

**FRANCIENE SANTOS BRIAND DO NASCIMENTO**

**AÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*,  
*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana* E  
PARÂMETROS BIOLÓGICOS APÓS PASSAGEM EM  
*Rhipicephalus sanguineus*.**

**RECIFE  
2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA**

**AÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*,  
*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana* E  
PARÂMETROS BIOLÓGICOS APÓS PASSAGEM EM  
*Rhipicephalus sanguineus*.**

**Orientanda: Franciene Santos Briand do Nascimento**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elza Áurea de Luna Alves Lima -UFPE**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Célia Rodrigues Athayde - UFPB**

**RECIFE -FEVEREIRO  
2003**

**FRANCIENE SANTOS BRIAND DO NASCIMENTO**

**AÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*,  
*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana* E  
PARÂMETROS BIOLÓGICOS APÓS PASSAGEM EM  
*Rhipicephalus sanguineus*.**

**Dissertação apresentada à pós-  
graduação em Biologia de Fungos  
do Centro de Ciências Biológica da  
Universidade Federal de  
Pernambuco, como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Biologia de Fungos.**

**ORIENTADORA:**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elza Áurea de Luna  
Alves Lima**

**CO-ORIENTADORA:**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Célia  
Rodrigues Athayde**

**RECIFE  
2003**

**FRANCIENE SANTOS BRIAND DO NASCIMENTO**

**AÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*,  
*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana* E  
PARÂMETROS BIOLÓGICOS APÓS PASSAGEM EM  
*Rhipicephalus sanguineus*.**

**Dissertação defendida e aprovada pela comissão examinadora:**

**Orientadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elza Áurea de Luna Alves Lima (Depto. de Micologia-UFPE)

**Examinadores:**

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neiva Tinti de Oliveira (Depto. de Micologia-UFPE)

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janete Magali de Araújo (Depto. de Antibióticos-UFPE)

**Suplente:**

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Laura Mesquita Paiva (Depto. de Micologia-UFPE)

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leonor Costa Maia (Depto. de Micologia-UFPE)

**Data de aprovação:**                    /                    /  
\_\_\_\_\_

**Dedico**  
**À minha família**  
**pela força e amor.**

"O mundo está nas  
mãos daqueles  
que têm coragem  
de sonhar e correr  
o risco de viver  
seus sonhos."

**SUMÁRIO**

Páginas

**AGRADECIMENTOS****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****RESUMO****ABSTRACT**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>03</b>
2.1 Histórico da Taxonomia de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin e <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin var. <i>acidum</i> Driver, Milner & Trumeman var. nov. e <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuillemin.	<b>03</b>
2.2 Aplicação no controle biológico e aspectos biológicos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i> e <i>Beauveria bassiana</i> .	<b>04</b>
2.2.1 <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<b>06</b>
2.2.2 <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	<b>09</b>
2.2.3 <i>Beauveria bassiana</i>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
3.1 Linhagens fúngicas	<b>15</b>
3.2 Meios de cultura e soluções empregadas	<b>15</b>
<b>3.2.1 Meios de cultura</b>	<b>15</b>
3.2.2 Soluções	<b>16</b>
3.3 Obtenção e desinfecção das teleóginas	<b>16</b>
3.3.1 Obtenção das teleóginas	<b>16</b>
3.3.2 Desinfecção das teleóginas	<b>17</b>

3.4	Quantificação do inóculo	17
3.5	Infecção das teleóginas	17
3.6	Parâmetros para avaliação biológica dos fungos sobre as teleóginas	17
3.7	Isolamento dos fungos das teleóginas infectadas	18
3.8	Análise dos fungos reisolados das fêmeas pós-infecção experimental	21
<b>3.8.1</b>	<b>Análise do comportamento dos fungos</b>	<b>21</b>
<b>3.9</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>24</b>
4.1	Parâmetros biológicos de teleóginas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infectadas pelos fungos	24
4.2	Parâmetros biológicos de ovos oriundos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infectadas pelos fungos	28
4.3	Comportamento dos fungos	30
<b>4.4</b>	<b>Observação microscópica</b>	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>53</b>

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

A minha família em especial a minha mãe Izaura Maria, pelo amor, compreensão.

A Gleyson José Fidelis Coelho pelo amor e carinho nos momentos difíceis.

A minha grande amiga Ginarajadaça Ferreira dos Santos pelo apoio e paciência nos momentos difíceis.

Ao Sr. Davi de Gentil de Oliveira e o Sr. Jonas Pereira e Oliveira Jr. pelo grande apoio que me foi prestado.

A minha orientadora Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima e Co-orientadora Dra. Ana Célia R. Athayde pela atenção, paciência, apoio e ensinamentos preciosos que servirão como um alicerce para minha carreira futura.

As meus colegas de laboratório Auristela Corrêa, Amélia Tavares, Maria do Livramento, Francisco Marlon e Fábio Marcondes pela força, apoio e excelente convívio.

A amiga Meiriane Xavier pela atenção e grande ajuda no escaneamento das fotografias.

Aos colegas de curso de pós-graduação, professores, serventes e servidores do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco pela boa convivência.

A professora Dra. Janete Magali de Araújo da Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco pela gentileza e apoio na realização das fotografias.

A professora Dra. Neiva Tinti de Oliveira pela compreensão dada por vários momentos.

A biblioteca do Centro de Ciências Biológicas e Biblioteca do Central pelo acesso as bibliografias.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuiriam para a realização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<b>FIGURA 1.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> infectando teleógina de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em BDA mais Cloranfenicol, aos 12 dias de crescimento a 27°C.	<b>19</b>
<b>FIGURA 2.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> infectando teleógina de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em BDA mais Cloranfenicol, aos 12 dias de crescimento a 27°C .	<b>19</b>
<b>FIGURA 3.</b> <i>Beauveria bassiana</i> infectando teleógina de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em BDA mais Cloranfenicol, aos 12 dias de crescimento a 27°C.	<b>20</b>
<b>FIGURA 4.</b> <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i> em BDA após 12 dias a 27°C.	<b>20</b>
<b>FIGURA 5.</b> Fêmea ingurgitada de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infectada por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> em BDA mais Cloranfenicol, ao 5º dia de crescimento a 27°C.	<b>27</b>
<b>FIGURA 6.</b> Fêmea ingurgitada de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infectada por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> em BDA mais Cloranfenicol, ao 5º dia de crescimento a 27°C.	<b>25</b>
<b>FIGURA 7.</b> Fêmea ingurgitada de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infectada por <i>Beauveria bassiana</i> em BDA mais Cloranfenicol, ao 5º dia de crescimento a 27°C.	<b>27</b>
<b>FIGURA 8.</b> Aspecto da colônia do <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisoliae</i> em BDA aos 12 dias a ± 28°C. (a) Controle e (b) <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisoliae</i> reisolado de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	<b>33</b>
<b>FIGURA 9.</b> Aspecto da colônia do <i>Metharizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> em BDA aos 12 dias a ± 28°C. (a) Controle e (b) <i>Metharizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> reisolado de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	<b>34</b>
<b>FIGURA 10.</b> Aspecto da colônia do <i>Beauveria bassiana</i> em BDA aos 12 dias a ± 28°C. (a) Controle e (b) <i>Beauveria bassiana</i> reisolado de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	<b>34</b>
<b>FIGURA 11.</b> Anastomoses (seta). <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> reisolado de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . 640X.	<b>36</b>
<b>FIGURA 12.</b> Formação de apressório (seta). <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> reisolado de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . 640X.	<b>36</b>

- FIGURA 13.** Conídios septados com germinação unipolar (seta a) e bipolar (seta b). *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*. 640X. 37
- FIGURA 14.** Conidióforo ramificado (seta) com conídios. *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*. 640X. 37
- FIGURA 15.** Primórdios de conidióforos (seta). *Beauveria bassiana* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*. 640X. 38
- FIGURA 16.** Conidióforo simples(seta). *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*. 640X. 38
- FIGURA 17.** Conidióforo e conídios em cachos. *Beauveria bassiana* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*. 640X. 39

## LISTA DE TABELAS

	Páginas
<b>TABELA I.</b> Origem das linhagens estudadas de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> e <i>Beauveria bassiana</i> .	15
<b>TABELA II.</b> Parâmetros biológicos das teleóginas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> após infecção por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> e <i>Beauveria bassiana</i> .	26
<b>TABELA III.</b> Parâmetros biológicos dos ovos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> após infecção por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> e <i>Beauveria bassiana</i> .	29
<b>TABELA IV.</b> Porcentagem de germinação de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> e <i>Beauveria bassiana</i> após isolamento de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	30
<b>TABELA V.</b> Esporulação de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> e <i>Beauveria bassiana</i> após reisolamento de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	31
<b>TABELA VI.</b> Número de colônia de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> e <i>Beauveria bassiana</i> após reisolamento de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	32
<b>TABELA VII.</b> Diâmetro da colônia de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> e <i>Beauveria bassiana</i> após reisolamento do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	33
<b>TABELA VIII.</b> Dados originais dos parâmetros biológicos das teleóginas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> inoculados com água destilada autoclavada.	54
<b>TABELA IX.</b> Dados originais dos parâmetros biológicos dos ovos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> inoculados com água destilada autoclavada .	54
<b>TABELA X.</b> Dados originais dos parâmetros biológicos das teleóginas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> após infecção por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> .	55
<b>TABELA XI.</b> Dados originais dos parâmetros biológicos dos ovos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> após infecção por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> .	55
<b>TABELA XII.</b> Dados originais dos parâmetros biológicos das teleóginas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> após infecção por <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i> .	56

- TABELA XIII.** Dados originais dos parâmetros biológicos dos ovos de *Rhipicephalus sanguineus* após infecção por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **56**
- TABELA XIV.** Dados originais dos parâmetros biológicos dos ovos de *Rhipicephalus sanguineus* após infecção por *Beauveria bassiana*. **57**
- TABELA XV.** Dados originais dos parâmetros biológicos dos ovos de *Rhipicephalus sanguineus* após infecção por *Beauveria bassiana*. **57**

## RESUMO

Os carrapatos são importantes vetores de doenças nas regiões tropicais e subtropicais. *Rhipicephalus sanguineus* é um ixodídeo causador de severa espoliação nos canídeos e vetor de doenças como as hematozooses (*Babesia canis*; *Ehrlichia canis*). Este trabalho avaliou a ação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Beauveria bassiana* sobre *R. sanguineus*, inoculados sob a forma de contato conidial seco e mantidos à temperatura ambiente de  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . Foi avaliado, também, o comportamento fúngico pós-infecção. A ação dos fungos estudados sobre *R. sanguineus* interferiu na média do peso da massa de ovos, ressaltando-se o tratamento com *M. anisopliae* var. *anisopliae* ( $0,054\text{g}_{\text{tratado}}$  e  $0,108\text{g}_{\text{controle}}$ ). A maior média do peso residual ocorreu no tratamento com *M. anisopliae* var. *anisopliae* ( $0,053\text{g}_{\text{tratado}}$  e  $0,022\text{g}_{\text{controle}}$ ). Para o período de pré-postura a menor média foi observada no tratamento com *M. anisopliae* var. *acridum* ( $4,50\text{dia}_{\text{tratado}}$  e  $5,20\text{dia}_{\text{controle}}$ ). O período de postura no grupo tratado com *M. anisopliae* var. *anisopliae* alcançou a menor média ( $9,14\text{dia}_{\text{tratado}}$  e  $11,80\text{dia}_{\text{controle}}$ ). O menor índice de produção médio de ovos foi observado no tratamento com *M. anisopliae* var. *anisopliae* ( $28,34\%_{\text{tratado}}$  e  $58,31\%_{\text{controle}}$ ) e que a menor eficiência reprodutiva média alcançada foi para o grupo tratado com *M. anisopliae* var. *anisopliae* ( $348,62\%$  e  $11512,53\%_{\text{controle}}$ ). *Beauveria bassiana* apresentou menor média de incubação de ovos ( $12,50\text{dia}_{\text{tratado}}$  e  $11,90\text{dia}_{\text{controle}}$ ). O menor percentual de eclosão médio de larvas foi obtido no tratamento com *M. anisopliae* var. *anisopliae* ( $32,06\%_{\text{tratado}}$  e  $99,59\%_{\text{controle}}$ ), com período médio de eclosão de  $10,71\text{dia}_{\text{tratado}}$  e  $11,00\text{dia}_{\text{controle}}$ . No estudo do comportamento dos fungos pós-infecção observou-se que o percentual de germinação médio de conídios de *B. bassiana* foi o mais alto ( $46,39\%$  tratado e  $30,66\%$  controle). *B. bassiana* esporulou melhor durante os 12 dias de observação. O número da colônia de *M. anisopliae* var. *acridum* foi maior nos 12 dias observados e no diâmetro da colônia de *B. bassiana* obteve melhor resultado nos 12 dias de observação. Na análise morfológica não foi identificada diferença nas estruturas reisoladas. ( $P > 0,05$ ).

## ABSTRACT

The ticks are important vectors of diseases in the tropical and subtropical areas. *Rhipicephalus sanguineus* is an ixodídeo which cause severe spoliation in the canídeos and is a vector of diseases as the hematozooses (*Babesia canis*; *Ehrlichia canis*). This work evaluated the action of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana* on *R. sanguineus*, inoculated under the form of dry conidial contact and maintained at room temperature of  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . It was evaluated, also, the fungus biology pos-infection. The fungus action on *R. sanguineus* interfered in the mean weight of the mass of eggs, being emphasized the treatment with *M. anisopliae* var. *anisopliae* (0,054g<sub>treaty</sub> and 0,108g<sub>control</sub>). The largest mean residual weight happened in the treatment with *M. anisopliae* var. *anisopliae* (0,053g<sub>treaty</sub> and 0,022g<sub>control</sub>). The medium smallest pre-posture period was observed in the treatment with *M. anisopliae* var. *acridum* (4,50day<sub>treaty</sub> and 5,20day<sub>control</sub>). The medium smallest posture period was in the group treaty with *M. anisopliae* var. *anisopliae* (9,14day<sub>treaty</sub> and 11,80day<sub>control</sub>). The smallest medium production index of eggs was observed in the treatment with *M. anisopliae* var. *anisopliae* (28,34%<sub>treaty</sub> e 58,31%<sub>control</sub>) and the smallest medium reproductive efficiency went to the group treaty with *M. anisopliae* var. *anisopliae* (348,62%<sub>treaty</sub> e 11512,53%<sub>control</sub>). *Beauveria bassiana* introduced minor medium of incubation of eggs (12,50day<sub>treaty</sub> and 11,90day<sub>control</sub>). The smallest medium percentile of larval eclosion was obtained in the treatment with *M. anisopliae* var. *anisopliae* (32,06%<sub>treaty</sub> and 99,59%<sub>control</sub>), with medium period of eclosion was 10,71dia<sub>treaty</sub> and 11,00dia<sub>control</sub>. In the study of the behavior of the fungus pos-infection observed that *B. bassiana* percentile of germination medium of conidia was the highest (46,00%<sub>treaty</sub> and 30,66 %<sub>control</sub>). *B. bassiana* being the better sporulation during the 12 days of observation. The number of the colony of *M. anisopliae* var. *acridum* was larger in the 12 observed days and in the diameter of the colony of *B. bassiana* was larger for 12 day of observation. In the morphologic analysis no were identified difference in the structures re-isolates ( $P > 0,05$ ).

## 1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são ectoparasitas que causam prejuízos à pecuária e provocam danos aos vertebrados domésticos, silvestres e ao homem, transmitindo graves enfermidades como a berbesiose em animais domésticos e a doença de Lyme no homem (CORDOVÉS, 1997; ESTRADA-PEÑA & JONGEJAN, 1999).

A população canina é estimada, no Brasil em torno de 10 milhões e está em processo de expansão, principalmente devido a utilização de cães para guarda e companhia. Este crescimento implica no aparecimento de ectoparasitoses. Um grande impicílio na criação de cães é a periodicidade de infestações maciças por carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*), inviabilizando assim, o custo de produção no tocante aos gastos com acaricidas e indiretamente com medicamentos para doenças transmitidas por estes vetores. O controle dessa praga é baseado no uso de produtos químicos acaricidas sobre os animais e o meio ambiente (CORDOVÉS, 1997; MELO & AZEVEDO, 1999), com o emprego indiscriminado, ocasionando sérios problemas com relação à poluição ambiental, resistência aos insetos, resíduos, toxidez e eliminação de inimigos naturais (BITTENCOURT *et al.*, 1995).

O controle biológico por fungos entomopatogênicos tem-se apresentado como uma alternativa para esse problema. Os fungos são os patógenos mais freqüentemente encontrados em população de ácaros, contribuindo para o seu controle, pois uma vez disponíveis na natureza são eficazes, mostrando-se seguros e específicos (BITTENCOURT *et al.*, 1995; FRAZZON *et al.*, 2000). A ocorrência natural de entomopatógenos é um fator importante no equilíbrio de populações de insetos e muitas espécies são empregadas como agentes biocontroladores de pragas (ALVES, 1998a; AZEVEDO, 2001). Muitas são as vantagens do uso destes agentes microbianos de controle principalmente no que concerne à segurança do homem, de outros organismos, à redução de resíduos de pesticidas químicos nos alimentos, à preservação dos inimigos naturais e no aumento da diversidade no equilíbrio do ecossistema (BELLWS, 2001; HEADRICK & GOEDEN, 2001; LACEY *et al.*, 2001).

Entre os fungos entomopatogênicos, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Verticillium lecanii* são os mais promissores para o controle de carrapatos (CORDOVÉS, 1997; ONOFRE *et al.*, 2002). *M. anisopliae* var. *anisopliae* é cosmopolita e de ampla distribuição geográfica, mundialmente conhecido como o patógeno da cigarrinha da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*), é o mais bem sucedido agente de controle biológico de insetos das pastagens (LUNA-ALVES LIMA, 1985). *M. anisopliae* var. *anisopliae* se caracteriza pela abundante esporulação na superfície do hospedeiro e meios artificiais (MESSIAS & AZEVEDO, 1980). A faixa de temperatura entre 25°C e 28°C e umidade aproximada a 92,5% tem-se apresentado ideal para o seu desenvolvimento (OUEDRAGO *et al.*, 1997). Esta espécie vem sendo bastante utilizada no controle biológico de insetos no Brasil e mais recentemente sobre os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *Boophilus microplus* (ATHAYDE *et al.*, 1999a; 2001).

*M. anisopliae* var. *acridum* é conhecido por sua eficiência no controle de gafanhotos (MOREIRA *et al.*, 1996; XAVIER-SANTOS *et al.*, 1999; FARIA *et al.*, 1998; FARIA & MAGALHÃES *et al.*, 2001). A faixa de temperatura entre 25°C e 26°C tem se mostrado ideal para a germinação e 24 e 25°C para esporulação (THOMAS & JENKINS, 1997; HONG *et al.*, 2000).

*B. bassiana* é cosmopolita amplamente utilizado como bioinseticida contra diversas espécies de insetos e ácaros incluindo carrapatos podendo viver por muito tempo em saprogênese (BITTENCOURT *et al.*, 1995; ATHAYDE *et al.*, 1999b). A temperatura ideal está entre 23 e 28°C, dependendo do isolado pode variar entre 5 e 35°C e a umidade relativa é de 90%.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a ação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *Beauveria bassiana* e os parâmetros biológicos após passagem em *Rhipicephalus sanguineus*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico da Taxonomia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin var. *Acridum* Driver, Milner & Trumeman var. nov. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin

*M. anisopliae* conhecido como muscardine verde, é considerado o mais bem sucedido agente de controle biológico de insetos que causam prejuízos às plantações de cana-de-açúcar e às pastagens. Foi classificado pela primeira vez como *Entomophthora anisopliae*, na praga do milho *Anisoplia austriaca*, por Metschnikoff, em 1879 na Rússia, sendo um ano depois, reclassificado como *Isaria destructor*. Posteriormente, o taxon recebeu várias denominações e por fim em 1893, na França, Delacroix o registrou como *Oospora destructor* (Metsch.) PETCH (1931). No mesmo ano, Sorokin põe em sinonímia, permanecendo até os dias atuais como *Metarhizium anisopliae* (LUNA-ALVES LIMA, 1985). A espécie *M. anisopliae* de acordo com o tamanho dos conídios está separada em duas variedades: *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin var. *anisopliae* de esporos curtos (3,5-9,0µm) e *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin var. *major* (Johnston) comb. nov. de esporos longos (9,0-18,0µm) (TULLOCH, 1976).

*M. flavoviride* foi citado pela primeira vez por GAMS & ROZSYPAL (1973) baseado essencialmente na morfologia e dimensões dos conídios, de uma cultura isolada de curculionídeo de solo em 1956 e cultivado em anos consecutivos, em vários países da Europa. ROMBACH *et al.* (1986) descreveram uma nova variedade para a espécie, *M. flavoviride* var. *minus* definindo assim duas variedades: *M. flavoviride* Gams & Rozsypal var. *flavoviride* e *M. flavoviride* Gams & Rozsypal var. *minus* Rombach, Haumber & Roberts var. nov. (ROMBACH *et al.*, 1986; XAVIER-SANTOS, 1995). Esta espécie é caracterizada pela formação de agregados de conidióforos que se assemelham aos esporodóquios e pelas cadeias de conídios elipsóides e fiálides clavadas (9-14 µm x 3-4,5 µm) com 7-9(-11) x 4,5-5,5 µm. Em

linhagem jovens, são encontrados conídios elipsóides e em linhagens mais velhas, conídios cilíndricos 7-10µm x 3-4 µm. Os conídios mostram-se de parede lisa e hialina e de coloração verde-amarelada quando forma colônia devido a grande massa de conídios.

Recentemente DRIVER *et al.* (2000) admitiram o *M. flavoviride* var. *flavoviride* Gams & Rozsypal, legitimamente reconhecida por esses autores pela primeira vez (GAMS & ROZSYPAL, 1973) e fundamentado nos padrões de RAPD-PCR e sequência de ITS do DNA ribossômico classificaram *M. flavoviride* em *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *M. anisopliae* e *M. flavoviride* foram separados em dez grupos, sendo um, isolado do Brasil (1173) no grupo 2 (*M. flavoviride* Tipo E). Os mesmos autores expuseram o quanto é difícil a separação desse grupo, inclusive a impossibilidade através de métodos moleculares. O grupo 7 corresponde o *M. anisopliae* var. *acridum* (1189-1193) isolado de *Schistocerca pallens* no Brasil e finalmente consideraram o grupo 9 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, incluindo neste outro isolado do Brasil (1036).

*Beauveria bassiana*, denominado anteriormente de *Brotiytis bassiana*, foi primeiro estudado detalhadamente por Agostino Bassi no ano de 1835. A primeira citação da espécie *B. bassiana* foi realizada por Vuillemin em 1912, quando descreveu o gênero em homenagem a Beauverie, um entomologista francês (BENHAN & MIRANDA, 1953).

## **2.2 Aplicação no controle biológico e aspectos biológicos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Beauveria bassiana*.**

Os fungos são capazes de atacar insetos fitófagos e aquáticos, pragas de solo e de causar epizootias naturais, além de se destacarem como patógenos de largo espectro. Podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, penetrando por diversas vias, inclusive pelo tegumento, com uma grande capacidade de disseminação horizontal (ALVES, 1998a).

São vários os mecanismos envolvidos na patogenicidade de fungos sobre os insetos. Fatores abióticos como temperatura, umidade, luz e radiação ultravioleta e bióticos como a predisposição do hospedeiro e as diferentes fontes nutricionais, podem influenciar no ciclo nas relações fungo-hospedeiro. As fases do ciclo incluem adesão, germinação, formação de apressórios, formação de grampo de penetração, penetração, colonização, reprodução do patógeno, disseminação do fungo, formação de estruturas de preservação do fungo, produção de enzimas e produção de toxinas. A morte do hospedeiro decorre da produção de micotoxinas, mudanças patológicas na hemocele, ação histolítica e bloqueio mecânico do aparelho digestivo ocasionado pelo crescimento do micélio e iniciação do processo de esporulação fúngica (ALVES, 1998b).

Os carrapatos são ectoparasitas que com frequência causam prejuízos à pecuária e provocam danos aos animais domésticos, silvestres e ao homem. Vetores eficientes de protozoários, bactérias, rickettsias e vírus, transmitem graves enfermidades como a doença de Lyme no homem e berbesiose nos animais. Além de provocar no hospedeiro mudanças de comportamento causado pelas severas expoliações de pele, causam susceptibilidade as infecções bacterianas secundárias, podendo ainda causar miíase e anemia, levando animais infestados à morte. *R. sanguineus* é um ioxodídeo responsável pela transmissão de vírus, rickettsias, toxinas, bactérias e hematozoários, em cães, podendo leva-los à morte. Como exemplo, podem ser citados a *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, e *Ehrlichia canis*. Apresentam como hospedeiros preferenciais, canídeos domésticos, silvestres e carnívoros africanos, podendo ser encontrados parasitando outros animais domésticos e também o homem (CORDOVÉS, 1997; ESTRADA-PEÑA & JONGEJAN, 1999). Estudos com *R. sanguineus* infectados naturalmente com o fungo *Aspergillus ochraceus*, mostraram que o mesmo colonizou o carrapato via ânus, intestinos e tubos de Malpighi, impedido consequentemente a ovoposição, promovendo a morte e a mumificação (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 1990).

Os principais carrapatos de importância econômica no Brasil são *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*. ONOFRE *et al.* (2001), em trabalho de revisão, relataram que na bovinocultura é difícil avaliar os prejuízos causados por esses ácaros. O *Boophilus microplus*, devido as condições climáticas favoráveis, propaga-se

facilmente, causando a mortandade do gado, o lento desenvolvimento dos animais, carne e leite produzidos contaminados por doenças, transmissão de agentes patogênicos, diminuição na produção de couro e o gasto monetário envolvendo o uso de acaricidas para o controle dos mesmos.

O uso de fungos tem grande importância no controle microbiano, que vem se intensificando principalmente na área agrícola por conta da utilização dos pesticidas (SAMISH & GLAZER, 1991; MWANGI *et al.*, 1991)

Os fungos são os agentes mais frequentemente encontrados em populações de ácaros e o controle biológico por fungos entomopatogênicos tem-se apresentado como uma alternativa para o problema causado pela utilização dos acaricidas (BITTENCOURT *et al.*, 1995). *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Verticillium lecanii* são os mais promissores. A ocorrência natural de agente é um fator importante no equilíbrio de populações de insetos e no emprego desses agentes como biocontroladores, que uma vez disponíveis na natureza, tornam-se mais eficazes, seguros e específicos (CORDOVÉS, 1997; FRAZZON *et al.*, 2000; LACEY *et al.*, 2001).

### 2.2.1 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

A implementação do controle biológico no Brasil começou com GUAGLIUMI (1970) em experimento no campo utilizando o entomopatogênico *M. anisopliae* em formulação sobre a folhagem das canas jovens e dos colmos infectados por *Mahanarva posticata*, cigarrinha da folha e *M. fimbriolata* cigarrinha das raízes. Já em 1974, GUAGLIUMI *et al.*, (1974) objetivando o controle da *M. posticata* em Pernambuco, aplicaram *M. anisopliae*, via terrestre e aérea, constatando um percentual de mortalidade de 30-40% para as ninfas e 20-30% para os adultos. Evidenciando que, no campo o fungo parasitou outros insetos como: *Diatraea* spp, *Metamasius hemipterus*, *Spodoptera frugiperda*, *Cirphis* sp e insetos inócuos a cana-de-açúcar.

XAVIER-SANTOS (1995) confirmou a patogenicidade de *M. flavoviride* (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) contra *Schistocerca pallens* em bioensaios de

laboratório utilizando formulações em óleo de soja com diferentes concentrações de conídios. A mesma autora estudou os aspectos: comportamento cultural, citológico e entomopatogênico da linhagem CG 423 de *M. flavoviride* isolada de gafanhoto no Nordeste *S. pallens*, verificou um bom desenvolvimento em Meio Completo e em Batata Dextrose-Ágar, ocorrendo neste último, um maior crescimento vegetativo.

MONTEIRO *et al.* (1998) em bioensaio de laboratório, testaram sobre larvas de *R. sanguineus*, três isolados de *M. anisopliae* e dois de *B. bassiana* nas concentrações de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios/mL e observaram que no grupo controle a média de mortalidade larval variou entre 10 a 46,6% e nos grupos tratados a média foi de 13,3 a 100%. A patogenicidade foi mais efetiva na concentração de  $3,5 \times 10^8$  conídios/mL, sob condições ambientais de umidade relativa de 80% e temperatura de 27°C.

ATHAYDE *et al.* (1999a) estudaram a patogenicidade *in vitro* de *M. anisopliae* sobre teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus*, utilizando suspensão de conídios na concentração de  $7,85 \times 10^5$  e verificaram um aumento no peso residual das fêmeas, redução do peso da massa de ovos, diminuição do índice de produção de ovos, diminuição do percentual de eclosão, aumento do período de pré-postura, diminuição no período de postura, aumento no período de incubação, aumento do período de eclosão, apresentando mortalidade de 70% no grupo tratado e percentual de controle de 79,43%.

ATHAYDE *et al.* (1999b) testaram a patogenicidade do *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre teleóginas de *R. sanguineus* de cães domiciliados do Semi-árido Paraibano e verificaram redução de peso da massa de ovos, diminuição no período de pré-postura, diminuição no percentual de eclosão, mortalidade larval variando entre 70-80% e percentual do controle em relação ao grupo tratado de 79,93% para o *M. anisopliae* e 99,99% para o *B. bassiana*.

ATHAYDE (2002) e ATHAYDE *et al.* (2001) avaliaram a patogenicidade *in vitro* de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e *B. bassiana* sobre ovos de fêmeas ingurgitadas selvagens de *Boophilus microplus* a temperatura ambiente. Para os grupos tratados com o *M. anisopliae*, o período de incubação ocorreu em 45,5 dia, o período de eclosão em 13 dias e o percentual de eclosão em 9,75%. Para o *M. flavoviride* os valores 50,35 dia, 15 dias e 10% e para o *B. bassiana* foi observado, 30,5 dia, 9,5 dia e 7,75%

respectivamente. Os resultados confirmam a patogenicidade de *M. anisopliae* e *B. bassiana* e a ação do *M. flavoviride* contra esse carrapato.

*M. anisopliae* var. *anisopliae* é amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado tanto em clima temperado quanto tropical PETCH (1931). Devido à facilidade de multiplicação em laboratório e adaptação em condições de campo e por ser um produtor de abundantes conídios essa espécie vem sendo muito utilizada no controle biológico de pragas no Brasil e em outros países (COSTA, 1978; SILVEIRA, 1990). Este é encontrado atacando mais de 200 espécies de insetos ou no solo, onde sobrevive por longos períodos. Em infecções experimentais sua ação sobre carrapatos tem sido observada, apresentando virulência contra *Boophilus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum* dentre outros (BITTENCOURT, 1996; ALVES, 1998a; MONTEIRO *et al.*, 1998; 1998; ATHAYDE *et al.*, 1999a).

Esse fungo apresenta apenas o ciclo assexuado, entretanto na década de 80 a recombinação parassexual foi descoberta, oferecendo uma alternativa, importante para a obtenção de recombinantes que sejam diferentes do tipo selvagem de origem, para os estudos genéticos em fungos imperfeitos, e o melhoramento genético dos mesmos com potencial para programas de controle biológico (AZEVEDO, 1971; MESSIAS & AZEVEDO, 1980; AZEVEDO, 1998). Seus conidióforos são hialinos, podendo ser simples ou ramificados e caracterizam-se por apresentarem fiáides hialinas diferenciadas em seção basipetal que formam conídios cilíndricos ou elípticos característicos de coloração esverdeada (TINLINE, 1971; LUNA-ALVES LIMA, 1985; XAVIER-SANTOS *et al.*, 1999). O ciclo biológico, em condições favoráveis, inicia-se com a germinação dos conídios, que podem emitir um ou mais tubos germinativos formando o micélio posteriormente a diferenciação hifal e os conídios são produzidos reiniciando o ciclo (FERREIRA, 2000).

Os fatores abióticos tais como temperatura, clima, luz ultravioleta e solar, pH do solo, dentre outros, influenciam tanto na distribuição quanto no desenvolvimento do fungo, assim como na patogenicidade (RATH *et al.*, 1992), na condição nuclear (ZIMMERMANN, 1982; MARGOSAN E PHILLIPS, 1985), na viabilidade e virulência dos conídios (DAVIES-MORLEY *et al.*, 1995; RATH *et al.*, 1995), na

germinação (BOCK *et al.*, 1999), e trazendo problemas no que diz respeito a performance do fungo no campo. Dentre esses fatores, a temperatura a umidade e a luz são os mais importantes (ALVES, 1998a).

As condições ambientais ótimas ao desenvolvimento micelial, germinação e esporulação do *M. anisopliae*, correspondem a umidade próxima a 92,5% de UR (WALSTAD *et al.*, 1970) e temperaturas de 25-30°C (STEINKRAUS & SLAYMAKER, 1994). *M. anisopliae* var. *anisopliae* é pouco exigente em relação à fonte nutritiva, desenvolvendo-se em diversos meios de cultura, utilizando como fonte de carbono amido, glicose, glicerina levulose, maltose, sacarose e quitina, apresentando um ótimo desenvolvimento em Meio Completo e Mínimo (RIBEIRO, 1992), os mesmos empregados pela primeira vez em outros estudos genéticos de *Aspergillus nidulans* (AZEVEDO, 1998).

### **2.2.2 *Metarhizium anisopliae* var. *acridum***

MOORE *et al.* (1992) realizaram ensaios para estudar as alterações na alimentação do gafanhoto *S. gragaria*, após infecção com *M. flavoviride* e observaram que altas dosagens do fungo após 24 horas, ocasionavam uma redução do consumo diário por parte dos gafanhotos, acompanhado de um período de morte dos mesmos, variando entre 5 a 14 dias, dependendo da concentração do inoculo.

FARGUES *et al.* (1992) estudando trinta e um isolados de Hyphomycetes entomopatogênicos quanto a influência da temperatura sobre o crescimento *in vitro*, verificaram que os isolados de *M. flavoviride* apresentaram crescimento na temperatura entre 8° e 32°C, mostrando à 25°C melhor taxa de crescimento.

STATHERS *et al.* (1993) estudaram o efeito de diferentes temperaturas sobre a viabilidade de conídios de *M. flavoviride* estocados em óleos vegetais e minerais. Foi verificado que a viabilidade dos conídios estocados em diferentes óleos vegetais e minerais foi reduzida substancialmente a uma temperaturas constante de 25°C. Sendo o melhor intervalo de temperatura para estocagem de 5-10°C. Foi observado também que em óleo de soja e querosene, houve um aumento na viabilidade dos conídios

BATEMAN *et al.* (1993) testaram as formulações de conídios de *M. flavoviride* em água e óleo e observaram que a formulação em óleo apresentou DL<sub>50</sub> menor do que a formulação em água, mostrando que sob condições de baixa umidade, ocorreu um aumento na infectividade de *M. flavoviride* sobre *S. gregaria*.

MILNER *et al.* (1994) avaliaram a patogenicidade de *M. flavoviride*, contra *Phaulacridium vittatum*, acridídeo oriundo da Austrália, verificaram uma mortalidade de 100% em três semanas e que os conídios aplicados nas folhagens usadas como alimento para o hospedeiro persistiram por 14 dias. O emprego experimental do *M. flavoviride* vem sendo realizado em condições de campo na África e em outros países contra gafanhotos, em doses de 10<sup>13</sup> conídios/ha, para aplicações no campo. Entretanto são necessárias grandes quantidades de conídios para o tratamento das áreas infestadas, o que inviabiliza o uso desse patógeno em grandes infestações da praga, implicando conseqüentemente, no estudo de novas estratégias de controle (ALVES, 1998a).

McCLATCHIE *et al.* (1994) verificaram que altas temperaturas (>40°C) provocavam retardamento na morte e germinação dos conídios de *M. flavoviride*. Conídios secos pela adição de sílica-gel às formulações apresentaram uma temperatura de tolerância muito maior. Os conídios produzidos a 30°C foram mais tolerantes às altas temperaturas do que os produzidos a 26°C. Também foi observado que um aumento de sacarose de 2 para 8% no meio do crescimento, reduziu a tolerância.

RATH *et al.* (1995) estudaram a infectividade de dois isolados de *M. anisopliae* e um de *M. flavoviride* e um de *B. bassiana*, contra larvas do 3º estágio e adultos de *Adoryphorus couloni*. Os resultados indicam que *M. anisopliae* foi altamente infectivo para larvas e adultos, que *M. flavoviride* foi infectivo apenas para adultos do inseto, e que *B. bassiana* não apresentou qualquer poder de infecção.

*M. anisopliae* var. *acridum* ocorre sobre Orthoptera, Hymenoptera e Coleoptera, sendo raramente encontrado investindo sobre insetos ou encontrados em amostras de solo, entretanto tem-se mostrado bastante promissor contra gafanhotos (ALVES, 1998b; TOMAS & JENKINS, 1997).

OUDEGRAGO *et al.* (1997) estudaram o efeito da temperatura no crescimento entre quatorze isolados de *M. flavoviride* e vinte e dois de *M. anisopliae* e chegaram a conclusão que a maioria dos isolados cresceram entre 11 e 32°C, alguns cresceram

entre 8° e 37°C e nove isolados cresceram até 40°C. A temperatura ótima ficou entre 25° e 35°C. *M. flavoviride* mostrou-se mais resistente às altas temperaturas do que *M. anisopliae*, tolerando uma temperatura de 32°C.

TOMAS & JENKINS (1997) estudaram em dois isolados de *M. flavoviride*, a temperatura ótima para germinação, taxa radial de extensão hifal e esporulação. A temperatura ótima para extensão hifal do isolado 191-609 foi de 25,5°C para a esporulação foi 24°C demonstrou também que e o isolado IMI 330189 mostrou temperatura ótima entre 25°C e 27°C, respectivamente. Para a germinação a temperatura foi de 30°C. Para a esporulação a temperatura ótima foi mais baixa do que para extensão hifal. Estudos adicionais foram realizados para avaliar o efeito da temperatura e da dose na mortalidade de *Zonocerus variegatus*. Com o aumento da dose, o tempo de sobrevivência em temperatura de incubação foi reduzido drasticamente. Dose e temperatura interagiram. Foi estimada para cada dose, a temperatura ótima para infecção, 5°C mais elevada do que para o crescimento e entre a taxa de extensão hifal, *in vitro* e o tempo de sobrevivência do hospedeiro não foi observada relação significativa.

Já foi verificado que para *M. anisopliae* var. *acidum*, a temperatura entre 25 e 27°C, tem se mostrado ideal para a germinação e entre 24 e 25°C para esporulação e para um bom crescimento da colônia e uma boa produção de conídios, a partir de 25°C, sendo os maiores valores encontrados a 30°C (HONG *et al.*, 2000).

MAGALHÃES *et al.*(2000) verificaram em estudos sobre a esporulação de *M. anisopliae* var. *acidum* e *B. bassiana* em *Rhammatocerus schistocercoides* em ambientes secos e úmidos e inoculados a 30° e 25°C respectivamente, que ambas espécies foram patogênicas ao *R. schistocercoides*, sendo que *M. anisopliae* produziu mais conídios internamente que *B. bassiana* à 53% e 75% de umidade relativa, não havendo esporulação externamente nessas mesmas umidades. Entretanto *M. anisopliae* mostrou-se melhor, produzindo mais conídios do que *B. bassiana* em 100% de umidade relativa.

### 2.2.3 *Beauveria bassiana*

MALAGODI *et al.* (1995), realizaram bioensaios em laboratório, avaliaram a patogenicidade dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* sobre cupim *Nasutitermes*. Os tratamentos utilizados foram as suspensões de cada um deles em cinco concentrações ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$  conídios /mL). Os resultados mostraram que ambos os fungos causaram mortalidade de 100% nas concentrações de  $1 \times 10^9$  e  $1 \times 10^{10}$  conídios/mL e de 97,5% e 87,5% respectivamente na concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL em cinco dias. O  $TL_{50}$  varou de 2,70 a 5,87 dias para *B. bassiana* e para *M. anisopliae* foi de 1,96 a 6,72 dias nas concentrações de  $1 \times 10^{10}$  e  $1 \times 10^6$  conídios /mL. A  $CL_{50}$  foi de  $3,18 \times 10^7$  e  $0,18 \times 10^7$  conídios/mL para *B. bassiana* e para *M. anisopliae*  $1,7 \times 10^7$  e  $0,69 \times 10^7$  conídios/mL aos quatro e seis dias de inoculação respectivamente.

KAAYA & MUNYINYI (1995) estudaram o potencial biocontrolador dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra larvas de *Glossina* spp. Utilizaram duas concentrações de areia esterilizada (1,0 g/litro e 0,5 g/litro) misturadas com os fungos. Verificaram que na concentração de 1,0 g/litro com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, a mortalidade das larvas foi de 97% e 80% respectivamente. KAAYA *et al.* (1996) testaram *B. bassiana*, juntamente com *M. anisopliae* contra *Rhipichephalus appendiculatus* de zebuínus infestados naturalmente e constataram que ambos induziram uma redução na fecundidade de 85-99%, na incubação dos ovos de 94-100%, promoveram uma mortalidade elevada de 76-85%. Também foi verificado, 100% de mortalidade das larvas, 76-95% das ninfas e 36-64% dos adultos para ambos os fungos.

BARBOSA *et al.* (1997) investigaram o efeito de diferentes concentrações de conídios de dois isolados (747 isolado de formiga e 986 isolado de carrapato) do fungo *B. bassiana* sobre a muda larval e a sobrevivência de ninfas do carrapato *R. sanguineus*, utilizadas as seguintes concentrações de  $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  conídios/mL. Como resultados verificaram que o percentual de muda diminuiu, a medida que se as concentrações de conídios aumentaram, alcançando percentuais de 100% de

mortalidade de larvas ingurgitadas nas concentrações mais elevadas. Também foi observado quanto a sobrevivência de ninfas oriundas da ecdise de larvas ingurgitadas que para o isolado 747, os percentuais de sobrevivência foram semelhantes com 93% para o controle e 92% para a concentração de  $10^4$ . Na concentração de  $10^6$  esse percentual foi de 11% e na concentração mais elevada ( $10^8$ ), não houve presença de ninfas, assim como nas concentrações de  $10^6$  e  $10^8$  do isolado 986, conseqüentemente esse resultado foi devido a mortalidade de 100% das larvas ingurgitadas.

*Beauveria bassiana* sob condições de laboratório pode colonizar vários insetos, ocorrendo no campo de forma enzoótica em Diptera, Hymenoptera e Orthoptera e epizoótica em Coleoptera, Lepidoptera e Hemiptera. A infecção ocorre frequentemente via tegumento, podendo ocorrer para alguns insetos por via oral (ALVES, 1998a).

TIGANO *et al.* (1998) estudaram a patogenicidade de três isolados de *B. bassiana* e treze de *M. anisopliae* sobre ninfas de *Triatoma infestans*. Os resultados mostraram que a  $CL_{50}$  foi maior para o *B. bassiana* com  $7,5 \times 10^5$  conídios/mL do que para *M. anisopliae* que foi de  $4,3 \times 10^6$  conídios/mL, possibilitando o emprego desses fungos contra este inseto.

MONTEIRO *et al.* (1998) avaliaram em ovos de *R. sanguineus* os efeitos de *B. bassiana* e de *M. anisopliae*. Como resultados verificaram que a porcentagem de eclosão variou entre 0 e 26,66% para a concentração de  $10^8$  conídios/mL e para a concentração de  $10^5$  conídios/mL de 66,6 a 100%. Para inibição da eclosão das larvas, a  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  foi melhor em temperatura e umidade variáveis. A temperatura de 27°C e UR de 80% foi o melhor para a eclosão das larvas.

WRAIGHT *et al.* (1998) indicaram em estudos de patogenicidade que *B. bassiana* juntamente com *Paecilomyces fumosorus* são altamente virulentos para as ninfas de *Bemisia argentifolli* (mosca branca), mostrando mais uma vez um considerável potencial do fungo *B. bassiana* para o controle biológico desse inseto.

TAMAI *et al.* (1999) avaliaram a patogenicidade de *B. bassiana* em fêmeas recém-emergidas do ácaro *Tetranychus urticae*. Foram testadas seis concentrações ( $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  e  $1 \times 10^9$  conídios/mL), nas quais foi observado que para este isolado à medida que a suspensão de conídios se tornou mais concentrada, os valores de mortalidade corrigida aumentaram, mostrando também que das seis

concentrações estudadas os valores de mortalidade corrigida ao sexto dia, foram inferiores a 50%, sendo observada apenas na concentração de  $1 \times 10^9$  conídios/mL, mortalidade total superior a 50% para as fêmeas de *T. urticae*.

Não foi ainda registrado na literatura dados sobre a patogenicidade tanto do *B. bassiana*, quanto do *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum* sobre cepas selvagens de *B. microplus* (carrapato bovino) das regiões semi-áridas (ATHAYDE, 2002).

*B. bassiana* é conhecido por ser amplamente utilizado como bioinseticida contra diversas espécies de insetos e ácaros incluindo carrapatos (BITTENCOURT *et al.*, 1995; ATHAYDE *et al.*, 1999b). Esta espécie é frequentemente encontrada parasitando insetos ou em amostras de solo podendo sobreviver por muito tempo em saprogênese (ALVES, 1998a). São apresentadas duas fases distintas para o ciclo biológico de *B. bassiana*: a parasitária onde a penetração tegumentar ocorre através da ação enzimática e da mecânica em 12 horas, com germinação dos conídios variando entre 16-18 horas após infecção e a fase sapróbia que ocorre depois que os conidióforos exteriorizam, formando conídios. Os requisitos nutricionais para *B. bassiana* com relação ao crescimento e à germinação não são complexos. Este fungo em vários ambientes é facilmente cultivado em meios naturais e sintéticos (ATHAYDE, 2002).

A temperatura é um dos fatores abióticos que mais influencia na biologia dos fungos. Isso foi bem evidenciado nas investigações realizadas por INGLIS *et al.* (1999) onde a colonização competitiva em fungos é influenciada pela temperatura, ocorrendo que, *B. bassiana* se sobrepujou sobre *M. flavoviride* a uma temperatura constante de 25°C, no entanto quando a temperatura foi elevada o inverso ocorreu.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens fúngicas

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Beauveria bassiana* foram obtidas da Coleção de Cultura (Micoteca-URM) do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela I).

**TABELA I.** Origem das linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Beauveria bassiana*.

Espécie Fúngica	Código da Linhagem Fúngica	Localização	Hospedeiro	Nº de acesso URM
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	PL <sub>43</sub>	Flexeiras/AL	<i>Mahanarva posticata</i>	3349
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	BR <sub>1</sub>	Rio Grande do Norte	<i>Shistocerca pallens</i>	3800
<i>Beauveria bassiana</i>	CL <sub>1</sub>	Carpina/PE	<i>Castnia licus</i>	3447

#### 3.2 Meios de cultura e soluções empregadas

##### 3.2.1 Meios de cultura

- **Batata-Dextrose-Ágar (BDA) OXOID**

Foram pesadas 39g de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e colocado em 1 litro de água destilada, o qual foi levado ao fogo para total dissolução. Em seguida foi autoclavado

por 15 minutos a 120°C e distribuídas assepticamente em placas de Petri ou em tubos de ensaios.

- **Batata-Dextrose-Ágar mais Cloranfenicol**

Ao BDA foram acrescentado 1ml da solução de Cloranfenicol e autoclavado a 120°C por 15 minutos sendo posteriormente distribuído assepticamente em placas de Petri.

### 3.2.2 Soluções

- **Solução de Cloranfenicol (50µg/mL)**

Cloranfenicol.....50.000mg  
Etanol.....10mL

O antibiótico foi dissolvido em 10mL de etanol.

- **Solução "Tween"80 (0,05% v/v)**

"Tween"80.....0,5mL  
Água destilada.....1000L

Foi colocado 0,5mL de "Tween"80 em 1000mL de água destilada e autoclavada a 120°C por 15 minutos, posteriormente estocados à temperatura ambiente.

### 3.3 Obtenção e desinfecção das teleóginas

#### 3.3.1 Obtenção das teleóginas

As fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* foram obtidas diretamente do corpo de cães domiciliados, da região do Grande Recife-PE. Foram utilizadas 30 fêmeas ingurgitadas, 10 para cada linhagem fúngica e um para o controle.

### 3.3.2 Desinfecção das teleóginas

As teleóginas foram imersas em hipoclorito de sódio a 4% por três minutos, em seguida em álcool a 70% por três minutos e posteriormente em água destilada autoclavada por três minutos e secos em papel filtro autoclavado.

### 3.4 Quantificação do inóculo

Para se determinar a dose infectante, uma fêmea foi infectada por cada fungo, através do contato em cultura fúngica em tubo de ensaio por cinco minutos. Após o tempo determinado a fêmea foi colocada em 10mL de Tween “80”, onde sofreu agitação em Vortex por três minutos. A fêmea foi retirada e alíquota dessa suspensão foi quantificada em câmara de Neübauer, adotando o campo de contagem 4 ( $n \times 4 \times 10^6$ ) de acordo com ALVES & MORAES (1998). Para *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum* e *B. bassiana* foram utilizadas as seguintes doses infectantes:  $33 \times 10^6$ ,  $73 \times 10^6$  e  $127 \times 10^6$  respectivamente.

### 3.5 Infecção das teleóginas

As fêmeas *R. sanguineus* foram infectadas sob forma de contato conidial seco, durante cinco minutos e colocadas em placas de postura à temperatura ambiente  $\pm 28^\circ\text{C}$  até cessarem as observações.

### 3.6 Parâmetros para avaliação da ação dos fungos sobre as teleóginas

Os parâmetros biológicos utilizados para avaliar a ação dos fungos sobre as fêmeas de *R. sanguineus*, foram: a) período de pré-postura; b) período de postura; c) peso inicial; d) peso residual; e) peso da massa de ovos. Para o cálculo do índice de produção de ovos (IPO), percentual de controle e eficiência reprodutiva (ER), utilizou-se as seguintes equações:

$$\text{IPO} = \frac{\text{Peso da massa de ovos (g)}}{\text{Peso inicial das fêmeas (g)}} \times 100$$

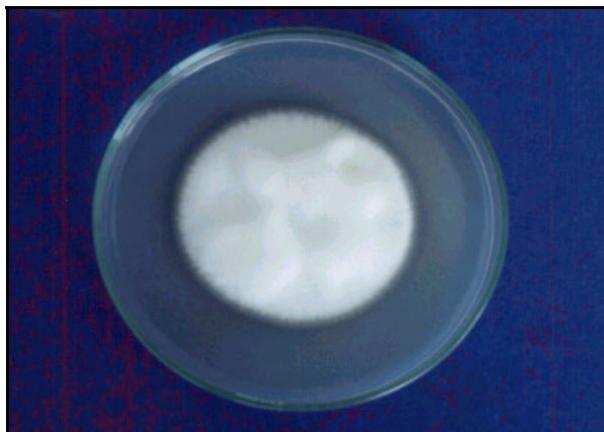
$$\% \text{ Controle} = \frac{\text{ER (controle)} - \text{ER (tratados)}}{\text{ER(controle)}}$$

$$\text{ER} = \frac{\text{Peso da massa de ovos (g)}}{\text{Peso das fêmeas (g)}} \times (\% \text{ Eclosão}) \times 20000$$

Foram analisados os parâmetros referentes aos ovos oriundos de fêmeas infectadas: a) período de incubação, b) período de eclosão, c) percentual de eclosão seguindo BENNETT (1974).

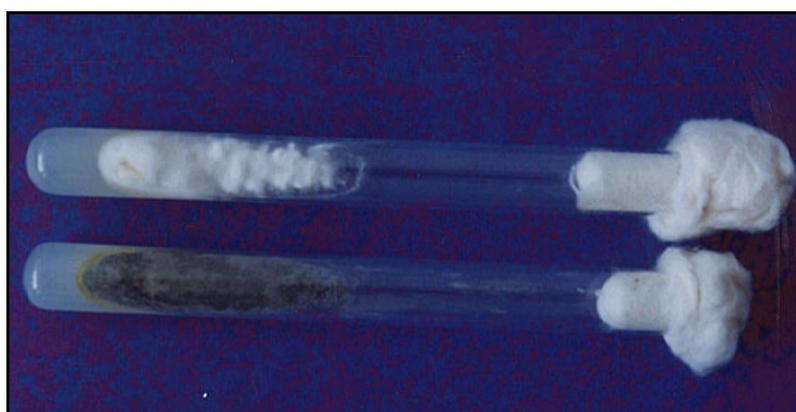
### 3.7 Reisolamento dos fungos das teleóginas infectadas

Após a morte das fêmeas, as mesmas passaram por um processo de lavagem com hipoclorito de sódio a 4% por três minutos, em álcool a 70% por três minutos e enxaguado em água destilada e autoclavada por três minutos, em seguida secadas em papel filtro autoclavado e colocadas em placas contendo BDA mais o antibiótico e acondicionadas em estufa de BOD a 28°C por 12 dias (Figuras 1, 2 e 3).



**FIGURA 3.** *Beauveria bassiana* infectando teleógina de *Rhipiccephalus sanguineus* em BDA mais Cloranfenicol, aos 12 dias de crescimento a 27°C.

O reisolamento foi feito examinando-se a fêmea infectada ao estereomicroscópio, retirando-se os conídios com alça de platina, transferindo-os para tubos de ensaio contendo BDA. Estes foram transferidos para estufa de BOD a 27°C com umidade relativa de 80%, onde foram examinados diariamente até a completa conidiogênese dos fungos (Figura 4).



**FIGURA 4.** *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Beauveria bassiana* em BDA após 12 dias a 27°C.

### **3.8 Análise dos fungos reisolados das fêmeas pós-infecção experimental**

#### **3.8.1 Análise do comportamento dos fungos**

Os fungos em estudo, após inoculação nas teleóginas de *R. sanguineus*, foram reisolados e realizadas observações quanto as microestruturas, a germinação dos conídios, o número de colônia, a esporulação e o diâmetro de colônia.

- **Análise das microestruturas**

Foi utilizada a técnica do cultivo em lamínula, onde inóculo do fungo, foi colocado assepticamente em pontos estratégicos para uma placa de Petri, contendo BDA. Lamínulas previamente flambadas, foram colocadas sobre cada inóculo e às 48, 72 e 96 horas de crescimento, as lamínulas foram coradas com azul de Aman e observadas ao microscópio óptico.

- **Germinação de conídios**

Da colônia de cada fungo reisolado de *R. sanguineus* e não reisolado (controle) com 14 dias de crescimento, em placas contendo BDA separadamente, foram obtidos discos de 5mm de diâmetro, que foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de “Tween” 80 a 0,05%, sofrendo agitação o número de conídios foi determinado através de câmara de Neübauer. A suspensão sofreu diluições sucessivas até se atingir uma contagem de 100 conídios/mL. Uma dosagem de 0,1mL da suspensão final foi espalhada com alça de Drigalsky em placas de Petri e em triplicata contendo BDA, em seguida foram incubadas a temperatura ambiente de  $\pm 28^\circ$ . A taxa de germinação foi determinada, contando-se 500 conídios (entre os germinados e não germinados) após 12 horas de inoculação; utilizando a seguinte fórmula:

$$1500 = n \text{ germinados}$$

$$100 = G$$

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

- **Número de colônias**

Da colônia de cada fungo reisolado de *R. sanguineus* e não reisolado (controle) com 14 dias de crescimento em placas contendo BDA separadamente, foram retirados discos de 5mm de diâmetro, que foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de “Tween” 80 a 0,05%, sofrendo agitação e o número de conídios foi determinado através de câmara de Neubauer. A suspensão sofreu diluições sucessivas até se atingir uma contagem de 100 conídios/mL. Uma dosagem de 0,1mL da suspensão final foi espalhada com alça de platina em placas de Petri e em triplicata contendo BDA, em seguida foram incubadas sob temperatura ambiente de  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . O número de colônias foi determinado aos 3, 6, 9 e 12 dias de incubação, por contagem direta das placas.

- **Diâmetro da colônia**

Da colônia de cada fungo reisolado de *R. sanguineus* e não reisolado (controle) com 14 dias de crescimento em placas contendo BDA separadamente, foram obtidos discos de 5mm de diâmetro, que foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de “Tween” 80 a 0,05%, sofrendo agitação e o número de conídios foi determinado através de câmara de Neubauer. A suspensão sofreu diluições sucessivas até se atingir uma contagem de 100 conídios/mL. Uma dosagem de 0,1mL da suspensão final foi espalhada com alça de Drigalsky em placas de Petri, em triplicata contendo BDA, em seguida incubadas a temperatura ambiente de  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . Discos de 5mm das culturas fúngicas foram colocadas no centro de placas de Petri com BDA, em

triplicata. As observações sobre o diâmetro das colônias dos fungos foram feitas durante o período de 0-3, 3-6, 6-9 e 9-12 dias a temperatura ambiente, utilizando-se para a mensuração uma régua.

- **Esporulação**

Da colônia do cada fungo reisolado do carrapato *R. sanguineus* e não reisolado (controle) com 14 dias de crescimento em placas contendo BDA separadamente, foram obtidos discos de 5mm de diâmetro, que foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de “Tween” 80 a 0,05%, sofrendo agitação e o número de conídios foi determinado através de câmara de Neubauer. A suspensão sofreu diluições sucessivas até se atingir uma contagem de 100 conídios/mL. Uma dosagem de 0,1mL da suspensão final foi espalhada com alça de platina em placas de Petri e em triplicata para cada dia, contendo BDA, em seguida foram incubadas a temperatura ambiente de  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . Aos 3, 6, 9 e 12 dias de crescimento, foram adicionadas as placas utilizadas para se determinar o número de colônias, 5mL de solução de etanol a 75%, para matar e secar os conídios. As placas foram lavadas 10 vezes com 9.5mL de uma solução de “Tween” 80 a 0,05%. O lavado foi coletado em frasco de Erlenmeyer de 125mL e agitado por 5 minutos, para a desagregação dos conídios. O número de conídios foi determinado em câmara de Neubauer, e a média por colônia em cada placa. foi usada como mensuração da esporulação.

### **3.9 Análise estatística**

Para cada parâmetro estudado, foi realizada a análise de variância, aplicando-se o teste de Tukey para comparação entre as médias seguindo FINNEY (1964).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Parâmetros biológicos de teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus* infectadas pelos fungos

Após infecção das fêmeas de *R. sanguineus* com os fungos *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum* e *B. bassiana*, vários parâmetros biológicos foram utilizados para verificar a ação destes organismos nas teleóginas. A Tabela II mostra que após a infecção das teleóginas se observou diferença significativa entre os fungos utilizados e o grupo controle em relação ao peso da massa de ovos, com exceção do grupo tratado pelo *M. anisopliae* var. *acridum* (0,087g). O menor peso de massa de ovos foi observado na infecção por *M. anisopliae* var. *anisopliae* (0,054g). No qual foi observado o peso da massa de ovos diminuiu em todos os tratamentos, esses resultados confirmam os obtidos por ATHAYDE (2002), que utilizou como hospedeiro o carrapato bovino *Boophilus microplus* e BITTENCOURT *et al.* (1995) que realizaram experimento semelhante contra o mesmo carrapato, com *M. anisopliae* var. *anisopliae*.

O peso residual de todas teleóginas infectadas diferiram das teleóginas controle (0,022g) com exceção dos tratados com *B. bassiana*. Os fungos não diferiram entre si, com exceção, mais uma vez, dos tratados com *B. bassiana* que diferiu dos tratados com *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Os resultados mostraram aumento no peso residual das fêmeas. O maior peso residual foi observado para o grupo tratado com *M. anisopliae* var. *anisopliae* (0,053g) e o menor com *B. bassiana* (0,033g). Esses resultados discordaram dos obtidos por ATHAYDE (2002) que verificou em fêmeas de *B. microplus* tratadas com *B. bassiana*, um maior peso residual (190,00mg).

Para o período de pré-postura só foi observada diferença significativa entre o grupo tratado por *M. anisopliae* var. *acridum* e o grupo controle. Houve diminuição do período de pré-postura para as fêmeas tratadas com *M. anisopliae* var. *anisopliae* (5,00dia) e *M. anisopliae* var. *acridum* (4,50dia) e aumento com as fêmeas tratadas

com *B. bassiana* (5,50dia). *M. anisopliae* var. *acridum* apresentou o menor período de pré-postura médio (4,50dia).

No período de postura, os grupos tratados não diferiram entre si e do controle. Houve aumento do período de postura para as fêmeas tratadas com *M. anisopliae* var. *acridum* (12,38 dia) e *B. bassiana* (12,50 dia), ocorrendo diminuição em fêmeas tratadas com *M. anisopliae* var. *anisopliae*. O menor período de postura médio foi observado no grupo tratado com *M. anisopliae* var. *anisopliae* (9,14 dia).

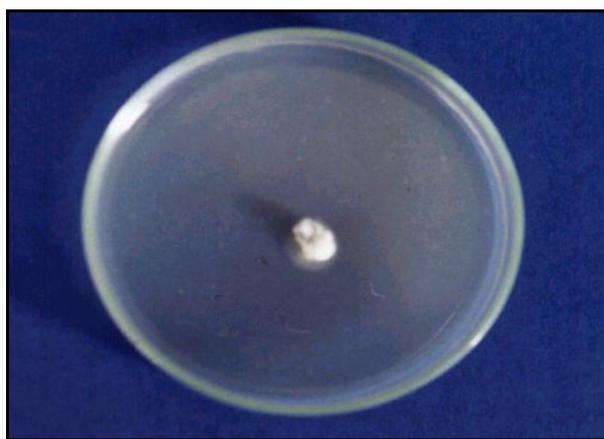
No índice de produção de ovos *M. anisopliae* var. *acridum* e *B. bassiana* não diferiram do controle apenas *M. anisopliae* var. *anisopliae* diferiu. O menor índice médio de produção de ovos foi observado no grupo tratado com *M. anisopliae* var. *anisopliae* (28,34%).

Para a eficiência reprodutiva todos os fungos diferiram do controle, entretanto não houve diferença significativa entre si. A eficiência reprodutiva média das teleóginas tratadas com os três fungos diminuiu. A menor média observada foi para o grupo tratado com *M. anisopliae* var. *anisopliae* (348,62%). Os resultados obtidos foram semelhantes aos de ATHAYDE (2002), embora tenha usado outro carrapato em seus estudos, *B. microplus* (Tabela II e Figuras 5, 6 e 7).

**TABELA II.** Parâmetros biológicos das teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus* após infecção por *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Beauveria bassiana*.

Tratamento	Peso inicial (g)	Peso da massa de ovos (g)	Peso residual (g)	Período de pré-postura (Dia)	Período de postura (Dia)	Índice de produção de ovos (%)	Eficiência reprodutiva (%)
Controle	0,186a	0,108a	0,022c	5,20a	11,80a	58,31a	11512,53a
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	0,175a	0,054c	0,053a	5,00ab	9,14a	28,34b	348,62b
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	1,176a	0,087ab	0,046ab	4,50b	12,38a	48,55a	563,44b
<i>Beauveria bassiana</i>	1,157a	0,072bc	0,033bc	5,50a	12,50a	45,63a	378,58b
CV(%)	15,29	22,74	19,32	10,49	24,90	24,86	27,39
	NT	NT	$\sqrt{x}$	NT	NT	NT	NT

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. NT= dados não transformado.

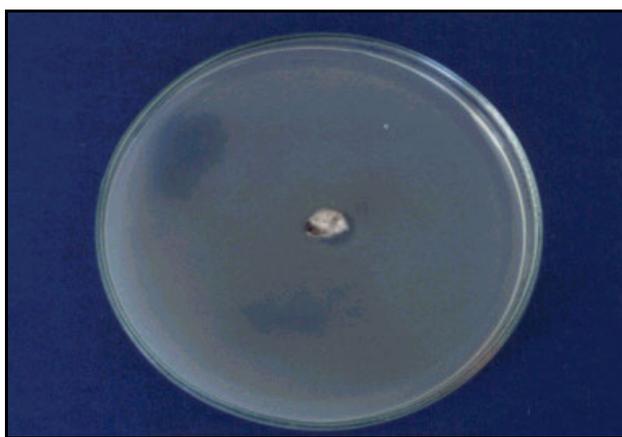


**FIGURA 5.** Fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus sanguineus* infectada por *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* em

BDA mais Cloranfenicol, ao 5º dia de crescimento a 27°C.



**FIGURA 6.** Fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus sanguineus* infectada por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA mais Cloranfenicol, ao 5º dia de crescimento a 27°C.



**FIGURA 7.** Fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus sanguineus* infectada por *Beauveria bassiana* em BDA mais Cloranfenicol, ao 5º dia de crescimento a 27°C.

#### 4.2 Parâmetros biológicos de ovos oriundos de teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus* infectadas pelos fungos

No que se refere a biologia de ovos de teleóginas infectadas de *R. sanguineus* (Tabela III), o período de incubação dos ovos não apresentou diferença significativa entre o tratamento com *B. bassiana* (12,5dia) e o controle (11,9dia). Enquanto que para *M. anisopliae* var. *anisopliae* (23,14dia) e *M. anisopliae* var. *acridum* (23dia), não houve diferença significativa. ATHAYDE (2002) obteve resultados semelhantes com *M. anisopliae* var. *acridum*. Nos grupos tratados foram encontrados um período de incubação de 23 dias desconcordando com BOYCEV & RIZVANOVA (1960) trabalhando com *I. ricinus* e BITTENCOURT (1995) com *B. microplus*, que observaram nos grupos tratados um período de incubação de 38 e 28 dias respectivamente.

No período de incubação médio foi observado que os grupos tratados foram maiores do que o controle. Para os grupos tratados esse período foi ampliado para até 23,14 dias e para o controle foi de 11,90 dias. A menor média ocorreu com *B. bassiana* (12,50 dias) e a maior foi para o grupo tratado com *M. anisopliae* var. *anisopliae* (23,14 dias) (Tabela III).

No período de eclosão não houve diferença significativa entre *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *acridum*, os quais diferiram da *B. bassiana*, discordando com os resultados obtidos por MONTEIRO, *et al.* (1998) que observou diferença significativa entre os tratamentos e controle. O período de eclosão aumentou nos grupos tratados com *M. anisopliae* var. *acridum* e *B. bassiana* concordando com os resultados obtidos por BITTENCOURT *et al.* (1996) e diminuiu nos grupos tratados com *M. anisopliae* var. *anisopliae*, corroborando com ONOFRE *et al.* (2001) que também trabalhou com *B. microplus*. A menor média ocorreu com o *M. anisopliae* var. *anisopliae* (10,71 dias) e a maior foi para *B. bassiana* (45,63 dias) concordando com os obtidos por KAAYA *et al.* (1996) que realizaram o mesmo experimento com *R. appendiculatus* (Tabela III).

Quanto ao percentual de eclosão não foi observada diferença significativa entre o gênero *Metarhizium* e o controle, no entanto, *B. bassiana* diferiu dos demais apresentando resultados compatíveis com MONTEIRO, *et al.* (1998). O percentual de eclosão diminuiu, resultados que estão de acordo com os de BITTENCOURT, *et al.* (1996), ONOFRE *et al.* (2001) e ATHAYDE (2002) que trabalharam com ovos de *R. sanguineus* e *B. microplus*. A menor média alcançada foi observada no tratamento com *M. anisopliae* var. *anisopliae* (32,06%) conforme mostra a Tabela III. Estes resultados diferem dos apresentados por KAAYA *et al.* (1996) que obtiveram a menor média no grupo tratado com *B. bassiana* (0%), quando trabalharam com *R. appendiculatus*.

**TABELA III.** Parâmetros biológicos dos ovos de *Rhipicephalus sanguineus* após infecção por *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Beauveria bassiana*.

Tratamento	Período de incubação (Dia)	Período de eclosão (Dia)	Percentagem de eclosão (%)
Controle	11,90b	11,00b	99,59b
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	23,14a	10,71b	32,06b
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	23,00a	11,50b	58,59b
<i>Beauveria bassiana</i>	12,50b	45,63a	254,72a
CV(%)	11,35	23,12	17,92
	NT	NT	Log (x+1)

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. NT= Dados não transformado.

### 4.3 Comportamento dos fungos

Após o crescimento dos fungos *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum* e *B. bassiana* nas teleóginas de *R. sanguineus* foi determinada o comportamento dessas linhagens em relação ao controle (linhagem sem contato com as teleóginas).

Não houve diferença significativa entre os fungos reisolados de carrapato e seus controles, no que se refere a germinação. Como pode ser observado na Tabela VI. A germinação de *M. anisopliae* var. *anisopliae* ocorreu após 16 horas de inoculação, assim como no controle. Enquanto que para germinação de *M. anisopliae* var. *acridum* e *B. bassiana*, a germinação ocorreu após 18 horas pós-inoculação, assim como seus controles. Os valores da média de porcentagem de conídios germinados foi menor para *M. anisopliae* var. *acridum* (33,88%) e maior para *B. bassiana* (46,39%), a Tabela IV documenta esses resultados.

**TABELA IV.** Porcentagem de germinação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Beauveria bassiana* pós reisolamento de *Rhipicephalus sanguineus*.

Tratamento	Germinação
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	37,38 a
Controle	66,90 a
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	33,88 a
Controle	36,17 a
<i>B. bassiana</i>	46,39 a
Controle	30,66 a
CV(%)	28,13
	arco seno $\sqrt{x}/100$

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados em arco seno  $\sqrt{x}/100$ .

Para a esporulação, todos os tratamentos com os fungos reisolados não diferiram significativamente entre si e de seus controles no 3° e 6° dia. Entretanto no 9° dia apenas o *B. bassiana* diferiu do seu controle e dos outros tratamentos. No 12° dia *B. bassiana* que apresentou melhores resultados, continuou diferindo do seu controle, no entanto diferiu apenas do *M. anisopliae* var. *anisopliae*, como mostra a Tabela V.

**TABELA V.** Esporulação de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Beauveria bassiana* após reisolamento de *Rhipicephalus sanguineus*.

Tratamento	Esporulação			
	3 Dias	6 Dias	9 Dias	12 Dias
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	2,69 a	8,27 a	53,17 cd	57,04 b
Controle	2,56 a	7,46 a	33,01 d	75,48 b
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	0,28 a	10,99 a	114,72 bc	152,11 ab
Controle	7,75 a	19,70 a	193,73 b	193,81 ab
<i>Beauveria bassiana</i>	3,44 a	7,93 a	376,93 a	431,73 a
Controle	2,30 a	12,29 a	71,27 cd	86,29 b
CV(%)	22,35	30,74	15,80	25,86
	$\sqrt{x+3}$	$\sqrt{x+5}$	$\sqrt{x}$	$\sqrt{x+3}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados em:  $\sqrt{x+3}$  para 3 e 12 dias;  $\sqrt{x+5}$  para 6 dias e  $\sqrt{x}$  para 9 dias.

Na análise do número da colônia os reisolados não diferiram entre si e do seu controle no 3° dia, com exceção do *M. anisopliae* var. *anisopliae* que diferenciou dos demais isolados. No 6° dia os isolados permaneceram não diferindo de seus controles e entre si, ocorrendo o mesmo no 9° dia excluindo o *M. anisopliae* var. *acridum* que apresentou diferença significativa entre os demais isolados. No 12° dia apenas *M. anisopliae* var. *anisopliae* diferiu do seu controle, diferindo somente do *M. anisopliae*

var. *acidum* que por sua vez diferiu do *B. bassiana*, como mostra a Tabela VI. O *M. anisopliae* var. *acidum* apresentou as melhores médias.

**TABELA VI.** Número de colônia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* e *Beauveria bassiana* após reisolamento de *Rhipicephalus sanguineus*.

Tratamento	Número de colônias			
	3 Dias	6 Dias	9 Dias	12 Dias
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	52,60 c	37,93 a	29,99 b	26,77 c
Controle	90,21 bc	28,86 a	12,66 b	77,56 ab
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	144,18 ab	55,72 a	115,50 a	112,65 a
Controle	230,47 a	37,27 a	81,97 a	137,88 a
<i>Beauveria bassiana</i>	143,48 ab	97,20 a	30,06 b	43,48 bc
Controle	91,24 bc	44,52 a	12,57 b	23,78 c
CV(%)	13,08	30,73	15,66	15,63
	$\sqrt{x}$	$\sqrt{x}$	$\sqrt{x}$	$\sqrt{x}$

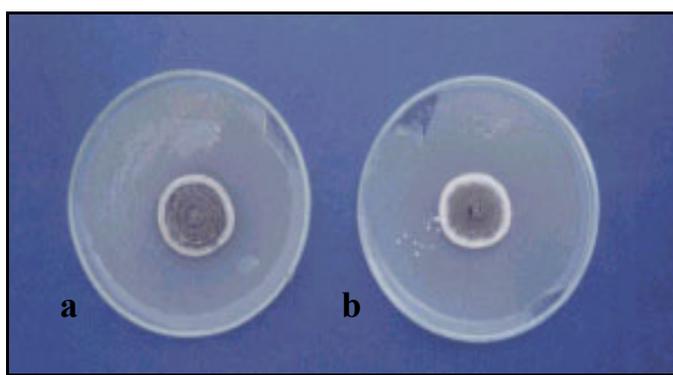
Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados transformados em  $\sqrt{x}$ .

Na análise do diâmetro da colônia os tratamentos no 3° dia não diferiram entre si e do controle. No 6° dia os reisolados não diferiram do seus controles, entretanto diferiram entre si, ocorrendo o mesmo no 9° dia. No 12° dia os fungos reisolados diferiram significativamente, não diferindo de seus controle com exceção do *M. anisopliae* var. *acidum*. *Beauveria bassiana* apresentou o melhor diâmetro de colônia. A Tabela VII e Figuras 8, 9 e 10 mostram os resultados obtidos.

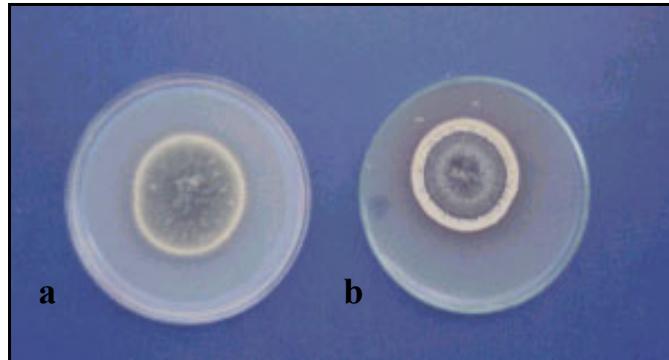
**TABELA VII.** Diâmetro da colônia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* e *Beauveria bassiana* após reisolamento de *Rhipicephalus sanguineus*.

Tratamento	Diâmetro da colônia			
	3 Dias	6 Dias	9 Dias	12 Dias
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	1,18 ab	1,72 d	2,27 c	2,95 c
Controle	1,22 ab	1,92 cd	2,48 c	3,07 c
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	1,25 ab	2,22 bc	3,42 b	4,38 b
Controle	1,05 b	2,48 ab	3,70 ab	5,03 a
<i>Beauveria bassiana</i>	1,48 a	2,82 a	3,95 a	5,08 a
Controle	1,42 a	2,70 ab	3,80 ab	4,88 ab
CV(%)	9,58	7,74	5,82	4,91
	NT	NT	NT	NT

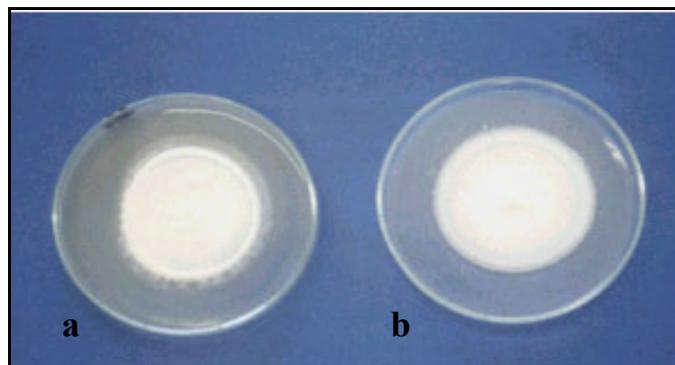
Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. NT=Dados não transformados.



**FIGURA 8.** Aspecto da colônia de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* em BDA aos 12 dias a  $\pm$  28°C. (a) Controle (b) *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*.



**FIGURA 9.** Aspecto da colônia de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* em BDA aos 12 dias a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . (a) Controle (b) *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*.



**FIGURA 10.** Aspecto da colônia de *Beauveria bassiana* em BDA aos 12 dias a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . (a) Controle e (b) *Beauveria bassiana* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*.

#### 4.4 Observação microscópica

*M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou formação de anastomoses no reisolado de *R. sanguineus* e no controle (Figura 11), importante no fenômeno para a parassexualidade (TINLIE, 1971), por propiciar a plasmogamia e conseqüentemente o estabelecimento do heterocário (AZEVEDO, 1998). Também foi verificada a presença de apressórios que são estruturas envolvidas na fixação do agente no hospedeiro (BURGES, 1981; RIBEIRO, *et al.* 1992) nos três primeiros dias (Figura 12), não sendo mais visível a 92 horas após. Característica peculiar do gênero, tendo sido detectada em *M. flavoviride* por XAVIER-SANTOS *et al.* (1999). Foi observado pouco crescimento micelial nos dois primeiros dias para o controle, entretanto no fungo reisolado do carrapato houve bastante crescimento micelial evidenciando bem os septos hifais, e conídios bem desenvolvidos (Figura 12). Presença de conidióforos ramificados e conídios tipicamente elípticos, alguns septados, para o reisolado de carrapato e controle, características também observadas por LUNA ALVES-LIMA, (1985) (Figuras 13 e 14).

Foi verificado em *M. anisopliae* var. *acridum* que o reisolado de *R. sanguineus* e o controle apresentaram abundante micélio septado nos dois primeiros dias, entretanto foram encontrados raros conidióforos simples e conseqüentemente conídios de formato ovóide típico (Figura 16), estruturas de reprodução observadas por XAVIER-SANTOS *et al.* (1999) e não foi observada a formação de anastomose e apressórios para o reisolado e o controle. Diante das observações não foram evidenciada diferença entre os *M. anisopliae* var. *acridum* reisolado de *R. sanguineus* e o controle.

Para *Beauveria bassiana* foi verificado que o reisolado de *R. sanguineus* e o controle produziram bastante micélio (Figura 17) e primórdio de conidióforos (Figura 15) nas primeiras 24 horas. O que indica processo da parassexualidade. Sendo observado abundantes conídios ovóides e conidióforos em forma de cachos, característica da espécie (Figura 17).



**FIGURA 11.** Anastomose (seta). *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*. 640X.

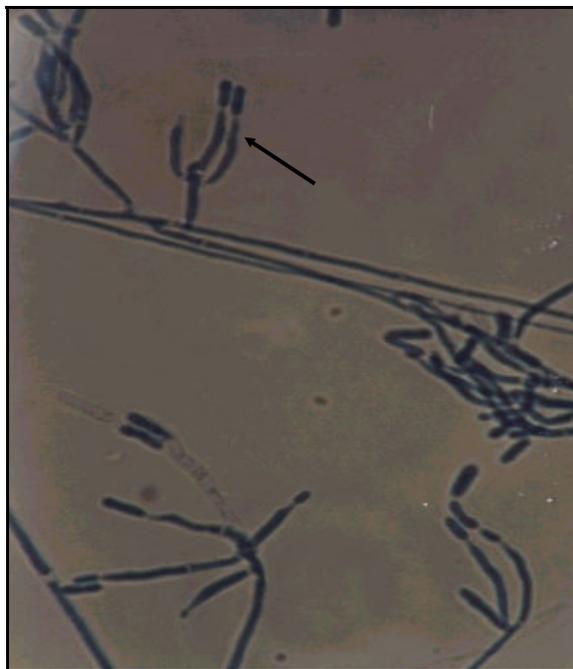


**FIGURA 12.** Formação de apressório (seta). *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*.  
640X.

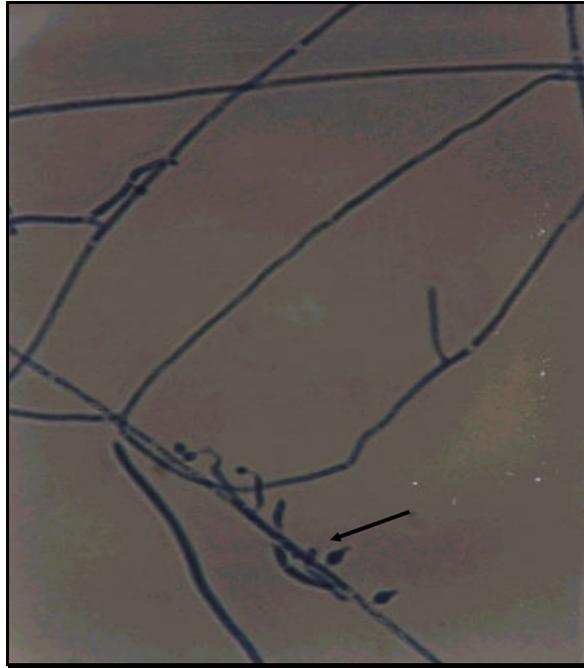


**FIGURA 13.** Conídios septados com germinação unipolar (seta a) e bipolar (seta b). *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*. 640X.

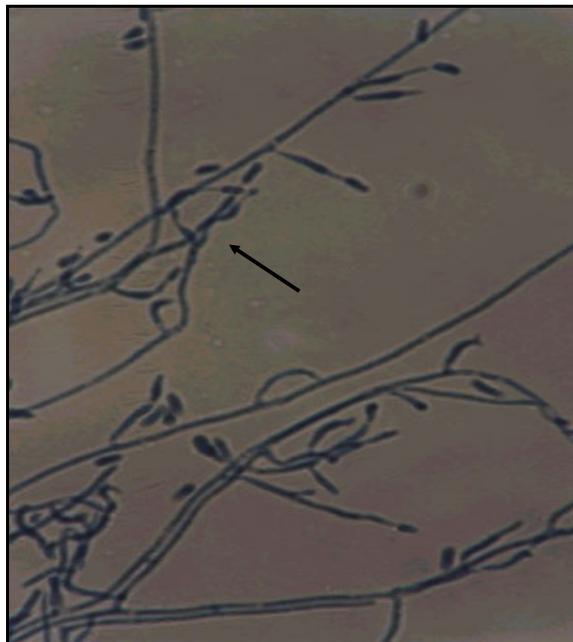


**FIGURA 14.** Conidióforo ramificado (seta) com conídios. *Metarhizium anisopliae* var.

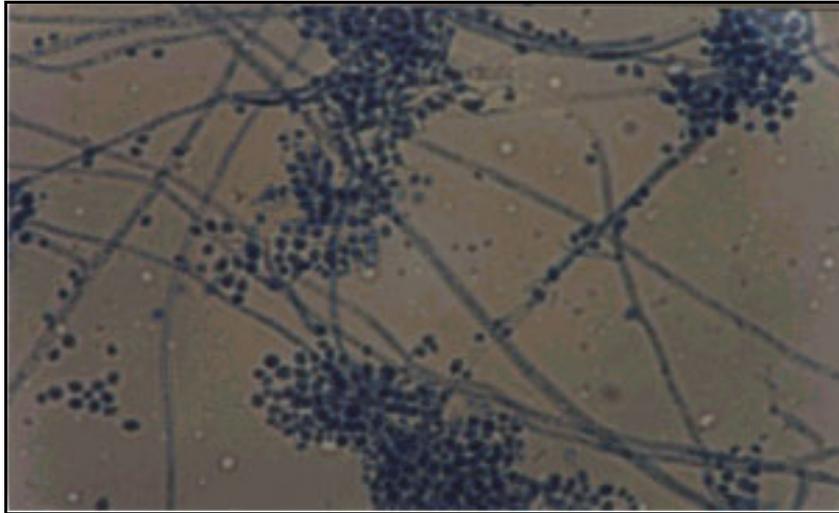
*anisopliae* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*. 640X.



**Figura 15.** Primórdios de conidióforos (seta). *Beauveria bassiana* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*. 640X.



**Figura 16.** Conidióforo simples (seta) *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus* 640X.



**FIGURA 17.** Conidióforo com conídios em cachos. *Beauveria bassiana* reisolado de *Rhipicephalus sanguineus*. 640X.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível formular as seguintes conclusões:

- Todos os fungos estudados comprovaram a ação contra o *Rhipicephalus sanguineus*.
- Para os parâmetros biológicos (peso da massa de ovos, peso residual, período de pre-postura, período de postura, índice de produção de ovos e eficiência reprodutivas) de teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou melhor resultado.
- *M. anisopliae* var. *anisopliae* apresentou resultado melhor quanto os parâmetros biológicos sobre os ovos (período de incubação, período de eclosão e percentagem de eclosão) de *Rhipicephalus sanguineus*.
- *Beauveria bassiana* apresentou maior germinação, esporulação e diâmetro de colônia após passagem em *Rhipicephalus sanguineus* e o *M. anisopliae* var. *acridum* apresentou melhor número de colônias.
- Não foram observadas modificações morfológicas entre os reisolados *Rhipicephalus sanguineus*.

## 6. BIBLIOGRAFIA

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: S. B. Alves edit. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: FEALQ, p.289-371, 1998a.

ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: S. B. Alves edit. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: FEALQ, p.21-37, 1998b.

ALVES, S. B. & MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: S. B. Alves edit. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: FEALQ, p.765-777, 1998.

ATHAYDE, A. C. R. **Patogenicidade de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride* sobre ovos, larvas e teleóginas de *Boophilus microplus* da região semi-árido paraibana**. Tese de Doutorado. Recife: UFPE, 138p. 2002.

ATHAYDE, A. C. R. ; BARRETO, C. A. & LIMA, E. A. L. A. Efeito de *Metarhizium anisopliae* 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**, 1999, Salvador-BA. Anais... Salvador Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária. p. 95, 1999a.

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**, 1999, Salvador-BA. Anais... Salvador Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária. p. 96, 1999b.

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. O ciclo parassexual em fungos. **Revista de Microbiologia**, v. 8, p. 157-168, 1971.

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

AZEVEDO, J. L. O uso dos fungos na biotecnologia. In: L. A. Serafini, N. M. Barros; J. L. Azevedo. **Biotecnologia na agricultura e na agropecuária**. Guaíba: Agropecuária. p. 93-149, 2002.

BARBOSA, J. V.; DAEMON, E.; BITTENCOURT, V. R. E. P. & FACCINE, J. L. H. Effect of two isolates of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on larval moulting and nymphal survival of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, p. 53-56, 1997.

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

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

BENNETT, G. F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on eggs production. **Acarologia**, v. 16, p. 52-61, 1974.

- BENHAM, R. W. & MIRANDA, J. L. The genus *Beauveria*, morfological and taxonomical studies of several species and of two strains isolated from Wharf-piling borers. **Mycologia**, v. 45, p. 727-746, 1953.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. da S. & VIEGAS, E. de C. Eficácia “in vitro” dos isolados 747 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* no carrapato *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, v. 4, p.86, 1995.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. da S.; VIEGAS, E. de C. & ALVES, S. Evaluation of the effect of the contact with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Canestrini,1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5 , p.81-84, 1996.
- BOCK, C. H., JEGER, M. J., MUGHOGHO, L. K., CARDWELL, K. F., & MTISI, E. Effect of dew point temperature and conidium age on germination, germ tube growth and infection of maize and sorghum by *Peronosclerospora sorghi*. **Mycological Research**. v. 103, 859-864, 1999.
- BOYCEV, D. & RIZVANOV, K. Relation of *Botrytis cinerea* to ixodids tick. **Zoologie Zeitschrift Ukranien**, v. 39, p. 460, 1960.
- BURGES, H. D. 1981. **Microbial Control of Pests and Plant Diseases**. 1970-1980. New York: Academia Press, 1981.
- CORDOVÉS, C. O. **Carrapato: Controle ou Erradicação**. Guaíba: Agopecuária, 1997. 176. p.
- COSTA, M. D. M. Susceptibilidade do triatimíneo *Rhodnius prolixus* ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. **Anais da Academia de Medicina da Bahia** v. 1, 35-44, 1978.

DAVIES-MORLEY J.; MOORE, D. E. & PROIR, C. Screening of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria* spp. Conidia with exposure to simulated sun light and a range of temperatures. **Mycological Research**, v.100, p.31-38, 1995.

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.

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

ESTRADA-PEÑA, A. & JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on humanbiting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental Applied Acarology**, v.9 p.685-715, 1999.

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

FARIA, M. R. & MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos em controle biológico no Brasil. **Biotechnology: Ciência e Desenvolvimento**. v. 22, p. 18-21, 2001.

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**, 1998, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro, p.7, 1998.

FARGUES, J.; MANIANIA, N. K.; DELMAS, J. C. & SMITS, N. Influence de la température sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopathogènes. **Agronomie**, v.12, p.557-564, 1992.

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

FINNEY, D. J. **Statistical method in biological assay.** 2<sup>th</sup>. London: Charles Griffin, 1964. p.668.

FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: H. D. BURGESS, **Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980.** London: Academic Press,. p.465-482, 1981.

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*. **Veterinária Parasitológica**, v. 94, p.117-125, 2000.

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

GUAGLIUMI, P. A cigarrinha das pastagens ataca a cana-de-açúcar no nordeste do Brasil. **Brasil Açucareiro**, v. 76, p. 89-91, 1970.

GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E. J. & VILAS BOAS, A. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle da "cigarrinha-da-folha" *Mahanarva posticata* (Stal) no Nordeste do Brasil. **Boletim Técnico da CODECAP**, v. 3, p. 1-56, 1974.

HITCHCOCK, L. F. Studies on the non-parasitic stages of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: ioxodidae). **Australian Journal of Zoology**, v. 3, p. 295-311, 1955.

HONG, T.D.; JENKINS, N. E. & ELLIS, R. H. The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Mycological Research**, v.104, p.662-665, 2000.

HEADRICK, D. H. & GOEDEN, R. D. Biological control as a tool for ecosystem management. **Biological Control**, v.21, p. 249-257, 2001.

INGLIS, G. D.; JOHSON, 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.

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

KAAYA, G. P.& MUNYINYI, D. M. Biocontrol potencial of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, p. 237-241, 1995.

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. 15-50, 1996.

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

KUKLINSKY-SOBRAI, J. & LUNA-ALVES LIMA, E. A. Citologia e viabilidade genética em *Metarhizium flavoviride*. **XII Encontro de Genética do Nordeste**, 1998, Feira de Santana- BA. Anais... Feira de Santana, p. 417, 1998.

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

LUNA-ALVES LIMA, E. A. **Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diploides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. Tese Doutorado, Rio de Janeiro, UFRJ, 206p., 1985.

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**, v. 4, p. 20-21, 1983.

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

MAGALHÃES, B. P.; GOETELL, M. S. & FRAZÃO, H. S. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* vr. *Acridum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 162-164, 2000.

MARGOSAN, D. A. & PHILLIPS, D. J. Effect of two temperatures on nuclear number of conidia of *Monilinia fructicola*. **Mycologia**, v. 77, p.835-837, 1985.

MALAGODI, M. & VEIGA, A. F S. L. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill sobre cupim *Nasutitermes* (Dudley) (Isoptera: Termitidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 315-321, 1995.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L., **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1999. p.388.

MESSIAS, C. L., & AZEVEDO, J. L. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 75, 473-477, 1980.

MILNER, R. J.; HARTELY, T. R.; LUTTON, G. G. & PRIOR, C. Control of *Phaulacridium vittatum* (Sjotedt) (Orthoptera: Acrididae) in field cages using an oil-based spray of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 33, p. 165-167, 1994.

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

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, 1998.

MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. P.; DAEMON, E. & FACCINI, J. L. H. Effect of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on eggs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ioxidade). **Ciência Rural**, v. 28, p. 461-466, 1998.

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

MOREIRA, M. A. S.; MAGALHÃES, B. P.; VALADARES, M. C. C. & CHAGAS, M. C. M. Occurrence of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Hyphomycetes) on *Schistocerca palles* (Thunberg) (Orthoptera: Acaridae) in Rio Grande do Norte, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p.359-391, 1996.

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

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N. M. & AZEVEDO, J. L. Patogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 1478-1480, 2001.

ONOFRE, S. B.; VARGAS, L. R. B.; ROSSATO, M.; BARROS, N. M.; BOLDO, J. T.; NUNES, A. R. F. & AZEVEDO, J. L. Controle biológico de pragas na agropecuária, por meio de fungos entomopatogênicos. In: L. A. Serafini; N. M. Barros; J. L. Azevedo. **Biociencia: avanços na agropecuária e na agroindústria**. Caxias do Sul, EDUSC. p. 297-317, 2002.

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

PETCH, T. Notes on entomogenous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 16, p. 67-71, 1931.

RATH, A. C.; KOEN, T. B. & YPI, H. Y. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture soils. **Mycological Research**, v. 96, 378-384, 1992.

RATH, A. C.; WORLEDGE, D.; ANDERSON, G. C. & CARR, C. J. Virulence of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to *Adoryphorus coulini* (Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of the Australian Entomological Society**, v. 34, p.181-186, 1995.

RIBEIRO, S. M. A.; LUNA-ALVES LIMA, E. A.; ASSUNÇÃO, W. T. G. & LIMA D. M. M. Behavior and characteristics of a wild strain of *Metarhizium anisopliae*. **Revista de Microbiologia**, v. 23, p. 97-100, 1992.

ROMBACH, M. C., HUMBER, R. A. & ROBERTS, D. W. *Metarhizium flavoviride* var. *mimus* var. nov., a pathogen of leafhoppers and plant hoppers of rice. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, p. 451-459, 1986.

SAMISH, M. & GLAZER, J. Killing ticks with parasitic nematodes of insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 281-282, 1991.

SILVEIRA, N. S. S. **Microflora associada a rizosfera da cana-de-açúcar (*Saccharum, spp*), sua interação com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e o efeito da vinhaça na sobrevivência deste fungo "in vitro" e no solo.** Dissertação de Mestrado em Biologia de Fungos, Recife, UFPE, 122p. 1990.

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.

STEINKRAUS, D. C. & SLAYMAKER, P. H. Effect of temperature and humidity of formation, germination and infectivity of conidia of *Neozygites freseni* (Zygomycetes: Neozygiteaceae) from *Sphis grossiui* (Homoptera: Aphididae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 54, p. 130-137, 1994.

TAMAI, M. A.; ALVES, S. B. & NEVES, P. J. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. ao ácaro *Tetranychus urticae* Koch. **Scientia Agricola**, v. 56, p.285-288, 1999.

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

TINLINE, R. D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**, v. 63, 713-721, 1971.

THOMAS, M. B. & JENKINS, N. E. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. **Mycological Research**, v. 101, p 1469-1474, 1997.

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

XAVIER-SANTOS, S., **Aspectos do comportamento cultural, citológico e entomopatogênico de *Metarhizium flavoviride***. Dissertação de Mestrado em Biologia de Fungos, Recife, UFPE, 102p. 1995.

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

WALSTAD, J. D., ANDERSON, R. J. & STAMBAUGH, J. Effect of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.16, p. 221-226, 1970.

WRAIGHT, S. P.; CARRUTHERS, R. I.; BRADLEY, C. A.; JARONSKI, S. T.; LACEY, L. A.; WOOD, P. & GALAINI-WRAIGHT. Pathogenicity of the

entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolli*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p. 217-226, 1998.

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

## **7. ANEXOS**

**TABELA VIII.** Dados originais dos parâmetros biológicos das teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus* com água destilada autoclavada.

Teleóginas	Peso inicial (g)	Peso da massa de ovos (g)	Peso residual (g)	Período de pré- postura (Dia)	Período de postura (Dia)	Índice de produção de ovos (g)	Eficiência reprodutiva
01	0,15	0,10	0,02	5	12	66,66	1.333.333,33
02	0,19	0,09	0,02	5	12	47,36	947.368,42
03	0,20	0,12	0,03	5	12	60,00	1.200.000,00
04	0,19	0,13	0,02	5	12	68,42	1.354.736,84
05	0,19	0,12	0,02	5	12	63,15	1.237.894,73
06	0,18	0,12	0,03	5	12	66,66	1.333.333,33
07	0,19	0,10	0,02	6	12	52,63	1.052.631,57
08	0,18	0,10	0,02	6	12	55,55	1.000.600,00
09	0,20	0,10	0,02	5	11	50,00	1.000.000,00
10	0,19	0,10	0,02	5	11	52,63	1.052.631,57

**TABELA IX.** Dados originais dos parâmetros biológicos dos ovos de *Rhipicephalus sanguineus* com água destilada autoclavada.

Teleóginas	Período de incubação (Dia)	Período de eclosão (Dia)	Eclosão (%)
01	12	11	100
02	12	11	100
03	12	11	100
04	12	11	99
05	11	11	98
06	12	11	100
07	12	11	100
08	12	11	99
09	12	11	100
10	12	11	100

**TABELA X.** Dados originais dos parâmetros biológicos das teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus* após infecção por *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Teleóginas	Peso inicial (g)	Peso da massa de ovos (g)	Peso residual (g)	Período de pré-postura (Dia)	Período de postura (Dia)	Índice de produção de ovos (g)	Eficiência reprodutiva (%)	Controle (%)
01	0,18	-	0,08	-	-	-	-	100,00
02	0,16	-	0,07	-	-	-	-	100,00
03	0,13	0,04	0,03	5	11	30,76	603,07	99,94
04	0,15	-	0,07	-	-	-	-	100,00
05	0,13	0,004	0,04	6	4	0,3076	-	100,00
06	0,18	0,08	0,03	5	11	44,44	177,77	99,98
07	0,21	0,04	0,07	5	8	19,04	19,04	99,99
08	0,28	0,02	0,08	5	6	7,1428	-	100,00
09	0,17	0,09	0,04	5	12	52,94	1037,64	99,98
10	0,16	0,07	0,04	4	12	43,75	43,75	99,99

**TABELA XI.** Dados originais dos parâmetros biológicos dos ovos de *Rhipicephalus sanguineus* após infecção por *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*.

Teleóginas	Período de incubação (Dia)	Período de eclosão (Dia)	Eclosão (%)
01	-	-	-
02	-	-	-
03	24	10	98
04	-	-	-
05	22	11	0
06	23	11	20
07	23	11	5
08	25	8	0
09	23	11	98
10	22	13	5

**TABELA XII.** Dados originais dos parâmetros biológicos das teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus* após infecção por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

Teleóginas	Peso inicial (g)	Peso da massa de ovos (g)	Peso residual (g)	Período de pré-postura (Dia)	Período de postura (Dia)	Índice de produção de ovos (g)	Eficiência reprodutiva (%)	Controle (%)
01	0,15	0,08	0,03	5	12	53,33	1045,33	99,92
02	0,19	0,10	0,03	5	18	52,63	1031,57	99,89
03	0,19	0,10	0,03	5	15	52,63	947,36	99,92
04	0,19	0,13	0,03	4	14	68,42	136,84	99,98
05	0,15	-	0,08	0	0	0	0	100,00
06	0,18	0,09	0,03	4	13	50	10	99,99
07	0,18	0,06	0,08	5	13	33,33	400	99,96
08	0,17	-	0,07	0	0	0	0	100,00
09	0,15	0,06	0,03	3	7	40	784	99,92
10	0,21	0,08	0,07	5	7	38,09	152,38	99,98

**TABELA XII.** Dados originais dos parâmetros biológicos dos ovos de *Rhipicephalus sanguineus* após infecção por *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.

Teleóginas	Período de incubação (Dia)	Período de eclosão (Dia)	Eclosão (%)
01	22	12	98
02	23	11	98
03	22	12	90
04	24	11	10
05	0	0	0
06	23	12	1
07	24	10	60
08	0	0	0
09	22	14	98
10	24	10	20

**TABELA XIV.** Dados originais dos parâmetros biológicos das teleóginas de *Rhipicephalus sanguineus* após infecção por *Beauveria bassiana*.

Teleóginas	Peso inicial (g)	Peso da massa de ovos (g)	Peso da residual (g)	Período de pré-postura (Dia)	Período de postura (Dia)	Índice de produção de ovos (g)	Eficiência reprodutiva (%)	Controle (%)
01	0,14	0,07	0,03	5	12	50	50	99,99
02	0,15	0,04	0,05	6	7	26,66	506,66	99,94
03	0,15	0,07	0,03	6	18	46,66	93,33	99,99
04	0,15	0,05	0,03	5	7	33,33	653,33	99,95
05	0,16	0,07	0,03	5	17	43,75	131,25	99,98
06	0,15	0,07	0,05	6	14	46,66	233,33	99,98
07	0,15	0,08	0,03	5	11	53,33	1013,33	99,90
08	0,15	0,08	0,03	6	16	53,33	746,66	99,92
09	0,19	0,10	0,02	5	12	52,63	157,89	99,98
10	0,18	0,09	0,04	6	11	50	200	99,98

**TABELA XV.** Dados originais dos parâmetros biológicos dos ovos de *Rhipicephalus sanguineus* pós infecção por *Beauveria bassiana*.

Teleóginas	Período de incubação (Dia)	Período de eclosão (Dia)	Eclosão (%)
01	22	12	5
02	22	11	95
03	23	10	10
04	22	12	98
05	23	11	15
06	24	9	25
07	22	12	95
08	23	12	70
09	22	10	15
10	22	11	20