

**AMÉLIA MARIA TAVARES GUIMARÃES**

**EFEITO DE CARRAPATICIDAS QUÍMICOS E OBSERVAÇÕES  
CITOLÓGICAS EM *Metarhizium anisopliae* var. *acridum***

**RECIFE**

**2002**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA

EFEITO DE CARRAPATICIDAS QUÍMICOS E OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM  
*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

**Orientanda:** Amélia Maria Tavares Guimarães

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima – UFPE

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Célia Rodrigues Athayde - UFCG

**RECIFE – OUTUBRO**

**2002**

**AMÉLIA MARIA TAVARES GUIMARÃES**

**EFEITO DE CARRAPATICIDAS QUÍMICOS E OBSERVAÇÕES  
CITOLÓGICAS EM *Metarhizium anisopliae* var *acridum*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Fungos

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dra. Elza Áurea de Luna  
Alves Lima

CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> . Dra. Ana Célia  
Rodrigues Athayde

**RECIFE  
2002**

**AMÉLIA MARIA TAVARES GUIMARÃES**

**EFEITO DE CARRAPATICIDAS QUÍMICOS E OBSERVAÇÕES  
CITOLÓGICAS EM *Metarhizium anisopliae* VAR. *acridum*.**

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

ORIENTADORA: \_\_\_\_\_  
Profª Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima (Depto. de Micologia-UFPE)

EXAMINADORES: \_\_\_\_\_  
Profª Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Depto. de Micologia-UFPE)

\_\_\_\_\_  
Profª Dra. Janete Magali de Araújo (Depto. de Antibióticos-UFPE )

SUPLENTE: \_\_\_\_\_  
Profª Dra. Luzinete Acioli de Queiroz (Depto de Micologia-UFPE)

\_\_\_\_\_  
Profª Dra. Isaíras Padovan (Depto. de Histologia-UFPE)

Data de aprovação: \_\_\_\_\_

## **DEDICO**

Aos meus pais José de Castro Guimarães (*In memoriam*) e Vanilza Tavares Guimarães pela luz do conhecimento que me proporcionaram.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à DEUS pela vida.

Agradeço à minha mãe (Vanilza) pelo exemplo de força, fé e esperança e ao meu pai (José de Castro – *In memoriam*) pelo poder de reação diante das dificuldades, pela força de querer e conseguir o almejado.

Agradeço aos meus irmãos: Sidney, Sérgio, Cidvan, Marcos e Marta pelo apoio constante.

Agradeço à minha irmã Marta por me incentivar a continuar diante de tantos obstáculos.

Agradeço às minhas tias e tio (Valdeci-Ciça, Wanda, Vatazena e Ivanildo) pelo incentivo, pelo apoio moral e financeiro.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima que me aceitou como orientanda, mesmo sabendo das minhas dificuldades em relação a Micologia, pelo apoio e compreensão em momentos difíceis.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Célia R. Athayde, pelo apoio incondicional, pela amizade, pela paciência e ajuda em todos os momentos, sempre com uma palavra consoladora e de incentivo, um exemplo a ser seguido.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> doutoranda Ubirany Lopes Ferreira pela presença constante em minha vida acadêmica, com seu exemplo de força, perseverança, humildade e pela amiga presente nos momentos de alegria e tristeza, obrigada amiga.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> doutoranda Bereneuza Tavares Ramos Valente Brasileiro pela amizade, compreensão, pelo exemplo de luta e pela atitude de estar sempre disposta a ajudar.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório: Ubirany Lopes Ferreira, Clécio Florêncio Queiroz, Maria do Livramento Ferreira Lima, Fábio Marcondes Ribeiro Freitas, Auristela Correia de Albuquerque, Jujú Andrade Rodrigues, Franciene Santos Briand do Nascimento e Ginarajadaça Ferreira dos Santos.

Agradeço aos amigos do Departamento de Micologia: Prof<sup>a</sup> Ângela Coimbra, Ana Paula Duarte, Sérgio Alves, Fábio Sérgio e Joana Angélica (Lab. Micorrizas), Cláudia Lins, Sandra, Suely, Diana, Rose Farias, Nicácio, Ana Cristina Barreto e Meiriana Vilas Boas.

Agradeço aos professores que compõem o corpo docente do Mestrado em Biologia de Fungos pelos conhecimentos adquiridos.

Agradeço ao técnico MsC Roberto Lins Xavier Silva do Laboratório de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela análise estatística.

Agradeço à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço ao Departamento de Botânica da UFRPE em especial a Professora Ariadne e ao Departamento de Histologia com especial atenção aos professores Isáiras Padovan, Paulo Padovan e Luciana pelas fotos.

Agradeço todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, pois cada pessoa é única para nós e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, mas não se vai só, nem nos deixa só, leva um pouco de nós e deixa um pouco de si mesma. Essa é a mais bela responsabilidade de nossas vidas e a prova tremenda de que as almas não se aproximam por acaso”.

**Charles Chaplin**

# SUMÁRIO

Páginas

## AGRADECIMENTOS

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABELAS

## RESUMO

## ABSTRACT

### 1. INTRODUÇÃO

01

### 2. REVISÃO DE LITERATURA

03

#### 2.1. Controle de Carrapatos

03

#### 2.2. *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* DRIVER; MILNER & TRUEMAN

06

##### 2.2.1. Aspectos da Taxonomia e da Biologia

06

##### 2.2.2. Potencial para o Controle Biológico

10

##### 2.2.3. Compatibilidade Química de Fungos Entomopatogênicos com Acaricidas Químicos

13

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

18

#### 3.1. Local de Realização do Experimento

18

#### 3.2. Material Fúngico

18

#### 3.3. Princípios Ativos Utilizados

19

#### 3.4. Concentrações Utilizadas

19

#### 3.5. Meio de Cultura e Soluções Utilizadas

19

##### 3.5.1. Batata-dextrose-ágar (BDA) OXOID

19

##### 3.5.2. Solução de Albumina

19

##### 3.5.3. Solução de Tween 80 (0,1% v/v)

19

##### 3.5.4. Solução de NaOH 1N

20

##### 3.5.5. Solução de HCl 1N

20

##### 3.5.6. Solução Tampão Fosfato

20

##### 3.5.7. Solução Corante de HCl Giemsa

20

#### 3.6. Manutenção da Cultura

20

#### 3.7. Efeito dos Carrapaticidas sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

21

##### 3.7.1. Germinação Conidial em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas

21

###### 3.7.1.1. Cálculo para Germinação de Conídios

21

##### 3.7.2. Crescimento Linear em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas

22

##### 3.7.3. Esporulação em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas

22

##### 3.7.4. Determinação da Toxicidade

22

##### 3.7.5. Condição Nuclear de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

23

#### 3.8. Análise Estatística

23

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

24

#### 4.1. Efeito dos Carrapaticidas sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

24

##### 4.1.1. Germinação Conidial em BDA com Diferentes Concentrações de

|  |           |
|--|-----------|
| Carrapaticidas   | 24        |
| 4.1.2. Crescimento Linear em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas                                      | 25        |
| 4.1.3. Esporulação em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas   | 30        |
| 4.1.4. Toxicidade de Carrapaticidas Químicos em Diferentes Concentrações   | 32        |
| 4.1.5. Condição Nuclear de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> após Cultivo em BDA mais Carrapaticidas | 35        |
| <b>5. CONCLUSÕES</b>   | <b>38</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>39</b> |
| <b>7. ANEXOS</b>   | <b>55</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|  | Páginas |
|--|---------|
| <b>FIGURA 1.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> com 12 dias de cultivo em meio BDA.....  | 19      |
| <b>FIGURA 2.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> em BDA mais Cipermetrina High Cis Técnica 100 na concentração de 0,50 µg no 12º dia de cultivo.....  | 27      |
| <b>FIGURA 3.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> em BDA mais Amitraz na concentração de 2,00 µg no 12º dia de cultivo.....  | 28      |
| <b>FIGURA 4.</b> Condição nuclear de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> após cultivo em BDA mais Amitraz (coloração em HCl-Giemsa. 640X). <b>a-</b> Linhagem selvagem de <i>Metarhizium Anisopliae</i> var. <i>acidum</i> , conídios uninucleados. <b>b-</b> 0,20 µg (48h); <b>c-</b> 0,20 µg (72h); <b>d-</b> 0,50 µg (48h); <b>e-</b> 1,00 µg (48h); <b>f-</b> 1,00 µg (72h); <b>g-</b> 2,00 µg (48h).                           | 36      |
| <b>FIGURA 5.</b> Condição nuclear de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> após cultivo em BDA mais Cipermetrina High Cis Técnica 100 (coloração em HCl-Giemsa. 640X). <b>a-</b> Linhagem selvagem de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> , conídios uninucleados. <b>b-</b> 0,20 µg (48h); <b>c-</b> 0,20 µg (72h); <b>d-</b> 0,50 µg (48h); <b>e-</b> 0,50 µg (72h); <b>f-</b> 1,00 µg (72h); <b>g-</b> 2,00 µg (48h). | 37      |

## LISTA DE TABELAS

|  | Páginas |
|--|---------|
| <b>TABELA I.</b> Germinação de esporos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> com 17 horas de cultivo em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz em relação ao grupo controle..... | 24      |
| <b>TABELA II.</b> Diâmetro da colônia de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 3º dia de cultivo.....                                  | 26      |
| <b>TABELA III.</b> Diâmetro da colônia de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 6º dia de cultivo.....                                 | 26      |
| <b>TABELA IV.</b> Diâmetro da colônia de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 12º dia de cultivo.....                                 | 28      |
| <b>TABELA V.</b> Esporulação de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 3º dia de cultivo.....   | 30      |
| <b>TABELA VI.</b> Esporulação de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 6º dia de cultivo.....  | 31      |
| <b>TABELA VII.</b> Esporulação de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 12º dia de cultivo.....  | 31      |
| <b>TABELA VIII.</b> Toxicidade de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz com diferentes concentrações em BDA sobre <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> no 3º dia de cultivo.....                                      | 33      |
| <b>TABELA IX.</b> Toxicidade de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz com diferentes concentrações em BDA sobre <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> no 6º dia de cultivo.....  | 33      |
| <b>TABELA X.</b> Toxicidade de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz com diferentes concentrações em BDA sobre <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> no 12º dia de cultivo.....  | 34      |

## RESUMO

Atualmente o método de maior interesse adotado para o controle de *Boophilus microplus*, carrapato de um só hospedeiro que acarreta prejuízos globais de milhões de dólares anuais, baseia-se na utilização de fungos entomopatogênicos, sendo *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* os mais utilizados. Este trabalho avaliou a compatibilidade química dos carrapaticidas Cipermetrina High Cis técnica 100 (CHC) e Amitraz sobre *M. anisopliae* var. *acridum*. No ensaio químico as concentrações utilizadas foram: 0,20µg; 0,50µg; 1,00µg; 2,00µg; 5,00µg e 10,00µg. Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições e um controle. Os parâmetros analisados foram, a germinação de conídios, o crescimento linear, a esporulação e a condição nuclear. Foi determinada, também a toxicidade. Os menores percentuais de germinação, 49,50%, 58,07% e 51,06% foram observados nos tratamentos com Amitraz nas concentrações 0,20µg; 5,00µg e 10,00µg, respectivamente. O diâmetro da colônia foi afetado no terceiro dia de cultivo (66,67%) na concentração de 0,50µg de CHC. O carrapaticida Amitraz no sexto dia de cultivo na concentração de 10,00µg promoveu um menor percentual de esporulação (33,35%). *M. anisopliae* var. *acridum* não apresentou alterações citológicas quando crescido em meio com carrapaticidas. A toxicidade obtida de 46,98% no sexto dia de cultivo, segundo a metodologia utilizada determinou que o produto Amitraz na concentração de 10,00µg é moderadamente tóxico para este fungo. Os resultados obtidos contribuirão para um emprego futuro do controle integrado do *B. microplus* utilizando-se carrapaticidas químicos e fungos entomopatogênicos.

## ABSTRACT

Now the method of larger interest adopted for the control of *Boophilus microplus*, tick of only one host that causes global damages of million of annual dollars, with bases on the use of entomopathogenic fungi, being *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* the more used. This work evaluated the chemical compatibility of the acaricides Cipermetrina High Cis technical 100 (CHC) and Amitraz with *M. anisopliae* var. *acridum*. In the chemical bioassays the concentrations used were: 0,20µg; 0,50µg; 1,00µg; 2,00µg; 5,00µg and 10,00µg with five repetitions per treatment and a control. The analyzed parameters were, the conidial germination, the lineal growth, the esporulation and the nuclear condition. It was observed too, a the toxicity. The smallest percentage of germination, 49,50%, 58,07% and 51,06% were observed in the treatments with Amitraz in the concentrations 0,20µg; 5,00µg and 10,00µg, respectively. The diameter of the colony was affected in the third day the of culture (66,67%) in the concentration of 0,50µg of CHC. The acaricid Amitraz in the sixth day the of culture in the concentration of 10,00µg promoted a percentage minor of esporulation (33,35%). *M. anisopliae* var. *acridum* didn't present alterations cytological when grown in middle with acaricids. The toxicity of 46,98% in the sixth day the of culture, according to the used methodology determined that the product Amitraz in the concentration of 10,00µg is moderately toxic to *M. anisopliae* var. *acridum*. The results obted contribute to a future use of the integrated control of *B. microplus* used chemical acaricids and entomopathogenic fungi.

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados no controle microbiano. Aproximadamente 80% das doenças têm como agentes etiológicos estes organismos, os quais pertencem a cerca de 90 gêneros e mais de 700 espécies. A maioria dos gêneros já relatados, ocorrem no Brasil e mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica. As enzootias e epizootias registradas, têm sido, aqui e em outros países, um fator importante na redução da população de pragas (ALVES, 1998).

A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens no controle microbiano de insetos. Através de testes de patogenicidade é possível selecionar linhagens de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos, visando o controle de grande número de pragas das culturas econômicas (ALVES, 1998; AZEVEDO, 1998).

Os carrapatos são considerados os mais importantes e eficientes vetores de doenças no mundo (HOOGSTRAAL, 1985). O maior prejuízo, causado pelos carrapatos, deve-se a sua habilidade em transmitir protozooses, riquetisioses e viroses. Mas, apesar do progresso alcançado pelos programas de controle de artrópodes em décadas anteriores, através de agentes químicos, estes ainda representam na atualidade um risco constante e grave para a população mundial, seja a humana, ou a animal, sendo fundamental o conhecimento da inter-relação “artrópode - agente patogênico - hospedeiro” dentro do ambiente total para se pensar em controle efetivamente viável (OMS, 1980; WAHARTON, 1983). No Brasil esse controle é exclusivamente voltado para o *Boophilus microplus*, carrapato de um só hospedeiro, que no entanto, acarreta prejuízos globais no valor de US\$ 967.886.184.00 (HORN, 1985).

O homem desenvolveu vários métodos para o controle do carrapato (KHALAF-ALLAH, 1999), no entanto, nem todos foram capazes de resolver o problema (FRISCH, 1999), para cuja solução imediatista sempre fora o uso de substâncias químicas acaricidas; porém, essas drogas determinaram, em diferentes épocas, o aparecimento de cepas de carrapatos resistentes a elas, além de determinarem a permanência de resíduos em produtos de origem animal e no meio ambiente (FARIAS, 1999). Conseqüentemente o controle das populações de artrópodes deve ser realizado, com o propósito de sua redução, respeitando a integridade do ecossistema (MONTEIRO *et al.*, 1998a) e para isto, vem se efetivando o controle biológico como medida alternativa e promissora (SAMISH & REHACEK, 1999). Vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo de infecções experimentais de carrapatos com bactérias e fungos (ATHAYDE *et al.*, 1999a,b; BITTENCOURT *et al.*, 1999) e, mais especificamente, usando o *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (ATHAYDE *et al.*, 2001).

A utilização de patógenos associados às subdosagens de inseticidas químicos é uma prática que tem sido usada experimentalmente. A finalidade do emprego do inseticida químico é provocar um estresse no inseto para torná-lo mais sensível ao patógeno (ALVES, 1998).

Dentre os métodos utilizados para o controle de carrapatos encontra-se o controle integrado, no entanto, necessita-se de informações acerca da compatibilidade do uso associado do método químico e aos dados biológicos através da utilização de fungos. O presente trabalho avaliou a compatibilidade química entre os carrapaticidas e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Controle de Carrapatos

Os carrapatos pertencem a Classe Arachnida, Ordem Acarina, Subordem Metastigmata, Superfamília Ixodoidea e Família Ixodidae (CORDOVÉS, 1997). São os mais importantes e eficientes vetores de doença no mundo (GONZALES, 1975). A sua classificação é bastante controversa, sendo que além das características morfológicas, a especificidade ao hospedeiro tem caracterizado pelo menos 700 das 800 espécies de ixodídeos existentes (HOOGSTRAAL, 1985). Causam paralisia através de secreções tóxicas das glândulas salivares e podem transmitir vírus, rickettsias, bactérias e protozoários (FAUST & JUNG, 1975).

As fêmeas precisam de 15 a 20 dias para se engurgitarem de sangue, assim como de uma grande quantidade do mesmo, ou seja, cada fêmea suga em média de dois a três microlitros de sangue do animal, alimentam-se apenas uma vez, produzem grandes massas de ovos e morrem (RAMIREZ, 1982). O ciclo de vida do carrapato é composto de uma fase de vida livre e de uma fase parasitária, necessitando ambas as fases de uma temperatura de 27° C e umidade relativa do ar acima de 70%. No meio ambiente, o ciclo biológico dos carrapatos é regulado pelas estações do ano. O *B. microplus*, produz aproximadamente três a quatro gerações por ano (WHARTON & UTECH, 1969).

Para o controle de carrapatos, utiliza-se usualmente produtos químicos, os quais entre outros prejuízos elevam o custo de produção (FRISCH,1999; VAZ JUNIOR *et al.*, 2000; JONSSON *et al.*, 2000) cujas cifras giram em torno de aproximadamente 1 bilhão de dólares por ano(HORN,1987) na pecuária sul-americana. Dentre os produtos utilizados se incluem derivados Arsênicos, Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos, Amidinas, Piretróides Sintéticos e Avermectinas. Devido as dificuldades de uso destes produtos, os carrapatos têm

desenvolvido resistência aos diferentes princípios ativos (DE CASTRO & NEWSON, 1993; KAY & KEMP, 1994; BAXTER *et al.*, 1999).

Técnicas “*in vitro*” e “*in vivo*” são realizadas para demonstrar a resistência dos carrapaticidas Organofosforados desenvolvida pela cepa (R4) de *B. microplus* (STONE *et al.*, 1984) podendo ser controlada no campo com o uso dos carrapaticidas Diazinon e Ethyl Pirimiphos. Neste sentido LUGURU *et al.* (1984) observaram que alguns carrapatos da Zâmbia apresentaram suscetibilidade aos carrapaticidas Dieldrin, Dioxathion, Dimethoate e Chlorfenvinphos, para este estudo foram utilizadas larvas de duas a três semanas das espécies de *Amblyomma variegatum*, *B. decoloratus*, *B. microplus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. evertsi evertsi* e *R. pravus*; concluindo que algumas cepas de *B. decoloratus* e *R. appendiculatus* foram resistentes a Dieldrin, Dioxathion e Dimethoate, que *R. evertsi evertsi* foi resistente a Dieldrin e Diexathione, e ainda que, uma cepa simples do carrapato *R. pravus* foi resistente ao Dioxathion e uma das quatro cepas de *A. variegatum* ao Dieldrin.

O problema continua e novas estratégias para resolvê-lo foram adotadas por BEUGNET *et al.* (1994) quando estudaram a resistência desenvolvida por cepas de *Boophilus microplus* contra vários carrapaticidas, em Nova Caledônia, na França e propuseram uma estratégia moderada baseada na rotação de carrapaticidas e limitação de tratamento para o controle desta espécie, que poderá vir a ser integrado com uso clássico de produtos químicos, a vacinação, medidas agrônômicas e biológicas.

Os predadores naturais do *B. microplus* são as formigas, as aranhas, (ROCHA, 1984; MATTHEWSON, 1984), os pássaros, do gênero *Buphagus*, (MWANGI *et al.*, 1991), as galinhas domésticas (HASSAN *et al.*, 1991) e parasitóides (MWANGI *et al.*, 1991), mas por dependerem do sangue dos animais dificilmente serão usados como controle dessa praga. O controle microbiano nas últimas décadas tem se intensificado, principalmente na área agrícola, devido aos sérios

danos que os inseticidas químicos têm causado no ecossistema (ALVES, 1998a). O controle biológico de artrópodes por fungos de ocorrência natural é um importante fator regulador das populações dos mesmos (BELLOWS, 2001). A vantagem do uso de agentes entomopatogênicos sobre os pesticidas químicos, reside na eficácia, no custo, na segurança ao homem e aos outros organismos, na redução de resíduos químicos nos alimentos e no meio ambiente, na preservação dos inimigos naturais e no aumento da biodiversidade no ecossistema (LACEY *et al.*, 2001).

A mortalidade de *Ixodes ricinus* foi observada por SAMSINAKOVA (1957) quando avaliou a infecção natural por *Beauveria bassiana*. A mortalidade de colônias de carrapatos em laboratório por fungos também foi estudada por BOYCEV & RIZVANOV (1960) e por LIPA (1971) que isolou 15 fungos encontrados em ovos e larvas de carrapatos, o mesmo autor observou que *Aspergillus fumigatus* foi patogênico às teleóginas de *Hyalomma scupense* e *Dermacentor marginatus*, determinando a mortalidade no início ou no final da postura. Infecção natural foi observada em *Rhipicephalus sanguineus* por fungos (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 1990), registrada através de estudos histológicos, que a colonização do carrapato foi realizada via ânus, intestino e tubos de Malpighi, conseqüentemente impediu a oviposição, provocando a morte destes carrapatos e posterior mumificação.

A ocorrência de fungos entomopatogênicos sobre *I. ricinus*, foi demonstrada por KALSBEEK *et al.* (1995), os mesmos constataram que *Paecilomyces farinosus* e *Verticillium lecanii* foram as espécies mais dominantes, sendo registradas também, as espécies *B. bassiana*, *B. brongniartii*, e *V. araneorum*. Quanto a estação do ano, uma proporção elevada de carrapatos coletados no outono estavam infectados. ZHIOUA *et al.* (1999) isolaram dois fungos de fêmeas de *I. scapularis* coletadas do campo e identificaram estes isolados como *V. lecanii* e *Verticillium* sp., determinando uma prevalência de 4.3%.

A mortalidade e a redução na oviposição de fêmeas de *B. microplus* infectadas com *M. anisopliae* foi observada por MONTEIRO *et al.* (1998b). Já

FRAZZON *et al.* (2000) analisaram 12 isolados de *M. anisopliae* e determinaram a patogenicidade do isolado E6S1 para o *B. microplus* e concluíram que os isolados após passagem em carrapatos infectados experimentalmente são mais patogênicos, portanto, mais viáveis para seu emprego e controle biológico desse carrapato.

A patogenicidade de *B. bassiana* e de *M. anisopliae* sobre teleóginas de *R. sanguineus* de cães domiciliados do Semi-árido Paraibano, foi estudada *in vitro* por ATHAYDE *et al.* (1999a;b) que evidenciaram principalmente, a redução do peso da massa de ovos, a diminuição no período de postura, a diminuição no percentual de eclosão, a mortalidade larval entre 70% e 80% e o percentual de controle, em relação ao grupo tratado de 79,43% para *M. anisopliae* e 99,99% para *B. bassiana*.

Não há dúvida que o método de controle de carrapatos, que mais tem interesse biológico, na atualidade, é o uso de fungos (KAAYA & HASSAN, 2000; BITTENCOURT, 2000), por produzirem uma grande quantidade de esporos viáveis, dentre outros fatores.

## **2.2. *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* DRIVER; MILNER & TRUEMAN**

### **2.2.1. Aspectos da Taxonomia e da Biologia**

As espécies de fungos de maior interesse, que causam doenças nos insetos, pertencem à subdivisão Deuteromycotina, mais especificamente a classe Hyphomycetes (KENDRICK, 1981; ROBERTS & HUMBER, 1981). As espécies mais comuns estão nos gêneros: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomurae*, *Hirsutella*, *Paecilomyces*, *Verticillium* entre outros (LUNA-ALVES LIMA, 1989). *Metarhizium flavoviride* GAMS & ROZSYPAL se enquadrava nas categorias taxonômicas seguintes: Amastigomycota, Deuteromycotina, Hyphomycetes, Moniliales e Moniliaceae (ALEXOPOULOS & MIMS, 1979). Atualmente essa classificação artificial caiu em desuso e esses fungos apresentam durante o seu desenvolvimento apenas o ciclo assexual, sendo modernamente chamados de anamorfos.

O gênero *Metarhizium* Sorokin, segundo TULLOCH (1976) comporta duas espécies: *M. flavoviride* e *M. anisopliae*, esta última com duas variedades, as quais foram separadas pelo tamanho dos conídios; sendo, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, que apresenta conídios curtos que variam de 3,5 a 9,0 µm e *M. anisopliae* var. *majus* com conídios longos variando de 9,0 a 18,0 µm (VON ARX, 1981). Com o domínio das técnicas enzimáticas avançadas e da biologia molecular, tornou-se possível o estudo das características bioquímicas e moleculares, para auxiliar na taxonomia com base também, nas características morfológicas, de maneira que, este gênero consta de três espécies, *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *M. album* (RAKOTONIRAINY *et al.* 1994).

Novos métodos desenvolvidos para compreender a biologia desses fungos (INGLIS *et al.* 1999) demonstraram através da análise de PCR (AP-PCR/RAPD) que existe apenas uma pequena variação genética entre os isolados de *M. flavoviride*. No mesmo estudo apenas a não ambiguidade de *telomeric fingerprinting* diferenciou algumas linhagens deste fungo, de linhagens da África e da Austrália. Esta técnica estimou uma similaridade menor que 50% de DNA telomérico entre linhagens distintas, definindo que este locus é efetivamente mutável nesta espécie. Já DRIVER *et al.* (2000) através de técnicas moleculares de sequenciamento das regiões ITS e 28S rDNA D3 e do RAPD, confirmaram as três espécies para o gênero, ressaltando a predominância do *M. anisopliae*, no entanto foram reconhecidos quatro agrupamentos, dois compostos por *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus* e outros dois que foram descritos como novas variedades, baseado nas suas distintas sequências ITS, compostos por *M. anisopliae* var. *lepidiotum* e *M. anisopliae* var. *acridum* var. nov. O terceiro agrupamento representou duas novas variedades, *M. flavoviride* var. *novazealandicum* e *M. flavoviride* var. *pemphigum* var. nov., também baseado nas suas sequências ITS.

O *M. flavoviride* foi descrito pela primeira vez por GAMS & ROZSYPAL (1973) quando o isolaram de larvas e pupas de curculionídeos, *Ceutorrhynchus maculata-alba* e *C. albovittatus* e de solos cultivados na Europa; os conídios de linhagens

jovens mostravam-se tipicamente elipsóides, com 7-9 (-11) x 4,5-5,5 µm, apresentavam-se hialinos quando vistos isoladamente e a massa conidial apresentava coloração verde-amarelada a olivácea. ROMBACH *et al.* (1986) isolaram de gafanhotos uma nova variedade, na Ásia; o *M. flavoviride var. minus*, com base nos conidióforos ramificados, células conidiogênicas clavadas e longas cadeias de conídios elipsóides, semelhantes aos de *M. flavoviride* descrita por GAMS & ROZSYPAL (1973), mas que se diferenciava pela mensuração dos conídios (4,5-7 x 2-3 µm), de forma elipsóide a ovóide, hialinos, formando massa conidial verde-acinzentada quando mais velhos. No Brasil, MAGALHÃES *et al.* (1995) e MOREIRA *et al.* (1996) o isolaram do gafanhoto (*Schistocerca pallens*) na região Nordeste.

Estudos sobre os parâmetros nutricionais básicos de *M. flavoviride* demonstraram que, o mesmo necessita de uma fonte de carboidrato e de nitrogênio, para a produção de biomassa vegetativa (JENKINS & PRIOR, 1993). Durante a formação e crescimento dos conídios do fungo *M. flavoviride* em meio líquido simples contendo sacarose e extrato de levedura cinco isolados de *M. flavoviride*, hospedeiros de acridídios, produziram células esporógenas e esporos indistinguíveis morfológicamente de fiálides aéreas e conídios.

A redução e viabilidade de conídios estocados em diferentes óleos vegetais e minerais à temperatura de 25°C, foi verificada por STATHERS *et al.* (1993). A temperatura acima de 40°C causava retardamento na germinação e na morte dos conídios (Mc CLATCHIE *et al.*, 1994). No entanto foi constatado que os conídios produzidos a 30°C eram mais tolerantes às altas temperaturas do que os produzidos a 26°C. Resultados semelhantes foram encontrados por XAVIER-SANTOS *et al.* (1999) quando trabalharam com a linhagem brasileira CG423 de *M. flavoviride*. OUEDRAOGO *et al.* (1997) observaram que entre 22 isolados de *M. anisopliae* e 14 de *M. flavoviride*, a maioria cresceu entre 11 e 32°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento para o *M. flavoviride* ficou entre 25 e 32°C e concluíram que os isolados desse fungo são muitos resistentes às altas temperaturas.

Outros fatores abióticos são de interesse da biologia de fungos e FARIA *et al.* (1998) avaliaram o efeito do teor de água em conídios de *M. flavoviride*, armazenados sob a forma de pó e em formulações de óleos vegetais e minerais. Os autores demonstraram a importância da secagem dos conídios visando, o armazenamento de fungos por longos períodos, haja vista que os conídios secos apresentaram viabilidade de 60% nas duas formulações. Enquanto HONG *et al.* (1998) observaram uma relação semi-logarítmica negativa entre a longevidade conidial e equilíbrio da umidade relativa em *M. flavoviride* estocado a 50°C. No modelo, cada redução de 11-2% dentro de uma média de 10-7 a 80% do equilíbrio da umidade relativa dobrou a longevidade conidial.

A linhagem de *M. flavoviride* BR em cultivo de 18 dias em meio BDA natural a temperatura ambiente foi estudada por FERREIRA (2000) que observou a coloração esverdeada, a conidiação abundante, o aspecto pulverulento formado por zonas concêntricas de diferentes densidades de esporulação e condição 100% uninucleada dos conídios. Ainda analisou o crescimento e a condição nuclear de *M. flavoviride* em meio de cultura e substratos naturais diferentes e observou que em BDA (Oxoid) o crescimento foi de 5,03 cm a temperatura ambiente e de 4,02 cm a temperatura de 25°C. Em BDA confeccionado a partir de batatinha (170g) o crescimento foi de 6,80 cm a temperatura ambiente e de 5,36 cm a temperatura de 25°C. O fungo apresentou viabilidade de 97,85% em milho de munguzá, sobressaindo-se dos demais substratos .

Os efeitos da luz natural e da luz artificial, por ultravioleta(uv) sobre a germinação de *M. flavoviride* foi estudado por MOORE *et al.* (1996) que verificaram que a luz natural causou mais danos na germinação devido provavelmente a dose de UV ser maior na luz natural em relação a luz artificial. KUKLINSKY-SOBRAL (1999) analisou a variabilidade genética natural e induzida do *M. flavoviride* e observou que este fungo é muito resistente às irradiações ultravioleta, ultrapassando a dose de 300 J/m<sup>2</sup> preestabelecida para *M. anisopliae* (LUNA-ALVES LIMA, 1985).

O crescimento e a esporulação de *M. flavoviride* var. *flavoviride* foram estudadas por ONOFRE *et al.* (2001) quando determinaram que as melhores condições foram obtidas tanto no meio de cultura BDA quanto no meio completo (MC) quando combinados com o regime de luz claro contínuo à temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Também estudos sobre a compatibilidade química com o fungicida Manzate e com os inseticidas Decis e Cipermetrin, foram analisados e nenhum efeito fungitóxico foi observado com doses inferiores a  $500\mu\text{g/mL}$  do fungicida, assim como, não foi observada também toxicidade dos inseticidas nas doses inferiores a  $500\mu\text{g/mL}$  para o Decis e a  $3000\mu\text{g/mL}$  para o Cipermetrin (PEDROZA & SILVA, 1999).

### **2.2.2. Potencial para o Controle Biológico**

A patogenicidade a insetos relacionada com a produção de toxinas foi observada por KODAIRA (1962) que isolou pela primeira vez de *M. anisopliae* duas substâncias tóxicas, a destruxinas A e B. *M. flavoviride* não é conhecido como produtor de destruxinas, mas um isolado produz um par de diterpinas derivadas de gama-pironas polissubstituídas, as viridoxinas, que exibem atividade inseticida contra o besouro da batata do Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*. São toxinas altamente efetivas e específicas contra insetos (GUPTA *et al.*, 1993) e sugere também que a atividade enzimática de fungos entomopatogênicos é um fator que interfere na determinação da virulência (GUPTA *et al.*, 1994).

Os Deuteromicetos entomopatogênicos penetram no tegumento do hospedeiro através da epicutícula e procutícula e no processo de penetração estão envolvidos digestão enzimática e pressão mecânica, afirmaram MEDELIN *et al.* (1966). ALVES (1998b) observou que a morte do inseto ocorre devido à produção de micotoxinas. Citou ainda, patologia na hemocele, ação histolítica e bloqueio mecânico do aparelho digestivo no crescimento micelial, durante a fase invasiva do fungo no interior do hospedeiro.

Vários são os mecanismos envolvidos na patogenicidade de fungos sobre os insetos. No ciclo das relações fungo-hospedeiro, mais especificamente, quando da infecção, estão envolvidas as seguintes fases: adesão; germinação sobre o inseto, com formação do tubo germinativo; formação de apressórios; penetração; colonização; reprodução do patógeno; disseminação do fungo; produção de enzimas e produção de toxinas conforme cita ALVES (1998b).

Pastos tratados com altas dosagens do fungo *M. flavoviride* foram observados por MOORE *et al.* (1992) e constataram que ocasionava em 24h uma diminuição diária do consumo pelos gafanhotos e a morte sobrevinha entre cinco a 14 dias. O mesmo fungo vem sendo estudado e testado contra várias espécies de insetos (MAGALHÃES *et al.* 1995). Atualmente é considerado o fungo de maior grau de infectividade e patogenicidade contra gafanhotos (GOETTEL *et al.* 1995; BLANFORD & THOMAS, 2001).

Nos gafanhotos se observa o fenômeno da termorregulação fisiológica (metabólica), com funções diversas, entre elas a de defesa às infecções (WHITMAN, 1988). INGLIS *et al.* (1997) demonstraram que o aumento da temperatura corporal pelos gafanhotos (*Melanopus sanguinipes*) é menos inibitória para *M. flavoviride*. Em estudo da oscilação da temperatura sobre a infecção competitiva e colonização de gafanhotos por *B. bassiana* e *M. flavoviride*, INGLIS *et al.* (1999) determinaram que *M. flavoviride* se sobressai em relação ao *B. bassiana*, principalmente quando a temperatura aumenta.

A termorregulação em acridídeos de clima tropical em resposta a uma infecção fúngica foi demonstrada por BLANFORD *et al.* (1998) sob condições naturais. A temperatura ótima de *Odaleus senegalensis* foi de 39°C; e para aqueles infectados por *M. flavoviride*, essa temperatura foi de aproximadamente 42°C.

O emprego de insetos estressados (DONEGAN & LIGHTHART, 1988) e a ausência de restrições ambientais ao desenvolvimento do patógeno (ROBERTS &

CAMPBELL, 1977), podem igualmente resultar em infecções que nas situações reais não ocorreriam ou que poderiam acontecer em intensidade consideravelmente menor.

As formulações de conídios de *M. flavoviride*, em óleo são mais eficazes em condições de baixa umidade, concluíram BATEMAN *et al.* (1993) e constataram também que a dose letal (DL<sub>50</sub>) requerida é menor do que nas formulações à base de água. BATEMAN *et al.* (1998) examinaram dois métodos de transferência de doses de micoinseticida a base de *M. flavoviride*, um por contato direto e outro por resíduos na vegetação, sobre o *Schistocerca gregaria* e concluíram que não houve diferença significativa no período de sobrevivência dos gafanhotos entre os tratamentos.

Estudos com duas diferentes doses de *M. anisopliae* var *acridum*, para análise do efeito sobre a sobrevivência e o potencial reprodutivo de *S. gregaria*, sob condições favoráveis e não favoráveis a termorregulação foram realizadas por BLANFORD & THOMAS (2001) os quais concluíram que a taxa de mortalidade variou de >90% após 10 dias, sob temperatura constante para 66%, após 70 dias sob condições ótimas de termorregulação. Não foi observada diferença significativa entre os insetos controle e os tratados quanto ao potencial reprodutivo.

Recentemente vem se testando experimentalmente o *M. anisopliae* var. *acridum* para o controle de carrapatos mas especificamente, sobre *B. microplus* (ATHAYDE *et al.* 2001 , ATHAYDE, 2002) e *R. sanguineus* (SANTOS *et al.* 2001), com resultados eficientes e estimulantes para produção massal.

### **2.2.3. Compatibilidade Química de Fungos Entomopatogênicos com Acaricidas Químicos**

Os agentes químicos empregados no controle de carrapatos são formulados à base de Organofosforados, Arsenicais, Organoclorados, Amidina, Formamidina,

Piretróides e Avermectinas, sob as formas de emulsão para o banho de imersão ou pulverização, suspensão e solução para aplicação subcutânea. O uso desses agentes é feito sem orientação incorrendo em erros de formulação e manuseio, favorecendo ao aparecimento de cepas de carrapatos resistentes, a ecotoxicidade, ressaltando ainda, a persistência de resíduos em subprodutos de origem animal (GRISSI & SCOTT, 1991; GRISSI *et al.* 1991).

Os organofosforados com atividade inseticida são considerados pouco persistentes no ambiente, sendo degradados no período entre uma a duas semanas (AGUIRRE, 2000).

Atualmente os piretróides são bastante utilizados no controle do carrapato bovino. São classificados como não persistentes para o meio ambiente. A absorção pelo organismo ocorre principalmente pelas vias orais, intragástrica, dérmica e inalatória. Dependendo do grau de exposição, os animais intoxicados podem apresentar sintomas como sialorréia e êmese, hiperexcitabilidade, tremores, convulsões, dispnéia, fraqueza, prostração e morte, sendo os sintomas iniciados depois de poucos minutos ou horas de exposição, dependendo da via de absorção (OSWEILER, 1998).

O conceito de Manejo Integrado de Pragas é baseado na exploração efetiva de agentes de mortalidade naturais e introduzidos, que sejam capazes de manter as espécies de pragas em densidades economicamente aceitáveis. A presença de patógenos de insetos-praga num ecossistema é importante, no entanto, sua eficácia depende da compatibilidade com os outros componentes deste sistema, determinando assim a eficácia do seu uso em programas de manejo de pragas (JAQUES & MORRIS, 1981). O sucesso no controle de carrapatos será viável através dos programas de controle integrado eficazes e duradouros (MWANGI *et al.* 1991).

Vários organismos entomopatogênicos, assim como o *M. flavoviride*, são utilizados no Controle Biológico. No entanto, testes laboratoriais têm demonstrado

que os fungos são afetados de formas adversas por fungicidas e fungistáticos mas, não por todos os inseticidas (RAMARAJEH *et al.* 1967; OLMERT & KENNETH, 1974; IGNOFFO *et al.* 1975; JAQUES & MORRIS, 1981; JAROS-SU *et al.* 1999; KUKLINSKY-SOBRAL *et al.* 1999).

Os fungicidas que inibem o crescimento de fungos entomopatogênicos, em testes *in vitro*, incluem: Benomyl, Maneb, Zineb, Captan, Ferbam, Chlorothalonil e Mancozeb. Os inseticidas são: Methyl Parathion, Phenthoate, Chlordane, Lindane e Toxaphene. O Benomyl e o Maneb têm sido considerados os produtos inibitórios mais efetivos contra vários fungos (WILDING, 1972; OLMERT & KENNETH, 1974; IGNOFFO *et al.* 1975; MERRIAM & AXTELL, 1983; MOHAMED *et al.*, 1987; TODOROVA *et al.* 1998).

Os pesticidas mais compatíveis com *B. bassiana* foram , Dinocap, Daconil e Diflubenzuron (OLMERT & KENNETH, 1974; DELGADO *et al.* 1999); Carbaryl, Carbofuran, DDT, Endrin, Naptalam, Trifluram em *Nomuraea rileyi* (IGNOFFO *et al.* 1975); Binapacryl e Daconil em *V. lecanii* (OLMERT & KENNETH, 1974); com *M. anisopliae* foram Pyrethrin, Permethrin, Resmethrin, Diflubenzuron e Methoprene (MOHAMED *et al.* 1987).

Os produtos fungicidas geralmente inibem os fungos entomopatogênicos enquanto que a maioria dos inseticidas testados são compatíveis ou estimulantes. A combinação de inseticidas com fungos entomopatogênicos matará mais insetos e de forma mais rápida (JAQUES & MORRIS, 1981).

Estudos sobre a sensibilidade de *B. bassiana* a herbicidas foram realizados por GARDNER & STOREY (1985) que ressaltaram a ocorrência de inibição na germinação, sem afetar o crescimento micelial ,caracterizando uma atividade fúngica que poderá ter um impacto benéfico na epizootilogia do fungo, agindo como um fator de preservação do inóculo infectivo.

Dose superior a recomendada para aplicação no campo foi testada por MOHAMED *et al.* (1987) que constataram também que o crescimento micelial do *M. anisopliae* foi compatível com todos os inseticidas, Organofosforados, Carbamatos, Piretróides, Hidrocarbonetos Clorados e por produtos reguladores do crescimento de insetos e observaram que a germinação conidial foi sensível a esses inseticidas.

*B. bassiana* e *M. anisopliae* foram incubados em várias doses de acaricidas organofosforados por mais de 120 horas e os dois fungos mantiveram o crescimento e as características morfológicas normais KAAYA *et al.* (1996). TODOROVA *et al.* (1998) demonstrou *in vitro* a inibição do crescimento *B. bassiana* por fungicidas e herbicidas. LECUONA (1999) concluíram que Deltametrina, Cipermetrina, Carbaril, Metamidofós, Clorpirifós, Triclorfon e Parathion apresentaram ação fungistática sobre *B. bassiana*

Aplicações de *B. bassiana* 20-28 horas após o tratamento químico, não demonstraram 100% de mortalidade de conídios com nenhum dos fungicidas testados por LORIA *et al.* (1983). LECUONA (1999) observou que existe um efeito da dose assim como também, um comportamento diferencial entre os inseticidas e a linhagem considerada. A aplicação de inseticidas tem que ser feita após um planejamento efetivo para evitar a interferência nas epizootias naturais e na eficácia dos fungos (MOHAMED *et al.* 1987), quando empregado nos programas de Controle Biológico.

Conídios de *B. bassiana* formulados em óleo mineral com o formulado de Diflubenzuron e Fenitrothion contra populações de gafanhotos foram testadas por ONSAGER & SWEARINGER (1999) e constataram que em 14 dias de tratamento as populações de gafanhotos diminuíram em 38,1% na área tratada com *B. bassiana*, 29,4% em áreas tratadas somente com Diflubenzuron, e 55,6% em áreas tratadas com *B. bassiana* mais Diflubenzuron. O efeito da combinação de Diflubenzuron e *B. bassiana* foram aditivo e não sinérgico. Na área com Fenitrothion, após uma dose de 95,5% dentro das primeiras 48 horas após o tratamento, as populações de

gafanhotos aumentaram a uma taxa de 12,4% por dia no resto do período de 14 dias, enquanto a densidade em outras áreas tratadas continuaram a diminuir.

Os fungos para serem utilizados no controle microbiano de insetos na forma de inseticidas biológicos, precisam estar disponíveis em grande quantidade. Os insetos, normalmente, necessitam de elevado potencial de inóculo para serem colonizados por esses patógenos e por isso, para que eles atuem como inseticidas microbianos, e sejam eficientes independentemente da densidade populacional dos insetos, altas doses por hectare devem ser empregadas. Se o fungo se estabelecer na forma de colonização, as doses poderão ser mais baixas, o suficiente para a formação de focos primários, importantes para a ocorrência das doenças. O controle microbiano deve visar o estabelecimento enzoótico do patógeno, para que o mesmo possa contribuir com outros métodos, para a manutenção de pragas ao nível não econômico, dentro dos conceitos atuais de manejo de pragas segundo ALVES (1998b).

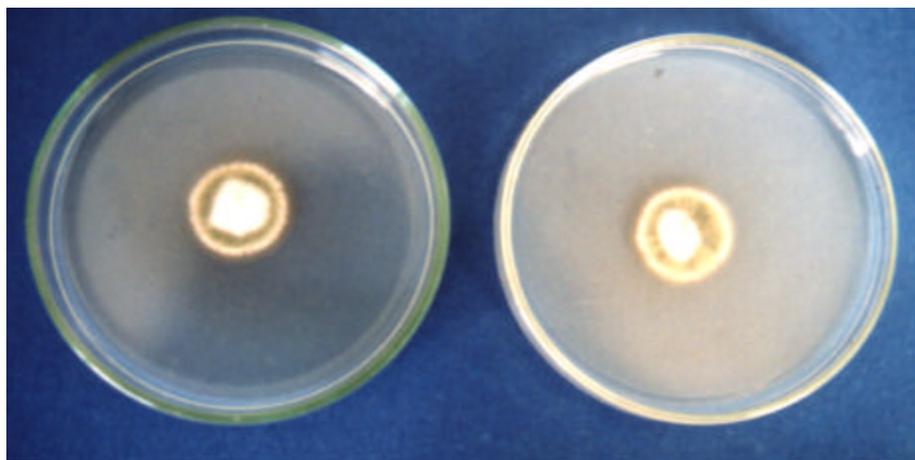
### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Local de Realização do Experimento

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco.

#### 3.2. Material Fúngico

A linhagem *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* CG423 foi isolada do gafanhoto *Schistocerca pallens* (Orthoptera: Acrididae), no Rio Grande do Norte-Brasil e foi cedida da Coleção de Cultura de Fungos Entomopatôgenicos do CENARGEN/EMBRAPA e está depositada na Micoteca (URM), no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco ( Figura 1).



**FIGURA 1.** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* com 12 dias de cultivo em meio BDA.

### 3.3. Princípios Ativos Utilizados

Amitraz 12,5%<sup>1</sup> - grupo químico: Amidina

Cipermetrina High Cis Técnica 100<sup>2</sup> 10% - grupo químico: Piretróide

### 3.4. Concentrações Utilizadas

Os carrapaticidas foram diluídos em água destilada, e as concentrações trabalhadas foram: 0,20µg; 0,50µg; 1,00µg; 2,00µg; 5,00µg e 10,00µg, as quais corresponderam a 0,2 mL; 0,5 mL; 1,0mL; 2,0 mL; 5,0mL; 10,0 mL do produto Amitraz e 0,25 mL; 0,62 mL; 1,25 mL; 2,5 mL; 6,25 mL; 12,5 mL do produto Cipermetrina High Cis Técnica 100, para cada 125 mL de meio BDA (batata-dextrose-ágar).

### 3.5. Meio de Cultura e Soluções Utilizadas

#### 3.5.1. Batata-Dextrose-Ágar (BDA) OXOID

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Batata-dextrose-ágar | 39,00g    |
| Água destilada       | 1000,00mL |

#### 3.5.2. Solução de Albumina

|                |         |
|----------------|---------|
| Clara de ovo   | 5,00mL  |
| Água destilada | 95,00mL |

---

<sup>1</sup> Triatox-COOPERS BRASIL LTDA

<sup>2</sup> Ectomin- FORT DODGE Saúde Animal LTDA

### 3.5.3. Solução Tween 80 (0.1% v/v)

|                 |          |
|-----------------|----------|
| <i>Tween 80</i> | 0,10mL   |
| Água destilada  | 100,00mL |

### 3.5.4. Solução de NaOH 1N

|                |           |
|----------------|-----------|
| NaOH           | 40,00g    |
| Água destilada | 1000,00mL |

### 3.5.5. Solução de HCl 1N

|                |           |
|----------------|-----------|
| HCl            | 85,00mL   |
| Água destilada | 1000,00mL |

### 3.5.6. Solução Tampão Fosfato

#### **Solução A**

|  |           |
|--|-----------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O | 3,73g     |
| Água destilada   | 1000,00mL |

#### **Solução B**

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 2,40g     |
| Água destilada                  | 1000,00mL |

### 3.5.7. Solução Corante de HCl Giemsa

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Solução estoque Giemsa (M) | 1,00mL  |
| Solução tampão fosfato     | 10,00mL |

### **3.6. Manutenção da Cultura**

A linhagem foi repicada para o meio BDA contido em tubos de ensaio, onde a cultura permaneceu a temperatura ambiente (30°C) durante 12 dias e em seguida foi acondicionada em refrigerador a 4°C.

### **3.7. Efeito de Carrapaticidas sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acridum***

#### **3.7.1. Germinação Conidial em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas**

Uma alçada da linhagem crescida em meio BDA e meio BDA mais carrapaticida foi transferida para tubos de ensaio com 10 mL de solução *Tween 80*. A suspensão foi agitada por aproximadamente 2 minutos em Vortex. Em seguida com o auxílio de uma pipeta graduada foi transferido 1mL para um tubo de ensaio contendo 9mL de água destilada e autoclavada mais a dose preestabelecida do carrapaticida. Estes tubos foram incubados durante 1 hora em BOD a  $28\pm 1^\circ\text{C}$ ; após o tratamento 0,1mL do conteúdo dos tubos foi semeado em placas contendo 20mL de BDA com o auxílio de uma alça de Drigalsky, e para o grupo controle foi semeado 0,1mL da suspensão de esporos não tratada com o carrapaticida. Após 17 horas da inoculação, leituras foram realizadas diretamente ao microscópio onde foram contados 500 conídios por placa, em três placas. Em vários campos de uma mesma placa foram contados conídios germinados e não germinados em faixas que correspondem ao diâmetro vertical e horizontal do campo. O conídio considerado germinado, é aquele cujo tubo germinativo se apresenta maior do que um terço do tamanho do conídio.

##### **3.7.1.1. Cálculo para Germinação de Conídios**

A germinação de conídios foi calculada pela fórmula:

$$G = \frac{n \times 100}{1500} = \% \text{ germinação}$$

Onde: 1500 conídios = total de conídios germinados e não germinados

**n** = total de conídios germinados

**G** = porcentagem de germinação

### **3.7.2. Crescimento Linear em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas**

O experimento foi conduzido à temperatura ambiente de 30°C, onde foram realizados seis tratamentos os quais corresponderam às concentrações preestabelecidas.

Uma alçada da linhagem, foi transferida para o centro das placas de Petri contendo meio BDA e de outras contendo meio BDA mais carrapaticida, com cinco repetições e o controle para cada tratamento. Posteriormente foi realizada a mensuração das colônias nas placas de Petri com o auxílio de uma régua milimetrada em intervalo de 3, 6 e 12 dias pós inoculação.

### **3.7.3. Esporulação em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas**

Uma alçada da linhagem crescida em meio BDA e meio BDA mais carrapaticida foi transferida para tubos de ensaio com 10 mL de solução *Tween 80*. A suspensão foi agitada por aproximadamente 2 minutos em Vortex. Em seguida com o auxílio de uma pipeta de Pasteur foi transferida uma alíquota da suspensão para a câmara de Neübauer onde foi realizada a quantificação de conídios.

### 3.7.4. Determinação da Toxicidade

Para avaliar a toxicidade dos produtos químicos sobre *M. anisopliae* var. *acridum* foi utilizado o modelo de classificação proposto por ALVES *et al.* (1998):

$$T = \frac{20 (CV) + 80 (ESP.)}{100}$$

**T** = valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para a classificação do produto químico.

**CV** = % de crescimento vegetativo com relação à testemunha.

**ESP.** = % de esporulação com relação à testemunha.

### 3.7.5. Condição Nuclear de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

A condição nuclear foi observada através da técnica de coloração de HCl-Giemsa (LUNA-ALVES LIMA & AZEVEDO, 1983).

### 3.8. Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado com dados submetidos a análise de variância e comparação das médias pelo Teste de Tukey a 5% (FINNEY, 1971; PIMENTEL-GOMES, 1984).

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Efeito de Carrapaticidas sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*

#### 4.1.1. Germinação Conidial em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas

O efeito dos carrapaticidas sobre a germinação de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* estão descritos na Tabela I e os dados originais encontram-se na Tabela I do anexo. Não foi observada diferença significativa entre as concentrações testadas do carrapaticida Cipermetrina High Cis Técnica 100 (CHC) quanto ao percentual de germinação, no entanto, as concentrações 0,50µg, 1,00µg e 2,00µg do carrapaticida Amitraz diferiram das concentrações 0,20µg, 5,00µg e 10,00µg. Os carrapaticidas testados apresentaram diferenças significativas nas concentrações 0,20µg, 0,50µg, 5,00µg e 10,00µg. O menor percentual de germinação foi obtido nas concentrações 0,20µg (49,50%) e 10,00µg (51,06%) quando foi utilizado o carrapaticida Amitraz.

**TABELA I.** Germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* com 17 horas de cultivo em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz em relação ao grupo controle.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (µg)            |          |          |         |          |         |
|---------|------------------------------|----------|----------|---------|----------|---------|
|         | 0,20                         | 0,50     | 1,00     | 2,00    | 5,00     | 10,00   |
|         | PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO (%) |          |          |         |          |         |
| CHC     | 99,44aA                      | 76,95bA  | 101,02aA | 84,94Aa | 98,34aA  | 89,21aA |
| AMITRAZ | 49,50bC                      | 100,62aA | 89,02aAB | 98,92aA | 58,07bBC | 51,06bC |

CV=16,11%

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey (P>0,05).

Os dados obtidos com o carrapaticida Amitraz estão de acordo com os resultados conseguidos por MOHAMED *et al.* (1987) que testaram o efeito de vários inseticidas sobre a germinação do *M. anisopliae* e constataram que o inseticida

Malathion foi mais inibitório para este parâmetro. Os resultados observados com o carrapaticida Amitraz diferiram dos obtidos por PACHAMUTHU & KAMBLE (1998) que estudaram a compatibilidade de *M. anisopliae* e afirmaram que os inseticidas Clorpirifós e Propetamfós nas concentrações de 500, 50, 5 e 0,5 ppm e Ciflutrin nas concentrações 50; 5; 0,5 e 0,05 ppm não inibiram a germinação de *M. anisopliae*. Os resultados obtidos com o produto Cipermetrina neste trabalho sobre *M. anisopliae* var. *acidum* demonstraram que as concentrações não diferiram entre si em relação ao percentual de germinação. Estes dados discordam dos obtidos por ATHAYDE (2002) que observou o percentual de germinação de conídios em meios com os carrapaticidas Diclorvos e Cipermetrina e constatou que todas as concentrações utilizadas diferiram do controle, e que todas as concentrações utilizadas do produto Cipermetrina se comportaram de forma diferenciada em relação ao controle e diferiram entre si. O menor percentual obtido foi de 81,04% na concentração de 10,00µg do produto Cipermetrina.

#### **4.1.2. Crescimento Linear em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas**

Os dados referentes a ação dos carrapaticidas sobre o percentual de crescimento de *M. anisopliae* var. *acidum*, são mostrados nas Tabelas II; III e IV e os dados originais encontram-se nas Tabelas II, III e IV do anexo. A concentração 0,50µg do carrapaticida CHC em relação ao percentual de crescimento de *M. anisopliae* var. *acidum* no 3º dia de cultivo diferiu da concentração 5,00µg, e as demais concentrações não apresentaram diferenças significativas. O carrapaticida Amitraz também não apresentou diferenças entre concentrações. Entre os carrapaticidas CHC e Amitraz foram observadas diferenças nas concentrações 0,50µg e 10,00µg. O menor percentual de crescimento foi observado na concentração 0,50µg (66,67%) do carrapaticida CHC (Tabela II).

**TABELA II.** Diâmetro da colônia de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 3º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (µg)             |          |           |          |          |          |
|---------|-------------------------------|----------|-----------|----------|----------|----------|
|         | 0,20                          | 0,50     | 1,00      | 2,00     | 5,00     | 10,00    |
|         | PERCENTUAL DE CRESCIMENTO (%) |          |           |          |          |          |
| CHC     | 79,45aAB                      | 66,67bB  | 103,03aAB | 74,71aAB | 124,07aA | 79,31bAB |
| Amitraz | 92,85aA                       | 104,17aA | 123,80aA  | 88,23aA  | 110,42aA | 121,63aA |

CV=20,42%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05)

Com relação ao percentual de crescimento (Tabela III) do 6º dia de cultivo, a concentração 2,00 µg do carrapaticida CHC diferiu das concentrações 1,00 µg e 5,00 µg. No carrapaticida Amitraz não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações. Entre os carrapaticidas CHC e Amitraz as concentrações 0,50 µg e 5,00 µg apresentaram diferenças significativas. O menor percentual de crescimento do fungo foi observado na concentração 2,00 µg do carrapaticida CHC.

**TABELA III.** Diâmetro da colônia de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 6º dia de cultivo.

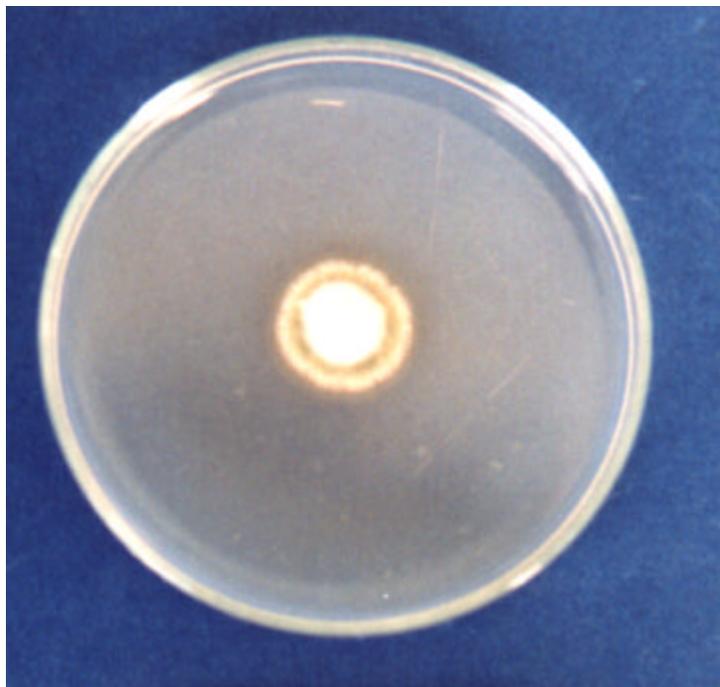
| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (µg)             |          |           |         |          |            |
|---------|-------------------------------|----------|-----------|---------|----------|------------|
|         | 0,20                          | 0,50     | 1,00      | 2,00    | 5,00     | 10,00      |
|         | PERCENTUAL DE CRESCIMENTO (%) |          |           |         |          |            |
| CHC     | 94,17aABC                     | 87,59bBC | 119,79aAB | 82,64aC | 124,24aA | 100,00aABC |
| Amitraz | 98,96aA                       | 116,66aA | 110,18aA  | 89,47aA | 86,67bA  | 99,09aA    |

CV= 13,91%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05)

A concentração 0,50µg do carrapaticida CHC em relação ao percentual de crescimento no 12º dia de cultivo (Tabela IV; Figura 2) diferiu das concentrações 1,00µg, 5,00µg e 10,00µg. O carrapaticida Amitraz não apresentou diferenças significativas entre as concentrações. As mesmas apresentaram diferenças com

relação aos carrapaticidas. O menor percentual de crescimento do fungo foi observado na concentração de 2,00 $\mu$ g do carrapaticida Amitraz (Figura 3).



**FIGURA 2.** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA mais Cipermetrina High Cis Técnica 100 na concentração de 0,50 $\mu$ g no 12<sup>o</sup> dia de cultivo.



**FIGURA 3.** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA mais Amitraz na concentração de 2,00 $\mu$ g no 12<sup>o</sup> dia de cultivo.

**TABELA IV.** Diâmetro da colônia de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 12<sup>o</sup> dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO ( $\mu$ g)       |          |           |           |          |           |
|---------|-------------------------------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|
|         | 0,20                          | 0,50     | 1,00      | 2,00      | 5,00     | 10,00     |
|         | PERCENTUAL DE CRESCIMENTO (%) |          |           |           |          |           |
| CHC     | 110,53aCD                     | 101,75aD | 159,46aAB | 104,16cdA | 168,57aA | 134,06aBC |
| Amitraz | 110,37aA                      | 113,72aA | 97,08bA   | 89,02aA   | 91,46bA  | 97,99bA   |

CV=10,68%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05)

O crescimento de *M. anisopliae* var. *acridum* quando associado com carrapaticidas não foi afetado, discordando de MOHAMED *et al.* (1987) que observaram que os inseticidas Chlorpyrifos, Lindane, Carboforan, Methomil e Oxamil foram moderadamente tóxicos ao crescimento de *M. anisopliae*. GARDNER &

STOREY (1985) ressaltaram que quando o herbicida não afeta o crescimento caracteriza um impacto benéfico na epizootiologia do fungo entomopatogênico, agindo como um fator de preservação do inóculo infectivo, dados estes que corroboram com os obtidos no trabalho.

A compatibilidade de *M. anisopliae* var. *acidum* com carrapaticidas, também foi observada por KAYA *et al.* (1996) em estudos da patogenicidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* quando analisaram a compatibilidade dos fungos com acaricidas organofosforados e observaram que eles mantiveram o crescimento e as características morfológicas, dados que corroboram com os obtidos neste trabalho. O mesmo não foi observado por LECUONA & DIAZ (1996); TODOROVA *et al.* (1998) e LECUONA (1999) ao testarem a compatibilidade de *B. bassiana* aos princípios ativos: Deltametrina, Cipermetrina, Carbaril, Metamidofós, Clorpirifós, Triclorfon e Parathion, os quais tiveram efeito fungistático para *B. bassiana* o que discorda dos resultados observados neste trabalho. PACHAMUTHU & KAMBLE (1998) estudando a compatibilidade de *M. anisopliae* determinaram que o inseticida Clorpirifós nas concentrações de 50 e 500 ppm e Propetamfós na concentração de 500 ppm reduziu o crescimento do fungo, resultados que diferiram dos obtidos no presente trabalho.

Os resultados obtidos com o carrapaticida CHC confirmaram os dados observados por ATHAYDE (2002) que analisou o crescimento de *M. anisopliae* em meio BDA mais carrapaticida e constatou que no percentual de crescimento em relação ao controle não houve diferença entre as concentrações testadas para o produto Diclorvos e que o produto Cipermetrina apresentou o menor percentual de crescimento (49,23%) na concentração de 10,00µg, diferindo no entanto com relação a concentração que apresentou o menor percentual de crescimento neste trabalho, o qual foi observado na concentração de 0,50µg (66,67%) no terceiro de cultivo.

#### 4.1.3. Esporulação em BDA com Diferentes Concentrações de Carrapaticidas

O comportamento de *M. anisopliae* var. *acidum* quanto ao percentual de esporulação está descrito nas Tabelas V, VI e VII e dados originais encontram-se nas Tabelas V, VI e VII do anexo. O percentual de esporulação no 3º dia de cultivo (Tabela V) apresentou diferença significativa entre a concentração 0,50µg e as concentrações 0,20µg, 1,00µg, 5,00µg e 10,00µg do carrapaticida CHC. No acaricida Amitraz a concentração 10,00µg diferiu das demais concentrações. Os carrapaticidas diferiram nas concentrações 0,20µg, 1,00µg e 5,00µg. Na concentração 0,50µg do carrapaticida CHC o fungo apresentou o menor percentual de esporulação (62,65%).

**TABELA V.** Esporulação de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 3º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (µg)             |         |           |           |          |            |
|---------|-------------------------------|---------|-----------|-----------|----------|------------|
|         | 0,20                          | 0,50    | 1,00      | 2,00      | 5,00     | 10,00      |
|         | PERCENTUAL DE ESPORULAÇÃO (%) |         |           |           |          |            |
| CHC     | 411,17aAB                     | 62,65aD | 251,69aBC | 178,53Acd | 587,54aA | 373,99aABC |
| Amitraz | 104,10bB                      | 90,08aB | 109,39bB  | 115,70aB  | 93,70bB  | 344,48aA   |

CV=18,34

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $P>0,05$ ). Dados transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

O carrapaticida CHC não apresentou diferenças significativas entre as concentrações no 6º dia de cultivo (Tabela VI). O carrapaticida Amitraz na concentração 2,00µg diferiu das concentrações 0,20µg, 1,00µg e 10,00µg e a concentração de 10,00µg diferiu ainda, da concentração de 5,00µg. Com relação aos carrapaticidas CHC e a Amitraz foram observadas diferenças nas concentrações 2,00µg e 10,00µg. O fungo apresentou o menor percentual de esporulação na concentração 10,00µg (33,35%) em meio com o carrapaticida Amitraz.

**TABELA VI.** Esporulação de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 6º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (µg)             |            |           |          |           |                       |
|---------|-------------------------------|------------|-----------|----------|-----------|-----------------------|
|         | 0,20                          | 0,50       | 1,00      | 2,00     | 5,00      | 10,00                 |
|         | PERCENTUAL DE ESPORULAÇÃO (%) |            |           |          |           |                       |
| CHC     | 120,64aA                      | 91,09aA    | 66,51aA   | 85,22Ba  | 238,60aA  | 194,87 <sup>a</sup> A |
| Amitraz | 104,63aBC                     | 167,57aABC | 106,42aBC | 425,61aA | 275,16aAB | 33,35bC               |

CV=25,78%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Dados transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

No percentual de esporulação do 12º dia de cultivo (Tabela VII) não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações dos carrapaticidas CHC e Amitraz. Com relação aos carrapaticidas testados também não foram observadas diferenças. O menor percentual de esporulação do fungo foi verificado na concentração 0,20µg (75,84%) do carrapaticida CHC e o maior percentual foi observado na concentração 2,00µg (177,97%) do carrapaticida Amitraz.

**TABELA VII.** Esporulação de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz no 12º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (µg)             |          |          |          |          |                       |
|---------|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------------------|
|         | 0,20                          | 0,50     | 1,00     | 2,00     | 5,00     | 10,00                 |
|         | PERCENTUAL DE ESPORULAÇÃO (%) |          |          |          |          |                       |
| CHC     | 75,84aA                       | 156,70aA | 142,87aA | 101,50Aa | 135,38aA | 141,97 <sup>a</sup> A |
| Amitraz | 84,50aA                       | 101,35aA | 81,04aA  | 177,97aA | 86,12aA  | 81,61aA               |

CV=19,72%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Dados transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

O piretróide utilizado (CHC) e o Amitraz (amidina) não inibiram a esporulação nas concentrações testadas, discordando dos resultados obtidos por MOHAMED *et al.* (1987) quando determinaram a inibição da esporulação do isolado E<sub>9</sub> do *M. anisopliae* var. *anisopliae* pelo Chlorpyrifos, Temefós, Malation, Leptofós, Carbofuran, Methomyl e Oxamyl; e confirmando os resultados referentes aos Piretróides (Pyrethrin, Permethrin e Resmethrin) e aos reguladores do crescimento

dos insetos (Diflubenzuron e Methoprene) os quais não foram inibitórios para os vários estágios de desenvolvimento do isolado. PACHAMUTHU & KAMBLE (1998) estudando a compatibilidade de *M. anisopliae* determinaram que os inseticidas Clorpirifós nas concentrações de 50 e 500ppm e Propetamfós na concentração de 500ppm afetaram significativamente a esporulação do fungo, resultados que diferiram dos obtidos no presente trabalho. LECUONA (1999) também, determinaram a ação inibitória de produtos químicos sobre a esporulação de fungos entomopatógenos ressaltando a existência de um efeito da dose assim como um comportamento diferencial entre os inseticidas e a linhagem considerada. Os resultados obtidos corroboram, também, com os de JAROS-SU *et al.* (1999) quando observaram que os fungicidas testados não apresentaram efeitos significativos sobre a esporulação de *B. bassiana* em cadáveres de insetos no campo; um dado importante que sugere a aplicação do fungo em consorciação com os produtos químicos. Os resultados diferiram de ATHAYDE (2002) que ao testar o Diclorvos e a Cipermetrina, afirmou que os carrapaticidas tiveram uma ação inibitória sobre *M. anisopliae*.

#### **4.1.4. Toxicidade de Carrapaticidas Químicos em Diferentes Concentrações**

O efeito tóxico de CHC e Amitraz sobre *M. anisopliae* var. *acridum* está descrito nas Tabelas VIII; IX e X. A concentração 0,50µg do carrapaticida CHC diferiu das concentrações 0,20 µg, 1,00µg, 5,00µg e 10,00µg com relação ao percentual de toxicidade no 3º dia de cultivo (Tabela VIII). A concentração 10,00µg do carrapaticida Amitraz diferiu das demais concentrações. Entre os carrapaticidas foram verificadas diferenças significativas nas concentrações 0,20µg, 1,00µg e 5,00µg. O menor percentual de toxicidade foi observado na concentração 0,50µg (63,58%) e o maior percentual na concentração 5,00µg (495,60%) no carrapaticida CHC.

**TABELA VIII.** Toxicidade de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz com diferentes concentrações em BDA sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* no 3º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (µg)            |         |           |           |          |            |
|---------|------------------------------|---------|-----------|-----------|----------|------------|
|         | 0,20                         | 0,50    | 1,00      | 2,00      | 5,00     | 10,00      |
|         | PERCENTUAL DE TOXICIDADE (%) |         |           |           |          |            |
| CHC     | 344,92.aAB                   | 63,58aD | 221,90aBC | 158,29Acd | 495,60aA | 315,22aABC |
| Amitraz | 103,55bB                     | 93,23aB | 120,78bB  | 92,42aB   | 107,01bB | 300,77aA   |

CV=16,37%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Dados transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

No percentual de toxicidade no 6º dia de cultivo (Tabela IX) as concentrações do carrapaticida CHC não apresentaram diferenças significativas. No carrapaticida Amitraz a concentração 2,00µg diferiu das concentrações 0,20µg, 1,00µg e 10,00µg esta última diferiu também da concentração 5,00µg. Entre os carrapaticidas foram observadas diferenças nas concentrações 2,00µg e 10,00µg. O menor percentual de toxicidade foi observado na concentração 10,00µg (46,98%) no carrapaticida Amitraz e o maior percentual foi verificado na concentração 2,00µg (359,05%) do mesmo carrapaticida.

**TABELA IX.** Toxicidade de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz com diferentes concentrações em BDA sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* no 6º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (µg)            |            |           |          |           |          |
|---------|------------------------------|------------|-----------|----------|-----------|----------|
|         | 0,20                         | 0,50       | 1,00      | 2,00     | 5,00      | 10,00    |
|         | PERCENTUAL DE TOXICIDADE (%) |            |           |          |           |          |
| CHC     | 116,12.aA                    | 91,59aA    | 78,00aA   | 105,35Ba | 216,88aA  | 176,83aA |
| Amitraz | 104,41aBC                    | 157,43aABC | 107,67aBC | 359,05aA | 238,67aAB | 46,98bC  |

CV=22,14%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Dados transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

Em ambos os carrapaticidas não foram verificadas diferenças significativas entre as concentrações do percentual de toxicidade do 12º dia de cultivo do fungo (Tabela X). A concentração 1,00µg diferiu das demais concentrações com relação aos carrapaticidas testados. O menor percentual de toxicidade foi observado na

concentração 0,20µg (82,99%) do carrapaticida CHC e o maior percentual foi verificado na concentração 2,00µg (163,55%) do carrapaticida Amitraz.

**TABELA X.** Toxicidade de Cipermetrina High Cis Técnica 100 e Amitraz com diferentes concentrações em BDA sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* no 12º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (µg)            |          |          |          |          |          |
|---------|------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|         | 0,20                         | 0,50     | 1,00     | 2,00     | 5,00     | 10,00    |
|         | PERCENTUAL DE TOXICIDADE (%) |          |          |          |          |          |
| CHC     | 82,99.aA                     | 145,72aA | 146,92aA | 101,93Aa | 132,24aA | 141,57aA |
| Amitraz | 91,00aA                      | 103,88aA | 85,19bA  | 163,55aA | 86,02aA  | 85,09aA  |

CV=15,49%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05). Dados transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

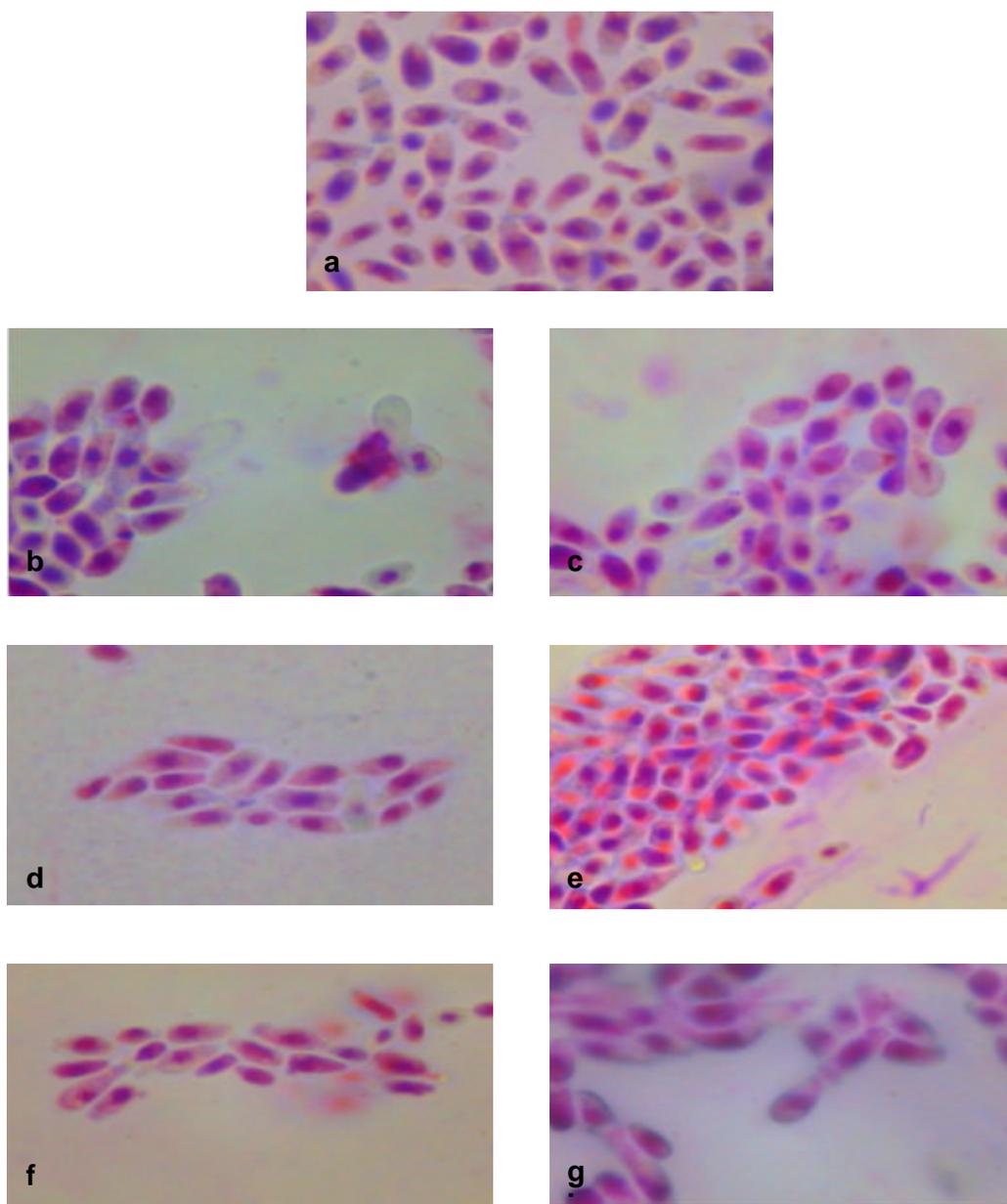
Não foi observada ação tóxica dos carrapaticidas testados sobre o *M. anisopliae* var. *acridum*, com exceção do Amitraz na concentração de 10,00 µg, resultados que confirmam os dados obtidos por PEDROZA & SILVA (1999) que avaliaram a compatibilidade de fungicidas Manzate e dos inseticidas Decis e Cipermetrina com *M. flavoviride* determinando que baixas concentrações dos produtos testados não causaram efeitos fungitóxicos, o que viabiliza a utilização do fungo em consorciação com o inseticida.

A toxicidade obtida de 46,98% na concentração de 10,00 µg de Amitraz no 6º dia de cultivo, segundo a metodologia utilizada (ALVES *et al.*, 1998b), determina que o produto é moderadamente tóxico. ATHAYDE (2002) obteve toxicidade 52,14% com a Cipermetrina na concentração de 10,00 µg sobre *M. anisopliae* e o classificou também de moderadamente tóxico.

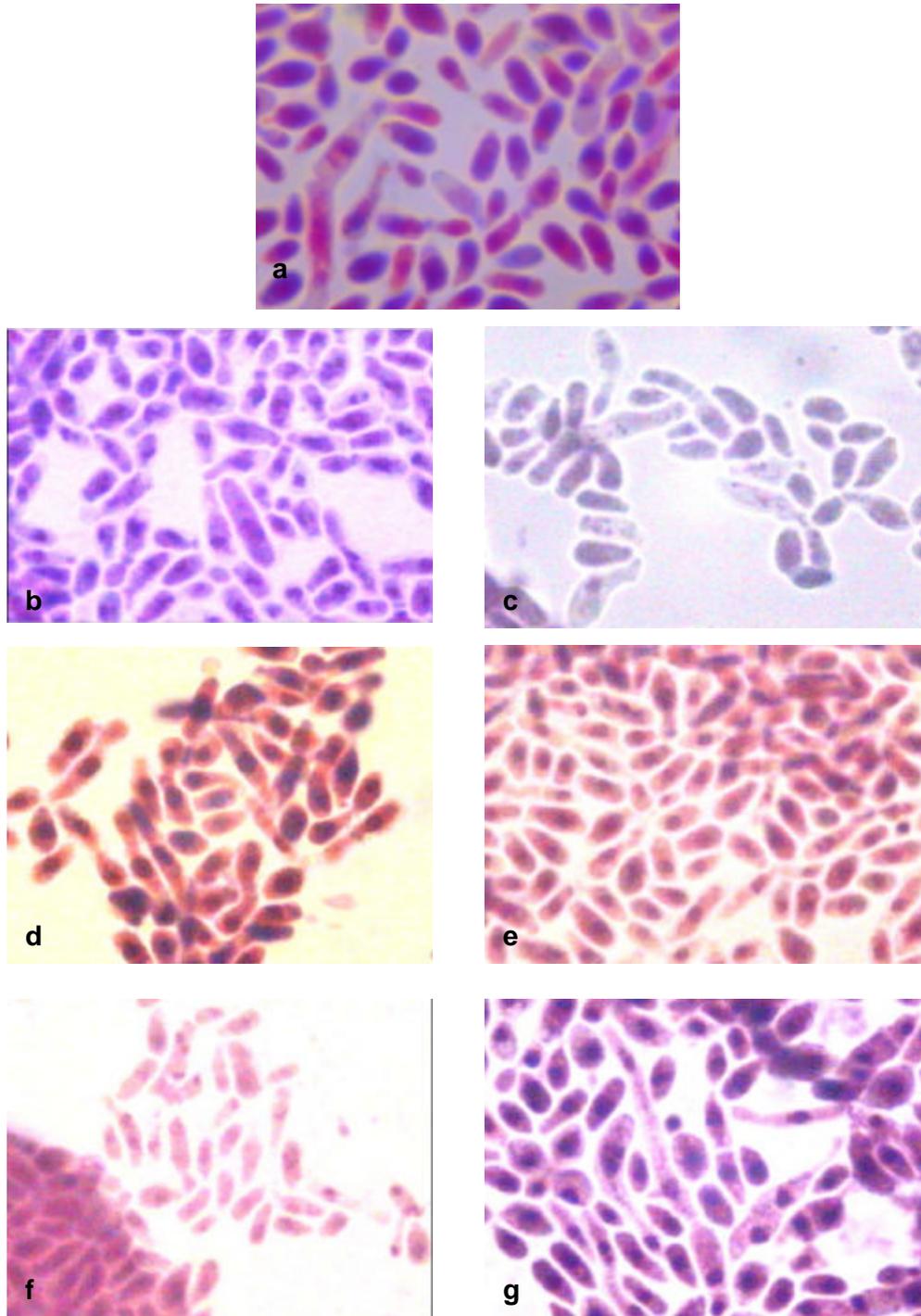
#### **4.1.5. Condição Nuclear de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* após Cultivo em BDA mais Carrapaticidas**

Os carrapaticidas Cipermetrina e Amitraz não induziram alterações na condição nuclear de *M. anisopliae* var. *acridum* (Figuras 4 e 5) mostrando sua condição uninucleada.

Os estudos *in vitro* dos efeitos causados pelos principais patógenos isolados em carrapatos já foram realizados. Nesses trabalhos, verificou-se que os fungos são os agentes de controle biológico mais promissores, devido ao seu mecanismo de penetração via cutícula. A justificativa para esta afirmação é a de que os carrapatos são artrópodes hematófagos, o que dificulta a utilização de patógenos que atuam por via oral (bactérias e vírus). Outra vantagem a ser atribuída aos fungos seria a sua capacidade de multiplicação e dispersão no meio ambiente através de carrapatos infectados e presentes no solo, assumindo um caráter enzoótico, além da sua capacidade de causar epizootias em determinadas circunstâncias (BITTENCOURT,2000).



**FIGURA 4.** Condição nuclear de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* após cultivo em BDA mais Amitraz (coloração em HCl-Giemsa 640X). **a-** Linhagem selvagem de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, conídios uninucleados. **b-** 0,20 µg (48h); **c-** 0,20 µg (72h); **d-** 0,50 µg (48h); **e-** 1,00 µg (48h); **f-** 1,00 µg (72h); **g-** 2,00 µg (48h);



**FIGURA 5.** Condição nuclear de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* após cultivo em BDA mais Cipermetrina High Cis Técnica 100 (coloração em HCl-Giemsa 640X). a- Linhagem selvagem de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, conídios uninucleados. b- 0,20 µg (48h); c- 0,20 µg (72h); d- 0,50 µg (48h); e- 0,50 µg (72h); f- 1,00 µg (72h); g- 2,00 µg (48h).

## 5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos possibilitaram as seguintes conclusões:

- O carrapaticida Amitraz inibiu a germinação de *M. anisopliae* var. *acridum* nas concentrações 0,20µg; 5,00µg e 10,00µg, diminuiu a esporulação na concentração 10,00µg após seis dias de cultivo e o crescimento linear foi estimulado em todas as concentrações utilizadas.
- O carrapaticida Cipermetrina High Cis Técnica 100 estimulou a germinação de *M. anisopliae* var. *acridum* nas concentrações utilizadas, diminuiu o crescimento linear e a esporulação na concentração 0,50µg após três dias de cultivo.
- O carrapaticida Amitraz foi considerado moderadamente tóxico ao *M. anisopliae* var. *acridum* na concentração 10,00µg após seis dias de cultivo.
- Os dois carrapaticidas testados não produziram alterações culturais em *M. anisopliae* var. *acridum* após 12 dias de cultivo, nas concentrações testadas
- O Cipermetrina High Cis Técnica 100 e o Amitraz não induziram alterações na condição nuclear de *M. anisopliae* var. *acridum*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, D. H. Susceptibility to two pyrethroids in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) populations of northwest Argentina: preliminary results. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p. 329-334, 2000.

ALEXOPOULOS, C. J. & MIMS, C. W. **Introduction Mycology**. New York : John Wiley, 1979. 632p.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: S. B. Alves (ed) **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo. Ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.289-305.

ALVES, S. B.; MOINO Jr., A. & ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: S. B. Alves (ed) **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo. Ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.217-238.

ATHAYDE, A. C. R. **Patogenicidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* sobre ovos, larvas e teleóginas de *Boophilus microplus* da região Semi-árida Paraibana**. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas-UFPE. 138p. 2002.

ATHAYDE, A. C. R.; BARRETO, C. A. & LUNA-ALVES LIMA, E. A. Efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* do semi-árido Paraibano-PB. In: XI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. II SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL. I SIMPÓSIO DE CONTROLE INTEGRADO DE PARASITOS DE BOVINOS, XI, 1999, Salvador. **Anais...** Bahia: Universidade Estadual de Santa Cruz, 1999a. p. 95.

ATHAYDE, A. C. R. ; BARRETO, C.A. & LIMA, E. A. L. A. Efeito de *Beauveria bassiana* sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* do semi-árido Paraibano-PB. In: XI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, II SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL E I SIMPÓSIO DE CONTROLE INTEGRADO DE PARASITOS DE BOVINOS, XI, 1999, Salvador-BA. **Anais...** Bahia: Universidade Estadual de Santa Cruz, 1999b. p. 96.

ATHAYDE, A. C. R.; FERREIRA, U. L. & LUNA-ALVES LIMA, E. A. Fungos entomopatogênicos: uma alternativa para o controle do carrapato bovino - *Boophilus microplus*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.21, p.12-15, 2001.

AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: UFG, 1998. 490p.

BATEMAN, R. P.; CAREY, M.; MOORE, D. & PRIOR, C. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. **Annals of Applied Biology**, v.122, p. 145-152, 1993.

BATEMAN, R. P.; DOURO-KPINDOU, O. K.; KOOYMAN, C. & LOMER, C. OUAMBAMA. Some observations on the dose transfer of mycoinsecticide sprays to desert locusts. **CROP PROTECTION**, v. 17, p. 151-158, 1998.

BAXTER, G. D.; GREEN, P.; STUTTGEN, M. & BARKER, S. C. Detecting resistance to organophosphates and carbamates in the cattle tick *Boophilus microplus*, with a propoxur-based biochemical test. **Experimental Applied Acarology**, v. 23, p. 907-14, 1999.

BELLOWS, T. S. Restoring population balance through natural enemy introductions. **Biological Control**, v. 21, p. 199-205, 2001.

BEUGNET, F.; COSTA, R. & CHARDONNET, L. Adaptations des methodes de lutte contre les tiques a l'extension du phenomene chimioresistance: exemple de *Boophilus microplus* em Nouvelle – Caledonie. **Revue de Medecine Veterinaire**. 1994, v. 145; p. 931-940.

BITTENCOURT, V. R. Trials to control South American ticks with entomopathogenic fungi. **Annals of N Y Academy of Science**, v. 916, p. 555-558, 2000.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; SOUZA, E. J.; PERALVA, S. L. F. S. & REIS, R. C. S. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.21, p.78-82, 1999.

BLANFORD, S. & THOMAS, M. B Adult survival, maturation, and reproduction of the Desert Locust *Schistocerca gregaria* infected with fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 1-8, 2001.

BLANFORD, S.; THOMAS, M. B. & LANGEWALD, J. Behavioural fever in the Senegalese grasshopper, *Oedaleus senegalensis*, and its implications for biological control using pathogens. **Ecological Entomology**, v. 23, p. 9-14, 1998.

BOYCEV, D. & RIZVANOV, K. Relation of *Botrytis cinerea* to ixodids ticks. **Zoologie Zeitschrift Ukranien**, n. 39, p. 460, 1960.

CORDOVÉS, C. O. **Carrapato: Controle ou Erradicação**. 2.ed. Guaíba: Agropecuária,1997. 176p.

DELGADO, F. X.; BRITTON, J. H.; ONSAGER, J. A. & SWEARINGEN, W. Field assesment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of savana grasshopper complex (orthoptera) in Mali. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p.34-39, 1999.

DE CASTRO, J. J. & NEWSON, R. M. Host resistance in cattle tick control. **Parasitology**, ,9, p. 13-17, 1993.

DONEGAN, K. & LIGHTHART, B. Effects of several stress factors on the susceptibility of the predatory insect, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.54, p.79-84, 1988.

DRIVER, F.; MILNER, R. F. & TRUEMAN, W. H. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequence data. **Mycological Research**, v. 104, p. 134-150, 2000.

ESTRADA-PEÑA, A.; GONZALES, J. & CASOLAS, A. The activity of *Aspergillus ohraceus* (Fungi) on replete females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in natural and experimental condicions. **Folia Parasitologica**, v.37, p. 331-336, 1990.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. & FRAZÃO, H. P. S. Efeito do teor de água na viabilidade de conídios do fungo *Metarhizium flavoviride* In:VI SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, VI, 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1998. p. 7.

FARIAS, N. A. R. Situacion de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* en la región sur de Rio Grande del Sul, Brasil. In: IV SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, IV, 1999, Puerto Vallarta, Jalisco. **Anais...** México, 1999. p. 25-31.

FAUST, E. C. & JUNG, E. C. **Animal Agents and Vectors of Human Disease**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.45-48, 1975.

FERREIRA, U. L. **Crescimento e condição nuclear de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* em meio de cultura e substratos naturais diferentes**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) Departamento de Micologia-UFPE, 68p. 2000.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. 3<sup>th</sup>. Cambridge: University Press, 1971. p.333.

FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p.57-71, 1999.

FRAZZON, A. P.; da SILVA VAZ JÚNIOR, I.; MASUDA, A.; SCHRANK, A. & VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 117-125, 2000.

GAMS, W. & ROZSYPAL, J. *Metarhizium flavoviride* n. sp. isolated from insects and soil. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 22, p. 518-521, 1973.

GARDNER, W. A. & STOREY, G. K. Sensivity of *Beauveria bassiana* to selected herbicides. **Journal of Economic Entomology**, v. 78, p. 1275-1279, 1985.

GOETTEL, M. S.; JOHONSON, D. L. & INGLIS, G. D. The role of fungi in the control of grasshoppers. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. S71-S75, 1995.

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

GRISI, L. & SCOTT, F. B. Eficácia comparativa a nível de campo dos piretróides tralometrina e deltametrina, no controle de *Boophilus microplus* em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, p. 20, 1991.

GRISI, L., SCOTT, F. B. & COMENDOURO, S. Eficácia a nível de campo do produto Pouracide pour-on no controle de *Boophilus microplus* em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, p. 21, 1991.

GUPTA, S.; LEAHERS, T. D.; EL-SAYED, G. & IGNOFFO, C. M. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 13-17, 1994.

GUPTA, S.; KRASNOFF, S. B.; RENWICK, J. A. A.; ROBERTS, D. W. STEINER, J. R. & CLARDY, J. Viridoxins A and B: Novel toxins from the fungus *Metarhizium flavoviride*. **Journal of the Organization of Chemistry**, v. 58, p. 1062-1067, 1993.

HASSAN, S. M.; DIPEOLU, O. O.; AMOO, A. O. & ODHIAMBO, T. R. Predation on livestock ticks by chickens. **Veterinary Parasitology**, v.38, p.199-204, 1991.

HONG, T. D.; JENKINS, N. E.; ELLIS, R. H & MOORE, D. Limits to the negative logarithmic relationship between moisture contents and longevity in conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Annals of Botany**. v. 81, p. 625-630, 1998.

HOOGSTRAAL, H. **Ticks**. In: S. M. GAAFAR; W. E. HOWARD & R. E. MARSH. Eds. Parasites, pests and predators. Netherlandes: Elsevier, 1985. 575p.

HORN, S. C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos, Brasil, 1983. **Boletim de Defesa Sanitária Animal (No. Especial)**, Ministério da Agricultura, Brasília, DF, 1985. 83p.

HORN, S. C. Ectoparasites of animals and their impact on the economy of South America. In: **World Veterinary Congress, Proceedings 23 Montreal**, 1987.

IGNOFFO, C. M.; HOSTETTER, D. L.; GARCIA, C. & PINNELL, R. E. Sensivity of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. **Environmental Entomology**, v. 4, p. 765-768, 1975.

INGLIS, G. D.; GRANT, M. D.; KAWCHUK, L. M. & GOETTEL, M. S. Influence os ocillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory Grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. **Biological Control**, v. 14, p. 11-120, 1999.

INGLIS, G. D.; JOHNSON, D. L.; CHENG, K. J. & GOETTEL, M. S. Use of pathogen combinations to overcome the constraints of temperature on entomopathogenic Hyphomycetes against grasshoppers. **Biological Control**, v.8, p. 143-152, 1997.

JAKUES, R. P. & MORRIS, O. N. : Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops. In: H. D. Burgess (ed) **Microbiol Control of Diseases** 1970-1980. Academic Press Inc, New York, p. 695-715. 1981.

JAROS-SU, J.; GRODEN, E. & ZHANG, J. Effects of selected fungicides and the timing of fungicide application on *Beauveria bassiana* induced mortality of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Biological Control**, v. 15, p. 259-269. 1999.

JENKINS, N. E. & PRIOR, C. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride*, in a simple liquid medium. **Mycological Research**, v. 97, p.1489-1494, 1993.

JONSSON, N. N.; MAYER, D. G. & GREEN, P. E. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 88, p.79-92, 2000.

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

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

KAY, B. H. & KEMP, D. H. Vaccines against arthropods. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 50, p. 87-96, 1994.

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

KENDRICK, W. B. The systematics of Hyphomycetes. In: G. T. Cole & W. B. Kendrick. **Biology of conidial fungi**. New York: Academic Press, 1981. v. 1, p. 21-42.

KHALAF-ALLAH, S. S. Control of *Boophilus microplus* ticks in cattle calves by immunization with a recombinant Bm86 glucoprotein antigen preparation. **DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v.106, p. 248-251, 1999.

KODAIRA, Y. Studies on the new toxic substances to insects destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I. Isolation and purification of destruxin A and B. **Agricola Biological Chemistry**, v. 26, p. 36-42, 1962.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. **Variabilidade genética por regeneração de protoplastos e sensibilidade a fungicidas em *Metarhizium flavoviride*** Recife, 1999. 94f. Dissertação (Mestrado em Genética), UFPE, 1999.

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

LECUONA, R. E. Control microbiano com hongos entomopatógenos en la Argentina. **Revista de la Sociedad Entomologica Argentina**, v. 58, p. 301-306, 1999.

LECUONA, R. E. & DIAZ, B. M. Compatibilidad de dos cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* com distintos insecticidas quimicos. **RIA**, v. 26 p.77-82, 1996.

LIPA, J. J. Microbial control of mites and ticks. In:H. D. BURGESS, & N. W. HUSSEY. **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1971. p.357-374.

LORIA, R. S.; GALAINI, S. & ROBERTS, D. W. Survival of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as influenced by fungicides. **Environmental Entomology**, v. 12, p. 1724-1726. 1983.

LUGURU, S. M.; BANDA, D. S. & PEGRAM, R. G. Susceptibility of ticks to acaricides in Zambia. **Tropical Animal Health and production**. 1984, V. 16, p. 21-26, 1984.

LUNA-ALVES LIMA, E. A. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Mestsc) Sorokin. Rio de Janeiro, 1985. 260p. Tese (Doutorado), UFRJ. 1985.

LUNA-ALVES LIMA, E. A. Aspectos Taxonômicos e Citológicos de Hyphomycetes (Deuteromycotina) entomopatogênicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 17-20, 1989.

LUNA-ALVES LIMA, E. A. & AZEVEDO, J. L. Técnicas para coloração nuclear em estruturas vegetativas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. **Boletim do Grupo de pesquisadores de Controle Biológico**, Brasília, v. 4, p. 20-21, 1983.

MAGALHÃES, B.; FARIA, M.; TIGANO, M. & SOBRAL, B. *Metarhizium flavoviride*, a pathogen of grasshoppers in Brazil, p.41. In: Proceedings Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology, 28, 75p. 1995.

MATTHEWSON, M. D. The future of tick control: a review of the chemical and non chemical options. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 2, p. 559-568, 1984.

McCLATCHIE, G. V.; MOORE, D.; BATEMAN, R. P. & Prior, C. Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. **Mycological Research**, v.98, p.749 – 756, 1994.

MEDELIN, M. F. Fungal parasites of insects. **Annual Review of Entomology**, v. 8, p. 423-448, 1966.

MERRIAM, T. L. & AXTELL, R. C. Relative toxicity of certain pesticides to *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales), a fungal pathogen of mosquito larvae. **Environmental Entomology**, v. 12, p. 515-521, 1983.

MOHAMED, A. K. A.; PRATT, J. P. & NELSON, F. R. S. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* with chemical pesticides. **Mycopathologia**, v. 99, p. 99-105. 1987.

MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P. & DAEMON, E. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, p. 113-116. 1998a.

MONTEIRO, A. C. , FIORIN, A. C. & CORREIA, A. C. B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 109-112, 1998b.

MOORE, D.; REED, M.; PATOUREL, G. L.; ABRAHAM, Y. J. & PRIOR, C. Reduction of feeding by desert locust, *Schistocerca gregaria*, after infection with *Metarhizium flavoviride*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 304-307, 1992.

MOORE, D.; HIGGINS, P. M. & LOMER, C. J. Effects of simulated and natural sunlight on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and interactions with temperature. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p. 63-76, 1996.

MOREIRA, M. A. B.; MAGALHÃES, B. P.; VALADARES, M. C. C. & CHAGS, M. C. M. Occurrence of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Hyphomycetes) on *Schistocerca pallens* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) in Rio Grande do Norte, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica**, v. 25, p. 359-361, 1996.

MWANGI, E. N.; DIPEOLU, O. O.; NEWSON, R. M.; KAAYA, G. P. & HASSAN, S. M. Predators, parasitoids and pathogens of ticks: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 1, p. 147-156, 1991.

OLMERT, I. & KENNETH, R. G. Sensivity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, and *Verticillium* sp. to fungicides and insecticides. **Environmental Entomology** , v. 3, p. 33-38, 1974.

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N. M. & AZEVEDO, J. L. Grow and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimes. **Scientia Agrícola**, v. 58, p. 613-616, 2001.

ONSAGER, J. A.; SWEARINGEN, W. Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of savanna grasshopper complex (ORTHOPTERA) in Mali. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p. 34-39, 1999.

OSWEILER, G. D. **Toxicologia Veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998, 526p.

**ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE LA SALUD**. Ordenamiento del médio para la lucha antivectorial. Ginebra, 1980 ( Série de informes técnicos, 649).

OUEDRAOGO, A.; FARGUES, J.; GOETTEL, M. S. & LOMER, C. J. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Mycopathologia**, v. 137, p. 37-43, 1997.

PACHAMUTHU, P. & KAMBLE, S. T. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* strain ESC-1 to german cockroaches and its compatibility with insecticides. Disponível em: <<http://www.ent.iastate.edu/entsoc/ncb98/prog/abs/33.html>>. Acesso em:28/08/2000.

PEDROZA, M. L. V. & SILVA, J. C. Compatibilidade de alguns fungicidas e inseticidas em *Metarhizium anisopliae*. In: XIV ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, Recife, Brasil, p. 25, 1999.

PIMENTEL-GOMES, F. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. Piracicaba. Potafos. 160p. 1984.

RAKOTONIRAINY, M. S.; CRIOU, M. L.; BRYGOO, Y. & RIBA, G. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isozyme comparison. **Mycological Research**, v. 98, p. 225-230, 1994.

RAMARAJEH, U. N. V. & GOVINDO, H. C. Shivashandara Shankara Shastry K. S. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, p. 398-403, 1967.

RAMIREZ, F. Projeto de estudos de factibilidade para el control de la garrapata en Costa Rica. **Salva Animal - IICA**. Publicação Científica, n. 1, 1982.10p.

ROBERTS, D. W. & CAMPBELL, A. S. Stability of entomopathogenic fungi. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 10, p. 19-76, 1977.

ROBERTS, D. W. & HUMBER, R. A. Entomogenous fungi. In: G. T. Cole & W. B. Kendrick. **Biology of conidial fungi**. New York: Academic Press, 1981. v. 2, p. 201-229.

ROCHA, U. F. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). **Boletim Técnico da Faculdade Ciências Agrícolas e Veterinárias de Jaboticabal**, v. 3, p. 1-32, 1984.

ROMBACH, M. C.; HUMBER, R. A. & ROBERTS, D. W. *Metarhizium flavoviride* var. nov., a pathogen of plant and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. **Mycotaxon**, v. 27, p. 87-92, 1986.

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.

SAMSINAKOVA, A. *Beauveria globulifera* (Speg) Pic. Iako parazit klistete *Ixodes ricinus* L. **Zoologie Lisy**, v. 6, n. 4, p. 329-230, 1957.

SANTOS, A. L. L. dos. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, 1978. 148p. Dissertação (Mestrado), ESALQ/USP, 1978.

STATHERS, T. E.; MOORE, D. & PRIOR, C. The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p.111-115, 1993.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P.; CARDOZO, H.; PETRACCIA, C.; NARI, A. & SOLARI, M. A. Estudios de resistencia a acaricidas organofosforados del *Boophilus microplus* en el Uruguay. II estudio de la resistencia de una cepa de campo a los acaricidas organofosforados. *Veterinaria, Uruguay*. 1984, v. 20, p. 86-87, 1984.

TODOROVA, S. I.; CODERRE, D.; DUCHESNE, R. M. & CÔTÉ, J. C. Compatibility of *Beauveria bassiana* with selected fungicides and herbicides. **Environmental Entomology**, v. 27, p. 427-433, 1998.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions British Mycological Society**, v. 66, p. 407-411, 1976.

VAZ JÚNIOR, I. S.; TERMIGNONI, C.; MASUDA, A. & OLIVEIRA, P. Vacina contra Carrapato. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 13, p. 18-23, 2000.

VON ARX, J. A. VON. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. Vaduz: J. Cramer, 1981. 632p.

WAHARTON, R. H. Enfermedades del ganado transmitidas por las garrapatas y sus vectores. S. Resistência a los acaricidas. **World Animal Review, Food and Agriculture Organization (FAO)**. Roma, v. 36, p. 8-15, 1983.

WAHARTON, R. H. & UTECH, K. W. B. The engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrine) Proc. In: **CONGRESS ACAROLOGY 2nd. SUTTON BONINGTON** (England), 1967, 347-348 p. BUDAPEST: Akademiai Kiado, 1969.

WHITMAN, D. W. Function and evolution of thermoregulation in the desert grasshopper *Taeniopoda eques*. **Journal of Animal Ecology**, v. 57, p. 369-383, 1988.

WILDING, N. The effect of systemic fungicides on the aphid pathogen, *Cephalosporium aphidicola*. **Plant Pathology**, v. 21, p.137-139, 1972.

XAVIER-SANTOS, S; MAGALHÃES, B. & LUNA-ALVES LIMA, E. A. Differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride* (Hyphomycetes). **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 47-51, 1999.

ZHIOUA, E.; GINSBERG, H. S.; HUMBER, R. A. & LeBRUN, R. A. Preliminary survey for entomopathogenic fungi associated with *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in Souther New York and New England, USA. **Journal of Medical Entomology**, v. 36, p. 635-637. 1999.

## **7.ANEXOS**

**TABELA I.** Germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae var. acridum* com 17 horas de cultivo em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 (CHC) e Amitraz.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (mg) |         |         |         |         |          |         |
|---------|-------------------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|
|         | 0                 | 0,20    | 0,50    | 1,00    | 2,00    | 5,00     | 10,00   |
| CHC     | 68,27aA           | 67,27aA | 52,33aA | 68,87aA | 57,67aA | 66,93Aa  | 60,60aA |
| Amitraz | 61,20aAB          | 34,87bC | 71,40aA | 63,73aA | 70,67aA | 41,20Abc | 35,90bC |

CV=13,83%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

**TABELA II.** Diâmetro da colônia de *Metarhizium anisopliae var. acridum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 (CHC) e Amitraz no 3º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (mg) |         |        |         |         |         |         |
|---------|-------------------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
|         | 0                 | 0,20    | 0,50   | 1,00    | 2,00    | 5,00    | 10,00   |
| CHC     | 1,37aA            | 0,95aAB | 0,83aB | 1,13aAB | 1,08aAB | 1,12Aab | 1,15aAB |
| Amitraz | 0,82bA            | 0,65aA  | 0,83aA | 0,87aA  | 0,75bA  | 0,88Aa  | 0,80bA  |

CV=19,69%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

**TABELA III.** Diâmetro da colônia de *Metarhizium anisopliae var. acridum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 (CHC) e Amitraz no 6º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (mg) |        |        |        |        |        |                     |
|---------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------------|
|         | 0                 | 0,20   | 0,50   | 1,00   | 2,00   | 5,00   | 10,00               |
| CHC     | 2,22aA            | 1,88aA | 1,88aA | 1,87aA | 1,98aA | 2,05Aa | 2,10aA              |
| Amitraz | 1,90aA            | 1,58aA | 1,98aA | 1,98aA | 1,70aA | 1,73Aa | 1,83 <sup>a</sup> A |

CV=11,81%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

**TABELA IV.** Diâmetro da colônia de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 (CHC) e Amitraz no 12º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (mg) |        |        |        |        |        |         |
|---------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
|         | 0                 | 0,20   | 0,50   | 1,00   | 2,00   | 5,00   | 10,00   |
| CHC     | 2,75aA            | 2,90aA | 2,90aA | 2,94aA | 2,92aA | 2,95Aa | 3,08aAB |
| Amitraz | 4,08bA            | 2,75aA | 3,87aA | 4,12aA | 3,75aA | 3,20Aa | 3,90bA  |

CV=22,87%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

**TABELA V.** Esporulação ( $\times 10^6$  conídios/mL) de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 (CHC) e Amitraz no 3º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÕES (mg) |         |        |         |          |          |          |
|---------|--------------------|---------|--------|---------|----------|----------|----------|
|         | 0                  | 0,20    | 0,50   | 1,00    | 2,00     | 5,00     | 10,00    |
| CHC     | 5,78aB             | 14,39aA | 5,18aB | 9,12aAB | 11,39aAB | 10,31Aab | 10,75aAB |
| Amitraz | 2,86aB             | 3,95bAB | 2,94aB | 4,10bAB | 9,26aA   | 2,11Bb   | 6,04bBA  |

CV=16,02

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). Dados transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

**TABELA VI.** Esporulação ( $\times 10^6$  conídios/mL) de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 (CHC) e Amitraz no 6º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (mg) |         |         |         |         |         |        |
|---------|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
|         | 0                 | 0,20    | 0,50    | 1,00    | 2,00    | 5,00    | 10,00  |
| CHC     | 7,58aA            | 5,60aA  | 4,14bA  | 5,75bA  | 8,52bA  | 9,56Aa  | 7,57aA |
| Amitraz | 12,21aA           | 11,27aA | 16,34aA | 17,70aA | 20,23aA | 12,07Aa | 8,31aA |

CV=21,22%

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). Dados transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .

**TABELA VII.** Esporulação ( $\times 10^6$  conídios/mL) de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA com diferentes concentrações de Cipermetrina High Cis Técnica 100 (CHC) e Amitraz no 12º dia de cultivo.

| PRODUTO | CONCENTRAÇÃO (mg) |         |         |         |         |         |         |
|---------|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         | 0                 | 0,20    | 0,50    | 1,00    | 2,00    | 5,00    | 10,00   |
| CHC     | 5,99bA            | 4,74bA  | 7,25aA  | 5,37aA  | 4,83bA  | 8,88Aa  | 7,47aA  |
| Amitraz | 14,49aA           | 14,05aA | 12,80aA | 11,67aA | 18,63aA | 14,11Aa | 13,37aA |

CV=17,78

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey( $P>0,05$ ). Dados transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ .