</i> .....	14
3.11	Reisolamento dos Entomopatógenos após Bioensaio.....	14
3.12	Análise Estatística e Próbites .....	14
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>15</b>
4.1	Avaliação Morfológica dos Isolados .....	15
4.2	Viabilidade dos Conídios .....	19
4.3	Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> .....	19
4.3.1	Peso médio das fêmeas ingurgitadas .....	19
4.3.2	Período de pré-postura .....	19
4.3.3	Período de postura .....	20
4.3.4	Período de incubação .....	23
4.3.5	Período de eclosão das larvas .....	24
4.3.6	Índice nutricional .....	25
4.3.7	Índice de produção de ovos .....	26
4.3.8	Percentual de eclosão.....	27
4.3.9	Percentual de controle .....	28
4.4	Bioensaio com Ovos de <i>Boophilus microplus</i> .....	29
4.5	Bioensaio com Larvas não Alimentadas de <i>Boophilus microplus</i> .....	33
4.6	Reisolamento dos Entomopatógenos após Bioensaio .....	39
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Boophilus microplus* é conhecido como o carrapato dos bovinos, porém em altas infestações nas pastagens, podem parasitar outros mamíferos como eqüinos, caprinos, ovinos, caninos, o homem (GONZALES, 1975), além de búfalo, gato, coelhos, canguru, porco e onça (PEREIRA, 1980). É um parasito hematófago e encontra-se amplamente distribuído nas regiões de clima tropical e subtropical. As condições de temperatura e umidade existentes em nosso país favorecem a distribuição de *B. microplus* em todo o território nacional.

O efeito do parasitismo sobre bovinos pode determinar a diminuição da produção de leite, do ganho de peso e dos índices de fertilidade, aumento da taxa de mortalidade, principalmente em bezerros, desvalorização do couro e aumento nos custos de produção, gerando grandes prejuízos na pecuária mundial. No Brasil, esses gastos chegam a dois bilhões de dólares por ano.

Na natureza, predadores, parasitóides e patógenos são conhecidos por influenciar o tamanho da população de carrapatos. No Brasil, predadores naturais como a anum, perdiz, aranhas, ratos, formigas, camundongos, gavião pomba, galinha, e galinha d'angola, já foram observados se alimentando de carrapatos. Entretanto, os inimigos naturais não são eficientes para o biocontrole do carrapato pois não possuem especificidade alimentar, e a população de carrapatos é muito ampla, havendo então, pouco potencial para o controle natural do carrapato. Além disso, a fecundidade dos predadores naturais parece estar muito abaixo do nível necessário para responder ao explosivo aumento no número de carrapatos em certas épocas do ano, uma vez que cada fêmea ingurgitada pode produzir cerca de 3000 ovos.

Os carrapatos são controlados principalmente por acaricidas químicos, através de banhos de imersão ou pulverização dos bovinos. No entanto, a utilização inadequada desses produtos propiciou a proliferação da resistência nas populações de carrapatos, além da contaminação dos produtos de origem animal, e do meio ambiente.

O controle biológico está se tornando uma abordagem cada vez mais atrativa para o manejo do carrapato devido ao aumento dos custos com o controle químico, aumento da resistência de carrapatos aos pesticidas e ao aumento da preocupação com segurança ambiental e a saúde humana. O biocontrole tem sido usado amplamente para pragas da agricultura, e até a presente data, poucos esforços estão sendo realizados para introduzir agentes biocontroladores no controle de carrapatos.

Patógenos como a bactéria *Cedecea lapagei*, encontrada principalmente no inverno, são capazes de causar mortalidade em fêmeas ingurgitadas de carrapatos devido à destruição do seu epitélio vaginal (Brum, 1989). As bactérias entomopatogênicas penetram em seus hospedeiros pela via oral, e esse modo de penetração constitui uma desvantagem na sua utilização para o controle microbiano de carrapatos quando comparadas com outros patógenos, como os fungos.

Os fungos entomopatogênicos são conhecidos pela sua especificidade a organismos-alvo sob condições a campo, especialmente durante epizootias, e essa especificidade evidentemente reduz os riscos de organismos não-alvo serem afetados.

Numerosos fungos patogênicos são conhecidos por estarem associados com carrapatos, entre eles *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* (= *Isaria fumosorosea*), *P. farinosus* (= *I. farinosa*) e *Verticillium lecanii* (= *Lecanicillium lecanii*). Esses fungos têm sido isolados de todos os estágios do ciclo evolutivo de carrapatos, incluindo ovos.

Inúmeros trabalhos comprovam experimentalmente a patogenicidade de fungos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* usados no controle microbiano de diferentes



estágios evolutivos de carrapatos. Ambos são os entomopatógenos mais empregados no controle microbiano, talvez devido a sua ampla distribuição geográfica, à variedade de hospedeiros e às ocorrências em condições naturais, enzoóticas ou epizoóticas.

Samish e Rehacek (1999) discutiram o potencial do controle biológico de carrapatos e concluíram que pesticidas biológicos baseados em fungos entomopatogênicos são uma alternativa promissora. Porém, há a necessidade de obtenção e caracterização de mais espécies de fungos patogênicos para ácaros e carrapatos, concomitantemente com o desenvolvimento de micoacaricidas.

Poucos dados experimentais existem sobre o impacto de inimigos naturais do carrapato sob condições a campo, e tais estudos são essenciais para o desenvolvimento de um programa eficiente de biocontrole de carrapatos.

Uma recente mudança na nomenclatura dos gêneros *Verticillium* e *Paecilomyces* foi proposta por alguns autores, baseados em estudos moleculares. O gênero *Lecanicillium* W. Gams & Zare (GAMS; ZARE, 2001) foi criado para acomodar anamorfos de *Verticillium* fungícolas e entomógenos de Clavicipitaceae anteriormente classificados como *Verticillium* seção *Prostrata*. *Lecanicillium* foi separado de *Verticillium* baseado em dados moleculares, morfológicos e ecológicos (ZARE et al., 2000; ZARE; GAMS, 2001).

Luangsa-Ard et al. (2005) analisaram as relações filogenéticas de 37 espécies de *Paecilomyces* seção *Isarioidea*. Nesse estudo, os autores reconheceram um grupo monofilético de espécies que foi então designado como a clade *Isaria*, na qual se encontram as espécies *P. farinosus*, *P. fumosoroseus*, entre outras. As espécies de *Paecilomyces* remanescentes formalmente localizadas na seção *Isarioidea* (incluindo *P. lilacinus*), necessitam ser mais bem estudadas e, portanto, permanecem no gênero *Paecilomyces*.

Os gêneros *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* são muito utilizados para o controle de pragas na agricultura, e as espécies *L. lecanii*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *P. lilacinus* foram escolhidas para a execução do bioensaio com carrapatos, uma vez que não há trabalhos citados na literatura.

O presente trabalho integra a linha de pesquisa Controle Microbiano de Artrópodes de Importância desenvolvido na UFRRJ, e teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* dos entomopatógenos *P. lilacinus*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *L. lecanii* sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, sugerindo novas espécies fúngicas como entomopatógenos no controle microbiano do carrapato *B. microplus*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O Carrapato *Boophilus microplus*

*Boophilus microplus* é um carrapato pertencente à família Ixodidae, superfamília Ixodoidea, subordem Acari, ordem Ixodida, classe Arachnida e ao filo Arthropoda. É originário do continente asiático e foi introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais pela importação do gado bovino (WHARTON, 1974). Encontra-se amplamente distribuído nos rebanhos bovinos da América Central, América do Sul, Este e Sul da África, Austrália, Oriente e sul da Flórida, na faixa compreendida entre os paralelos 32° Norte (sul dos EUA) e 32° Sul (próximo à cidade de Rio Grande, RS) (GONZÁLES, 2002).

É parasita de um único hospedeiro (homoxeno) e apresenta o ciclo evolutivo dividido em duas fases: fase de vida livre e fase de vida parasitária. A fase de vida livre ocorre no solo, e se inicia quando a fêmea ingurgitada se desprende do hospedeiro, cai ao solo, começando então, o período de pré-postura, que dura em média de dois a três dias. Posteriormente, há a fase de ovopostura, que pode variar de 17 a mais de 90 dias, seguida pela fase de eclosão das larvas, que varia de cinco a dez dias, podendo durar mais de 100 dias. Um período de quatro a 20 dias é necessário para que as larvas tornem-se infestantes. Em condições ótimas de temperatura e umidade, o ciclo de vida livre pode durar 28 dias (GONZÁLES, 1974). Segundo Gonzáles (1975), a fase de vida livre sofre variações em decorrência das alterações da temperatura e umidade, porém a fase de vida parasitária é praticamente constante em todas as regiões.

A fase de vida parasitária inicia-se com a fixação da larva infestante no hospedeiro, seguida pela sua alimentação, troca de cutícula, fase adulta, acasalamento, ingurgitamento e queda das fêmeas. Esse período dura, em média, de 18 a 26 dias no Brasil-Central (FURLONG, 1993).

Recentes estudos moleculares e morfológicos realizados com os gêneros *Rhipicephalus* Koch, 1844 e *Boophilus* Curtice, 1891 sugerem uma mudança na nomenclatura de *B. microplus* fundamentada na filogenia de ambos os gêneros. De acordo com Murrell e Barker (2003), as cinco espécies de *Boophilus* tornam-se membros de *Rhipicephalus* (*Boophilus*), ou seja, *Boophilus* é mantido como um subgênero de *Rhipicephalus*, o que torna *R. (B.) microplus* sinonímia de *B. microplus*.

O impacto econômico das principais ectoparasitoses no Brasil foi estimado por Grisi et al. (2002) em 2,650 bilhões de dólares/ano, sendo o carrapato *B. microplus* responsável por 2 bilhões de dólares. Os prejuízos econômicos são decorrentes da ação espoliativa sobre o hospedeiro, da predisposição ao aparecimento de miíases, da desvalorização do couro, do retardo no desenvolvimento dos animais, diminuição da produção, excessivos gastos com mão-de-obra e carrapaticidas e pela transmissão de patógenos causadores de doenças como anaplasmose e babesiose (HORN; ARTECHE, 1985).

A babesiose é uma doença de alta morbidade em bovinos e é descrita como a principal parasitose de eqüinos devido aos danos diretos e indiretos causados à sanidade animal, como mortalidade, impedimento para comercialização e impossibilidade de exportação (FRIEDHOFF, 1990), além da diminuição do desempenho dos animais nas atividades esportivas e funcionais nos trabalhos de campo (IBANÉZ et al., 1979). Guimarães et al. (1998) sugeriram que *B. microplus* desempenhasse o papel de vetor de *Babesia equi* em eqüinos, e Heuchert et al. (1999), mostraram altas prevalências de *B. equi* em eqüinos criados em associação com bovinos.

## 2.2. Métodos de Controle Realizados para *Boophilus microplus*

O controle da fase parasitária de *B. microplus* é feito basicamente por aplicação de carrapaticidas no rebanho. Contudo, os frequentes tratamentos com produtos químicos e o manejo inadequado tem conduzido o desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes. Segundo Wharton (1967), as cepas resistentes aos acaricidas se desenvolvem por seleção e recombinações de genes resistentes em populações de carrapatos expostas a pressão de seleção por carrapaticidas.

Uma redução na população de carrapatos no rebanho pode ser alcançada melhorando a eficácia no seu controle através da seleção e aplicação correta do carrapaticida, e utilizando o sistema estratégico de controle associado a outras práticas de manejo (FURLONG et al., 2004).

Outras medidas relacionadas com o controle da fase parasitária são pesquisas sobre resistência do hospedeiro e desenvolvimento de vacinas. As vacinas contra *B. microplus* são baseadas no antígeno recombinante Bm86 e Willadsen et al., (1995) afirmam que são capazes de reduzir o número de fêmeas ingurgitadas, seu peso e sua capacidade reprodutiva, significando que o efeito positivo da vacina é caracterizado com a redução da infestação de larvas em uma geração subsequente.

Na tentativa de controlar a fase não parasitária, Thompsom et al. (1978) e Sutherst et al. (1982) estudaram a ação de forrageiras sobre larvas de carrapatos, e demonstraram a existência de repelência e/ou letalidade em algumas espécies de gramíneas e leguminosas, respectivamente. As espécies de gramíneas forrageiras estudadas por Barros e Evans (1989) apresentaram elevado poder letal devido à retenção mecânica de larvas nas pilosidades e/ou secreções.

De acordo com Penna, (1990), outros métodos para controlar a população de carrapatos seriam a rotação de pastagens, o controle biológico, a criação de raças de animais resistentes aos carrapatos, introdução de machos estéreis na população e atividades como a queimada. Todavia, nem todos esses métodos são eficientes ou mesmo indicados.

A utilização exclusiva dos carrapaticidas é cada dia menos viável em termos práticos e econômicos, tornando-se necessária a adição de métodos alternativos a serem empregados em sistemas de controle integrado (BARROS; EVANS, 1989).

## 2.3. Controle Microbiano – uma Alternativa para o Controle de Carrapatos

A primeira classificação de um entomopatógeno foi feita por Réaumur em 1726, que identificou um fungo atacando um lepidóptero como sendo do gênero *Cordyceps*. Porém há referências antigas de chineses e egípcios relatando doenças apresentadas pelo bicho-da-seda (2700 anos a.c.) e pelas abelhas (2200 anos a.c.), respectivamente. Em 1835, Agostino Bassi, considerado o pai da patologia de insetos, foi o primeiro pesquisador a provar a natureza infecciosa de um agente microbiano para um animal quando comprovou que o fungo *Beauveria bassiana* era o causador de uma doença no bicho-da-seda, chamada “muscardine branca”. Desde então, muitos trabalhos foram desenvolvidos e muitos conceitos básicos da patologia de insetos foram bem definidos.

No Brasil, o estudo da patologia de insetos e o desenvolvimento do controle microbiano iniciaram-se há cerca de 80 anos, com algumas referências de patógenos atacando insetos. Dentre eles, podemos citar: Hambleton (1937), que relatou a ocorrência de *Botrytis* sp (*B. bassiana*) e *Verticillium* sp. sobre a broca-do-algodoeiro e Viègas (1939), que mencionou aspectos interessantes relacionados a *V. lecanii* infectando *Coccus viridis* e *Empusa dysderci* infectando *Dysdercus* sp. Contudo, somente depois de 1964, com a ocorrência epizootica de

*Metarhizium anisopliae* sobre as cigarrinhas da cana-de-açúcar, que os fungos receberam maior atenção dos pesquisadores (ALVES, 1998).

Atualmente, é crescente o número de trabalhos publicados por pesquisadores na área de controle microbiano de carrapatos envolvendo fungos, vírus, bactérias, protozoários e nematóides (SAMISH; REHACED, 1999). Esses autores revisaram mais de 100 espécies de patógenos e aproximadamente 150 predadores associados com carrapatos, o que representa um amplo arsenal para seleção de espécies com potencial uso como agentes de biocontrole.

Alves (1998) cita inúmeras vantagens da utilização de patógenos como fungos, vírus e bactérias quando comparados aos produtos químicos de amplo espectro: especificidade/seletividade dos entomopatógenos, evitando desequilíbrios biológicos de importância no ecossistema; controle mais duradouro quando a doença estabelecida pelo patógeno assume um caráter enzoótico; controle associado com produtos químicos seletivos visando à ação sinérgica e conseqüentemente um controle mais rápido e eficaz da praga; além de causarem a mortalidade direta, os patógenos podem afetar as gerações seguintes dos artrópodes tratados, diminuindo a oviposição, viabilidade dos ovos e aumentando a sensibilidade a outros agentes biológicos; os patógenos não poluem o ambiente, não são tóxicos para o homem e outros animais, desde que selecionados e manuseados corretamente.

Os fungos foram os primeiros patógenos a serem utilizados no controle microbiano. A maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos ocorre no Brasil, e em condições naturais, tanto enzoótica quanto epizootica, sua ocorrência é um fator importante na redução das populações de pragas. A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma de suas principais vantagens no controle microbiano de artrópodes, pois o uso da ferramenta da biologia molecular permite selecionar isolados altamente virulentos, específicos ou não, para o controle de um grande número de pragas (ALVES, 1998).

O mecanismo de penetração de fungos entomopatogênicos foi descrito por Madelin et al. (1967), que relataram a penetração via tegumento através de processos químicos como digestão enzimática e processo físico por pressão mecânica. Essa via de penetração foi comprovada por Bittencourt et al. (1995), uma vez que não evidenciaram, através de técnicas histológicas, a infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* nas cavidades naturais do carrapato *B. microplus*.

Em 1999, Bittencourt et al. descreveram pela primeira vez o mecanismo de infecção do isolado 959 de *M. anisopliae* em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, no qual foi observada a fixação dos conídios na cutícula do carrapato, germinação do conídio, formação do tubo germinativo a partir de conídios germinados, e início da dilatação da extremidade deste tubo, formando o apressório. Chandler et al. (2000) descreveram que após a fixação e penetração dos conídios, o fungo se multiplica na hemocele e tecidos moles do hospedeiro, e a morte do mesmo ocorre em um período de três a 10 dias em função da perda de água, privação de nutrientes, danos mecânicos e ação de toxinas. Sob condições favoráveis, o fungo esporula extensivamente sobre o cadáver do hospedeiro para facilitar novas infecções na população de hospedeiros e assim continuar o ciclo da doença.

Cerca de 750 espécies de fungos agrupados em 56 gêneros são conhecidos por serem patógenos ou parasitos de artrópodes (HAWKSWORTH et al., 1995). A maioria dos fungos patogênicos de artrópodes estudados mundialmente pertence a quatro gêneros: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticillium* (= *Lecanicillium*), e *Paecilomyces*. As espécies *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *V. lecanii* (= *L. lecanii*), *P. farinosus* (= *I. farinosa*) e *P. fumosoroseus* (= *I. fumosorosea*) são patogênicas tanto para insetos quanto para ácaros e carrapatos (CHANDLER et al., 2000).

*Beauveria bassiana* já foi encontrada promovendo infecções naturais em *Hyalomma anatolicum* e *Ixodes ricinus* (SAMSINAKOVA, 1957). Outras espécies de fungos

entomopatogênicos foram encontradas causando infecções em carrapatos das famílias Ixodidae e Argasidae, em países de clima temperado (LIPA, 1971).

*Beauveria*, *Metarhizium*, e *Paecilomyces* mostram adaptações ao solo, possuindo uma ampla variedade de hospedeiros na classe Insecta, ocupando amplamente nichos tróficos similares. *V. lecanii* está comumente associado com a superfície do solo e habitats aerados. Todos esses fungos têm distribuição mundial e podem ser cultivados facilmente em grandes quantidades

Os micopesticidas têm demonstrado ser eficientes contra uma variedade de pragas, particularmente quando o uso de pesticidas químicos é inapropriado devido ao desenvolvimento de resistência ou em função dos danos causados ao ambiente (CHANDLER et al., 2000). Como exemplo, pode-se incluir o uso de *V. lecanii* contra pulgões e moscas brancas (QUINLAN, 1988), *Metarhizium* spp. contra baratas, gafanhotos e cupins (HARMON, 1994; BATEMAN, 1997; MILNER et al., 1998) e *B. brongniartii* utilizada para o controle do besouro *Melolontha melolontha* (KELLER, 1992).

Gindin et al. (2001) afirmam que uma cepa de um fungo que é altamente patogênica para uma espécie de carrapato, frequentemente é patogênica para outras espécies, uma vez que cepas de *M. anisopliae* foram altamente virulentas para a maioria dos estágios de desenvolvimento de três diferentes gêneros de carrapatos ixodídeos sob condições de laboratório.

Bittencourt et al. (1996) evidenciaram elevada capacidade carrapaticida dos isolados 986 e 747 de *B. bassiana* quando verificaram sua patogenicidade *in vitro* sobre ovos e larvas não alimentadas de *B. microplus*, observando uma elevada redução do percentual de eclosão e uma maior mortalidade das larvas nos grupos tratados.

Infecção artificial de *M. anisopliae* sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* promoveu alterações significativas nos parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas, alteração na viabilidade dos ovos tratados e elevada mortalidade das larvas a infecção causada pelo fungo (BITTENCOURT, 1992).

A mortalidade de ninfas alimentadas e não alimentadas e de adultos de *Amblyomma cajennense* foi demonstrada por Reis et al. (2001) ao utilizarem diferentes isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em testes *in vitro*, sugerindo que os isolados testados são capazes de controlar os estágios avaliados de *A. cajennense*.

Alves et al. (1998) afirmam que pode haver sinergismo entre produtos químicos e biológicos, resultando no aumento da eficácia do tratamento de alguns artrópodes resistentes ou menos susceptíveis aos produtos químicos. Esse efeito sinérgico foi comprovado pela compatibilidade entre os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* e o piretróide sintético quando associados para o tratamento de larvas de *B. microplus* deltametrina-resistente (BAHIENSE, 2003). Outros trabalhos mostram o sinergismo entre várias classes de acaricidas e fungos entomopatogênicos, (CLARK et al., 1982; KAAYA et al., 1996; KAAYA; HASSAN, 2000; LECUONA et al., 2001), tornando possível a utilização de ambos os métodos para o controle do carrapato.

Recentes avanços na tecnologia de formulação de entomopatógenos têm mostrado que é possível o uso de micopesticidas em ambientes onde a umidade era considerada um fator limitante (MILNER, 1997). Kaaya e Hassan (2000) demonstraram a eficiência da formulação oleosa de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre *B. decoloratus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, e *Amblyomma variegatum*. Esses mesmos autores afirmam que o impacto desses fungos sobre as populações de *B. decoloratus* é grande, quando a mortalidade dos carrapatos e a redução na viabilidade dos ovos são consideradas, fato esse que garante que fungos entomopatogênicos podem ser utilizados como substitutos ou de forma integrada no controle dessa espécie de carrapato, atenuando assim, o problema da resistência.

A necessidade de métodos não-químicos para controlar pestes como ácaros e carrapatos tende a aumentar no futuro, devido à preocupação acerca da segurança e sustentabilidade dos pesticidas químicos de pesticidas químicos (CHANDLER et al., 2000).

Muitos estudos sobre fungos entomopatogênicos e desenvolvimento de produtos formulados a base desses fungos são realizados para controle de pragas da agricultura. Gindin et al. (2001) afirmam que a concentração necessária para causar alta mortalidade de carrapatos é similar a que é usada comercialmente contra insetos, aumentando assim, a possibilidade de desenvolvimento de um carrapaticida a base de fungos entomopatogênicos. Porém, os agentes de controle biológico que afetam os ixodídeos e sua ação patogênica ainda são pouco estudados.

Maiores informações sobre as doenças que afetam os carrapatos, sua susceptibilidade aos entomopatógenos e o funcionamento do seu sistema imune são necessárias para a aplicação eficaz do controle biológico (MONTEIRO et al., 2003).

#### **2.4. *Verticillium lecanii* – Classificação Atual e sua Utilização no Controle de Artrópodes**

O gênero anamorfo *Verticillium* é extremamente heterogêneo, compreendendo membros de Phyllachorales e Hypocreales, particularmente Clavicipitaceae. *Verticillium* seção *Prostrata* W. Gams (1971) compreende fungos saprofíticos e parasitos, que podem atacar insetos e outros artrópodes, nematóides e invertebrados, além de vários fungos (ZARE et al., 2001).

Em função das inúmeras diferenças biológicas entre espécies associadas a plantas e patogênicas para insetos e nematóides, bem como das evidências moleculares, bioquímicas e fisiológicas, uma subdivisão de *Verticillium* tem sido proposta por diversos autores (JACKSON; HEALE, 1985; KOUVELIS et al., 1999; ZARE et al., 1999; ZARE et al., 2000).

Zare et al. (2000) usando análise filogenética de seqüências do ITS, sugeriram no mínimo quatro clades distintas, sendo os taxon entomógenos e fungícolas considerados na clade B. A nitidez dessas clades foi confirmada por Sung et al. (2001), baseadas em análises de seqüências de DNA nuclear LSU e SSU de um extenso arranjo de taxon. A maior parte das espécies formalmente classificadas como *Verticillium* seção *Prostrata* foram transferidas para o gênero *Lecanicillium* e quatro delas, distantes da clade de *Lecanicillium*, foram classificadas como um novo gênero: *Simplicillium* (ZARE; GAMS, 2001).

Zare e Gams (2001) descreveram uma chave para identificação das espécies de *Lecanicillium* e *Verticillium*, baseada nas características morfológicas dos conídios e das fiáldes das espécies estudadas.

Fundamentado em análises moleculares, o isolado CG 420 de *V. lecanii* utilizado no experimento, foi agrupado no gênero *Lecanicillium*, logo sua atual classificação é *L. lecanii* (GAMS; ZARE, 2001).

*Lecanicillium lecanii* é um patógeno que ocorre frequentemente sobre pulgões e cochonilhas nas regiões tropicais e neotropicais. Já foi relatado sobre insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, sobre ácaros eriofídeos, adultos de *Encarsia formosa*, parasitóide de moscas brancas (EKBON, 1979) e sobre o carrapato *Ixodes ricinus* (KALSBECK et al., 1995).

Balazy et al., (1987) isolaram 24 espécies de fungos infectando ácaros mesostigmatas coletados do solo, de ninhos de pássaros e formigueiros. Entre essas espécies, somente *B. bassiana*, *P. farinosus* (= *Isaria farinosa*) e *V. lecanii* (= *L. lecanii*) têm sido estudadas como agentes de biocontrole. Samsinakova et al. (1974) observaram infecções naturais de 17 espécies de fungos sobre os carrapatos *I. ricinus*, *Dermacentor marginatus* e *D. reticulatus*. Dentre elas, foram identificadas *Aspergillus parasiticus*, *B. bassiana*, *V. lecanii* (= *L. lecanii*)

e *P. fumosoroseus* (= *I. fumosorosea*), responsáveis por causar mortalidade de 57% de fêmeas ingurgitadas de *I. ricinus*.

Testes de patogenicidade *in vitro* realizados com *V. lecanii* (= *L. lecanii*), *P. fumosoroseus* (*I. fumosorosea*), *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre diferentes estágios do ciclo de *R. sanguineus*, *Hyalomma excavatum* e *B. annulatus* mostraram que todos os fungos testados foram capazes de causar alta mortalidade, redução da fecundidade das fêmeas ingurgitadas tratadas e redução da viabilidade dos ovos dos carrapatos (GINDIN et al., 2001).

## 2.5. *Paecilomyces* sp - Classificação Atual e sua Utilização no Controle de Artrópodes

O gênero *Paecilomyces* foi identificado por Bainier (1907), que descreveu sua estreita relação com *Penicillium*, diferindo na ausência de colônias com coloração verde e pelas fiálides cilíndricas curtas. Anteriormente, espécies similares foram agrupadas no gênero *Spicaria* Hartin (1846). Hughes (1951) e Brown e Smith (1957) (*apud* SAMSON, 1974) sugeriram que o nome *Spicaria* fosse esquecido, e transferiram várias espécies para *Paecilomyces*. Esses últimos autores reconheceram a ocorrência de estruturas conidiogênicas similares na espécie tipo *Paecilomyces variotii* e em algumas espécies descritas em *Isaria* e *Spicaria*, e as transferiram para *Paecilomyces*. Uma dessas espécies é *I. farinosa*, que foi considerada por Clements e Shear (1931), Mains (1955) e Morris (1963) como o lectótipo do gênero *Isaria* (*apud* SAMSON, 1974). Essa escolha poderia indicar que, devido à prioridade, *Isaria* deveria ser usada para todas as espécies de *Paecilomyces*.

Samson (1974) reconheceu espécies mesofílicas anteriormente localizadas em *Isaria* ou *Spicaria* e a maior parte das espécies associadas a insetos como uma distinta seção *Isarioidea* dentro do gênero. As espécies descritas nesta seção apresentam fiálides com “pescoços” distintos, conídios catenulados e conidióforos verticilados.

Hodge et al. (2005) discutiram a nomenclatura e a história do gênero *Isaria*, e Gams et al. (2005) propuseram conservar o nome *Isaria*. Recentes estudos com análise de seqüências de  $\beta$ -tubulina parcial de 34 cepas de *Paecilomyces* e seqüências de DNAr ITS1-5.8S-ITS2 de 37 cepas mostraram que a seção *Isarioidea* não é monofilética e que não há um grupo monofilético para todas as espécies associadas a invertebrados. No entanto, uma clade foi criada, a qual inclui espécies de entomopatógenos previamente considerados como pertencentes ao gênero *Isaria* (Luangsa-Ard et al., 2005).

As espécies *P. amoeneroseus*, *P. cateniannulatus*, *P. cateniobliquus*, *P. cicadae*, *P. coleopterorus*, *P. farinosus*, *P. ghanensis*, *P. fumosoroseus*, *P. javanicus* e *P. tenuipes*, analisadas por Luangsa-Ard (2005), foram reclassificadas como *Isaria* e suas nomenclaturas foram modificadas. As espécies foram renomeadas como *I. amoenerosea*, *I. cateniannulata*, *I. cateniobliqua*, *I. cicadae*, *I. coleoptera*, *I. farinosa*, *I. ghanensis*, *I. fumosorosea*, *I. javanica* e *I. tenuipes*, respectivamente.

*Paecilomyces suffultus*, *P. marquandii*, *P. cinnamomeus*, *P. viridis*, *P. niphedodes*, *P. sulphurellus*, *P. puntonii*, *P. inflatus*, *P. carneus*, *P. penicillatus* e *P. lilacinus* são espécies remanescentes de *Paecilomyces* formalmente colocadas na seção *Isarioidea* e que necessitam de maiores estudos para determinar sua verdadeira relação entre essas espécies e entre os outros anamorfos de Clavicipitacea. Portanto, permanecem no gênero *Paecilomyces* (Luangsa-Ard et al., 2005).

O antigo gênero *Paecilomyces* reunia diversas espécies entomopatogênicas, sendo as mais freqüentes *P. farinosus* (= *I. farinosa*), *P. tenuipes*, *P. amoeneroseus*, *P. cicadidae* e *P. fumosoroseus* (*I. fumosorosea*) observadas sobre lepidópteros, coleópteros, homópteros e ortópteros (ALVES, 1998). Este gênero causa o chamado “muscardine amarelo” em insetos e podem provocar epizootia em populações de lagartas do gênero *Brassolis* no Sudeste do Brasil, e algumas espécies podem atacar nematóides de plantas (ALVES, 1998).

*Paecilomyces lilacinus* tem sido isolado frequentemente de diferentes hospedeiros ou substratos oriundos de várias localidades (FARIA; TIGANO, 1996; SOSA-GOMEZ, 2002), apresenta distribuição cosmopolita e maior frequência em solos agricultáveis (DUNN et al., 1982). É um fungo habitante do solo, capaz de parasitar ovos de nematóides, juvenis e fêmeas, e reduzir a população de nematóides parasitos de plantas (CABANILLAS et al., 1989).

Caracteriza-se por penetrar nos ovos de nematóides, destruindo o embrião, podendo exercer forte pressão na capacidade reprodutiva das fêmeas que são colonizadas e posteriormente mortas (DUNN et al., 1982). Sua capacidade em controlar nematóides foi observada em diferentes culturas agrícolas (JATALA et al., 1979; SCHENCK et al., 2004; SANTIAGO et al., 2006).

*Isaria fumosorosea* tem sido isolada de uma ampla variedade de hospedeiros (em mais de 25 famílias) e demonstrou ser patogênica para a mosca branca do tomate *Bemisia tabaci* (OSBORNE et al., 1990). É resistente a vários pesticidas comumente usados no controle de pragas em casas-de-vegetação, característica favorável para sua utilização no Manejo Integrado de Pragas. Atualmente, já existe no mercado micopesticidas para o controle da mosca branca utilizando o fungo *I. fumosorosea* (LACEY et al., 2001).

*Isaria farinosa* é cosmopolita, encontrada nas áreas tropicais parasitando vários insetos das ordens: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera e Homoptera (SAMSON, 1974; DOMSCH et al., 1980; ALVES, 1998). Devido à diversidade de hospedeiros, é considerada um agente promissor no controle biológico de inseto-pragas, sendo sua patogenicidade *in vitro* comprovada contra o besouro *Scolytus scolytus* (DOBERSKI, 1981), larvas de *Cephalgia abietis* (PRENEROVÁ, 1994), a mosca *Bemisia argentifolii* (WRAIGHT et al., 1998), a formiga cortadeira *Atta sexdens sexdens* (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005) e diferentes estágios de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) (STEENBERG et al., 2001; ANGEL-SAHAGÚN et al., 2005). Porém, poucos estudos demonstram o potencial patogênico de *Isaria* sp. sobre carrapatos (POLAR et al., 2005; GINDIN et al., 2001; GINDIN et al., 2002).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Localização do Experimento

A manutenção dos isolados e os bioensaios *in vitro* para avaliar o efeito dos fungos *P. lilacinus*, *I. fumosorosea*, *I. farinosa* e *L. lecanii* sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado em Seropédica<sup>1</sup> - RJ, no período entre setembro e novembro de 2005.

#### 3.2. Obtenção e Manutenção dos Isolados Fúngicos

Foram utilizados os isolados de *P. lilacinus*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *L. lecanii*, cedidos pelo CENARGEN / EMBRAPA ao Laboratório de Controle Microbiano. A origem dos isolados fúngicos e seus hospedeiros / substrato estão relatados na tabela 1.

**Tabela 1.** Isolados de fungos entomopatogênicos, suas respectivas espécies, seus hospedeiros ou substratos, sua origem e ano de recebimento da cultura no Cenargen.

<u>Isolados fúngicos agrupados por hospedeiro</u>				
Isolado*	Espécie	Hospedeiro / substrato	Origem	Ano
CG 36	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	(Homoptera: Cercopidae)	Brasília – DF, Brasil	1992
CG 198	<i>Isaria farinosa</i>	(Diptera: Culicidae)	Califórnia, EUA	1985
CG 202	<i>I. fumosorosea</i>	(Diptera: Muscidae)	Brittany, França	1990
CG 420	<i>Lecanicillium lecanii</i>	solo	Aracaju – SE, Brasil	1992

\* CG = Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN / EMBRAPA, Brasil.

Esses isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata - dextrose - ágar), e incubadas em câmara climatizada sob temperatura de  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$  por 15 dias. Decorrido esse período, as placas foram armazenadas em um refrigerador sob temperatura de 5°C.

#### 3.3. Avaliação Morfológica dos Isolados

Os isolados fúngicos foram repicados em meio de cultura extrato de malte e mantidos em câmara climatizada sob condições ideais de temperatura e umidade descritas acima, segundo Samson (1974). Após 14 dias, foi realizada descrição das características macroscópicas da colônia de cada isolado: mensuração do diâmetro da colônia, aspecto e coloração das massas conidiais e reverso.

A avaliação das características microscópicas foi realizada através da utilização da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula (RIVALIER; SEYDEL, 1932) utilizando

<sup>1</sup> Entre os paralelos 22°49' e 22°45' de latitude sul, e os meridianos 43°38' e 43°42' de longitude oeste de Greenwich, com altitude de 33 metros e clima do tipo subtropical.

meio de cultura extrato de malte. As placas com as culturas foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura e umidade durante 14 dias. Decorrido esse período, foram confeccionadas lâminas temporárias coradas com Lactofenol de Amman com azul de algodão (HAWKSWORTH, 1977).

### **3.4. Preparo das Suspensões Fúngicas**

As suspensões fúngicas foram preparadas a partir do cultivo dos isolados dos fungos em placas de Petri contendo meio de cultura extrato de malte. A superfície das colônias foi raspada com auxílio de um cabo e lâmina de bisturi para retirada dos conídios, que foram adicionados a 30ml de água destilada estéril e espalhante adesivo Tween 80 a 0,1% (LUZ et al., 1998). A suspensão conidial foi homogeneizada e filtrada em gaze estéril. Uma amostra da suspensão foi colocada em Câmara de Neubauer e examinada sob microscópio óptico para a quantificação dos conídios.

As concentrações  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de cada isolado foram preparadas através de diluição seriada. Dessa forma, 2 ml da concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  era adicionado a 18 ml de água destilada estéril + Tween 80 a 0,1% e homogeneizados, resultando na concentração  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . A mesma metodologia foi usada para o preparo das demais concentrações.

### **3.5. Viabilidade dos Conídios**

Após o preparo das suspensões conidiais, uma alíquota de  $10\mu\text{L}$  da suspensão  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de cada isolado do entomopatógeno foi transferida para placas de Petri contendo BDA e antibiótico (500 mg de Cloranfenicol : 1 L meio de cultura). As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$ . Após 24 horas, foi efetuada a leitura, através da visualização direta ao microscópio. Procedeu-se o cálculo de germinação, obtido através da divisão do número de conídios germinados pelo total de conídios contados. Esse resultado foi multiplicado por 100 (ALVES, 1998).

### **3.6. Delineamento Experimental**

O tratamento para as diferentes fases do desenvolvimento de *B. microplus* foi formado pelo grupo controle e por quatro diferentes concentrações ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ). O grupo controle foi tratado com uma solução de água destilada estéril e Tween 80 a 0,1%.

Cada tratamento foi constituído por dez repetições. As suspensões fúngicas utilizadas no tratamento variaram sua concentração de acordo com o isolado do entomopatógeno utilizado e com a fase do desenvolvimento de *B. microplus* testada. A tabela 2 mostra as concentrações  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  dos isolados de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* utilizados para o tratamento. As demais concentrações utilizadas no bioensaio foram preparadas a partir dessa concentração, como explicado no item anterior.

**Tabela 2.** Concentrações de conídios de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* utilizadas para o tratamento de fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas não alimentadas de *Boophilus microplus*.

	Fêmeas ingurgitadas	Ovos	Larvas não alimentadas
<i>P. lilacinus</i>	2,75 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>	2,70 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>	2,80 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>
<i>I. farinosa</i>	2,14 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>	2,80 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>	2,07 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>
<i>I. fumosorosea</i>	2,07 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>	3,62 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>	1,04 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>
<i>L. lecanii</i>	2,22 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>	1,75 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>	2,50 x 10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>

### 3.7. Obtenção de *Boophilus microplus*

Para obtenção do carrapato *B. microplus*, dois bezerros, alojados em baias na Estação Experimental, foram infestados artificialmente com larvas provenientes de 300mg de ovos durante três dias consecutivos. Decorridos vinte e um dias, as fêmeas ingurgitadas foram coletadas do piso das baias e levadas ao Laboratório de Controle Microbiano para assepsia da cutícula, sendo então, submetidas à imersão com solução de hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos, e posteriormente, secas em papel toalha. Uma amostra dessas fêmeas ingurgitadas foi submetida ao tratamento proposto, enquanto que a outra, foi mantida em placas de Petri em câmara climatizada sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa ≥90% para obtenção de ovos e larvas.

### 3.8. Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas de *Boophilus microplus*

As fêmeas ingurgitadas da amostra destinada ao tratamento foram pesadas individualmente e divididas em dez classes. O número de classes foi calculado através da fórmula de Yule (SAMPAIO, 2002), em função do número de observações (n), permitindo, com isso, o cálculo do intervalo de classe (IC), obtido pelas fórmulas seguintes:

$$\text{Número ideal de classes} = 2,5 \sqrt[4]{n}$$

$$\text{IC} = \frac{\text{Amplitude dos valores obtidos na amostra}}{\text{Número ideal de classes}}$$

A amplitude observada na amostra é a diferença entre os valores máximo e mínimo observados.

O intervalo de classe utilizado foi de 8 mg sendo o valor mínimo para o peso das fêmeas 200 mg e o valor máximo para a mesma variável 280 mg. Uma fêmea de cada classe foi escolhida aleatoriamente para formar um grupo tratamento. Após formação dos grupos, procedeu-se a pesagem individual das fêmeas, seguida pela sua identificação e seu respectivo tratamento.

As fêmeas ingurgitadas foram colocadas individualmente em tubos de ensaio, e tratadas com um ml da concentração fúngica, ficando submersas por três minutos. As fêmeas do grupo controle foram submersas por três minutos em um ml de água destilada estéril + Tween 80 0,1%. Após o tratamento, as fêmeas ingurgitadas, devidamente identificadas, foram

fixadas em decúbito dorsal, em placas de Petri, com auxílio de fita dupla face, e mantidas em câmara climatizada sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 90\%$ . Diariamente, a postura de cada fêmea foi coletada, pesada e armazenada em pequenos frascos de vidro, vedados com uma rolha de algodão hidrófilo, identificados e mantidos em câmara climatizada para a avaliação diária do percentual de eclosão das larvas.

Para avaliação dos efeitos dos fungos sobre fêmeas ingurgitadas, foram observados os seguintes parâmetros biológicos:

**Peso inicial da fêmea**, valor obtido da pesagem individual das fêmeas ingurgitadas, em balança analítica, antes do tratamento.

**Período de pré-postura**, número de dias compreendido entre a data da coleta da fêmea até o início da postura.

**Peso da postura**, obtido do somatório das pesagens parciais diárias da postura. A separação e pesagem diária dos ovos ocorreram do primeiro dia da postura até a observação da última postura.

**Período de postura**, número de dias compreendido entre a data do início e o fim da postura.

**Período de incubação**, número de dias compreendido entre a data do início da postura e o início da eclosão das larvas.

**Período de eclosão**, número de dias compreendido entre as datas do início e fim da eclosão.

**Percentual de eclosão das larvas**, obtido por avaliação visual da quantidade de larvas eclodidas em relação à massa total de ovos.

**Peso da quenógina**, obtido da pesagem individual das fêmeas três dias após a observação da última postura.

**Cálculo do Índice de Produção de ovos (IPO)**, realizado segundo Bennett (1974), e obtido através da equação:

$$\text{IPO} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial da fêmea ingurgitada (g)}} \times 100$$

**Cálculo do Índice Nutricional (IN)**, realizado segundo Bennett (1974), e obtido pela equação:

$$\text{IN} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso da teleógina (g)} - \text{peso da quenógina (g)}} \times 100$$

**Cálculo do Percentual de controle**, realizado segundo Drummond *et al.* (1971) e obtido pela equação:

$$\text{Percentual de controle} = \frac{\text{média RE (controle)} - \text{média RE (tratado)}}{\text{média RE (controle)}} \times 100,$$

onde o cálculo de reprodução estimada (RE) foi realizado segundo Drummond *et al.* (1971) e obtido pela equação:

$$\text{RE} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso da teleógina (g)}} \times \% \text{ eclosão larvas} \times 20000$$

### **3.9. Bioensaio com Ovos de *Boophilus microplus***

As fêmeas ingurgitadas destinadas à produção de ovos tiveram sua postura separada no 10º dia. Os ovos foram separados em alíquotas de 50 mg e acondicionados em tubos de ensaio vedados com uma rolha de algodão hidrófilo. Cada tubo de ensaio recebeu um ml de cada concentração conidial testada e o grupo controle positivo recebeu um ml de água destilada estéril + Tween 80 0,1%. Os ovos ficaram submersos na suspensão por três minutos. Decorrido esse período, os tubos de ensaio foram invertidos, para que o excesso da suspensão fosse absorvido pelo algodão, e mantidos em câmara climatizada.

Como parâmetro de avaliação, foi observado diariamente o período de eclosão, o período de incubação e o percentual de eclosão das larvas.

### **3.10. Bioensaio com Larvas não Alimentadas de *Boophilus microplus***

Tubos de ensaio contendo alíquotas de 50 mg de ovos de *B. microplus* foram mantidos em câmara climatizada em condições ideais de temperatura e umidade, já descritas, até a completa eclosão das larvas. Os tubos de ensaio que não apresentaram eclosão próxima de 100% foram excluídos do tratamento. A metodologia utilizada para o tratamento foi semelhante à descrita no item anterior.

O parâmetro de avaliação utilizado foi o percentual de mortalidade das larvas, observado a cada cinco dias após a realização do tratamento, até o 20º dia.

### **3.11. Reisolamento dos Entomopatógenos após Bioensaio**

Uma amostra das quenóginas, dos ovos e das larvas dos grupos controle e tratamento foi colocada em câmara úmida para propiciar o crescimento fúngico sobre suas cutículas. Após sete dias, as amostras foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura extrato de malte acrescido de cloranfenicol (0,05%), mantidas em câmara climatizada durante 15 dias. Decorrido esse período, as colônias foram avaliadas quanto às características macro e micromorfológicas.

### **3.12. Análise Estatística e Próbites**

Para análise dos dados paramétricos (períodos de pré-postura, postura, incubação e eclosão) foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre as médias. Para avaliação do percentual de eclosão e mortalidade das larvas, do índice nutricional e do índice de produção de ovos foram realizadas análises não paramétricas de Kruskal Wallis seguida pelo teste t de Student para comparação entre as ordenações médias (SAMPALIO, 2002).

O cálculo das concentrações letais,  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ , foi realizado pelo método de análise de próbites segundo Finney (1971).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação Morfológica dos Isolados

Após o período de incubação, foi realizada a descrição macromorfológica das colônias dos quatro isolados fúngicos. Foram consideradas as seguintes características: mensuração da colônia, aspecto e coloração das massas conidiais e reverso.

Segundo Samson (1974), as espécies classificadas na seção Isarioidea do gênero *Paecilomyces*, na qual se encontram a maioria das espécies entomopatogênicas, apresentam colônias com coloração viva, brilhante, podendo ser branca, amarela, verde clara, rosa ou violeta.

*Paecilomyces lilacinus* apresenta colônias com crescimento rápido em meio de cultura extrato de malte, atingindo um diâmetro de cinco a sete centímetros com 14 dias a 25° C. Apresenta um crescimento flocoso do micélio aéreo. Inicialmente, a colônia é branca, mas quando esporula torna-se lilás vináceo. O reverso algumas vezes é incolor, mas usualmente com sombreado vinho, se aproximando de uma coloração avermelhada a púrpura (SAMSON, 1974).

Segundo Samson (1974), as colônias de *I. farinosa* crescem moderadamente rápido em meio de cultura extrato de malte, atingindo um diâmetro de quatro centímetros com 14 dias a 25°C. Apresentam numerosos conidióforos em isolados pulverulentos recentes, e algumas vezes sinemas amarelos evidentes em cepas antigas com micélio aéreo flocoso. Inicialmente são de coloração branca, permanecendo assim, ou se tornando amarelo brilhante ou creme. O reverso pode variar entre creme a amarelo, e em isolados recentes, frequentemente é amarelo brilhante.

O crescimento das colônias de *I. fumosorosea* é moderadamente rápido em meio de cultura extrato de malte, atingindo um diâmetro de cerca de quatro centímetros com 14 dias a 25°C. Apresentam um elevado crescimento flocoso, pulverulento quando isolado recentemente. Inicialmente branca, permanecendo assim ou tornando-se ligeiramente rosa, especialmente quando esporula abundantemente. O reverso apresenta-se incolor ou amarelo (SAMSON, 1974).

Todas as características macromorfológicas dos isolados de *P. lilacinus*, *I. farinosa* e *I. fumosorosea* foram compatíveis com as descrições realizadas por Samson (1974) (Tab.3 e Fig.1), e as características do isolado de *L. lecanii* foram compatíveis com as descritas por Zare e Gams (2001).

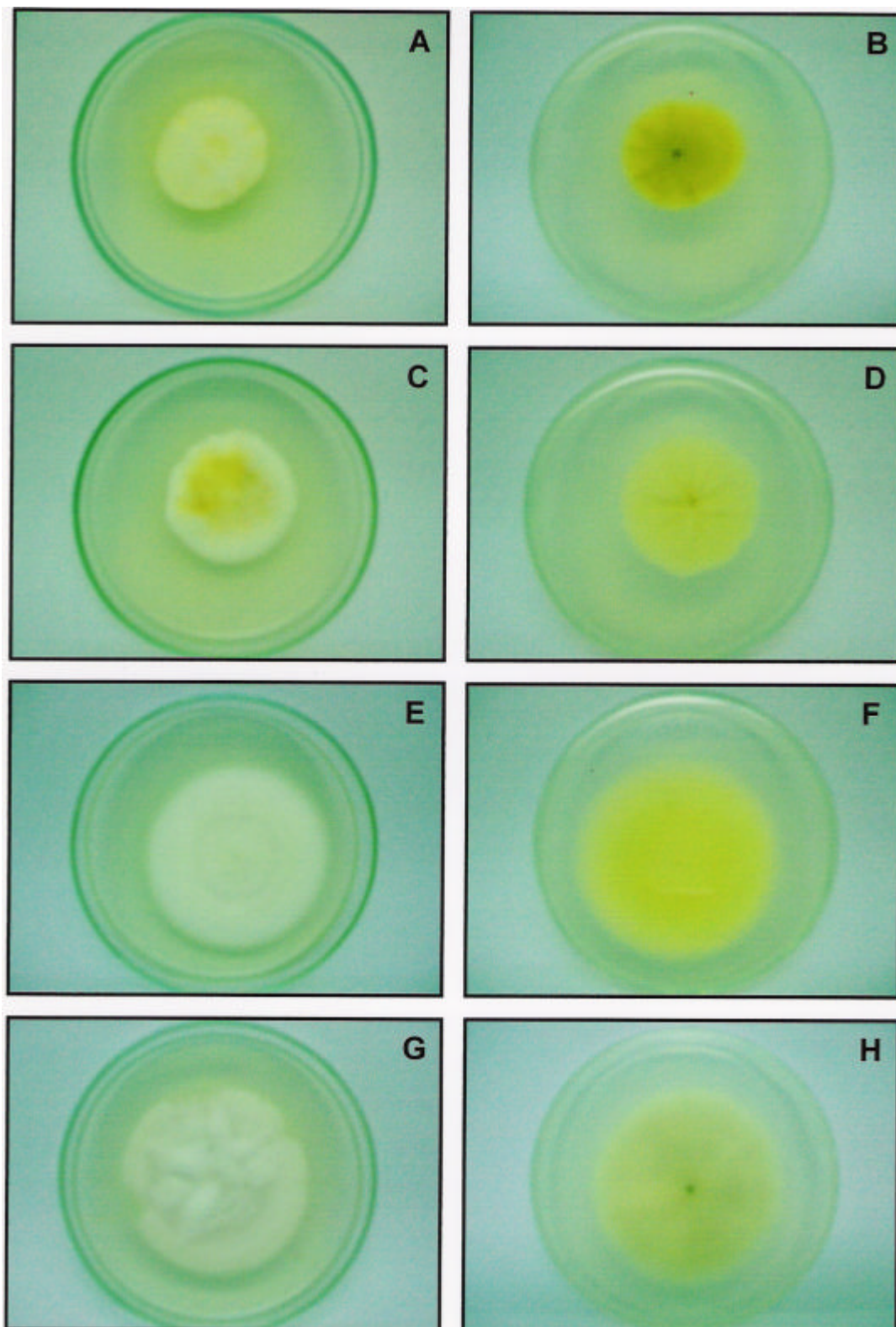
**Tabela 3.** Características macromorfológicas dos entomopatógenos *Paecilomyces*, *Isaria* e *Lecanicillium* utilizados nos bioensaios.

Isolado	Espécie	Características macromorfológicas		
		Diâmetro da colônia	Coloração da colônia	Reverso
CG 420	<i>L. lecanii</i>	3,4 cm	Branca amarelada.	Creme
CG 198	<i>I. farinosa</i>	4,0 cm	Amarela apresentando borda branca.	Creme
CG 202	<i>I. fumosorosea</i>	6,5 cm	Branca apresentando borda rósea.	Amarelo
CG 36	<i>P. lilacinus</i>	6,4 cm	Branca apresentando borda lilás.	Incolor

Segundo a chave descrita por Samson (1974), os isolados de *P. lilacinus* apresentam as seguintes características micromorfológicas: conidióforos pigmentados, parede áspera e clamidosporos ausentes. *I. farinosa* apresenta conídios elipsóides a fusiformes enquanto *I. fumosorosea* apresenta conídios fusiformes a cilíndricos, medindo  $3,0 - 4,0 \times 1,0 - 2,0 \mu\text{m}$ . As características dos isolados utilizados nos bioensaios foram compatíveis com as descritas por Samson (1974) (Fig.2).

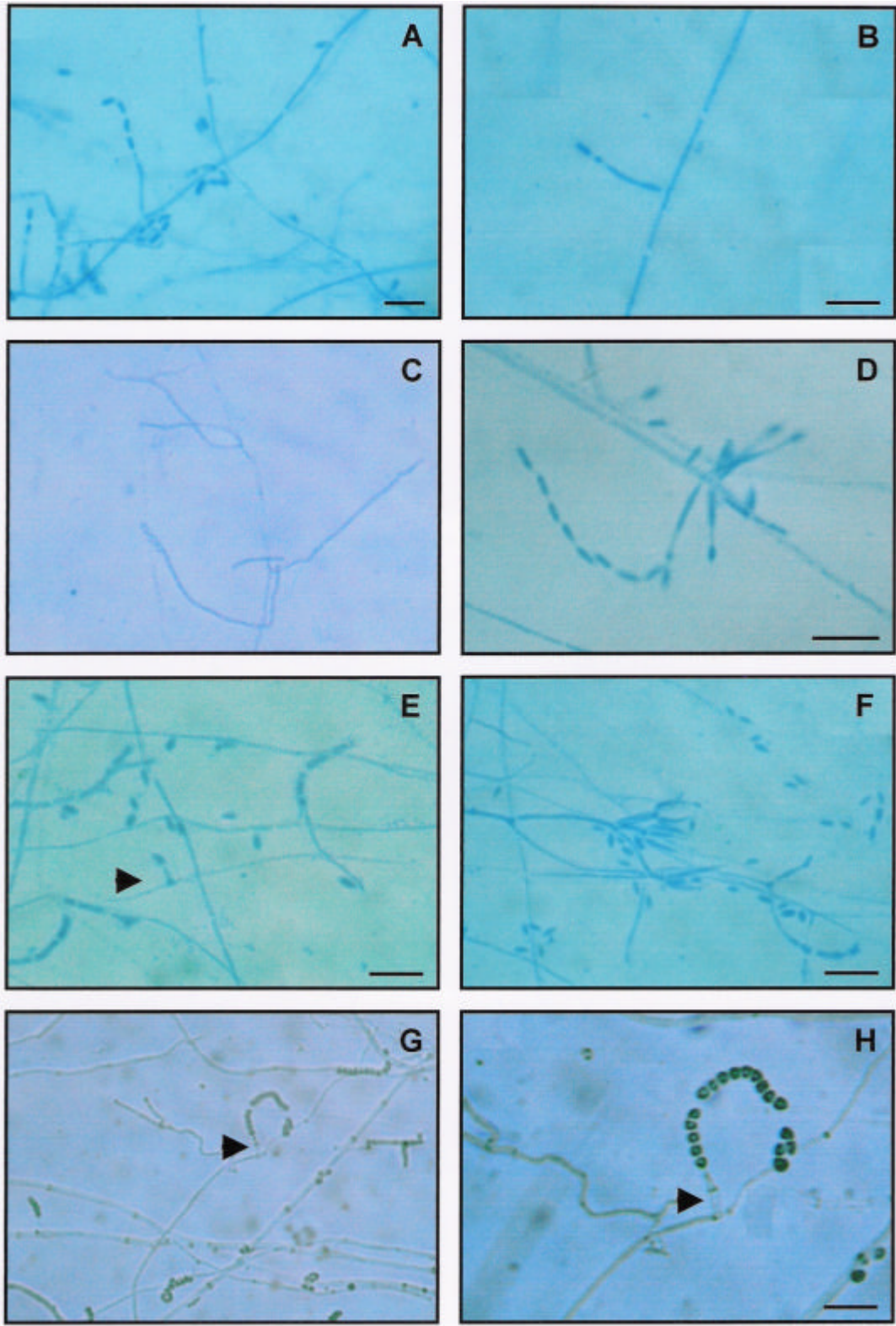
De acordo com a chave para identificação das espécies de *Lecanicillium* descrita por Zare e Gams (2001), *L. lecanii* apresenta fiálides curtas, conídios curtos-elipsóides a subcilíndricos, medindo  $2,5 - 3,5 \times 1,0 - 1,5 \mu\text{m}$ . Tais características foram observadas no isolado CG420 de *L. lecanii* utilizado no bioensaio (Fig.2).

Portanto, sendo as características macro e micromorfológicas dos isolados testados compatíveis com as descritas na literatura, pode-se afirmar que não houve contaminação das colônias de *L. lecanii*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *P. lilacinus* utilizadas no presente trabalho e que qualquer alteração nos parâmetros de avaliação das fases de desenvolvimento de *B. microplus* se deu pela ação do fungo.



**Figura 1.** Características macromorfológicas das colônias dos entomopatógenos. **A:** Colônia de *Lecanicillium lecanii*; **B:** Reverso da colônia de *L. lecanii*; **C:** Colônia de *Isaria farinosa*; **D:** Reverso da colônia de *I. farinosa*; **E:** colônia de *I. fumosorosea*; **F:** Reverso da colônia de *I. fumosorosea*; **G:** Colônia de *Paecilomyces lilacinus*; **H:** Reverso da colônia de *P. lilacinus*.





**Figura 2.** Isolado dos entomopatógenos observados sob microscopia óptica. Barras = 10 $\mu$ m. **A e B:** Fiálides solitárias de *Lecanicillium lecanii*; **C:** Fiálide solitária e conídios em cadeia de *Isaria farinosa* em aumento de 400  $\times$ ; **D:** Fiálides com porção basal dilatada – *I. farinosa*; **E:** Fiálide com porção basal globosa – *I. fumosorosea*; **F:** Conidióforo de *I. fumosorosea* **G:** Fiálide de *Paecilomyces lilacinus* em aumento de 400  $\times$ ; **H:** Fiálide com porção basal dilatada, apresentando um “pescoço” na extremidade – *P. lilacinus* em aumento de 1000  $\times$ .

## 4.2. Viabilidade dos Conídios

Os conídios das suspensões de *I. farinosa*, *I. fumosorosea*, *P. lilacinus* e *L. lecanii* apresentaram 100% de germinação após 24 horas de incubação sob temperatura de  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$ .

Garantindo a qualidade dos conídios nas suspensões utilizadas para tratamento, podemos afirmar que tanto os resultados positivos quanto os negativos encontrados no presente trabalho são decorrentes exclusivamente da ação do fungo sobre o estágio de desenvolvimento do carrapato testado, uma vez que todos os conídios estavam viáveis.

## 4.3. Bioensaio com Fêmeas Ingurgitadas de *Boophilus microplus*

### 4.3.1. Peso médio das fêmeas ingurgitadas

O peso médio, em gramas, das fêmeas ingurgitadas utilizadas no bioensaio está demonstrado na tabela 4. Segundo Bennett (1974), fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* com pequeno tamanho são menos eficientes na produção de ovos do que fêmeas apresentando média de peso entre 160 e 300mg. Logo, as fêmeas utilizadas tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados com suspensão conidial dos entomopatógenos apresentaram médias de peso que validam a cepa de *B. microplus* utilizada nesse estudo.

**Tabela 4.** Valores médios, em gramas, do peso de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	0,2392 $\pm$ 0,02 a	0,2392 $\pm$ 0,02 a	0,2392 $\pm$ 0,02 a	0,2392 $\pm$ 0,02 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	0,2376 $\pm$ 0,02 a	0,2382 $\pm$ 0,02 a	0,2387 $\pm$ 0,02 a	0,2381 $\pm$ 0,02 a
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	0,2377 $\pm$ 0,02 a	0,2381 $\pm$ 0,02 a	0,2397 $\pm$ 0,02 a	0,2406 $\pm$ 0,02 a
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	0,2388 $\pm$ 0,02 a	0,2390 $\pm$ 0,02 a	0,2380 $\pm$ 0,03 a	0,2378 $\pm$ 0,02 a
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	0,2400 $\pm$ 0,02 a	0,2381 $\pm$ 0,03 a	0,2365 $\pm$ 0,03 a	0,2406 $\pm$ 0,02 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (p=0,05).

### 4.3.2. Período de pré-postura

O período de pré-postura foi um dos parâmetros avaliados para identificar o efeito dos isolados dos entomopatógenos sobre a fase não parasitária de *B. microplus*. Os isolados dos fungos entomopatogênicos *P. lilacinus*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *L. lecanii* não demonstraram redução significativa nesse parâmetro quando comparados ao grupo controle, independente da concentração de conídios utilizada (Tab.5).

Glória et al. (1993) ao compararem a biologia da fase não parasitária de duas estirpes de *B. microplus* sob diferentes temperaturas, verificaram que o período de pré-postura dessas fêmeas durou em média 2,91 dias, quando submetidas à temperatura de  $27 \pm 1$ °C e umidade relativa de  $80 \pm 10\%$ . Portanto, a cepa de *B. microplus* utilizada como controle no presente

estudo apresentou período de pré-postura condizente com o descrito na literatura, validando a cepa de *B. microplus* utilizada no presente estudo.

**Tabela 5.** Valores médios, em dias, do período de pré-postura de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	3,2 ± 0,48 a	3,2 ± 0,48 a	3,2 ± 0,48 a	3,2 ± 0,48 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	3,2 ± 0,44 a	3,2 ± 0,42 a	3,5 ± 0,53 a	3,1 ± 0,32 a
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	3,0 ± 0,00 a	3,4 ± 0,52 a	3,6 ± 0,52 a	3,0 ± 0,00 a
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	3,1 ± 0,32 a	3,6 ± 0,52 a	3,9 ± 0,57 a	3,0 ± 0,00 a
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	3,2 ± 0,42 a	3,2 ± 0,42 a	4,0 ± 0,50 a	3,0 ± 0,00 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (p=0,05).

Bittencourt et al. (1994) ao avaliarem os efeitos do fungo *M. anisopliae* sobre as características biológicas de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* mostraram que houve aumento significativo no período de pré-postura à medida que se aumentava a concentração dos conídios, provando que o isolado do entomopatógeno utilizado interfere na biologia de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*.

Outro estudo realizado por Bittencourt et al. (1997) não demonstrou variação significativa no número de dias do período de pré-postura de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* quando comparou o grupo controle com cinco concentrações conidiais de *B. bassiana*. Mesmo não interferindo no período de pré-postura, os isolados 747 e 986 de *B. bassiana* foram considerados eficazes no controle biológico do carrapato *B. microplus*, uma vez que apresentaram efeito patogênico sobre outros parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas estudados.

Embora as espécies de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* utilizadas no presente trabalho não tenham demonstrado interferência no período de pré-postura de fêmeas ingurgitadas tratadas por imersão em suspensões conidiais, ainda podem ser consideradas agentes microbianos promissores no controle de *B. microplus*.

#### 4.3.3. Período de postura

*Lecanicillium lecanii* e *I. farinosa* demonstraram seu potencial patogênico para as fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* causando diminuição significativa do período de postura. As concentrações  $10^7$  conídios ml<sup>-1</sup> e  $10^8$  conídios ml<sup>-1</sup> de *L. lecanii* foram responsáveis por tal redução, e somente a maior concentração de *I. farinosa* mostrou-se eficaz (Tab.6). Os isolados de *I. fumosorosea* e *P. lilacinus* não reduziram significativamente esse parâmetro quando comparados com o grupo controle.

As fêmeas ingurgitadas do grupo controle apresentaram período de postura de  $12,1 \pm 1,27$  dias, semelhante ao demonstrado por Glória et al (1993) quando submeteram fêmeas da mesma espécie às mesmas condições de temperatura e umidade relativa.

O trabalho de Bittencourt et al. (1994) mostrou redução significativa desse período quando trataram fêmeas de *B. microplus* com *M. anisopliae*, sugerindo o potencial do fungo de controlar a população de carrapatos, uma vez que o período de postura foi diminuído.

**Tabela 6.** Valores médios, em dias, do período de postura de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de conídios de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	12,1 ± 1,27 a	12,1 ± 1,27 a	12,1 ± 1,27 a	12,1 ± 1,27 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	9,4 ± 3,71 a	12,8 ± 2,15 a	11,9 ± 1,73 a	12,7 ± 1,49 a
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	10,6 ± 2,22 a	10,9 ± 3,14 a	11,5 ± 1,31 a	12,2 ± 1,75 a
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	6,4 ± 1,96 b	11,4 ± 3,78 a	11,9 ± 0,74 a	11,9 ± 3,38 a
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	5,8 ± 1,93 b	8,2 ± 1,99 b	12,0 ± 1,58 a	11,4 ± 2,01 a

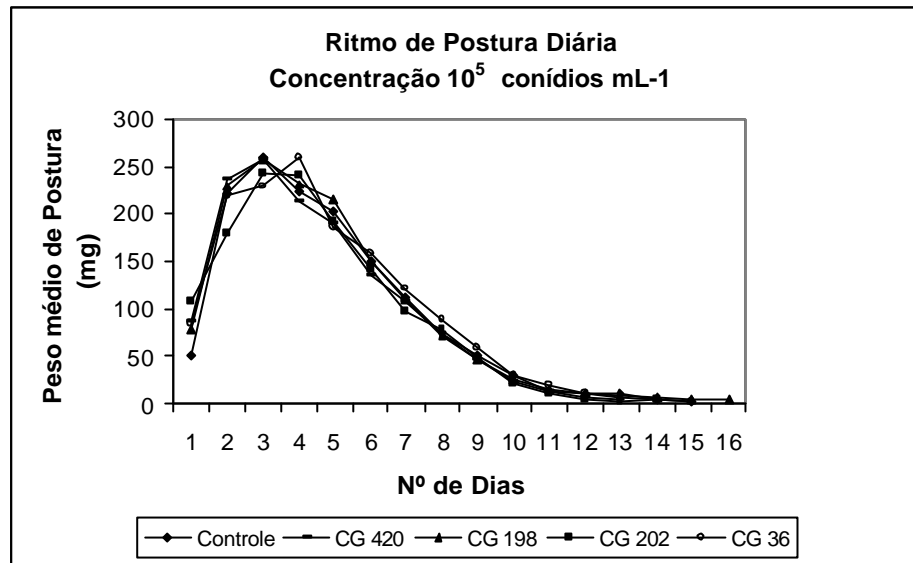
\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (p=0,05).

Os ritmos de postura diária das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* tratadas com diferentes concentrações de conídios dos fungos entomopatogênicos estão demonstrados nas figuras 3, 4, 5 e 6.

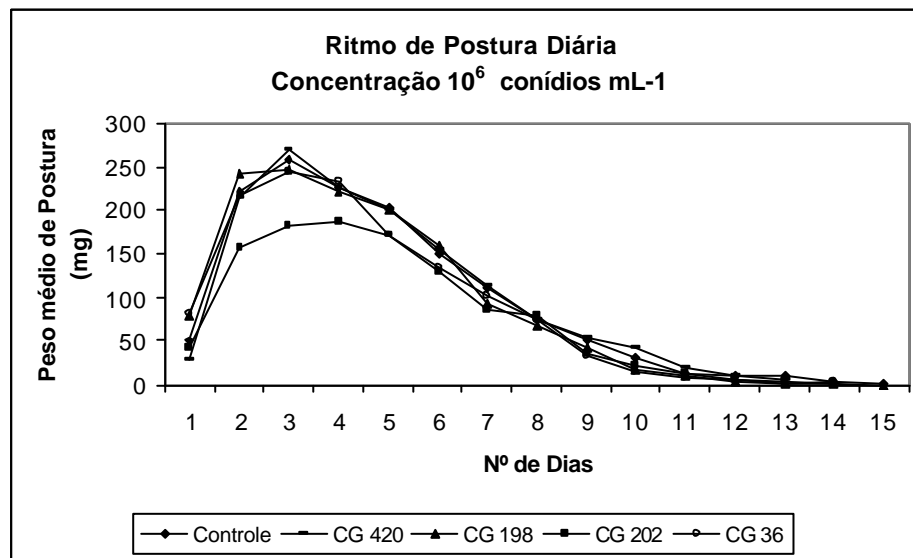
Na concentração 10<sup>5</sup> conídios ml<sup>-1</sup> não houve diferença significativa do pico de postura dos isolados testados quando comparados ao grupo controle. Nas concentrações 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> conídios ml<sup>-1</sup> o isolado de *I. fumosorosea* se destacou dos demais isolados apresentando pico de postura abaixo do grupo controle, embora essa diferença não tenha sido significativa.

Notou-se que o isolado de *I. farinosa* na concentração 10<sup>7</sup> conídios ml<sup>-1</sup> foi o único que apresentou pico de postura acima do grupo controle, porém não diferiu significativamente. Além disso, o pico de postura de fêmeas ingurgitadas precedeu o dia do pico de postura de fêmeas do grupo controle, mostrando que o entomopatógeno foi capaz de intervir na biologia de fêmeas desafiadas à infecção fúngica.

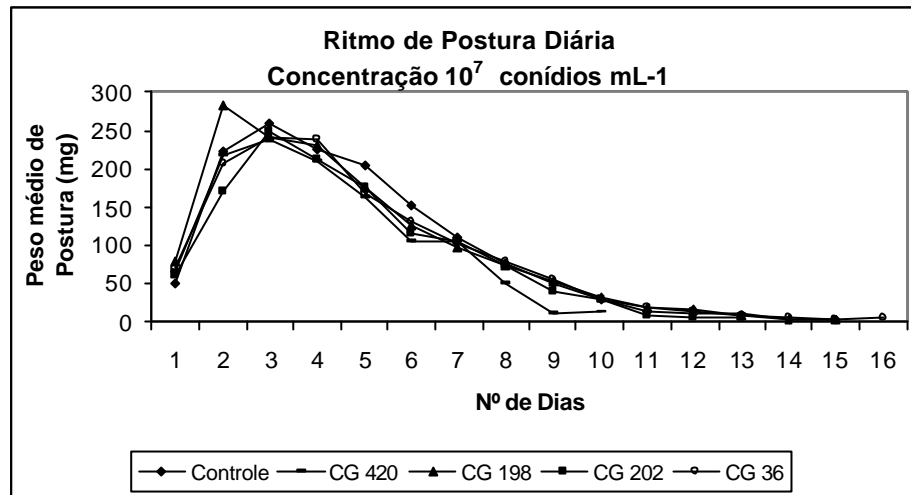
Ao tratar as fêmeas de *B. microplus* com *L. lecanii* e *I. farinosa* na concentração 10<sup>8</sup> conídios ml<sup>-1</sup> observou-se diferenças significativas nos picos de postura, que se mostraram abaixo do pico do grupo controle, em razão da menor postura realizada por essas fêmeas tratadas com a maior concentração dos entomopatógenos em questão.



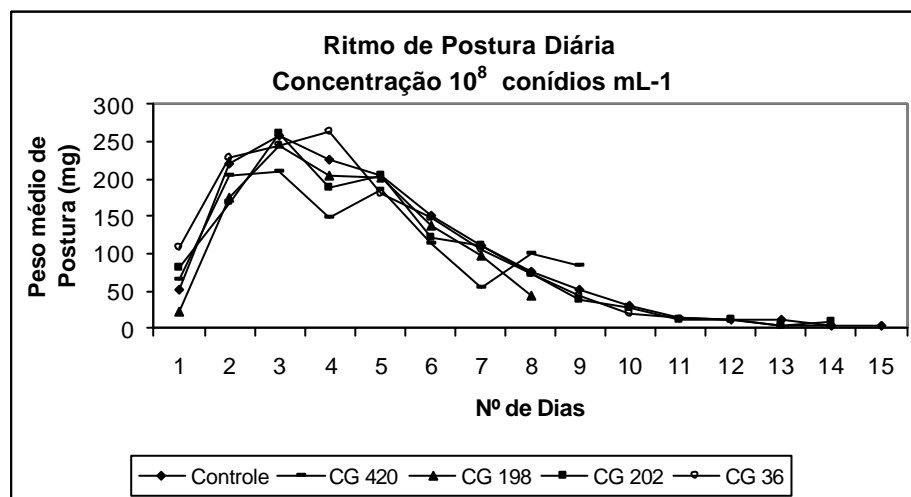
**Figura 3.** Ritmo de postura diária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*.



**Figura 4.** Ritmo de postura diária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*.



**Figura 5.** Ritmo de postura diária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*.



**Figura 6.** Ritmo de postura diária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*.

#### 4.3.4. Período de incubação

Com relação ao período de incubação, foi observado aumento significativo no número de dias apenas com a maior concentração do isolado CG 420 de *L. lecanii*, sugerindo que esse isolado pode atuar no controle da fase não parasitária de *B. microplus*, uma vez que a concentração  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> aumentou o período necessário para a eclosão das larvas, prolongando o ciclo biológico do carrapato. Esse aumento do período de uma das fases do ciclo biológico do carrapato pode ser útil quando o manejo integrado de pragas é utilizado como forma de controle, pois ganha-se tempo para a utilização simultânea de outras práticas

de controle do carrapato. Os demais isolados aumentaram o período de incubação, porém essa diferença não foi considerada significativa (Tab.7).

**Tabela 7.** Valores médios do período de incubação da postura de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	25,5 ± 0,52 a	25,5 ± 0,52 a	25,5 ± 0,52 a	25,5 ± 0,52 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	25,4 ± 0,73 a	26,0 ± 0,82 a	26,2 ± 0,92 a	25,5 ± 0,57 a
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	26 ± 0,94 ab	26,1 ± 0,74 a	26,0 ± 9,24 a	26,0 ± 0,94 a
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	25,4 ± 1,07 a	26,2 ± 1,03 a	26,8 ± 1,99 a	26,1 ± 0,74 a
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	26,6 ± 1,17 b	25,7 ± 0,82 a	26,2 ± 1,09 a	26,2 ± 0,79 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (p=0,05).

Boycev e Rizvanov (1960) e Gorskova (1966) também observaram aumento no número de dias do período de incubação quando expuseram fêmeas de *Ixodes ricinus* ao fungo *Botrytis cinerea*. Bittencourt et al. (1997), ao estudarem dois isolados de uma espécie de *Beauveria* sobre o carrapato *B. microplus*, mostraram resultados diferentes entre si quando o período de incubação foi comparado. O isolado 986 de *B. bassiana* promoveu aumento significativo no número de dias à medida que a concentração de conídios aumentava, porém o isolado 747 não causou aumento significativo. Logo, tanto a espécie do artrópode-alvo quanto à espécie e o isolado do entomopatógeno utilizado, devem ser considerados quando se deseja avaliar o potencial do fungo no controle de tal artrópode.

Glória et al. (1993), ao estudarem a biologia comparativa da fase não parasitária de *B. microplus*, observaram um período de incubação variando entre 24 a 27 dias, em temperatura de  $27 \pm 1$ °C, semelhante ao observado no estudo para o grupo controle. Logo, as cepas de carrapatos utilizadas no bioensaio apresentaram parâmetros biológicos compatíveis com os parâmetros de outras cepas de *B. microplus* já descritos na literatura sob mesmas condições de temperatura e umidade.

#### 4.3.5. Período de eclosão das larvas

O período de eclosão das larvas foi reduzido significativamente com a concentração  $10^8$  conídios ml<sup>-1</sup> do isolado de *P. lilacinus*. Os outros isolados testados não foram capazes de causar diferenças significativas no período de eclosão quando comparados ao grupo controle. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 8.

Bittencourt et al. (1994), ao estudarem dois isolados de *B. bassiana*, observaram aumento no período de eclosão de larvas de *B. microplus* quando o tratamento foi realizado sobre fêmeas ingurgitadas, embora o isolado Bm tenha apresentado melhores resultados que o isolado Mãe. O aumento desse período foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de conídios. No presente trabalho, os resultados encontrados discordam dos apresentados pelos autores supracitados, pois o período de eclosão das larvas foi reduzido

com a utilização dos entomopatógenos, porém tal redução foi considerada significativa apenas com a maior concentração do isolado de *P. lilacinus*.

**Tabela 8.** Valores médios do período de eclosão de larvas provenientes do tratamento de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* com diferentes concentrações de conídios de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	8,5 ± 1,65 a	8,5 ± 1,65 a	8,5 ± 1,65 a	8,5 ± 1,65 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	8,0 ± 1,41 a	8,1 ± 1,03 a	7,2 ± 2,25 a	7,3 ± 1,16 ab
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	7,8 ± 0,92 a	7,8 ± 1,14 a	6,4 ± 3,98 a	7,7 ± 0,95 ab
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	8,2 ± 1,23 a	7,6 ± 1,51 a	7,3 ± 2,31 a	7,3 ± 1,06 ab
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	7,3 ± 1,64 a	7,9 ± 0,74 a	8,1 ± 2,98 a	7,0 ± 1,15 b

\*Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls (p=0,05).

#### 4.3.6. Índice nutricional

Os resultados dos valores médios do índice nutricional de fêmeas ingurgitadas dos grupos controle e tratados podem ser observados na tabela 9.

Observou-se que as concentrações  $10^7$  conídios ml<sup>-1</sup> e  $10^8$  conídios ml<sup>-1</sup> do isolado de *I. fumosorosea* demonstraram redução significativa do índice nutricional, cujos valores obtidos foram 59,02% no grupo tratado com a maior concentração e 69,65% no grupo controle. O isolado de *L. lecanii* também demonstrou redução nesse parâmetro quando as fêmeas ingurgitadas foram tratadas com as duas maiores concentrações.

Quanto ao isolado de *I. farinosa*, foi observado redução do índice nutricional somente com a concentração  $10^8$  conídios ml<sup>-1</sup>.

A redução significativa deste índice demonstra que as fêmeas infectadas experimentalmente com determinadas concentrações de entomopatógenos apresentaram menor proporção entre seu peso inicial e a produção de ovos, indicando que esses fungos interferem na capacidade reprodutiva de fêmeas de *B. microplus*.

O isolado CG 36 de *P. lilacinus* não foi capaz de causar diminuição significativa do índice nutricional quando comparado com o grupo controle.

Bittencourt et al. (1997) testaram dois isolados de *B. bassiana* sobre fêmeas de *B. microplus* e observaram uma tendência à diminuição do índice nutricional quando se aumentava a concentração de conídios na suspensão. Essa proporção foi observada apenas quando se utilizou as duas maiores concentrações dos isolados de *L. lecanii* e *I. fumosorosea*, sugerindo uma menor patogenicidade dos fungos avaliados no presente trabalho.



**Tabela 9.** Valores médios do índice nutricional de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	69,65 a	69,65 a	69,65 a	69,65 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	56,01 a	73,96 a	71,63 a	76,14 a
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	65,68 a	66,07 a	60,30 ab	71,91 a
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	51,60 b	69,54 a	68,38 b	64,91 a
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	44,83 b	55,48 b	59,02 b	70,45 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste t de Student (p=0,05).

#### 4.3.7. Índice de produção de ovos

As fêmeas ingurgitadas utilizadas para formação do grupo controle apresentaram valores do índice de produção de ovos semelhantes aos encontrados por Davey et al. (1980). Esses autores, ao avaliarem a biologia da oviposição de *B. microplus* em condições de laboratório, observaram que o índice de produção de ovos foi de 57,95%. Isso significa que as fêmeas utilizadas no presente estudo apresentaram parâmetros semelhantes aos já descritos na literatura.

Todos os isolados demonstraram redução significativa no índice de produção de ovos em relação ao grupo controle (Tab.10). O índice de produção de ovos traduz a relação entre o somatório de nutrientes ingeridos pela fêmea durante a fase parasitária e a energia despendida para a produção da massa de ovos. As fêmeas ingurgitadas do grupo controle e do grupo tratado com fungos não apresentaram diferença significativa quanto ao peso inicial, como demonstrado na tabela 4, logo a quantidade e qualidade (pois as fêmeas foram obtidas do mesmo hospedeiro) de sangue ingerido eram iguais nos dois grupos. Porém, as fêmeas submetidas ao tratamento com os isolados fúngicos não foram capazes de fazer a adequada conversão de nutrientes em ovos, pois o índice de produção de ovos dessas fêmeas foi significativamente reduzido quando comparado com o de fêmeas do grupo controle.

As quatro diferentes concentrações de conídios de *L. lecanii* reduziram significativamente esse índice, o que significa que uma menor quantidade de conídios desses entomopatógenos poderá ser usada para causar impacto no tamanho da população de carrapatos, uma vez que a postura dessas fêmeas será reduzida, interferindo assim, na geração subsequente.

Estudos realizados por Gindin et al. (2001) mostraram redução na fecundidade de fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus* tratadas com suspensão conidial de *I. fumosorosea* e *L. lecanii* quando comparados com o grupo controle. Esses mesmos autores, ao avaliarem a eficácia de outras duas cepas de *I. fumosorosea* e a mesma cepa de *L. lecanii* sobre *B. annulatus*, *R. sanguineus* e *Hyalomma excavatum* observaram a redução da massa de ovos das fêmeas ingurgitadas tratadas com a concentração  $1 \times 10^7$  conídios ml<sup>-1</sup>. Esses dados são similares aos observados neste trabalho, comprovando a eficiência de *I. fumosorosea* e *L. lecanii* na redução do índice de produção de ovos de fêmeas de outra espécie de carrapato.

**Tabela 10.** Valores médios do índice de produção de ovos de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	58,21 a	58,21 a	58,21 a	58,21 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	47,58 b	61,01 a	57,47 ab	61,80 a
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	57,03 b	54,32 bc	43,54 c	54,83 b
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	41,25 c	56,17 ab	52,84 bc	49,52 b
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	35,02 c	45,04 c	48,95 bc	59,05 ab

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste t de Student (p=0,05).

#### 4.3.8. Percentual de eclosão

Não foi observada a redução significativa do percentual de eclosão de larvas oriundas de fêmeas ingurgitadas tratadas com as diferentes concentrações conidiais dos isolados de *I. farinosa*, *P. lilacinus* e *L. lecanii*.

O isolado de *P. lilacinus*, quando utilizado na maior concentração de conídios, foi capaz de interferir no período de eclosão das larvas quando fêmeas de *B. microplus* foram tratadas, como demonstrado na Tab.8, porém não foi capaz de interferir na eclosão dessas larvas, haja visto que nenhuma diferença significativa foi encontrada no percentual de eclosão entre os grupos tratados e o controle.

O isolado CG 202 de *I. fumosorosea* foi o único capaz de reduzir o percentual de eclosão, porém essa redução somente foi obtida quando se utilizou as concentrações 10<sup>6</sup> conídios ml<sup>-1</sup> e 10<sup>7</sup> conídios ml<sup>-1</sup> como tratamento de fêmeas ingurgitadas. A maior concentração utilizada não foi capaz de alterar o parâmetro avaliado (Tab.11).

**Tabela 11.** Valores médios do percentual de eclosão de larvas oriundas do tratamento de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em relação aos diferentes tratamentos, mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	97,8 a	97,8 a	97,8 a	97,8 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	90,4 a	88,3 a	67,0 ab	96,1 a
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	97,4 a	89,5 a	51,2 b	91,8 a
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	97,6 a	98,9 a	58,5 b	96,6 a
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	92,9 a	95,4 a	83,6 ab	83,1 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste t de Student (p=0,05).

A redução do percentual de eclosão foi observada por Kaaya et al. (1996), quando testaram o potencial de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre os carrapatos *Rhipicephalus*

*appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* em testes a campo. Os resultados mostraram percentual de eclosão de 0% em *A. variegatum* e variação de 0 a 6% em *R. appendiculatus*, demonstrando o potencial destes patógenos no controle de carrapatos.

*Beauveria bassiana* foi utilizada por Boycev e Rizvanov (1960) em infecção artificial de fêmeas de *I. ricinus*, e foi capaz de reduzir significativamente o percentual de eclosão de larvas oriundas da postura das fêmeas tratadas. Foi observado somente 6,5% de eclosão das larvas. Resultados diferentes foram encontrados por Fernandes et al. (1997), que ao utilizarem o mesmo fungo sobre fêmeas de *B. microplus* encontraram valores que variaram de 18,18% a 83,33%. Essa diferença de resultados pode ser atribuída à espécie de carrapato utilizada nos bioensaios, aos isolados do fungo testados, e à ausência de informação quanto à concentração da suspensão utilizada na infecção de *I. ricinus*.

#### 4.3.9. Percentual de controle

O percentual de controle foi calculado e os seguintes resultados foram obtidos: as concentrações  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  dos quatro entomopatógenos mostraram maior eficiência no controle *in vitro* de fêmeas de *B. microplus*. O percentual de controle variou entre 2,51% e 41,02% para *L. lecanii*, 2,61% e 25,15% para *I. farinosa*, 28,57% e 59,19% para *I. fumosorosea* (Tab.12).

O isolado CG 36 de *P. lilacinus* não apresentou resultados promissores no percentual de controle, mostrando variações entre -4,28% a 13,5%.

O fungo *I. fumosorosea* apresentou os melhores resultados, que variaram entre 28,57% e 59,19%, porém, ao contrário do que se podia esperar, o melhor percentual de controle não foi obtido na maior concentração de conídios utilizada.

**Tabela 12.** Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de conídios de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* e mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
$10^5$ con. $\text{ml}^{-1}$	24,22 %	5,21 %	33,05%	-4,28 %
$10^6$ con. $\text{ml}^{-1}$	2,51 %	15,17 %	59,19 %	10,77 %
$10^7$ con. $\text{ml}^{-1}$	29,16 %	2,61 %	46,16 %	7,21 %
$10^8$ con. $\text{ml}^{-1}$	41,02 %	25,15 %	28,57 %	13,50 %

Estudos realizados por Fernandes et al. (1997) mostraram o elevado percentual de controle promovido por dois isolados de *B. bassiana* quando testados *in vitro* sobre fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*. O percentual de controle foi maior à medida que se aumentava a concentração de conídios na suspensão, variando entre 10,45% e 86,78% para o isolado 986, e entre 4,4% e 83,39% para o isolado 747.

Os resultados de percentual de controle de *B. microplus* demonstrados no presente trabalho estão aquém dos obtidos por Fernandes et al. (1997) quando utilizou o fungo *B. bassiana*, considerado promissor no controle de diversas espécies de artrópodes em geral. Mesmo tendo sua eficácia contra carrapatos comprovada por diversos autores, a virulência do fungo contra o artrópode-alvo pode variar consideravelmente em função do isolado utilizado, uma vez que, Fernandes (2003) ao estudar a variabilidade genética de 50 isolados de *B.*

*bassiana* de diferentes regiões geográficas, observou variação de 3% a 100% no percentual médio de mortalidade de larvas não alimentadas de *B. microplus* infectadas artificialmente.

Considerando as espécies dos fungos avaliadas no presente trabalho, poucos estudos demonstram seu efeito sobre carrapatos. Dessa forma, outros isolados fúngicos de *L. lecanii*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea* e *P. lilacinus* deveriam ser estudados para avaliação do seu potencial no controle de *B. microplus*.

#### 4.4. Bioensaio com Ovos de *Boophilus microplus*

O isolado CG 420 de *L. lecanii* se mostrou eficaz para reduzir significativamente o percentual de eclosão das larvas quando ovos de *B. microplus* foram submetidos ao tratamento com as concentrações  $10^6$  e  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . As concentrações  $10^5$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  não foram capazes de causar redução significativa desse parâmetro (Tab.13).

O fungo entomopatogênico *I. farinosa* reduziu o parâmetro estudado quando utilizou-se todas as concentrações, porém essa redução foi considerada significativa somente quando as duas maiores concentrações conidiais foram utilizadas. Resultados diferentes foram obtidos quando avaliou-se o percentual de eclosão de larvas, oriundas do tratamento de fêmeas ingurgitadas (Tab.8). Portanto, o isolado CG 198 de *I. farinosa* somente é eficaz na redução do percentual de eclosão de larvas de *B. microplus* quando a infecção ocorre sobre a fase de ovo.

O isolado CG 36 de *P. lilacinus* não foi capaz de causar redução significativa do percentual de eclosão das larvas quando ovos de *B. microplus* foram expostos às diferentes concentrações conidiais. Da mesma forma, nenhuma concentração utilizada foi capaz de reduzir o percentual de eclosão de larvas quando fêmeas de *B. microplus* foram submetidas ao tratamento, como demonstrado anteriormente (Tab.11).

Em relação ao isolado de *I. fumosorosea*, todas as concentrações foram capazes de reduzir significativamente o percentual de eclosão das larvas, exceto a concentração  $10^6$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ . A concentração  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  mostrou-se eficaz na redução do percentual de eclosão tanto no bioensaio com fêmeas ingurgitadas quanto no bioensaio com ovos, mostrando uma possível utilização do fungo entomopatogênico *I. fumosorosea* no controle da fase não parasitária de *B. microplus*.

**Tabela 13.** Percentual de eclosão de larvas de *Boophilus microplus* após tratamento de ovos com diferentes concentrações de conídios de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidos sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	98,8 ab	98,8 a	98,8 a	98,8 a
<b><math>10^5</math> con. <math>\text{ml}^{-1}</math></b>	97,4 ac	97,7 a	64,8 bc	98,3 a
<b><math>10^6</math> con. <math>\text{ml}^{-1}</math></b>	97,3 c	97,9 a	79,0 ab	98,9 a
<b><math>10^7</math> con. <math>\text{ml}^{-1}</math></b>	96,0 c	92,5 b	63,0 c	98,2 a
<b><math>10^8</math> con. <math>\text{ml}^{-1}</math></b>	98,9 b	88,3 b	25,5 d	98,4 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste t de Student ( $p=0,05$ ).

Gindin et al. (2001) demonstraram a virulência de nove isolados de fungos entomopatogênicos sobre fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas de *B. annulatus*, entre os quais se

encontravam dois isolados de *I. fumosorosea* e um isolado de *L. lecanii*. O percentual de mortalidade foi observado no sétimo dia após tratamento e os isolados de *I. fumosorosea* e um isolado de *L. lecanii* apresentaram menor virulência para fêmeas ingurgitadas quando comparados com os demais isolados testados. Os isolados de *I. fumosorosea* colonizaram a superfície dos ovos tratados e a eclodibilidade foi retardada, porém, o percentual de eclosão das larvas não diferiu estatisticamente do grupo controle quando observado 15 dias após o tratamento. Já o isolado de *L. lecanii* não provocou alteração na eclodibilidade das larvas tão pouco colonizou a superfície dos ovos.

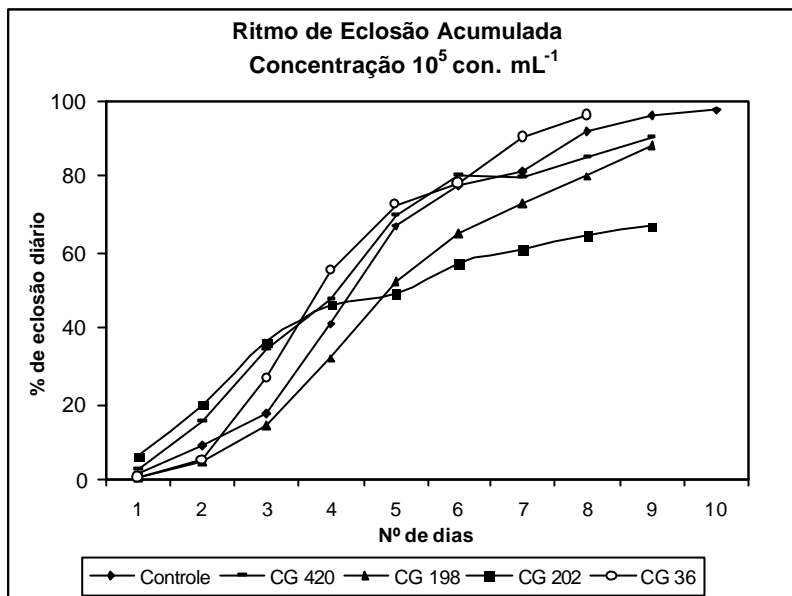
Os resultados obtidos no presente trabalho diferiram dos observados por Gindin et al. (2001). A concentração utilizada por esses autores foi menor que a utilizada no presente trabalho, fato esse que poderia justificar a ausência de patogenicidade do isolado sobre ovos do carrapato *B. annulatus*, sendo esses valores  $1 \times 10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  e  $3,62 \times 10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente. Outro fator a ser considerado é a diferença entre as espécies de carrapatos estudadas e entre as metodologias empregadas. Gindin et al. (2001) adotaram como metodologia o contato dos ovos com papel filtro impregnado com 0,5 ml da suspensão  $1 \times 10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  enquanto que na metodologia aqui apresentada, os ovos ficaram submersos na suspensão por três minutos, aumentando o contato dos conídios com a superfície dos ovos.

Bittencourt et al. (1996) avaliaram o efeito patogênico dos isolados 986 e 747 de *B. bassiana* sobre ovos e larvas de *B. microplus*, que se mostraram patogênicos para ambos os estágios de desenvolvimento do carrapato. Foi observada a redução do percentual de eclosão das larvas, que variou entre 20% e 86,6% de acordo com o isolado e concentração conidial utilizados, enquanto que o percentual de eclosão do grupo controle foi de 93,3%.

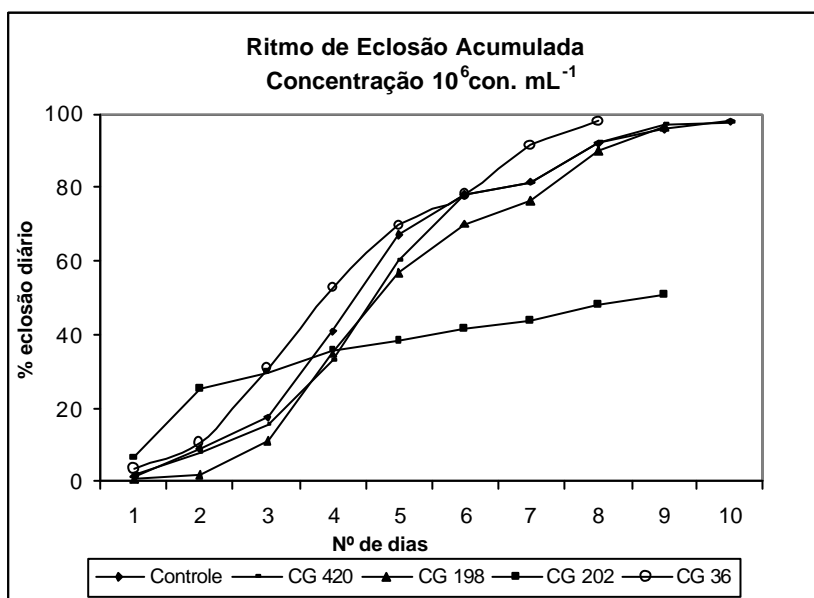
Paião et al. (2001) estudando a ação de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre ovos de *B. microplus* obtiveram os melhores resultados com os tratamentos contendo as maiores concentrações de conídios.

O ritmo de eclosão acumulada comparando os quatro entomopatógenos é demonstrado nas figuras 7, 8, 9 e 10. Percebe-se nitidamente que as quatro concentrações do isolado de *I. fumosorosea* se destacam do grupo controle, mostrando sua capacidade de reduzir o percentual de eclosão das larvas. Porém, diferenças estatísticas significativas somente foram encontradas quando as concentrações  $10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  e  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  foram utilizadas.

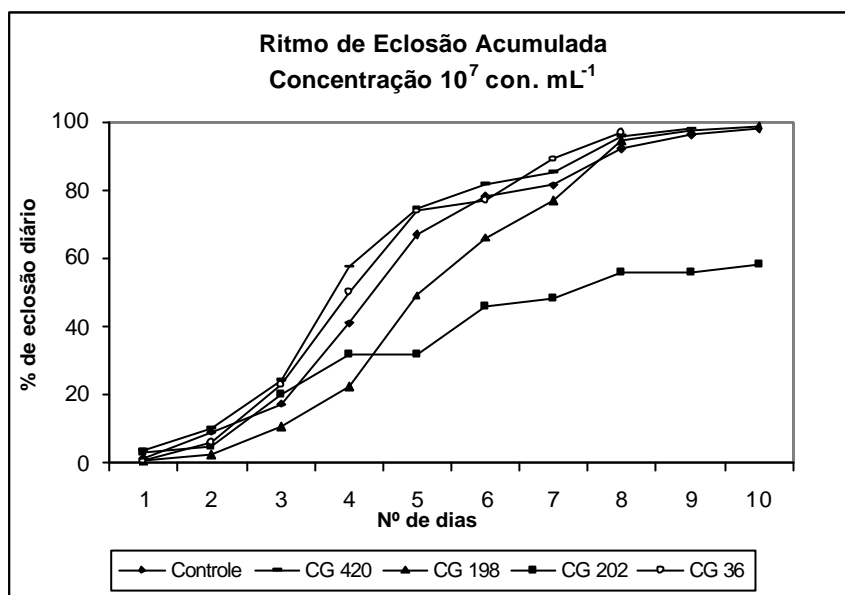
Ainda observando as figuras 11, 12, 13 e 14, constatamos que *I. fumosorosea* também se destaca dos demais fungos utilizados no bioensaio, porém deve-se considerar que a quantidade de conídios disponíveis na suspensão preparada com esse isolado fúngico foi maior que a quantidade de conídios contida nos demais tratamentos. Portanto, não podemos afirmar que o isolado CG 202 é mais patogênico para ovos de *B. microplus* que os outros isolados testados.



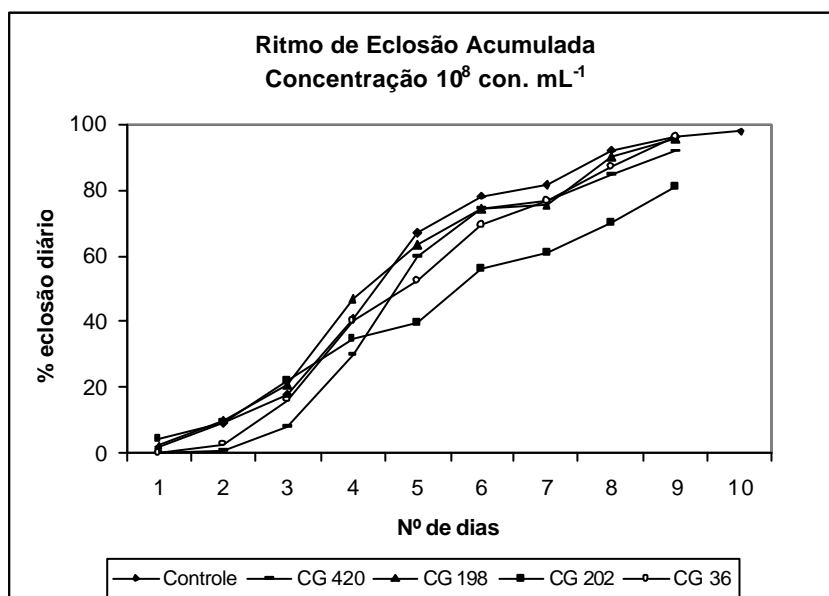
**Figura 7.** Ritmo de eclosão acumulada de larvas de *Boophilus microplus* a partir do tratamento de ovos com a concentração 10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup> dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus* sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa = 90%.



**Figura 8.** Ritmo de eclosão acumulada de larvas de *Boophilus microplus* a partir do tratamento de ovos com a concentração 10<sup>6</sup> conídios mL<sup>-1</sup> dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus* sob temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa = 90%.



**Figura 9.** Ritmo de eclosão acumulada de larvas de *Boophilus microplus* a partir do tratamento de ovos com a concentração  $10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus* sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%.



**Figura 10.** Ritmo de eclosão acumulada de larvas de *Boophilus microplus* a partir do tratamento de ovos com a concentração  $10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus* sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%.

#### 4.5. Bioensaio com Larvas não Alimentadas de *Boophilus microplus*

Os dados do percentual de mortalidade das larvas analisados nos dia 5, 10, 15 e 20 após tratamento estão demonstrados nas tabelas 14, 15, 16 e 17, respectivamente.

Os resultados mostraram que *L. lecanii* foi o único isolado que causou mortalidade das larvas no 5º dia após o tratamento. Esse percentual variou de 1,3% para o grupo tratado com a menor concentração, e 13,0% para o grupo tratado com a maior concentração, enquanto que no grupo controle, não houve mortalidade das larvas (Tab.14).

**Tabela 14.** Percentual de mortalidade das larvas não alimentadas de *Boophilus microplus* no 5º dia após o tratamento com as diferentes concentrações de conídios dos fungos entomopatogênicos *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
Controle	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
10 <sup>5</sup> con. ml <sup>-1</sup>	1,3 ab	0,0 a	0,0 a	0,0 a
10 <sup>6</sup> con. ml <sup>-1</sup>	11,0 cd	0,0 a	0,0 a	0,0 a
10 <sup>7</sup> con. ml <sup>-1</sup>	6,5 bc	0,0 a	0,0 a	0,0 a
10 <sup>8</sup> con. ml <sup>-1</sup>	13,0 d	0,0 a	0,0 a	0,0 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste t de Student (p=0,05).

Os isolados de *Isaria* somente causaram mortalidade nas larvas de *B. microplus* no 10º dia após o tratamento, e esse percentual foi inferior ao causado pelo isolado de *L. lecanii*. A variação encontrada no percentual de mortalidade das larvas foi de 6 a 56% para *I. farinosa* e 5,5% para *I. fumosorosea*, enquanto que a menor concentração de conídios do isolado de *L. lecanii* causou mortalidade de 18,5% das larvas e a maior concentração demonstrou percentual de mortalidade de 82,2% das larvas tratadas (Tab.15).

Dois isolados de *I. fumosorosea* tiveram sua ação avaliada sobre larvas não alimentadas de *R. sanguineus* (Samish et al., 2001). Os resultados obtidos por esses autores mostraram que os isolados causaram percentual de mortalidade das larvas inferior a 10%, sete dias após o tratamento. Esses dados foram similares aos encontrados neste trabalho, em que o isolado de *I. fumosorosea* causou apenas 5,5% de mortalidade no 10º dia após o tratamento. Os dois isolados estudados por Samish et al. (2001) não demonstraram efeito patogênico sobre larvas alimentadas de *R. sanguineus* 10 dias após inoculação, ratificando que na maioria das vezes, estágios imaturos não alimentados são mais susceptíveis à infecção causada pelo fungo que o seu estágio alimentado correspondente (GINDIN et al., 2002).

Esses mesmos isolados estudados por Samish et al. (2001) provocaram cerca de 15% de mortalidade de ninfas alimentadas e não alimentadas, sete dias após a inoculação. Por ter sido pouco patogênico para os estágios imaturos de *R. sanguineus*, os autores não testaram a patogenicidade dos isolados de *I. fumosorosea* sobre adultos dessa espécie de carrapato.



**Tabela 15.** Percentual de mortalidade das larvas não alimentadas de *Boophilus microplus* no 10° dia após o tratamento com as diferentes concentrações de conídios dos fungos entomopatogênicos *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	18,5 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	43,5 c	6,0 b	0,0 a	0,0 a
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	73,0 d	13,0 c	0,0 a	0,0 a
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	82,2 d	56,0 d	5,5 b	0,0 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste t de Student ( $p=0,05$ ).

O isolado de *P. lilacinus* demonstrou seu efeito sobre larvas somente no 15° dia após tratamento, causando mortalidade de apenas 13,0% das larvas tratadas com a maior concentração de conídios. O percentual de mortalidade das larvas variou de acordo com a concentração utilizada e o fungo testado: 32% e 94,4% quando o tratamento foi realizado com *L. lecanii*; 2,0 e 89,5% quando se testou o isolado de *I. farinosa* e 1,0 e 17,0% quando *I. fumosorosea* foi testada (Tab.16).

**Tabela 16.** Percentual de mortalidade das larvas não alimentadas de *Boophilus microplus* no 15° dia após o tratamento com as diferentes concentrações de conídios dos fungos entomopatogênicos *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	32,0 b	2,0 a	1,0 a	0,5 ab
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	78,0 c	16,5 b	1,5 a	1,0 ab
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	85,0 d	46,0 c	5,5 b	5,5 b
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	94,4 d	89,5 d	17,0 c	13,0 c

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste t de Student ( $p=0,05$ ).

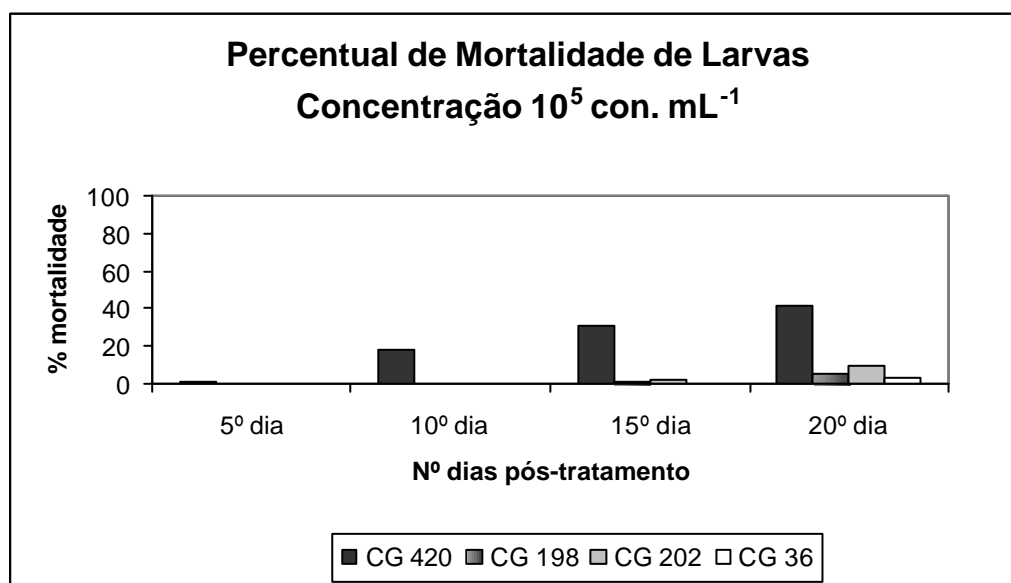
Somente o isolado de *L. lecanii* foi capaz de causar o máximo percentual de mortalidade das larvas, quando utilizada a maior concentração no 20° dia após o tratamento. Resultados similares foram obtidos com o isolado de *I. fumosorosea*, que causou 98,5% de mortalidade. Em todos os isolados, o percentual de mortalidade foi maior à medida que se aumentava a concentração de conídios (Tab.17).

**Tabela 17.** Percentual de mortalidade das larvas não alimentadas de *Boophilus microplus* no 20º dia após o tratamento com as diferentes concentrações de conídios dos fungos entomopatogênicos *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* mantidas sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa = 90%\*.

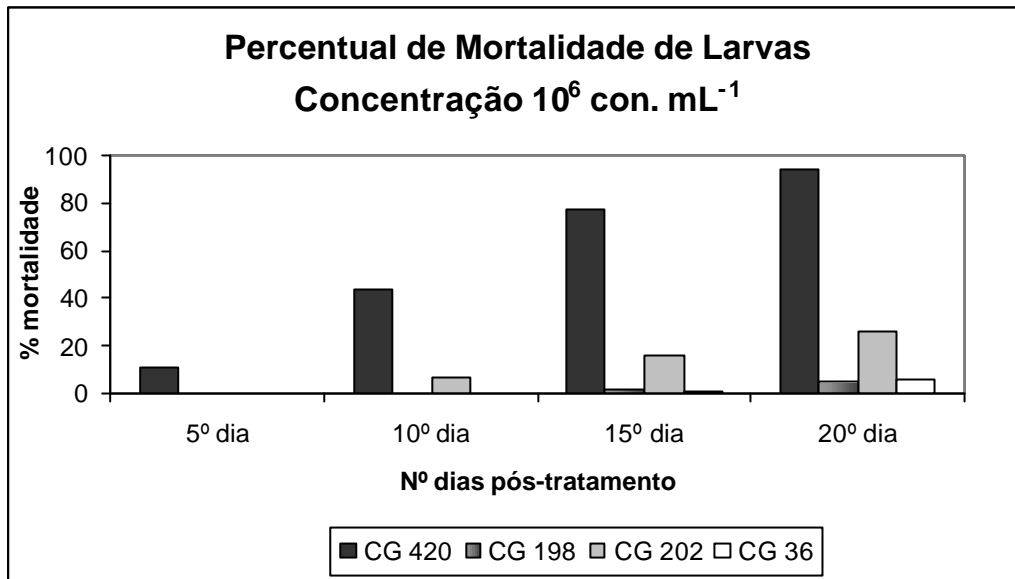
	<i>L. lecanii</i>	<i>I. farinosa</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinus</i>
<b>Controle</b>	1,0 a	1,0 a	1,0 a	1,0 a
<b>10<sup>5</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	42,0 b	10,0 b	6,0 b	3,0 ab
<b>10<sup>6</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	94,5 c	26,0 c	4,5 b	5,5 b
<b>10<sup>7</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	98,5 d	66,0 d	24,0 c	31,5 c
<b>10<sup>8</sup> con. ml<sup>-1</sup></b>	100,0 d	98,5 e	56,0 d	67,5 d

\* Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste t de Student (p=0,05).

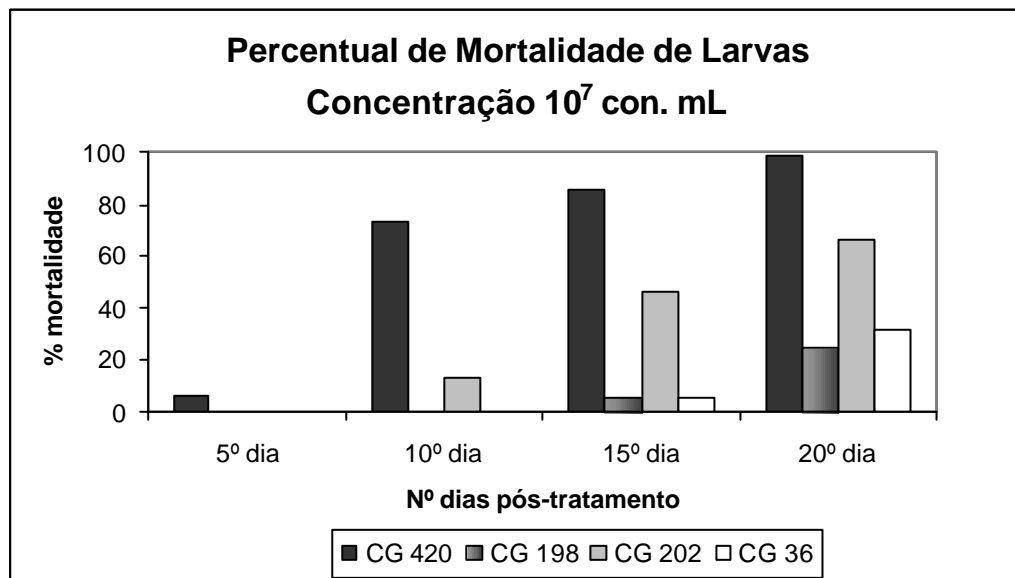
Comparando o isolado CG 420 de *L. lecanii* com os demais isolados estudados, nota-se que em todas as concentrações testadas, e independente dos diferentes dias de observação, este isolado causou o maior percentual de mortalidade das larvas (Fig.11, 12, 13 e 14). Portanto, o isolado CG 420 de *L. lecanii* foi mais patogênico para larvas não alimentadas de *B. microplus* do que os isolados CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*.



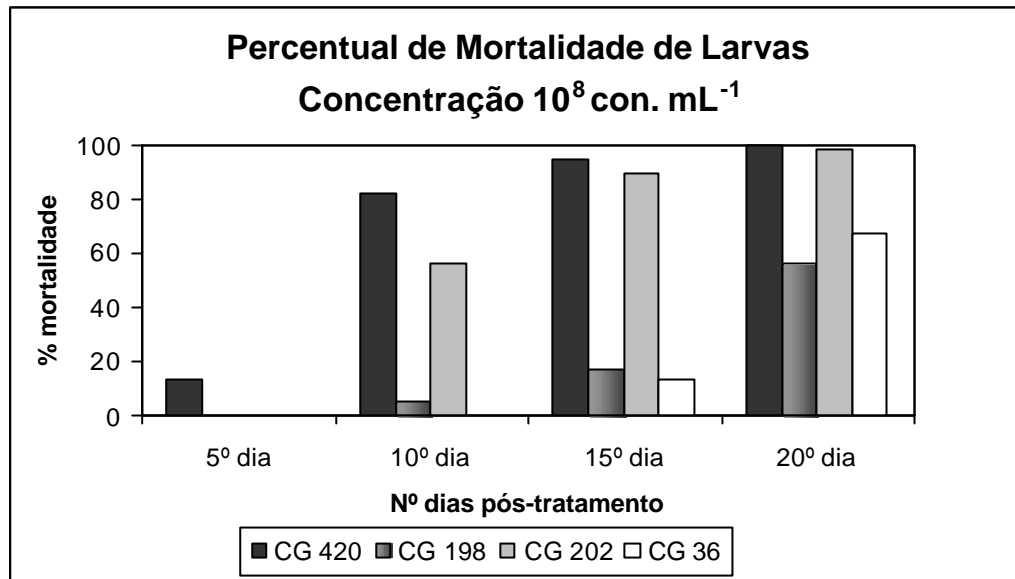
**Figura 11.** Percentual de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração 10<sup>5</sup> conídios ml<sup>-1</sup> dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*, demonstrado em diferentes dias pós-tratamento.



**Figura 12.** Percentual de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*, demonstrado em diferentes dias pós-tratamento.



**Figura 13.** Percentual de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^7$  conídios mL<sup>-1</sup> dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*, demonstrado em diferentes dias pós-tratamento.



**Figura 14.** Percentual de mortalidade das larvas de *Boophilus microplus* tratadas com a concentração  $10^8$  conídios mL<sup>-1</sup> dos isolados CG 420 de *Lecanicillium lecanii*, CG 198 de *Isaria farinosa*, CG 202 de *I. fumosorosea* e CG 36 de *Paecilomyces lilacinus*, demonstrado em diferentes dias pós-tratamento.

Bittencourt et al. (1996) avaliaram o efeito patogênico dos isolados 986 e 747 de *B. bassiana* sobre larvas de *B. microplus*. A observação do percentual de mortalidade das larvas foi realizada 10 dias após o tratamento. Os dois isolados causaram considerável mortalidade das larvas, que variou entre 18,8% e 88%, enquanto que o percentual de mortalidade do grupo controle variou entre 13% e 16,5%. Os valores obtidos com o fungo *L. lecanii* no presente trabalho são similares aos observados pelos autores supracitados, que consideraram os dois isolados de *B. bassiana* como sendo patogênicos para o carrapato. Sendo assim, podemos considerar o isolado CG 420 de *L. lecanii* patogênico para larvas *B. microplus*.

Polar et al. (2005) ao avaliarem o efeito de *M. anisopliae*, *Simplicillium lamellicola* e *I. farinosa* sobre fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas de *B. microplus* observaram que os melhores resultados foram obtidos com o fungo *M. anisopliae*. Como parâmetros de avaliação, foram observados o tempo médio de sobrevivência das fêmeas e das larvas e o tempo médio de eclodibilidade das larvas oriundas do tratamento de ovos. Esses autores verificaram que o isolado de *I. farinosa* não se mostrou patogênico para nenhuma das fases testadas do desenvolvimento de *B. microplus* 21 dias após o tratamento.

O presente trabalho mostra o efeito patogênico de *I. farinosa* sobre larvas no 10º dia após o tratamento, enquanto que no 20º dia após o tratamento, a mortalidade observada chegou próximo de 100%. Essa diferença pode ser atribuída ao isolado fúngico utilizado, como também às distintas metodologias empregadas para a avaliação do fungo sobre os diferentes estágios do carrapato. Polar et al. (2005) utilizaram concentração de conídios menor quando comparada com a utilizada no presente trabalho, além de menor tempo de exposição das fêmeas, ovos e larvas.

Os isolados de *I. fumosorosea* e *L. lecanii* estudados por Gindin et al. (2001) não mostraram diferenças significativas sobre o percentual de mortalidade de larvas não alimentadas de *B. annulatus* quando comparados com o grupo controle. As observações foram realizadas nos dias três e seis após inoculação. Embora a metodologia empregada para o tratamento das larvas tenha sido distinta, esses resultados corroboram os obtidos nesse bioensaio com o isolado de *I. fumosorosea*, uma vez que a mortalidade das larvas só foi

observada 10 dias após o tratamento. Porém, os dados observados com o isolado de *L. lecanii* diferem dos encontrados neste bioensaio, uma vez que a concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  foi capaz de provocar 13% de mortalidade das larvas no 5º dia após o tratamento.

As concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) das suspensões de conídios dos diferentes entomopatógenos, nos diferentes dias após tratamento, estão demonstradas na tabela 18. Pode-se observar que o isolado CG 420 de *L. lecanii* foi capaz de causar mortalidade de 50% e 90% das larvas de *B. microplus* utilizando uma menor concentração de conídios, quando comparado com os demais isolados.

**Tabela 18.** Valores das concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) dos isolados de *Lecanicillium*, *Isaria* e *Paecilomyces* obtidos através da avaliação do percentual de mortalidade de larvas não alimentadas de *Boophilus microplus* nos diferentes dias de observação.

Fungos		Dias após tratamento			
		5	10	15	20
<i>L. lecanii</i>	CL <sub>50</sub>	$1,16 \times 10^{14}$	$1,96 \times 10^7$	$2,47 \times 10^6$	$1,16 \times 10^4$
	CL <sub>90</sub>	$7,4 \times 10^{19}$	$2,15 \times 10^9$	$1,81 \times 10^8$	$1,35 \times 10^7$
<i>I. farinosa</i>	CL <sub>50</sub>	-	$8,98 \times 10^8$	$9,22 \times 10^7$	$3,11 \times 10^7$
	CL <sub>90</sub>	-	$2,57 \times 10^{10}$	$1,41 \times 10^9$	$4,87 \times 10^8$
<i>I. fumosorosea</i>	CL <sub>50</sub>	-	$9,05 \times 10^{14}$	$7,45 \times 10^{10}$	$8,55 \times 10^8$
	CL <sub>90</sub>	-	$2,83 \times 10^{19}$	$1,97 \times 10^{13}$	$5,52 \times 10^{10}$
<i>P. lilacinus</i>	CL <sub>50</sub>	-	-	$2,63 \times 10^{11}$	$3,54 \times 10^8$
	CL <sub>90</sub>	-	-	$1,39 \times 10^{14}$	$8,14 \times 10^9$

Os valores da CL<sub>50</sub> dos isolados CG 420 de *L. lecanii* e CG 198 de *I. farinosa* obtidos no 15º dia após tratamento foram menores do que os encontrados por Reis et al. (2001) quando estudaram o efeito *in vitro* de três isolados de *M. anisopliae* sobre ninfas não-alimentadas de *Amblyomma cajennense*. Todos os isolados utilizados no presente trabalho apresentaram valores de CL<sub>90</sub> menores do que os encontrados por Reis et al. (2001). Esses resultados podem ser explicados pela diferença de patogenicidade entre as espécies dos entomopatógenos utilizados e/ou pela espécie e estágio dos carrapatos e demonstram que os isolados CG 420 de *L. lecanii* e CG 198 de *I. farinosa* apresentam potencial para o controle microbiano *in vitro* de larvas de *B. microplus*, uma vez que as concentrações conidiais  $2,47 \times 10^6$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  e  $1,81 \times 10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ ,  $9,22 \times 10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  e  $1,41 \times 10^9$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  relativos às CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, respectivamente (Tab.18), são facilmente preparadas em laboratório.

Bittencourt et al. (1996) avaliaram o efeito do contato de dois isolados de *B. bassiana* sobre larvas de *B. microplus*, no décimo dia após o tratamento, e observaram que o percentual de mortalidade das larvas variou entre 13,0% e 88,0%, proporcionando uma CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> de  $6,83 \times 10^6$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  e  $5,95 \times 10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente para o isolado 986 de *B. bassiana*, e  $1,01 \times 10^7$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  e  $1,15 \times 10^9$  conídios  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente, para o isolado 747. Os valores das concentrações conidiais letais encontrados para o isolado CG 420 de *L. lecanii* (Tab.18) são similares aos descritos por Bittencourt et al. (1996), que consideraram o entomopatógeno *B. bassiana* patogênico para larvas de *B. microplus*.

Portanto, o isolado CG 420 de *L. lecanii* pode ser considerado patogênico para larvas de *B. microplus* sob condições ideais.

#### **4.6. Reisolamento dos Entomopatógenos após Bioensaio**

Amostras de quenóginas, ovos e larvas dos grupos tratados com as diferentes concentrações conidiais dos entomopatógenos *I. farinosa*, *I. fumosorosea*, *P. lilacinus* e *L. lecanii* incubadas em câmara úmida apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas. Tais colônias foram avaliadas quanto as suas características macro e micromorfológicas e identificadas como sendo as mesmas espécies de fungos utilizadas no bioensaio com fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas não alimentadas de *B. microplus*, comprovando que os entomopatógenos utilizados nos bioensaios foram responsáveis pela infecção nos carrapatos.

As amostras de quenóginas, ovos e larvas do grupo controle que foram mantidas em câmara úmida, sob as mesmas condições das amostras dos grupos tratados, não apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas.

Gindin et al. (2001) após realizar tratamento de fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus* com suspensões de nove fungos entomopatogênicos observaram a colonização das superfícies dorsal e ventral dos cadáveres por *M. anisopliae* e *M. flavoviridae* (= *M. anisopliae* var. *acridum*). Em contrapartida, os autores relatam que os isolados de *B. bassiana* e *I. fumosorosea* normalmente não emergem da cutícula do carrapato e sim através das aberturas naturais, e que o isolado de *L. lecanii* testado não colonizou a superfície das fêmeas mortas, já que não apresentaram sinais típicos da infecção fúngica.

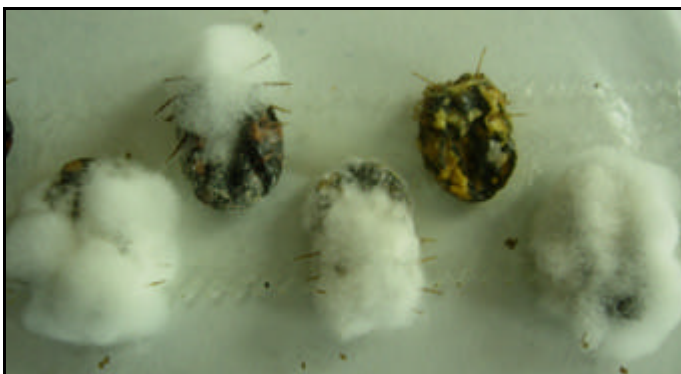
No presente estudo, foi observado a colonização fúngica da cutícula de fêmeas ingurgitadas no 10º dia após o tratamento. As figuras 15, 16 e 17 ilustram fêmeas de *B. microplus* do grupo controle, e dos grupos tratados com a concentração  $10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  dos isolados de *L. lecanii* e *I. farinosa*, respectivamente.



**Figura 15.** Fêmeas de *Boophilus microplus* pertencentes ao grupo controle, 10 dias após tratamento.



**Figura 16.** Fêmeas de *Boophilus microplus* pertencentes ao grupo tratado com a concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de *Lecanicillium lecanii*, 10 dias após o tratamento.



**Figura 17.** Fêmeas de *Boophilus microplus* pertencentes ao grupo tratado com a concentração  $10^8$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de *Isaria farinosa*, 10 dias após o tratamento.

## 5. CONCLUSÕES

Os isolados CG 420 de *L. lecanii*, CG 198 de *I. farinosa*, CG 36 de *P. lilacinus* e CG 202 de *I. fumosorosea* interferem na biologia de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* mediante bioensaio *in vitro*.

O isolado CG 202 de *I. fumosorosea* promove o maior percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, em laboratório, seguido pelos isolados CG 420 de *L. lecanii*, CG 198 de *I. farinosa* e CG 36 de *P. lilacinus*.

Os isolados CG 420 de *L. lecanii*, CG 198 de *I. farinosa* e CG 202 de *I. fumosorosea* são patogênicos para ovos de *B. microplus* sob condições de laboratório.

O isolado CG 36 de *P. lilacinus* não é patogênico para ovos de *B. microplus* mediante tratamento *in vitro*.

Os isolados CG 420 de *L. lecanii*, CG 198 de *I. farinosa*, CG 36 de *P. lilacinus* e CG 202 de *I. fumosorosea* causam mortalidade em larvas não alimentadas de *B. microplus* sob condições ideais de temperatura e umidade.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ANGEL-SAHAGÚN, C.A. et al.. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). **Journal of Insect Science**, v.5, n.50, 2005.
- BAHIENSE, T.C. **Avaliação da associação dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* com a deltametrina, sobre uma cepa de *Boophilus microplus* resistente a piretróides**. 2003. 31f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- BAINIER, G. Mycothèque de l'école de Pharmacie. XI. *Paecilomyces*, genre nouveau de Muceédinées. Bull. Trimest. **Soc. Mycol.** Fr. 23, p.26-27, 1907.
- BALAZY, S.; WISNIEWSKI, J.; KACZMAREK, S. Some noteworthy fungi occurring on mites. Bulletin of the Polish Academy of Sciences, **Biological Sciences**, v.35, p.199-224, 1987.
- BARROS, T.A.M.; EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infectantes do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, p.17-21, 1989.
- BATEMAN, R. The development of a mycoinsecticide for the control of locust and grasshoppers. **Outlook on Agriculture**, v.26, p.13-18, 1997.
- BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v.16, n.1, 1974.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. **Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. 1992. 105f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1992.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.351-354, 1999.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural**. Série Ciências da Vida, v.16, p.49-55, 1994.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, v.17, p.83-88, 1995.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.F.S.; SOUZA, E.J.; MASCARENHAS, A.G.; ALVES, S.B. Ação de dois isolados do fungo entomogênico *Beauveria bassiana* sobre algumas características biológicas de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em laboratório. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da vida, v.19, n.1-2, p.65-71, 1997.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.F.S.; VIEGAS, E.C.; ALVES, S.B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, p. 81-84, 1996.

BOYCEV, D.; RIZVANOV, K. Relation of *Botrytis cinerea* to ixodid ticks. **Zoologie Zeitschrift Ukranien**, v.39, p.460, 1960.

BROWN, A.H.S.; SMITH, G. The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect stage *Byssochlamys* Westling. **Transactions of the British Mycological Society**, v.40, p.17-89, 1957.

BRUM, J.G.W. 1989. **Infecção em teleóquina de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecealapegi* (Grescont, 1981): etiopatologia e sazonalidade**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 44f, 1989.

CABANILLAS, E.; BARKER, K. R.; DAYKIN, M. E. Histology of the interactions of *Paecilomyces lilacinus* with *Meloidogyne incognita* on tomato. **Journal of Nematology**, v.20 n.3, p.362-365, 1989.

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.

CLARK, R.A.; CASAGRANDE, R.A.; WALLACE, D.B. Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. **Environmental Entomology**, v.11, p.67-70, 1982.

CLEMENTS, F.E.; SHEAR, C.L. **The genera of Fungi**. – H. W. Wilson, New York, 1931.

DOBERSKI, W.J. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the Elm Bark Beetle *Scolytus scolytus*: pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus* to larvae and adults of *Scolytus scolytus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 33, p. 188-194, 1981.

DRUMMOND, R.O.; GLADNEY, W.J.; WHETSTONE, T.M.; ERNST, S.E. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. **Journal Economic Entomology**, v.64, p.686-688, 1971.

DUNN, M.T. *et al.* Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. **Scanning Electron Microscopy**, p.1351-1357, 1982.

EKBON, B.S. Investigations on the potential of a parasitic fungus (*Verticillium lecanii*) for biological control of the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). Swed. **Journal of Agricultural Research** v.9, p.129-138, 1979.

FARIA, M.R.; TIGANO, M.S. **Coleção de fungos entomopatogênicos do Cenargen**. Brasília: Embrapa, Serviço de Produção e Informação, 1996. 76p.

FERNANDES, E.K.K. **Estudo da variabilidade genética de diferentes isolados de *Beauveria bassiana* associado a avaliação morfológica e da patogenicidade em bioensaio com larvas de *Boophilus microplus***. 2003. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

FINNEY, D.S. **Probit analysis**. 3ed. Cambridge: University Press, 1971. 333p.

FRIEDHOFF, K.T. Interaction between parasite and tick vector. **International Journal for Parasitology**, v.20, n.4, p.525-535, 1990.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola Veterinária UFMG**, n.8, p.49-61, 1993.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, ano 23, n.137, 2004.

GAMS, W.; ZARE, R. A revision of *Verticillium* section *Prostrata* III. Generic classification. **Nova Hedwigia**, v.72, p.329-337, 2001.

GAMS, W.; HODGE, K.T.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P.; SEIFERT, K.A. Proposal to conserve the name *Isaria* Pers.: Fr. (anamorphic fungi) with a conserved type. **Taxon: in press**, 2005.

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. The Susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) Ticks to Entomopathogenic Fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v.11, p.111-118, 2001.

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ZANGI, G.; MISHOUTCHENKO, A.; GLAZER, I. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, p.283-288, 2002.

GLÓRIA, M. A.; FACCINI, J. L. H.; DAEMON, E.; GRISI, L. Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *B. microplus* (Can., 1887) resistente e sensível a carrapaticida em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 79-84, 1993.

GONZÁLES, J.C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Revisão histórica e conceitual). **A Hora Veterinária**, ano 21, n.125, p.23-28, 2002.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. 103p.

GONZALES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101p.

GORSKOVA, G.J. Reduction of fecundity of ixodid ticks females induced by fungal infection. **Vetsnik Leningraskogo Universitık**, v.21, p.13-16, 1966.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, ano 21, n.125, p.23-28, 2002.

GUIMARÃES, A.M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO, M.F.B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.84, p.323-327, 1998.

HAMBLETON, E.J. A broca do algodoeiro no Brasil *Gasterocercodes brasiliensis* Hambleton (Col. Curcul.) **Archive Institute of Biology**, v.8, p.47-118, 1937.

HARMON, J.D. Keeping pace with cockroaches. **Pest Control Technology**, v.22, p.42-44, 1994.

HARTIN, M.P. Recherches sur la nature et les causes de la maladie des pommes de terre en 1845. **Nieuwe Verhandelingen Koninklijk Instituut Wetensch.** Amsterdam, v.12, p.203-297, 1846.

HAWKSWORTH, D.L. **Micologist's handbook**. 2<sup>a</sup>ed. England, Kew Surrey: CAB Press, 1977. 231p.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. ( Ainsworth and Bisby's) **Dictionary of the Fungi**, 8<sup>a</sup>ed. , CAB International, Wallingford, UK, 616p., 1995.

HEUCHERT, C.M.; DE, G.V.JR.; DE ATHAIDE, D.F.; BOSE, R.; FRIEDHOFF, K.T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.1-11, 1999.

HODGE, K.T.; GAMS, W.; SAMSON, R.A.; KORF, R.P.; SEIFERT, K.A. Lectotypification and status of *Isaria* Pers.: Fr. **Taxon: in press**, 2005.

HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.4, p.12-32, 1985.

HUGHES, S.J. Studies on micro-fungi. IX. Some Hyphomycetes, which produce phialides – **Mycological Papers**, v.45, p.1-36, 1951.

IBANÉZ, E.A.; GIMÉNEZ, R.L.; ZENOCRATI, L.G.R. Aspectos clínicos y morfológicos de la *Babesia caballi* e *Babesia equi*. **Gaceta Veterinária**, v.41, n.342, p.422-429, 1979.

JACKSON, C.W.; HEALE, J.B. Relationship between DNA content and spore volume in sixteen isolates of *Verticillium lecanii* and two new diploids of *V. dahliae* (= *V. dahliae* var. *longisporum* Stark). **Journal Generic of Microbiology**, v.131, p.3229-3236, 1985.

JATALA, P.; KALTENBACH, R.; BOCANGEL, M. Biological control of *Meloidogyne incognita acrita* and *Globodera pallida* on potatoes. **Journal of Nematology**, v.11, p.303, 1979.

KAAYA, G.P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental and Applied Acarology**, v.24, p.913-926, 2000.

KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.15-20, 1996.

KALSBECK, V.; FRANDBEN, F.; STEENBERG, T. Entomopathogenic fungi associated with *Ixodes ricinus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v.19, p.45-51, 1995.

KELLER, S. The *Beauveria – Melolontha* project: experiences with regard to locust and grasshopper control. In: LOMER, C. J.; PRIOR, C. **Biological Control of Locusts and Grasshoppers**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 279-286.

KOUVELIS, V.N.; ZARE, R.; BRIDGE, P.D.; TYPAS, M.A. Differentiation of mitochondrial subgroups in the *Verticillium lecanii* species complex. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.263-268, 1999.

LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.K.; VAIL, P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? **Biological Control**, v.21, p. 230-248, 2001.

LECUONA, R.E.; EDELSTEIN, J.D.; BERETTA, M.F.; LA ROSSA, F.R.; ARCAS, J.A. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, v.38, p.172-179, 2001.

LIPA, J.J. Microbial control of mites and ticks. In: **Microbial control of insects and mites**. Academic Press London: Burges, H.D. & N.W.Hussey (ed), 1971. p.357-374.

LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sensu lato* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera:Formicidae). **Revista Árvore**, v. 29, p.553-561, 2005.

LUANGSA-ARD, J.J.; HYWEL-JONES, N.L.; MANOCH, L.; SAMSON, A. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. **Mycology Research**, v.109, n.5, p.581-589, 2005.

LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S.M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.6, p.839-846, 1998.

MADÉLIN, M.F.; ROBINSON, R.K.; WILLIAMS, R.J. Apressorium like structures in insects parasiting Deuteromycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.9, p.404-412, 1967.

MAINS, E.B. Some entomogenous species of *Isaria*.– **Papers of the Michigan Academy of Science**, v.40, p.23-32, 1955.

MILNER, R.J.; STAPLES, J.A.; LUTTON, G.G. The selection of an isolate of the hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. **Biological Control**, v.11, p.240-247, 1998.

MONTEIRO, S.G.; BAHIENSE, T.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, p.559-563, 2003.

MORRIS, E.F. The synnematosous genera of the Fungi Imperfecti. – Western Illin. **Univ. Ser. Biol. Sci.**, v.3, 1963. 146p.

MURREL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, 56, p. 169-172, 2003.

OSBORNE, L.S.; STOREY, G.K.; McCOY, C.W; WALTER, J.F. Potential for controlling the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. In: International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, 5, 1990, Adelaide, Australia. **Proceedings...** Adelaide, 1990. p.386-390.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biochemistry**, v.17, p.245-251, 2001.

PENNA, V.M. *Boophilus microplus*: A resistência genética do hospedeiro como forma de controle. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, v.4, p.3-65, 1990.

PEREIRA, M.C. *Boophilus microplus*: Revisão taxionômica e morfo-biológica. 1980. 126f. Tese (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 1980.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.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, n.3, 2005.

PRENEROVÁ, E. Pathogenicity of *Paecilomyces farinosus* toward *Cephalcia abietis* eonymphs (Insecta, Hymenoptera): Enhancement of bioactivity by *in vivo* passaging. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 62-64, 1994.

QUINLAN, J. Use of fungi to control insects in glasshouses. In: **Fungi in Biological Control Systems** . Manchester: Burge, M.N. ed., Manchester University Press, 1988. p.19-36.

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; SOUZA, E.J.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.544-547, 2001.

RIVALIER, E. & SEYDEL, S. Nouveau procede de culture sur lames gélosés appliqué a l'étude microscopique de champignons deteignes. **Annals of Parasitology**, v.10, n.5, p.444-452, 1932.

SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. Pathogenicity of Entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **The Journal of Parasitology**, v.87, n.6, p.1355-1359, 2001.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v.129, p.S389-S403, 2004.

SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Review of Entomology**, v.44, p. 159-182, 1999.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ- Editora, 2002. 265p.

SAMSINAKOVA, A. *Beauveria globulifera* (Speg.) Pic. Lako Parasit. Klistete *Ixodes ricinus*. **Zoologie List**, v.6, p.329-30, 1957.

SAMSINAKOVA, A. KALALOVA, S.; DANIEL, M.; DUSBABEK, F.; HOZAKOVA, E.; CERUY, V. Entomogenous fungi associated with the tick *Ixodes ricinus*. **Folia Parasitologica (Praha)**, v.21, p.38-48, 1974.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. **Studies in Mycology**, n.6, 120pp, 1974.

SANTIAGO, D.C. et al.. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.36, n.4, p.1055-1064, 2006.

SCHENCK, S. Control of Nematodes in Tomato with *Paecilomyces lilacinus* Strain 251. **Vegetable Report**, v.5, 1-5, 2004.

SOSA-GOMES, D.R. **Fungos entomopatogênicos**: catálogo de isolados. Londrina: Embrapa Soja (Série Documentos), v.1, p.1-32, 2002.

STEENBERG, T.; JESPERSEN, J.B.; JENSEN, K.M.V.; NIELSEN, B.O.; HUMBERT, R.A. Entomopathogenic fungi in flies associated with pasture cattle in Denmark. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.77, p.186-197, 2001.

SUNG, G.; SPATAFORA, J.W.; ZARE, R.; HODGE, K.T.; GAMS, W. A revision of *Verticillium* section *Prostrata* II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the Clavicipitaceae. **Nova Hedwigia**, v.72, p.311-328, 2001.

SUTHERST, R.W.; JONES, R.J.; SCHNITZERLING, H.J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, v.295, p.320-321, 1982.

THOMPSON, K.C.; ROA, J.; ROMERO, T. Anti- tick grasses as the basis for developing practical tick control packages. **Tropical Animal Health and Production**, v.10, n.3, p.179-182, 1978.

VIÈGAS, A.P. *Empusa dysdercy* n. sp., um novo parasita de *Dysdercus*. **Jornal de Agronomia**, v.2, p.229-258, 1939.

WHARTON, R.H. Acaricide resistance and cattle tick control. **Australian Veterinary Journal**, v.43, p.394-399, 1967.

WHARTON, R.H. Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: **Control of arthropods of medical and veterinary importance**. London: Pal, R. & R.H.Wharton (ed.). Plenum Press, 1974. p.134-177.

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G.S.; HUNGERFORD, J. Commercialization of recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v.110, p.43-50, 1995.

WRAIGHT, P.S.; CARRUTHERS, R.I.; WRAIGHT, G. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 217-226, 1998.

ZARE, R.; GAMS, W. A revision of *Verticillium* section *Prostrata* IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. **Nova Hedwigia**, v.73, p.1-50, 2001.

ZARE, R.; GAMS, W.; CULHAM, A. A revision of *Verticillium* section *Prostrata* I. Phylogenetic studies using ITS sequences. **Nova Hedwigia**, v.71, p.465-480, 2000.

ZARE, R.; KOUVELIS, V.N.; TYPAS, M.A.; BRIDGE, P.D. Presence of a 20bp insertion/deletion in the ITS1 region of *Verticillium lecanii*. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.258-262, 1999.