

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

**DISSERTAÇÃO**

**Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ensaios *in vitro* da virulência e conidiogênese.**

**Giselle Arieiro Jones**

**2017**



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

**Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato  
*Rhipicephalus microplus*: ensaios *in vitro* da virulência e conidiogênese.**

**GISELLE ARIEIRO JONES**

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

*E Coorientação do Professor*  
**Wendell Marcelo de Souza Perinotto**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2017



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

Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato  
*Rhipicephalus microplus*: ensaios in vitro da virulência e conidiogênese.

GISELLE ARIEIRO JONES

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

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

J77s Jones, Giselle Arieiro, 1989-  
Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ensaios in vitro da virulência e conidiogênese. / Giselle Arieiro Jones. - 2017. 46 f.

Orientadora: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt.  
Coorientador: Wendell Marcelo de Souza Perinotto.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, 2017.

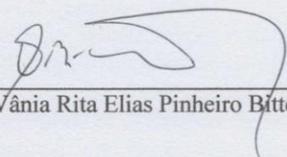
1. Carrapato dos bovinos. 2. Fungos artropodopatogênicos. 3. Controle biológico. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias Pinheiro, 1959-, orient. II. Perinotto, Wendell Marcelo de Souza, 1983-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

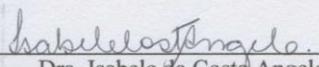
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

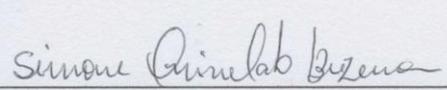
GISELLE ARIEIRO JONES

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/2017.

  
Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt (UFRRJ)

  
Dra. Isabele da Costa Angelo (UFRRJ)

  
Dra. Simone Quinelato Bezerra (FIOCRUZ)

*Dedico este trabalho a todos os entes queridos que incentivaram minha  
continuidade e à ciência, que é a centelha motriz de todos os pesquisadores.*

*Dedico este trabalho a todos os entes queridos que incentivaram minha caminhada e à ciência, que é a centelha motivadora de todos os pesquisadores.*

## AGRADECIMENTOS

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants.” – Isaac Newton  
Gostaria de agradecer a todos os gigantes que me sustentaram até aqui.

Primeiramente a toda a Espiritualidade que não só me agraciou com a dádiva da vida, mas me protegeu e sustentou durante toda a minha existência, graças eternas!

Ao meu pai Sydney Mussel Jones e minha mãe Rosana Gouvea Arieiro Jones por sempre terem investido na minha educação e sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas.

Ao meu grande amor e companheiro Debarshee Bagchi por toda paciência, carinho e cumplicidade dispensados a mim durante a fase final desta jornada.

À professora Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt pela confiança depositada em mim. Agradeço não só pela oportunidade profissional que me ofereceu, mas também por toda a amizade e carinho dispensados a mim.

Aos antigos e atuais integrantes do Laboratório de Controle Microbiano: Mariana Guedes Camargo, Patrícia Gôlo, Isabele Ângelo, Simone Quinelato, Wendel Perinotto, Caio Balduino, Michel Pereira, Allan Marciano, Jessica Fiorotti, Maria Clemente, Thaís Almeida, Emily Mesquita, Laura Meirelles, Julie Tavares e Adonis de Lima. Palavras não seriam suficientes para expressar a minha gratidão por tudo que fizeram por mim. Obrigada por me receberem de braços abertos, contribuírem imensamente para a conclusão deste trabalho e pela amizade que levarei por toda a minha vida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por toda minha formação acadêmica e crescimento pessoal.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade de retornar a esta casa.

A todos os professores, funcionários, técnicos e alunos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

A CAPES pelo auxílio financeiro, indispensável para a realização deste trabalho.

A todos os amigos e familiares que, mesmo não contribuindo diretamente com minha vida acadêmica, sempre estiveram presentes na vida pessoal, proporcionando a força e incentivo necessários para superar os meus limites. Seria impossível nomear a todos!

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta vitória, o meu muito obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Giselle Arieiro Jones, filha de Sydney Mussel Jones e Rosana Gouvea Arieiro Jones, nasceu em 14 de fevereiro de 1989 em Nova Iguaçu, RJ.

Concluiu o ensino médio em 2006 no Colégio Curso Equipe Grau de Nilópolis, cidade onde viveu toda sua vida.

Em Setembro de 2007 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído o mesmo em Abril de 2014. Durante esse período realizou diversos estágios dentro e fora da universidade tendo realizado seu Estágio Curricular de Conclusão de Curso na área de Patologia Clínica, onde atuou no mercado de trabalho durante todo o ano de 2014.

Em março de 2015 iniciou o Mestrado sob a orientação da professora Vania Elias Rita Pinheiro Bittencourt, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias com área de concentração em Parasitologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sendo bolsista CAPES, tendo participado de diversos eventos científicos e acadêmicos.

## RESUMO

JONES, Giselle Arieiro. Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ensaios *in vitro* da virulência e conidiogênese. 2017. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O parasitismo causado por *Rhipicephalus microplus*, conhecido popularmente como carrapato dos bovinos, acarreta diversos prejuízos para a pecuária brasileira. O uso indiscriminado de produtos químicos para o seu controle tem gerado diversos efeitos negativos e nesse contexto, estudos envolvendo o fungo *Metarhizium* spp. para controle biológico de carrapatos tem demonstrado grande importância. O presente estudo avaliou a virulência de 11 isolados de *Metarhizium* spp. para fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas de *R. microplus* e também o potencial de conidiogênese dos mesmos isolados e a sua relação com a virulência. Pontos únicos de inóculo e microcultivo entre lâmina e lamínula foram realizados a fim de avaliar a macro e micro morfologia dos isolados. Durante o bioensaio utilizando fêmeas ingurgitadas, foram avaliados os efeitos dos fungos sobre os parâmetros reprodutivos através da análise do percentual de controle de cada isolado após o tratamento por imersão das fêmeas em suspensões aquosas de  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL. A virulência dos isolados para ovos e larvas foi avaliada através da observação da taxa de eclosão e mortalidade, respectivamente, após tratamento com suspensões aquosas nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL. Também foi calculada a CL50 e CL90 de cada isolado para larvas no vigésimo quinto dia após o tratamento. Para calcular a conidiogênese dos isolados, foram feitos três recortes aleatórios de  $1,256 \text{ cm}^2$  de área de cada placa contendo conídios fúngicos de 14 dias de cultivo, em seguida foram agitados em 1mL de solução de água destilada e tween 80 a 0,1% e uma alíquota desta suspensão foi quantificada com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico. Os dados paramétricos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey e os não paramétricos pelo teste de Kruskal Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) com nível de significância de 5% através do software livre R Studio Versão 0.99.903 e o pacote “agricolae” (Statistical Procedures for Agricultural Research), versão 1.2-4. Adicionalmente foi aplicada estatística multivariada mediante a Análise de Componentes Principais (ACP) para parâmetros de fêmeas ingurgitadas. A análise macro e micromorfológica dos isolados testados se mostrou compatível com as descritas na literatura para *Metarhizium* spp. De maneira geral, os resultados se apresentaram diretamente proporcionais às concentrações que foram testadas e os isolados ARSEF 729 de *Metarhizium anisopliae* e ARSEF 3643 de *Metarhizium anisopliae* sensu lato, apresentaram os melhores resultados para fêmeas, ovos e larvas de *R. microplus*, demonstrando ser bons candidatos para estudos futuros. O isolado ARSEF 2211 de *Metarhizium anisopliae* sensu lato demonstrou baixa virulência para todos os estágios. A conidiogênese dos diferentes isolados testados se mostrou muito variada e não apresentou nenhuma relação com a virulência dos mesmos. O presente estudo possibilitou a seleção de isolados de *Metarhizium* spp. com alta virulência para os diferentes estágios de vida do carrapato *R. microplus* bem como isolados com alta produção de conídios, ressaltando a importância de estudos que visem selecionar isolados adequados para serem utilizados futuramente em formulações para controle biológico a campo.

**Palavras-chave:** Controle biológico, Fungos artropodopatogênicos, carrapato dos bovinos.

## ABSTRACT

JONES, Giselle Arieiro. Selection of *Metarhizium* spp. isolates to the control of the tick *Rhipicephalus microplus*: *in vitro* tests of virulence and conidiogenesis. 2017. 46p. Dissertation (Master Science in Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The parasitism caused by *Rhipicephalus microplus*, popularly known as cattle tick, causes several losses to the Brazilian livestock. The indiscriminate use of chemical products for its control has generated several negative effects and in this context, studies involving the fungus *Metarhizium* spp. for biological control of ticks have shown great importance. The present study evaluated the virulence of 11 isolates of *Metarhizium* spp. for engorged females, eggs and larvae of *R. microplus* and also the conidiogenesis potential of the same isolates and their relationship with virulence. Single point of inoculum and cultivation between slide and coverslip were performed to evaluate the macro and micromorphology of the isolates. During the bioassay using engorged females, the effects of fungi on reproductive parameters were evaluated by analyzing the control percentage of each isolate after treatment by immersion of females in suspensions of  $10^7$  and  $10^8$  conidia / mL. The virulence of the isolates for eggs and larvae was evaluated by observing the hatch rate and mortality, respectively, after treatment with aqueous suspensions of *Metarhizium* spp. at concentrations of  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  conidia / mL. The LC50 and CL90 of each isolate for larvae were also calculated on the 25th day after treatment. To calculate the conidiogenesis of the isolates, three random cuts of 1.256 cm<sup>2</sup> of area of each plate containing fungal conidia of 14 days of culture were made, then stirred in 1 ml of distilled water solution and 0.1% tween 80 and one aliquot of this suspension was quantified using a Neubauer chamber and optical microscope. Parametric data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test and non-parametric by Kruskal Wallis test followed by Student-Newman-Keuls (SNK) with significance level of 5% through free software R Studio Version 0.99 .903 and the "agricolae" package (Statistical Procedures for Agricultural Research), version 1.2-4. In addition, multivariate statistics were applied using Principal Component Analysis (PCA) for parameters of engorged females. The macro and micromorphological analysis of the isolates tested were compatible with those described in the literature for *Metarhizium* spp. In general, the results were directly proportional to the concentrations that were tested and the isolates ARSEF 729 of *Metarhizium anisopliae* and ARSEF 3643 of *Metarhizium anisopliae* sensu lato, presented the best results for *R. microplus* females, eggs and larvae, proving to be good candidates for future studies, whereas the isolate ARSEF 2211 of *Metarhizium anisopliae* sensu lato demonstrated low virulence for all stages. The conidiogenesis of the different isolates tested varied a lot and no relation between conidia production and virulence was observed. The present study made possible the selection of isolates of *Metarhizium* spp. with high virulence for several stages of life of the *R. microplus* tick as well as isolates with high conidia production and their relationship with virulence, emphasizing the importance of studies to select suitable isolates for future use in formulations for biological control in the field.

**Keywords: Biological control, Arthropodopathogenic fungi, Cattle tick.**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Isolados de <i>Metarhizium</i> spp., origem, substrato e identificações. ....	9
<b>Tabela 2.</b> Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P. I. F.), Peso Total da Massa de Ovos (P. T. M. O.), Percentual de Eclosão (%), Índice de Produção de Ovos (I. P. O.), Índice Nutricional (I. N.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas por imersão em suspensão aquosa de $10^7$ ou $10^8$ conídios/mL de 11 isolados de <i>Metarhizium</i> spp. ....	18
<b>Tabela 3-</b> Percentual médio $\pm$ desvio padrão de eclosão de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> com 10 dias após o início da eclosão após a exposição aos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e Umidade Relativa $\geq 80\%$ . ....	20
<b>Tabela 4-</b> Percentual médio $\pm$ desvio padrão de mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> 5 dias após a exposição aos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e Umidade Relativa $\geq 80\%$ . ....	22
<b>Tabela 5-</b> Percentual médio $\pm$ desvio padrão de mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> 10 dias após a exposição aos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e Umidade Relativa $\geq 80\%$ . ....	23
<b>Tabela 6-</b> Percentual médio $\pm$ desvio padrão de mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> 15 dias após a exposição aos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e Umidade Relativa $\geq 80\%$ . ....	24
<b>Tabela 7-</b> Percentual médio $\pm$ desvio padrão de mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> 20 dias após a exposição aos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e Umidade Relativa $\geq 80\%$ . ....	25
<b>Tabela 8</b> - Percentual médio $\pm$ desvio padrão de mortalidade de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> 25 dias após a exposição aos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e Umidade Relativa $\geq 80\%$ . ....	26
<b>Tabela 9-</b> Concentração letal (CL 50 e CL 90) dos diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp. obtida no bioensaio de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> 25 dias após o tratamento. Experimento realizado sob condições controladas de $27 \pm 1^\circ$ C e Umidade Relativa $\geq 80\%$ . ..	31
<b>Tabela 10-</b> Média e desvio padrão da produção de conídios dos isolados de <i>Metarhizium</i> spp. ....	32

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Isolados fúngicos cultivados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) após 14 dias de cultivo a 25°C em escotofase. **A:** *Metarhizium pingshaense* ARSEF 552; **B:** *Metarhizium robertsii* ARSEF 724; **C:** *Metarhizium anisopliae* ARSEF 729; **D:** *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 760; **E:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 929; **F:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 1885; **G:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 2211; **H:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 2521; **I:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3479; **J:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3641; **K:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3643. .... 15
- Figura 2-** Análise de componentes principais para 11 isolados de *Metarhizium* spp. (**2B**) nas concentrações de 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> em função dos parâmetros avaliados: Peso Inicial da Fêmea (PIF), Peso Total da Massa de Ovos (PTMO), Índice Nutricional (IN), Índice de Produção de Ovos (IPO), Percentual de Eclosão (PE) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (**2A**). .... 19
- Figura 3 -** Percentual de redução da eclosão de larvas obtidas de ovos de *Rhipicephalus microplus* após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de 10<sup>7</sup> conídios/mL no décimo dia após o início da eclosão das larvas. .... 21
- Figura 4-** Percentual de redução da eclosão de larvas obtidas de ovos de *Rhipicephalus microplus* após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/mL no décimo dia após o início da eclosão das larvas. .... 21
- Figura 5-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de 10<sup>7</sup> conídios/mL no 15º dia após o tratamento. .... 27
- Figura 6-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de 10<sup>7</sup> conídios/mL no 20º dia após o tratamento. .... 27
- Figura 7-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de 10<sup>7</sup> conídios/mL no 25º dia após o tratamento. .... 28
- Figura 8-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/mL no 15º dia após o tratamento. .... 29
- Figura 9-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/mL no 20º dia após o tratamento. .... 29
- Figura 10-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de 10<sup>8</sup> conídios/mL no 25º dia após o tratamento. .... 30

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
2.1	O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	2
2.2	O controle biológico	3
2.2.1	Controle biológico utilizando fungos artropodopatogênicos	4
2.3	O gênero <i>Metarhizium</i> .	5
2.4	Estudos <i>in vitro</i> sobre a virulência de <i>Metarhizium</i> spp. para o controle de carrapatos.	6
2.5	Importância da Conidiogênese dos fungos artropodopatogênicos	7
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>8</b>
3.1	Local e período de execução do experimento	8
3.2	Obtenção e manutenção de fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	8
3.3	Obtenção e manutenção dos isolados fúngicos de <i>Metarhizium</i> spp.	8
3.4	Ensaio <i>in vitro</i>	9
3.4.1	Caracterização morfológica	9
3.4.2	Elaboração e quantificação das suspensões	10
3.4.3	Viabilidade dos conídios	10
3.4.4	Delineamento experimental	10
3.4.5	Bioensaio com fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	10
3.4.6	Re-isolamento dos isolados fúngicos após o ensaio biológico	11
3.4.7	Bioensaio com ovos de <i>Rhipicephalus microplus</i>	11
3.4.8	Bioensaio com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	12
3.4.9	Avaliação da conidiogênese entre os diferentes isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	12
3.5	Análise estatística	12
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>14</b>
4.1	Caracterização morfológica	14
4.2	Viabilidade dos conídios utilizados nas suspensões	15
4.3	Bioensaio com fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .	15
4.3.1	Peso inicial das fêmeas ingurgitadas	15
4.3.2	Peso total da massa de ovos	16
4.3.3	Percentual de eclosão de larvas	16
4.3.4	Índice de produção de ovos	16
4.3.5	Índice nutricional	16
4.3.6	Percentual de controle	16
4.3.7	Re-isolamento fúngico	19
4.4	Bioensaio com ovos de <i>Rhipicephalus microplus</i>	20
4.5	Bioensaio com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	22
4.6	Avaliação da produção de conídios	31
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodida) (Murrel; Barker, 2003), popularmente conhecido como carrapato dos bovinos, é um ectoparasita de grande importância econômica em diversas partes do mundo devido aos prejuízos que o seu parasitismo acarreta para a pecuária. Tais prejuízos envolvem a perda de ganho de peso, da produção de leite, transmissão de hematozoários, bem como danos causados ao couro do animal que também fica mais susceptível a infecções bacterianas e míases.

O controle deste carrapato é feito majoritariamente através de produtos químicos, porém o seu uso indiscriminado tem gerado diversas consequências negativas como contaminação ambiental e desenvolvimento de populações de carrapatos resistentes. Nesse contexto, a busca por alternativas de controle tem sido cada vez maior e o controle biológico utilizando fungos artropodopatogênicos é uma delas.

O gênero *Metarhizium* envolve fungos artropodopatogênicos amplamente distribuídos na natureza de forma saprófita sendo encontrado na rizosfera de plantas e parasitando diversos artrópodes. Estes fungos são de fácil cultivo em laboratório e sua eficácia contra diversas fases de vida do carrapato já foi demonstrada em vários estudos *in vitro* e *in vivo*, indicando que o seu uso para utilizações a campo se mostra promissor.

A variabilidade genética existente entre os diversos isolados de *Metarhizium* spp. faz com que eles demonstrem diferenças entre si com relação a sua virulência e a capacidade de produzir conídios. Quando se objetiva o uso futuro a campo de formulações envolvendo este complexo de fungos, a escolha de isolados com características satisfatórias é fundamental para o sucesso do tratamento. Dessa forma, estudos que envolvam a seleção de isolados pela sua virulência e conidiogênese é fundamental.

O presente trabalho integra a linha de pesquisa de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médica e Veterinária desenvolvida na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e teve como objetivo avaliar a virulência e a conidiogênese de 11 isolados de *Metarhizium* spp. sobre ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O carrapato *Rhipicephalus microplus*

*Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) vulgarmente conhecido como o carrapato dos bovinos, é um artrópode hematófago pertencente ao Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida e Família Ixodidae (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Anteriormente era classificado como *Boophilus microplus*, entretanto, através de estudos baseados em técnicas morfológicas e moleculares, o gênero *Boophilus* foi reclassificado como subgênero de *Rhipicephalus* devido a sua grande similaridade (MURREL; BACKER, 2003).

Esse carrapato é originário do continente asiático, especialmente da Índia e da Ilha de Java, e através de importações de bovinos foi introduzido em quase todos os países tropicais e subtropicais (WHARTON, 1974), onde se adaptou perfeitamente devido ao calor e umidade que propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção desta espécie (POWEL; REID, 1982).

Distribuiu-se pelos rebanhos bovinos das Américas Central e do Sul, Leste e Sul da África, Austrália, Oriente e sul da Flórida e sua distribuição no Brasil varia de intensidade de acordo com as condições climáticas e os tipos raciais de bovinos explorados (GONZÁLES, 2002). Acredita-se que a introdução de *Rhipicephalus microplus* no Brasil tenha ocorrido no início do século XVIII através de animais oriundos do Chile (GONZÁLES, 1995).

O hospedeiro preferencial de *R. microplus* é o bovino, sendo que quanto maior o grau de sangue zebuino do animal, maior a resistência ao carrapato e portanto, observa-se maiores infestações em *Bos taurus* e menores em *Bos indicus* (WHARTON et al., 1970; OLIVEIRA; ALENCAR et al., 1990, SILVA et al., 2010). Embora não seja comum, também pode parasitar outros animais e o homem em casos de infestações muito intensas em pastagens (GONZÁLES, 1974).

De acordo com Furlong (1993), seu ciclo de vida se divide em fase de vida parasitária e fase de vida livre. A fase de vida parasitária se inicia com a fixação da larva no hospedeiro seguida da sua alimentação, troca da cutícula, o desenvolvimento para os estágios de ninfa e adulto, o acasalamento e finalmente o ingurgitamento da fêmea com sua consequente queda ao solo. Os machos permanecem por mais tempo no hospedeiro copulando com outras fêmeas. Essa fase de vida parasitária dura em média de 18 a 26 dias. A fase de vida livre tem início no momento em que a fêmea ingurgitada se desprende do hospedeiro e cai ao solo onde, após um período de pré-postura de dois a três dias, inicia-se a postura dos ovos que dura em torno de três a seis semanas. Os ovos no ambiente passam por um processo de incubação por um período de 22 a 30 dias e em seguida inicia-se a fase de eclosão das larvas com duração de cinco a dez dias. Após eclodirem, as larvas necessitam de um período de dois a três dias para enrijecimento da cutícula e assim se tornarem aptas a infestar novos hospedeiros e iniciarem a fase parasitária. De acordo com GONZALES (2002), a fase de vida livre é fortemente influenciada por fatores ambientais, principalmente pela umidade e temperatura.

É evidente que a infestação maciça dos bovinos pelo carrapato *R. microplus* afeta negativamente a produtividade na pecuária causando debilidade, anemia, perda de peso e morte (JOHSSON, 2006). As áreas da pele parasitadas pelos carrapatos podem desenvolver lesões que, além de desvalorizar o couro como produto final, também predispõem os animais a parasitas como larvas de moscas causando miíases e também infecções bacterianas (HORN; ARTECHE, 1985).

Além da influência negativa na produção de leite, carne e couro causados pela infestação, o *R. microplus* também serve como vetor de agentes infecciosos que causam a

anaplasmosse e babesiose bovina (ANDREOTTI et al., 2010). Estudos recentes de GRISI et al. (2014) estimam que o parasitismo causado por *R. microplus* acarreta prejuízos anuais em cerca de 3,2 bilhões de dólares.

Historicamente, a estratégia de controle de *R. microplus* que tem se mostrado mais eficaz para atenuar o impacto econômico na indústria pecuária é a utilização de acaricidas comerciais (ANDREOTTI et al., 2010). Apesar dos benefícios associados aos pesticidas químicos para controle de parasitas, o seu uso excessivo e indiscriminado vem gerando diversos danos à saúde animal e ao meio ambiente (ECOBICHON, 2001).

O Brasil é um dos países que mais utiliza pesticidas no mundo (REBELO, 2010). De acordo com Rocha (1997), *R. microplus* representa um sério problema na pecuária em diversas regiões do Brasil e a principal medida de controle profilático e terapêutico contra este carrapato vem sendo o uso de acaricidas químicos. A maior parte dos produtores combate o carrapato com uso intenso e desordenado de produtos comerciais que são empregados de 12 até 24 vezes ao ano.

O surgimento de populações resistentes aos acaricidas é causa de grande preocupação entre os produtores de gado, agências governamentais e pessoal técnico. (ANDREOTTI et al., 2010). De acordo com Furlong e Martins (2000), a resistência dos carrapatos aos agentes químicos se dá com o estabelecimento de um alelo resistente, onde o uso contínuo do produto leva ao aumento de indivíduos com a característica de resistência, propagando dessa forma o alelo resistente por pressão de seleção.

Os artrópodes em geral possuem um período de tempo curto entre uma geração e outra e isso favorece o surgimento de populações com diferentes características de resistência, que podem variar desde o aumento do sequestro de moléculas tóxicas, redução do poder de penetração do acaricida e até mesmo insensibilidade a compostos químicos (OAKESHOTT, 2003). Acredita-se que, devido ao menor período de tempo entre as gerações, o *R. microplus* pode apresentar resistência mais rapidamente que outros carrapatos (KOCAN, 1995).

O fato de que os acaricidas químicos podem gerar danos ao meio ambiente e podem ser tóxicos para a saúde humana, além do crescente aparecimento de populações resistentes, tem estimulado a busca por métodos alternativos para controle de carrapatos (KIRKLAND, 2004). A consciência pública sobre os impactos ambientais e sobre a segurança de vertebrados pelo uso generalizado de acaricidas químicos está guiando investigações por métodos alternativos e sustentáveis para controle de carrapatos, incluindo o controle biológico (CHANDLER et al., 2000).

## **2.2 O controle biológico**

O termo controle biológico define todas as formas de controle que utilizam métodos biológicos como alternativa ao uso de agentes químicos, inserindo métodos de combate a organismos considerados nocivos a saúde pública e agropecuária. Ele está dividido em três principais métodos de aplicação: uso de inimigos naturais, de substâncias semioquímicas e repelentes/inseticidas naturais (MATA, 2007).

O controle biológico é um fenômeno que ocorre naturalmente visto que todas as espécies de animais e plantas possuem inimigos naturais que atacam seus diversos estágios de vida. Tais inimigos se inserem em grupos bastante variados como insetos, vírus, fungos, bactérias, nematóides, protozoários, rickettsias, micoplasmas, ácaros e até mesmo aranhas, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (PARRA, 2002).

Ainda segundo Parra (2002), o controle biológico foi primeiramente utilizado para controle de insetos, ácaros e ervas daninhas e, com o tempo, aplicado mais amplamente para controle de outros invertebrados, patógenos de plantas e até mesmo alguns vertebrados passaram a ser considerados alvos.

A idéia de usar patógenos para combater insetos praga pode ter crescido juntamente com o reconhecimento de que eram contagiosos, passando de um inseto infectado para um saudável em condições laboratoriais e naturais, e que a mortalidade que ocorre em epizootias naturais poderiam contribuir para o controle de pragas (LORD, 2005).

A utilização de micro-organismos para o controle biológico de artrópodes foi proposto pela primeira vez no meio do século 19 e as diversas vantagens desta prática somente foi explorada em escala comercial com o desenvolvimento dos conhecimentos sobre os patógenos, seus hospedeiros e ambiente, porém, o aprendizado sobre a sua praticidade ainda é constante (LORD, 2005; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

### **2.2.1 Controle biológico utilizando fungos artropodopatogênicos**

Segundo Thomas e Read (2007), os fungos são os microorganismos mais estudados e utilizados para controle biológico em comparação com vírus e bactérias. Isso se deve a sua maior eficiência em matar os hospedeiros, a grande biodiversidade de fungos que apresentam muitas possibilidades de encontrar isolados mais apropriados para desenvolver agentes para controle biológico além da sua segurança ambiental. Cerca de 700 espécies de fungos distribuídos em mais de 90 gêneros são conhecidos por serem agentes parasitas ou patogênicos de artrópodes (FREIMOSER et al., 2003).

Algumas espécies fúngicas apresentam potencial para uso em controle biológico de artrópodes, por possuírem virulência relativamente específica para um ou pequeno grupo de pragas, pela sua capacidade de penetrar a cutícula e de um mesmo isolado ser capaz de matar diferentes estágios da mesma praga. Entretanto, também possuem algumas desvantagens como o fato de precisarem de umidade para germinar e esporular, serem sensíveis aos raios UV e lentos para matar o hospedeiro. Além disso podem vir a afetar outros artrópodes não alvos (GINSBERG et al. 2002).

De acordo com CHANDLER et al. (2000), os fungos são importantes inimigos naturais de artrópodes podendo ser utilizados para controle biológico. Os fungos patogênicos para insetos que são naturalmente difundidos na natureza têm recebido mais atenção enquanto fungos patogênicos para ácaros são menos estudados. Entretanto, existe uma enorme gama de espécies de fungos patogênicos para ácaros que podem ser utilizados para controle biológico.

Dentre várias espécies de fungos descritas, os Ascomicetos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são os fungos entomopatogênicos mais amplamente caracterizados e utilizados para controle biológico. Aproximadamente 13 espécies ou subespécies de ambos os fungos já foram formuladas para uso como inseticida ou acaricidas fúngicos (FARIA ; WRAIGHT, 2007). O gênero *Metarhizium* spp. é, sem dúvida, o fungo mais estudado para controle de pragas devido ao seu alto potencial entomopatogênico (ONOFRE et al., 2001).

Provavelmente, as razões do atraso em se adotar estratégias de controle biológico são a prática trabalhosa de isolar e identificar potenciais agentes de biocontrole e o desenvolvimento de formulações adequadas para maximizar a eficiência dos bio-produtos. Após a conscientização de todos os problemas associados ao uso maciço de agrotóxicos e o conhecimento em formulações de muitos microrganismos artropodopatogênicos, o controle biológico é agora uma realidade (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

### 2.3 O gênero *Metarhizium*.

O gênero *Metarhizium* foi descrito pela primeira vez na Rússia em 1879 por Metchnikoff como sendo um patógeno de besouro, *Anisolia austríaca* (BISCHOFF et al. 2006). Foi classificado primeiramente como *Entomophora anisopliae* e em 1883 foi descrito por Sorokin como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (TULLOCH, 1976).

Posteriormente, estudos demonstraram a variabilidade genética existente entre os isolados de *M. anisopliae*, sugerindo que esta espécie era possivelmente um agregado de espécies (ST. LEGER et al., 1992; BIDOCHKA et al., 2005). Estudos de Bischoff et al. (2009) avaliaram morfológicamente e filogeneticamente o que classificaram como complexo de espécies *Metarhizium anisopliae*. Segundo os autores, foram reconhecidas nove espécies *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus* e *M. brunneum*, *M. globosum* e *M. robertsii*. Desta maneira, sugere-se que as espécies que ainda não tenham sido reclassificadas de acordo com a metodologia de Bischoff et al. (2009) deverão ser consideradas pertencentes ao complexo *M. anisopliae* e referenciadas como *M. anisopliae* sensu lato (s.l.).

*M. anisopliae* s.l. geralmente apresenta micélio hialino e septado com fiáides cilíndricas sustentando uma cadeia de conídios normalmente uninucleados e cilíndricos que formam uma camada densa de conídios e possuem coloração esverdeada (ZIMMERMANN, 1993; DRIVER; MILNER, 1998). Por conta desta coloração apresentada pela massa de conídios, este complexo de espécies recebeu a denominação de “muscardine verde” (BISCHOFF et al., 2006). Segundo Bischoff et al. (2009), as colônias dos isolados deste fungo crescem inicialmente brancas, geralmente se apresentam amarelas durante as fases iniciais do desenvolvimento dos conídios e finalmente quando os mesmos estão maduros, as colônias tornam-se verdes com tons de variações de oliva.

*M. anisopliae* s.l. é um fungo de cultivo simples e desenvolve-se em diversos meios de cultura, necessitando basicamente de uma fonte de amido (AZEVEDO, 1998). Cresce de forma vegetativa com hifas produzindo micélios e conídios que são os propágulos infectantes para artrópodes e para cultivo em meios de cultura. Apesar da diversa gama de hospedeiros, determinadas cepas podem parasitar apenas alguns hospedeiros específicos (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

A invasão do tecido dos insetos se assemelha ao processo que ocorre com patógenos fúngicos em plantas, com a formação de tubo germinativo, apressório e grampos de penetração e envolve uma combinação de pressão mecânica e degradação enzimática (SAMSON et al., 1982; CHARNLEY, 1984; WEBSTER, 2015).

O processo de infecção do hospedeiro é uma importante etapa na patogenicidade do fungo (ST LEGER et al., 1996; BITTENCOURT et al., 1999). Após a adesão na cutícula do hospedeiro, o conídio se hipertrofia e ocorre o desenvolvimento dos tubos germinativos e de uma estrutura chamada de apressório, que funciona como uma ancora facilitando a penetração fúngica através de pressão mecânica e secreção enzimática sobre uma pequena área permitindo assim maior eficiência no processo de penetração (HAJEK; ST LEGER, 1994; DÍAS et al., 2006; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

O complexo de espécies *M. anisopliae* é amplamente distribuído na natureza como um fungo saprófita e é encontrado na rizosfera de plantas e cadáveres de artrópodes parasitando diversos insetos e carrapatos (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). A gama de hospedeiros desse fungo pode incluir mais de 200 espécies de artrópodes o que o torna um agente de controle biológico adequado para diversas pragas (ZIMMERMANN, 1993).

A primeira tentativa de se controlar uma praga utilizando fungo foi realizada na Rússia em 1888, quando o fungo *Metarhizium anisopliae* s.l. foi produzido em massa em cereais e

aspergido no campo para controle de besouro da beterraba *Cleonus punctiventris* (Germar) (LORD, 2005).

Tem sido amplamente utilizado como modelo para o estudo de controle biológico de pragas através de investigações sobre virulência, bioquímica e mecanismos de patogenicidade (CHAMLEY, 1989; CHAMLEY; ST LEGER, 1991), podendo oferecer um controle eficaz de populações de carrapatos com um potencial de efeitos ambientais negativos relativamente baixo (GINSBERG et al., 2002). *Metarhizium anisopliae* s.l. já foi encontrado, inclusive, parasitando naturalmente fêmeas de *R. microplus* (COSTA et al., 2002).

Diversos estudos comprovam a grande variabilidade morfológica, fisiológica e genotípica entre os diversos isolados do complexo *Metarhizium anisopliae*, gerando diferentes níveis de virulência entre eles para muitas espécies de artrópodes, inclusive carrapatos (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; LOMER et al., 2001; FERNANDES et al., 2010.). Nesse contexto, estudos *in vitro* são, portanto, de extrema importância quando se pretende selecionar bons isolados e testar sua virulência para um determinado artrópode alvo.

#### **2.4 Estudos *in vitro* sobre a virulência de *Metarhizium* spp. para o controle de carrapatos.**

Virulência é um termo quantitativo que está relacionado com a intensidade de um organismo em provocar doença dentro de um grupo ou espécies (SHAPIRO-ILAN, 2005). Atualmente existem muitas coleções no mundo armazenando diversas linhagens de *M. anisopliae* s.l. que foram isoladas de diferentes substratos e hospedeiros. Quando testados sobre carrapatos, estes diferentes isolados apresentam variação quanto a sua virulência (MONTEIRO et al., 1998; FRAZZON et al., 2000; QUINELATO et al., 2012).

Na natureza, aproximadamente vinte espécies de fungos já foram relatadas em associação com carrapatos. Quando diversas espécies e diferentes isolados foram testados *in vitro*, *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria bassiana* demonstraram maior patogenicidade contra carrapatos sendo que *M. anisopliae* s.l. na maior parte dos casos, demonstrou possuir maior virulência em comparação a *B. bassiana* (SAMISH, 2004).

*Metarhizium anisopliae* s.l. foi utilizado em pesquisas para o controle de diversas pragas agrícolas como cigarrinha-da-pastagem (*Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*), cigarrinha-da-cana (*Mahanarva posticata*, *M. fimbriolata*), cupim-das-pastagens (*Cornitermes cumulans*), cupim da cana-de-açúcar (*Heterotermes*), broca-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), broca-dos-citros (*Diploschema rotundicolle*), broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) e do percevejo-do-colmo do arroz (*Tibraca limbativentris*) (ALVES, 1998). Diversos estudos comprovam a eficácia do uso de fungos artropodopatogênicos para controle de carrapatos (KAAYA et al., 1996; ZHIOUA et al., 1997; KIRKLAND et al., 2004; FERNANDES et al., 2008; FERNANDES et al., 2012).

Com relação ao uso do fungo artropodopatogênico *M. anisopliae* s.l. para o controle do carrapato dos bovinos *R. microplus*, já foram realizados diversos estudos *in vitro* que comprovam a sua eficácia (BITTENCOURT et al., 1994a-b; FRAZZON, 2000; LEEMON; JONSSON et al., 2008a; POLAR et al., 2005; ARRUDA et al., 2005; BAHIANSE et al., 2006; QUINELATO et al., 2012; PERINOTTO et al., 2014) bem como estudos *in vivo* que demonstram positivas perspectivas para a sua utilização a campo (CORREIA et al., 1998; BASSO et al., 2005; ALONSO-DÍAZ et al., 2007; LEEMON et al., 2008b; LÓPEZ et al., 2009; CAMARGO et al., 2014; WEBSTER et al. 2015).

Cepas que são naturalmente mais virulentas e apresentam boa germinação e crescimento padronizado, são essenciais para o desenvolvimento de formulações de biopesticidas comerciais bem sucedidas (LUBECK, 2008). Desta maneira, quando objetiva-se

investir em programas de biocontrole a campo, o desenvolvimento de bioensaios prévios é essencial para selecionar isolados com as características ideais.

## **2.5 Importância da Conidiogênese dos fungos artropodopatogênicos**

Em geral, as estruturas fúngicas de infecção que compartilham o mesmo ambiente com o hospedeiro são os conídios e a infecção se dá quando o mesmo encontra a cutícula de um hospedeiro susceptível, causando a adesão e a formação de um tubo germinativo. Em geral a infecção é bem sucedida quando ocorre a quebra da cutícula e as hifas em desenvolvimento alcançam a hemolinfa colonizando, em seguida, o corpo do hospedeiro (SHAH AND PELL, 2003).

Os conídios de Hyphomycetos como é o caso de *Metarhizium anisopliae* s.l. e *Beauveria* spp. são hidrofóbicos e sofrem dispersão passiva no ambiente através de cadáveres infectados. Em geral os conídios são descarregados sob pressão hidrostática e carreados pelo vento e outros insetos (HEMMATI et al., 2001; ROY et al., 2001).

Sendo o conídio a estrutura responsável pelo início da infecção no hospedeiro, ele é o ingrediente ativo das formulações de biopesticidas (JEFFS et al., 1999). Portanto, quantificar a conidiogênese de cada isolado é de extrema valia quando se visa a produção em massa para uso comercial.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e período de execução do experimento

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Controle Microbiano da Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. Os experimentos foram realizados no período de dezembro de 2015 a setembro de 2016.

#### 3.2 Obtenção e manutenção de fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas de *Rhipicephalus microplus*

Para a realização dos bioensaios, foram utilizadas fêmeas de *R. microplus* provenientes de infestações artificiais, feitas periodicamente, em bezerros mantidos em baias localizadas na Estação de Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz. Vinte e um dias após as infestações, as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas do piso das baias e levadas ao laboratório onde foram devidamente higienizadas em água corrente para a retirada de sujidades e, em seguida, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 0,05% durante três minutos e secas em papel toalha, para a devida assepsia da cutícula. As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* não utilizadas foram mantidas em placas de Petri e acondicionadas em câmara climatizada do tipo BOD com temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$  para a obtenção de ovos e posteriormente larvas para os subseqüentes ensaios biológicos. A manutenção das colônias de carrapatos é o objeto de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA-IV) da UFRRJ com o protocolo de aprovação 037/2014.

#### 3.3 Obtenção e manutenção dos isolados fúngicos de *Metarhizium* spp.

Os 11 isolados de *Metarhizium* spp. estudados foram cedidos pela *Agriculture Research Service Collection of Entomopathogenic Fungi* (ARSEF), Laboratório de Plantas, Solo, e Nutrição (Ithaca, NY, EUA), originários de diferentes regiões geográficas e hospedeiros ou substratos do Brasil (Tabela 1). Todos os isolados estudados foram preservados em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), sendo mantidos sob refrigeração e integrando o acervo de fungos artropodopatogênicos do Laboratório de Controle Microbiano da UFRRJ.

**Tabela 1** - Isolados de *Metarhizium* spp., origem, substrato e identificações.

<b>Isolado</b>	<b>Hospedeiro/Substrato</b>	<b>Origem</b>	<b>Espécie</b>
<b>ARSEF 552</b>	<i>Lepidoptera</i>	MG, Brasil	<i>Metarhizium pingshaense</i>
<b>ARSEF 724</b>	<i>Cerotoma arcuata</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	GO, Brasil	<i>Metarhizium robertsii</i>
<b>ARSEF 729</b>	<i>Deois flavopicta</i> (Homoptera: Cercopidae)	GO, Brasil	<i>Metarhizium anisopliae</i>
<b>ARSEF 760</b>	<i>Cerotoma arcuata</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
<b>ARSEF 929</b>	<i>Chalcodermus aeneus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l.
<b>ARSEF 1885</b>	<i>Diabrotica</i> sp. (Coleoptera: Chrysomelidae)	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l
<b>ARSEF 2211</b>	Solo	SP, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l
<b>ARSEF 2521</b>	<i>Deois</i> sp. (Homoptera: Cercopidae)	PR, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l
<b>ARSEF 3479</b>	(Coleoptera: Scarabaeidae)	DF, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l
<b>ARSEF 3641</b>	Solo	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l
<b>ARSEF 3643</b>	Solo	GO, Brasil	<i>M. anisopliae</i> s.l

### 3.4 Ensaios *in vitro*

#### 3.4.1 Caracterização morfológica

Foram feitos pontos únicos de inóculo com auxílio de alça de platina, no centro de placas de petri contendo 23mL de meio de cultura BDA. As placas foram mantidas em câmaras climatizadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  por 14 dias. Após esse período, foram feitas as descrições das características macroscópicas através da observação do diâmetro, coloração, reverso, aspecto, aparência do crescimento e verificação da produção de exsudatos das colônias. Para mensurar o tamanho das colônias, foi utilizado um paquímetro (calipter digital Mitutoyo com resolução de 0,01 mm).

A avaliação das características micromorfológicas foi realizada a partir da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula em meio BDA, com posterior acondicionamento em câmara úmida a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e U. R.  $\geq 80\%$  (RIDDELL, 1950). Após 5 dias de cultivo, foram confeccionadas lâminas coradas com lactofenol acrescido de azul de algodão (NewProv<sup>®</sup>) e

observadas com auxílio de microscópio óptico com magnitude de 400x para a observação da forma dos conídios e fiáldes.

### **3.4.2 Elaboração e quantificação das suspensões**

Os isolados de *Metarhizium* spp. foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) através de esgotamento da alça por repique contínuo. As placas foram mantidas em câmara climatizada a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  por 14 dias.

Após o período de cultivo, os conídios fúngicos, foram coletados da superfície da placa com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril. Os conídios foram suspensos em 30 mL de uma solução de água destilada estéril e Tween 80 a 0,1% (LUZ et al., 1998). Em seguida, a suspensão foi homogeneizada e quantificada em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada a  $1 \times 10^8$  conídios/mL, segundo Alves (1998).

Foram preparadas diluições seriadas a partir da concentração de  $1 \times 10^8$  conídios/mL para a obtenção das demais concentrações ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^5$  conídios/mL), utilizando-se 1 mL da suspensão mais concentrada, acrescida de 9 mL de água destilada estéril e Tween 80 a 0,1%.

### **3.4.3 Viabilidade dos conídios**

A viabilidade das suspensões utilizadas nos experimentos foi avaliada transferindo-se uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão na concentração de  $10^5$  conídios/mL de cada isolado para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Essas placas foram incubadas em câmara climatizada sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  durante 24 horas. Após esse período, a viabilidade dos conídios foi verificada através de observação direta ao microscópio óptico calculando-se a germinação dos mesmos segundo Alves (1998), onde um número mínimo de 300 conídios por placa foi avaliado e o percentual de conídios viáveis calculado através da divisão do número de conídios germinados pelo número total de conídios contados.

### **3.4.4 Delineamento experimental**

Para realização dos bioensaios com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram preparadas, para cada isolado testado, duas suspensões conidiais nas concentrações de  $10^8$  e  $10^7$  conídios/mL. Para os bioensaios com ovos e larvas foram preparadas, para cada isolado testado, quatro suspensões conidiais, nas concentrações de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  conídios/mL. No grupo controle utilizou-se apenas uma solução estéril de água e Tween 80 a 0,1%. Os tratamentos e o grupo controle foram constituídos por oito unidades experimentais.

### **3.4.5 Bioensaio com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus***

Após terem sido devidamente higienizadas no laboratório, as fêmeas coletadas foram pesadas individualmente e distribuídas homoganeamente de acordo com o peso entre os grupos, sendo cada grupo composto por oito fêmeas. Cada um dos 11 isolados fúngicos foi avaliado nas concentrações de  $10^8$  e  $10^7$  conídios/mL (ALVES, 1998), além do grupo controle.

Durante o tratamento, cada fêmea foi imersa individualmente durante três minutos em tubos de ensaio contendo 1 mL da suspensão fúngica ou água destilada estéril e Tween 80 0,1% (Controle). Após esse tempo, cada fêmea foi fixada pela parte dorsal do idiossoma em

placas de Petri utilizando-se fita adesiva dupla face e em seguida, as placas foram acondicionadas em câmara climatizada sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$ . O bioensaio com fêmeas ingurgitadas foi repetido duas vezes.

Quando as fêmeas iniciaram a oviposição, a postura diária foi pesada individualmente e acondicionada em frascos de vidro vedados com algodão hidrófilo, para posterior avaliação do percentual de eclosão das larvas. Três dias após o término da oviposição, as fêmeas foram pesadas individualmente, para obtenção dos pesos das mesmas após a postura. Para verificar a ação patogênica dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, foram avaliados os seguintes parâmetros reprodutivos: peso da massa de ovos, percentual de eclosão das larvas, índices de produção de ovos (I.P.O.) e nutricional (I.N.), utilizando as fórmulas descritas abaixo, segundo Bennet (1974).

$$\text{IPO} = \text{Peso da massa de ovos (g)} \times 100 / \text{Peso inicial da fêmea ingurgitada (g)}.$$

$$\text{IN} = \text{Peso da massa de ovos (g)} \times 100 / \text{Peso inicial da fêmea ingurgitada (g)} - \text{Peso da fêmea após a postura (g)}.$$

Para a obtenção do percentual de controle de *R. microplus* exercido pelos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. foi calculada a Reprodução Estimada (RE), de acordo com Drummond et al., (1971).

$$\text{RE} = \text{Peso da massa de ovos (g)} \times \% \text{ eclosão larvas} \times 20000 / \text{Peso da fêmea ingurgitada (g)}.$$

$$\text{Percentual de controle} = \text{Média RE (controle)} - \text{média RE (tratado)} \times 100 / \text{média RE (controle)}.$$

### **3.4.6 Re-isolamento dos isolados fúngicos após o ensaio biológico**

Após o término do ensaio biológico, cada grupo foi avaliado individualmente a fim de se isolar o fungo *Metarhizium* spp. da superfície das fêmeas e, desta forma, confirmar a infecção das mesmas pelo tratamento. Primeiramente, as fêmeas tratadas foram depositadas em câmaras úmidas com a presença de papel filtro embebido em água destilada estéril, que permaneceram em câmara climatizada sob temperatura de  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa  $\geq 80\%$ , a fim de induzir a exteriorização do fungo na superfície das fêmeas. Em seguida, o crescimento fúngico resultante da exteriorização, foi raspado da superfície das fêmeas com o auxílio de uma alça de platina para a realização da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula em meio BDA, com posterior acondicionamento em câmara úmida a  $25 \pm 1$  °C e U. R.  $\geq 80\%$  (RIDDELL, 1950). Após 5 dias de cultivo, foram confeccionadas lâminas coradas com lactofenol acrescido de azul de algodão (NewProv<sup>®</sup>) e observadas com auxílio de microscópio óptico com magnitude de 400x para a identificação de conídios de *Metarhizium* spp.

### **3.4.7 Bioensaio com ovos de *Rhipicephalus microplus***

Para a realização do ensaio biológico com ovos, alíquotas de 50 mg de ovos de *R. microplus* provenientes do primeiro ao décimo dia de postura das fêmeas foram homogeneizadas, pesadas e acondicionadas em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo. As suspensões fúngicas foram preparadas como descrito anteriormente no item 3.4.2 e quantificadas nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL (ALVES, 1998) sendo cada grupo composto por oito tubos.

O tratamento foi feito através da imersão da massa de ovos em 1 mL da suspensão fúngica ou água destilada estéril e Tween 80 0,1% (Controle). Para isso foram utilizadas seringas de 10 mL com agulha acoplada para ultrapassar a vedação feita pelo algodão. Os ovos permaneceram imersos por 3 minutos e após esse tempo os tubos foram vertidos a fim de que a suspensão ou água fosse absorvida pelo algodão.

Os tubos foram devidamente identificados com os isolados testados e mantidos em câmara climatizada sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$ . A avaliação do efeito dos diferentes isolados fúngicos sobre os ovos foi feita através da observação do percentual de eclosão das larvas, realizado em microscópio estereoscópio no décimo dia após o início da eclosão das mesmas. O bioensaio com ovos foi repetido duas vezes.

### **3.4.8 Bioensaio com larvas de *Rhipicephalus microplus***

Para o bioensaio com larvas, alíquotas de 50 mg de ovos do primeiro ao décimo dia de postura foram homogeneizadas, pesadas e acondicionadas em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo e mantidos em câmara climatizada sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  até a eclosão total das larvas. Os tubos que não apresentaram eclosão superior a 95% foram excluídos do experimento. Os tratamentos ocorreram no 15º dia após a eclosão total das larvas utilizando-se a mesma metodologia empregada no tratamento dos ovos. Para avaliar a ação dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. sobre larvas de *R. microplus* o parâmetro utilizado foi o percentual de mortalidade das larvas, realizado com a visualização em microscópio estereoscópio a cada cinco dias, sendo a última análise ao 30º dia após tratamento. O bioensaio com larvas foi repetido duas vezes.

### **3.4.9 Avaliação da conidiogênese entre os diferentes isolados de *Metarhizium* spp.**

Para a avaliação do potencial de produção de conídios, foram feitas suspensões na concentração de  $10^6$  conídios/mL de cada isolado fúngico. Em seguida, foram preparadas seis placas de Petri contendo 23mL de meio BDA para cada isolado onde, com a ajuda de uma micropipeta automática, 40  $\mu\text{L}$  da suspensão foi depositada em cada placa e esse volume distribuído por toda a extensão do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski.

As placas foram mantidas em câmara climatizada sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  por 14 dias. Após esse período, com o auxílio de uma alça de platina adaptada, foram realizados três recortes aleatórios de  $1,256\text{cm}^2$  de área do meio de cultura contendo o fungo em sua superfície, que foram depositados em um tubo de ensaio com 1 mL de água destilada estéril e Tween 80 a 0,1%, sendo agitado vigorosamente em aparelho do tipo vórtex por 60 segundos. A quantificação de conídios foi realizada a partir da observação direta de 10  $\mu\text{L}$  de suspensão fúngica através da câmara de Neubauer em microscópio óptico. O processo foi repetido com todas as seis placas de cada isolado fúngico e o experimento da conidiogênese foi repetido duas vezes.

## **3.5 Análise estatística**

Para a análise estatística foi utilizado o software livre R Studio Versão 0.99.903 e o pacote “agricolae” (Statistical Procedures for Agricultural Research), versão 1.2-4. Os dados paramétricos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla Tukey. Adicionalmente foi aplicada estatística multivariada mediante a Análises de Componentes Principais (ACP) com o intuito de detectar quais foram os parâmetros correlacionados e quais os tratamentos que estiveram mais representados por estes parâmetros. Para os dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido

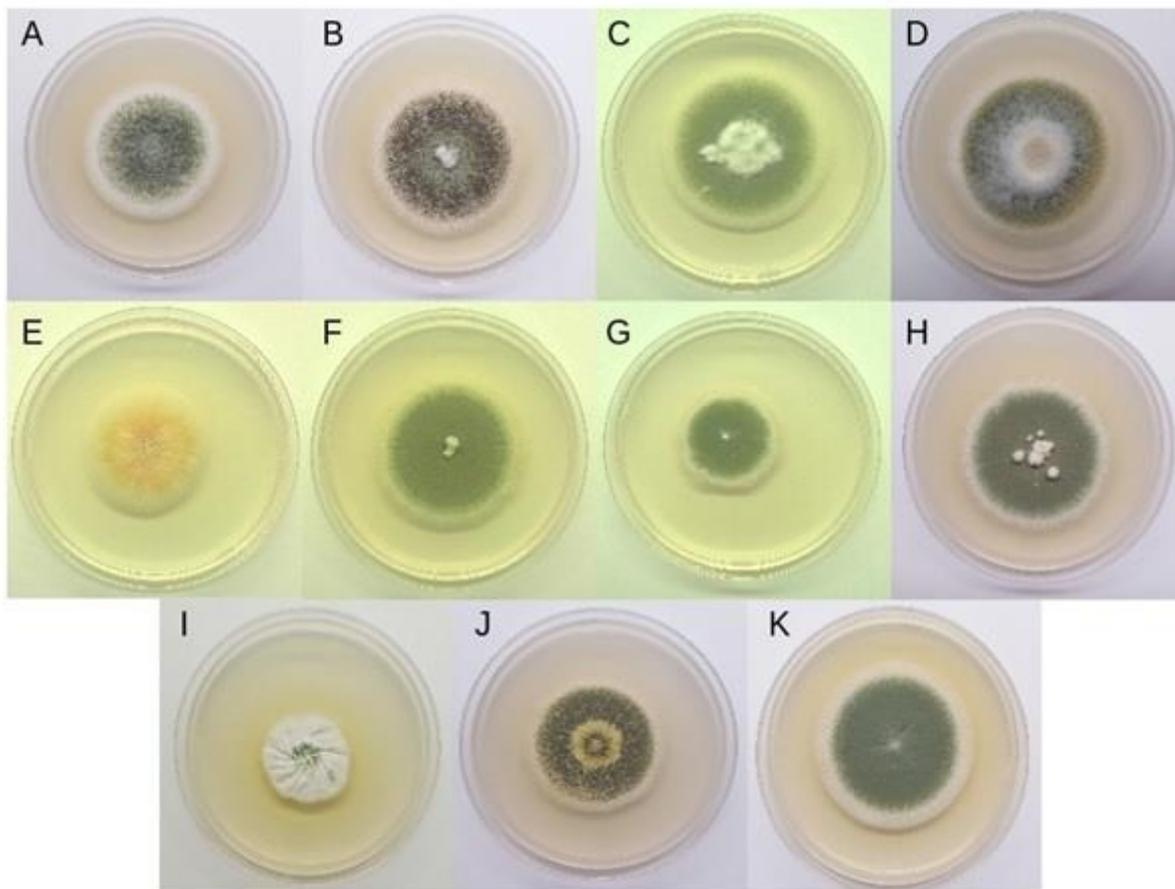
do teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (SNK). Para estas análises foi considerado um nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização morfológica

Os isolados de *Metarhizium* spp. estudados apresentaram características morfológicas compatíveis com as descritas na literatura (TULLOCH, 1976; DRIVER et al., 2000; BISCHOFF et al., 2009). O tamanho das colônias utilizadas durante os experimentos variou de 26,28mm a 59,25mm. Inicialmente apresentaram coloração branca, tornando-se amarelas com o início da produção de conídios que se concentraram mais ao centro e, com o amadurecimento, conferiram às colônias colorações que variaram em tonalidades de verde oliva. O reverso das colônias apresentou colorações que variaram de amarelo claro a alaranjado. Em geral, as colônias apresentaram aspecto pulverulento e crescimento de aparência entre lisa e zonada. Foi observada a produção de exsudatos de coloração hialina pelos isolados ARSEF 724, ARSEF 760 e ARSEF 3641.

A análise micromorfológica evidenciou conídios de forma cilíndrica a oval, com aparência lisa, podendo ser estreitos na região central e truncados nas extremidades. As fiálides apresentaram formato cilíndrico podendo ser solitárias ou agrupadas. Houve variação no comprimento e na largura dos conídios e fiálides.



**Figura 1-** Isolados fúngicos cultivados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) após 14 dias de cultivo a 25°C em escotofase. **A:** *Metarhizium pingshaense* ARSEF 552; **B:** *Metarhizium robertsii* ARSEF 724; **C:** *Metarhizium anisopliae* ARSEF 729; **D:** *Metarhizium anisopliae* s.l. ARSEF 760; **E:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 929; **F:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 1885; **G:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 2211; **H:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 2521; **I:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3479; **J:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3641; **K:** *M. anisopliae* s.l. ARSEF 3643.

#### 4.2 Viabilidade dos conídios utilizados nas suspensões

Os conídios dos isolados de *Metarhizium* spp. presentes nas suspensões aquosas que foram utilizadas nos bioensaios apresentaram 100% de germinação após 24 horas de incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$ . Portanto, os conídios apresentaram-se viáveis e as suspensões aptas a serem utilizadas nos bioensaios.

#### 4.3 Bioensaio com fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

O valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P. I. F.), Peso Total da Massa de Ovos (P. T. M. O.), Percentual de Eclosão (%), Índice de Produção de Ovos (I. P. O.), Índice Nutricional (I. N.) e Percentual de Controle (% Controle) das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas pelos isolados fúngicos estão demonstrados na tabela 2.

##### 4.3.1 Peso inicial das fêmeas ingurgitadas

O peso inicial das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* que foram utilizadas nos diferentes grupos testados não diferiram estatisticamente, variando de 0,2223g a 0,2368g. Portanto, as alterações que ocorreram nos parâmetros biológicos durante os ensaios podem ser atribuídas aos tratamentos com os isolados fúngicos que foram testados.

#### **4.3.2 Peso total da massa de ovos**

Após o término do período de postura, a massa de ovos de cada fêmea foi pesada individualmente para posterior avaliação do percentual de eclosão das larvas. Dentre os grupos tratados com os diferentes isolados fúngicos, sete apresentaram redução significativa no peso da massa de ovos, quando comparados ao grupo controle.

O isolado ARSEF 729 na concentração de  $10^8$  conídios/mL apresentou redução de 42,1% do peso total da massa de ovos. O isolado ARSEF 552 apresentou redução de 44,3% na concentração de  $10^8$  conídios/mL e 32,5% na concentração de  $10^7$  conídios/mL.

O isolado ARSEF 3641 apresentou redução de 48,4% na concentração de  $10^8$  conídios/mL e 39,8% na concentração de  $10^7$  conídios/mL e o isolado ARSEF 3643 apresentou redução de 63,4% na concentração de  $10^8$  conídios/mL e 38,8% na concentração de  $10^7$  conídios/mL.

#### **4.3.3 Percentual de eclosão de larvas**

Os tratamentos fúngicos não demonstraram influência na eclosão das larvas, já que nenhum grupo apresentou diferença estatística quando comparados ao grupo controle, que apresentou 91,7% de eclosão de larvas. O percentual de eclosão das larvas variou de 71,5% a 93,3% entre os grupos tratados.

#### **4.3.4 Índice de produção de ovos**

Dentre os grupos tratados com os diferentes isolados fúngicos, nove apresentaram redução significativa no índice de produção de ovos, quando comparados ao grupo controle. Os grupos tratados pelos isolados ARSEF 729, ARSEF 1885 e ARSEF 2521 na concentração de  $10^8$  conídios/mL, apresentaram redução de 44,4%, 27,5% e 29,1% respectivamente.

O isolado ARSEF 552 apresentou redução de 44,1% na concentração de  $10^8$  conídios/mL e 33,2% na concentração de  $10^7$  conídios/mL no índice de produção de ovos. O isolado ARSEF 3641 apresentou redução de 49,9% na concentração de  $10^8$  conídios/mL e 41,3% na concentração de  $10^7$  conídios/mL e o isolado ARSEF 3643 apresentou redução de 54% na concentração de  $10^8$  conídios/mL e 39,5% na concentração de  $10^7$  conídios/mL.

#### **4.3.5 Índice nutricional**

Com relação aos grupos tratados com os diferentes isolados fúngicos, sete apresentaram redução significativa no índice nutricional, quando comparados ao grupo controle. O isolado ARSEF 729 apresentou redução de 33,6% no índice nutricional das fêmeas testadas na concentração de  $10^8$  conídios/mL. O isolado ARSEF 552 apresentou redução de 36,3% na concentração de  $10^8$  conídios/mL e 25,6% na concentração de  $10^7$  conídios/mL. O isolado ARSEF 3641 apresentou redução de 40,6% na concentração de  $10^8$  conídios/mL e 34,5% na concentração de  $10^7$  conídios/mL e o isolado ARSEF 3643 apresentou redução de 44,6% na concentração de  $10^8$  conídios/mL e 31,3% na concentração de  $10^7$  conídios/mL.

#### **4.3.6 Percentual de controle**

Os valores de percentual de controle apresentaram grande variação entre os isolados fúngicos testados e, em geral, demonstraram melhores resultados na maior concentração

testada. Todavia, mesmo na maior concentração ( $10^8$  conídios/mL), o isolado ARSEF 2211 apresentou percentual de controle baixo de aproximadamente 5,3%. Já os isolados ARSEF 729, ARSEF 3641 e ARSEF 3643 na mesma concentração alcançaram percentuais de controle de 55,3%, 58,7% e 58,7%, respectivamente.

**Tabela 2.** Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P. I. F.), Peso Total da Massa de Ovos (P. T. M. O.), Percentual de Eclosão (%), Índice de Produção de Ovos (I. P. O.), Índice Nutricional (I. N.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas por imersão em suspensão aquosa de  $10^7$  ou  $10^8$  conídios/mL de 11 isolados de *Metarhizium* spp.

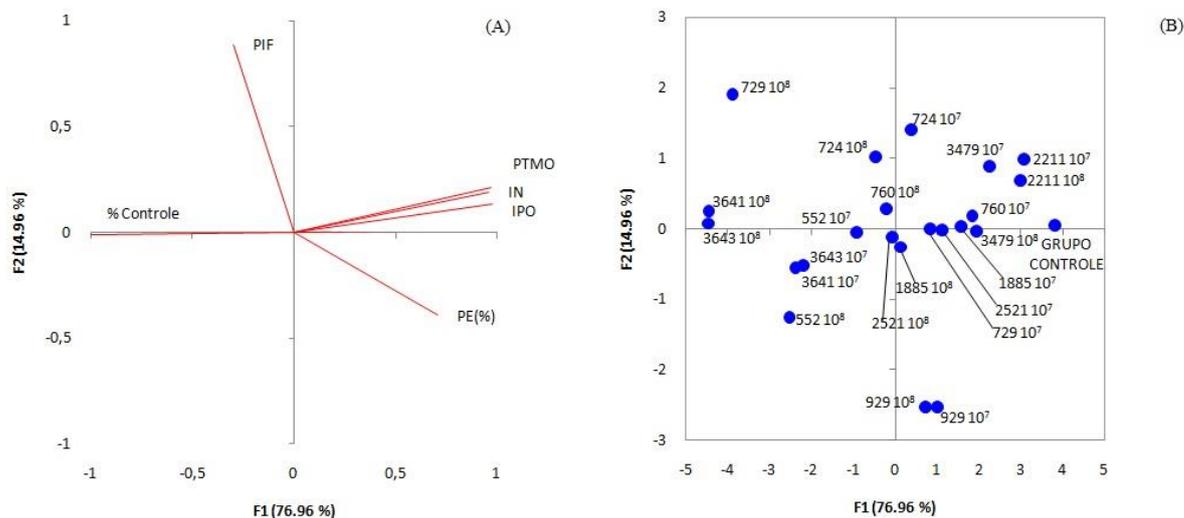
<b>Grupo</b>	<b>P. I. F. (g)</b>	<b>P. T. M. O.</b>	<b>P.E. (%)</b>	<b>I. P.O.</b>	<b>I.N.</b>	<b>% Controle</b>
CTR	0,2282±0,0255a	0,1338±0,0154a	91,7±6,3ab	58,6±2,7a	67,6±4,6a	-
ARSEF 552 $10^7$	0,2319±0,0263a	0,0904±0,0196bcdef	89,9±8,7ab	39,2±8,4cdefg	50,3±8,8bcde	34,0%
ARSEF 552 $10^8$	0,2285±0,0249a	0,0746±0,0243def	87,5±11,2ab	32,8±10,8efg	43,1±10,9de	46,2%
ARSEF 724 $10^7$	0,2354±0,0240a	0,1075±0,0218abcdef	88,7±5,8ab	46,0±10,1abcdef	56,4±9,2abcde	24,5%
ARSEF 724 $10^8$	0,2310±0,0254a	0,1081±0,0192abcde	75,4±16,2ab	46,8±6,5abcde	57,2±6,2abcd	34,3%
ARSEF 729 $10^7$	0,2304±0,0256a	0,1039±0,0234abcdef	90,5±8,6ab	45,1±8,8abcdef	60,9±9,0abc	23,0%
ARSEF 729 $10^8$	0,2368±0,0211a	0,0775±0,0245def	72,5±29,5ab	32,6±9,1efg	44,9±10,1cde	55,3%
ARSEF 760 $10^7$	0,2309±0,0252a	0,1145±0,0363abcd	93,2±6,3a	49,2±13,4abcd	62,2±13,0abc	15,2%
ARSEF 760 $10^8$	0,2302±0,0253a	0,0993±0,0278abcdef	82,9±14,2ab	43,8±12,8abcdefg	59,4±15,9abcd	32,1%
ARSEF 929 $10^7$	0,2223±0,0197a	0,0997±0,0337abcdef	93,3±6,5a	45,6±16,1abcdef	54,4±17,2abcde	21,4%
ARSEF 929 $10^8$	0,2223±0,0183a	0,0974±0,0310abcdef	92,2±6,2ab	44,3±14,3abcdefg	54,5±14,1abcde	23,8%
ARSEF 1885 $10^7$	0,2307±0,0277a	0,1122±0,0154abcd	93,2±4,1a	48,6±3,0abcde	58,9±3,0abcd	15,9%
ARSEF 1885 $10^8$	0,2308±0,0258a	0,0984±0,0212abcdef	92,4±4,0a	42,5±7,3bcdefg	53,7±6,7abcde	26,8%
ARSEF 2211 $10^7$	0,2321±0,0274a	0,1285±0,0138ab	91,4±6,1ab	55,5±4,0ab	67,1±4,1a	5,5%
ARSEF 2211 $10^8$	0,2313±0,0257a	0,1289±0,0201ab	92,0±2,5ab	55,4±3,1ab	64,2±4,1ab	5,3%
ARSEF 2521 $10^7$	0,2303±0,0241a	0,1087±0,0230abcde	90,8±11,0ab	47,3±8,7abcde	58,7±8,9abcd	20,0%
ARSEF 2521 $10^8$	0,2316±0,0258a	0,0958±0,0192abcdef	92,7±4,4a	41,6±8,5bcdefg	53,9±10,1abcde	28,4%
ARSEF 3479 $10^7$	0,2318±0,0250a	0,1228±0,0198ab	88,8±5,4ab	52,9±5,8abc	64,8±8,4ab	12,3%
ARSEF 3479 $10^8$	0,2268±0,0261a	0,1222±0,0119abc	82,0±15,1ab	54,6±4,2abc	66,2±4,3ab	17,3%
ARSEF 3641 $10^7$	0,2302±0,0258a	0,0806±0,0368def	84,9±13,4ab	34,4±13,5defg	44,3±13,9de	45,0%
ARSEF 3641 $10^8$	0,2314±0,0250a	0,0691±0,0213ef	71,5±25,1b	29,4±6,9fg	40,3±9,0e	58,7%
ARSEF 3643 $10^7$	0,2297±0,0266a	0,0819±0,0306cdef	83,5±12,7ab	35,5±12,4defg	46,5±13,0cde	44,0%
ARSEF 3643 $10^8$	0,2333±0,0290a	0,0490±0,0319f	80,7±17,6ab	27,0±7,2g	37,5±8,4e	58,7%

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

A análise de componentes principais (ACP) é uma análise descritiva que simplifica a visualização de grande volume de dados (Tabela 2) em um gráfico ou mapa (Figura 2 a-b) mostrando as variáveis que tiverem correlação entre si além de relacioná-las com determinadas características.

Na figura 2-A, observa-se que o P. I. F. se mantém indiferente a todas as outras variáveis, sugerindo assim que este dado não influenciou nas outras respostas. O P. T. M. O., P. E. (%), I. P. O. e I. N. estão inversamente proporcionais ao percentual de controle, indicando que quanto menores as médias das outras variáveis, maior será o percentual de controle.

Considerando-se a posição dos isolados na figura 2-B, pode-se constatar que os grupos tratados pelos isolados ARSEF 3641 e ARSEF 3643 nas concentrações de  $10^7$  conídios/mL e  $10^8$  conídios/mL e os grupos tratados pelos isolados ARSEF 552 e ARSEF 729 na concentração de  $10^8$  conídios/mL apresentaram os melhores índices de percentuais de controle pois estão posicionados próximos a essa variável. Os isolados mais próximos ao grupo controle foram os que apresentaram os resultados menos satisfatórios como é o caso dos grupos tratados pelos isolados ARSEF 2211 e ARSEF 3479 em ambas as concentrações.



**Figura 2-** Análise de componentes principais para 11 isolados de *Metarhizium* spp. (2B) nas concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  em função dos parâmetros avaliados: Peso Inicial da Fêmea (PIF), Peso Total da Massa de Ovos (PTMO), Índice Nutricional (IN), Índice de Produção de Ovos (IPO), Percentual de Eclosão (PE) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (2A).

#### 4.3.7 Re-isolamento fúngico

Após o término dos ensaios biológicos, as fêmeas expostas aos isolados de *Metarhizium* spp. apresentaram desenvolvimento de colônias fúngicas que foram identificadas como sendo *Metarhizium* spp. Tal identificação foi feita através de análises macro e micro-morfológicas das características dos isolados fúngicos (TULLOCH, 1976; BISCHOFF, 2009). Em todos os ensaios, os grupos controle não apresentaram crescimento fúngico.

#### 4.4 Bioensaio com ovos de *Rhipicephalus microplus*

O percentual de eclosão de larvas oriundas dos ovos tratados pelas suspensões fúngicas está demonstrado na tabela 3. O grupo controle apresentou taxa de eclosão de 99% e de maneira geral, a eclosão das larvas oriundas dos ovos tratados pelos isolados fúngicos ocorreu de forma inversamente proporcional à concentração de conídios testada. Desta maneira, quanto maior a concentração de conídios a qual os ovos foram expostos, menor o percentual de eclosão de larvas.

Nos grupos tratados pelas suspensões na concentração de  $10^5$  conídios/mL, já foram observadas reduções no percentual de eclosão das larvas com relação ao grupo controle, onde as reduções na eclosão variaram de 6% com o isolado ARSEF 1885 a 9,1% com o isolado ARSEF 3641. Na concentração de  $10^6$  conídios/mL, as reduções variaram de 7,1% com os isolados ARSEF 1885 e ARSEF 3479 a 12,7% com o isolado ARSEF 760.

Entre os grupos tratados com as suspensões na concentração de  $10^7$  conídios/mL, as reduções na eclosão das larvas variaram de 9,1% com isolado ARSEF 3643 a 26,8% com o isolado ARSEF 760. A concentração de  $10^8$  conídios/mL demonstrou ser a mais eficiente, onde os isolados ARSEF 3643, ARSEF 729 e ARSEF 760, se destacaram com reduções de 56,9%, 63,3% e 68,5%, respectivamente. O resultado menos satisfatório foi demonstrado pelo isolado ARSEF 2211, com redução de 14,7%.

**Tabela 3-** Percentual médio  $\pm$  desvio padrão de eclosão de larvas de *Rhipicephalus microplus* com 10 dias após o início da eclosão após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1^\circ$  C e Umidade Relativa  $\geq 80\%$ .

Isolados	Percentual de eclosão (10 dias após início da eclosão)				
	Controle	$10^5$ con./mL	$10^6$ con./mL	$10^7$ con./mL	$10^8$ con./mL
ARSEF 552	99,0 $\pm$ 0,0a	91,2 $\pm$ 3,5b	90,9 $\pm$ 7,6b	79,3 $\pm$ 12,3c	61,0 $\pm$ 21,5d
ARSEF 724	99,0 $\pm$ 0,0a	92,0 $\pm$ 3,4b	89,5 $\pm$ 2,8bc	89,0 $\pm$ 3,1c	79,4 $\pm$ 12,1d
ARSEF 729	99,0 $\pm$ 0,0a	92,0 $\pm$ 2,5b	87,2 $\pm$ 5,0c	81,1 $\pm$ 19,6c	36,4 $\pm$ 13,4d
ARSEF 760	99,0 $\pm$ 0,0a	91,1 $\pm$ 3,3b	86,5 $\pm$ 7,0b	72,5 $\pm$ 16,2c	31,2 $\pm$ 12,1d
ARSEF 929	99,0 $\pm$ 0,0a	90,5 $\pm$ 3,0b	88,5 $\pm$ 4,1bc	84,4 $\pm$ 7,2c	71,8 $\pm$ 9,2d
ARSEF 1885	99,0 $\pm$ 0,0a	93,1 $\pm$ 3,7b	92,0 $\pm$ 3,4b	87,7 $\pm$ 4,4c	82,8 $\pm$ 6,3c
ARSEF 2211	99,0 $\pm$ 0,0a	91,4 $\pm$ 3,7b	90,6 $\pm$ 3,2b	87,2 $\pm$ 2,6c	84,5 $\pm$ 3,6c
ARSEF 2521	99,0 $\pm$ 0,0a	91,5 $\pm$ 4,1b	89,5 $\pm$ 3,6b	85,5 $\pm$ 4,9c	60,0 $\pm$ 13,2d
ARSEF 3479	99,0 $\pm$ 0,0a	93,0 $\pm$ 2,5b	92,0 $\pm$ 5,3b	87,5 $\pm$ 3,7c	77,7 $\pm$ 9,0d
ARSEF 3641	99,0 $\pm$ 0,0a	90,0 $\pm$ 5,5b	89,5 $\pm$ 4,9b	87,2 $\pm$ 5,0bc	84,2 $\pm$ 1,8c
ARSEF 3643	99,0 $\pm$ 0,0a	93,0 $\pm$ 2,5b	91,5 $\pm$ 2,4b	90,0 $\pm$ 5,7b	42,7 $\pm$ 15,0c

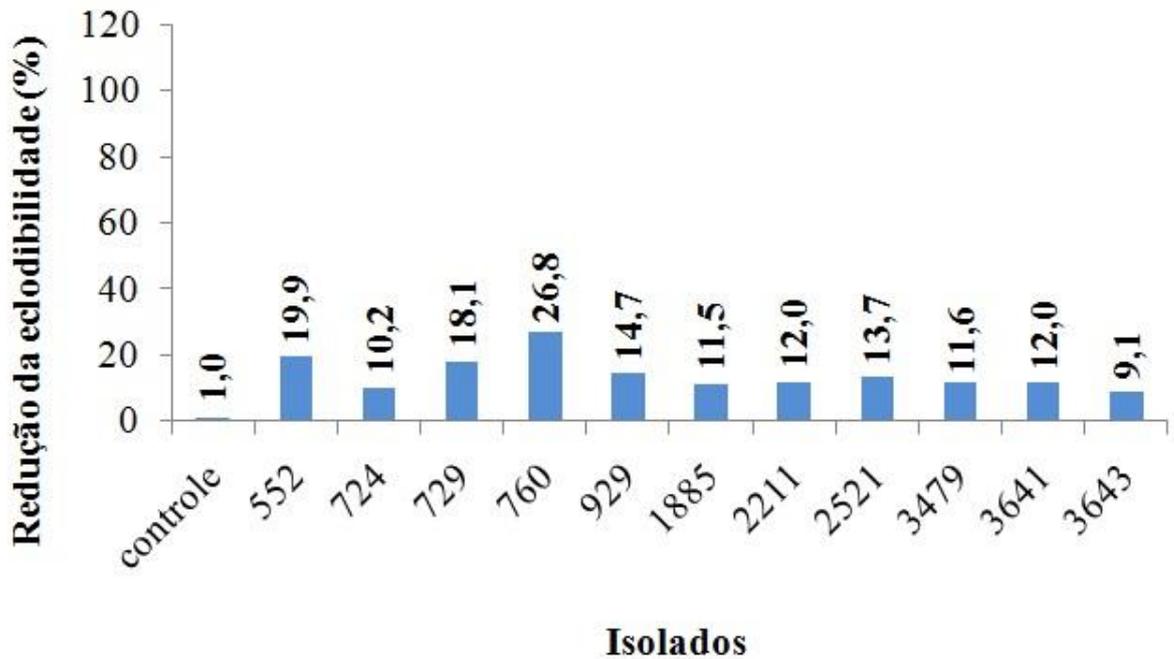
(\*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

Para comparar a ação dos diferentes isolados fúngicos de *Metarhizium* spp. sobre a redução de eclosão das larvas oriundas dos ovos submetidos aos tratamentos, avaliou-se as concentrações de  $10^7$  conídios/mL (Figura 3) e  $10^8$  conídios/mL (Figura 4) no décimo dia após o início da eclosão.

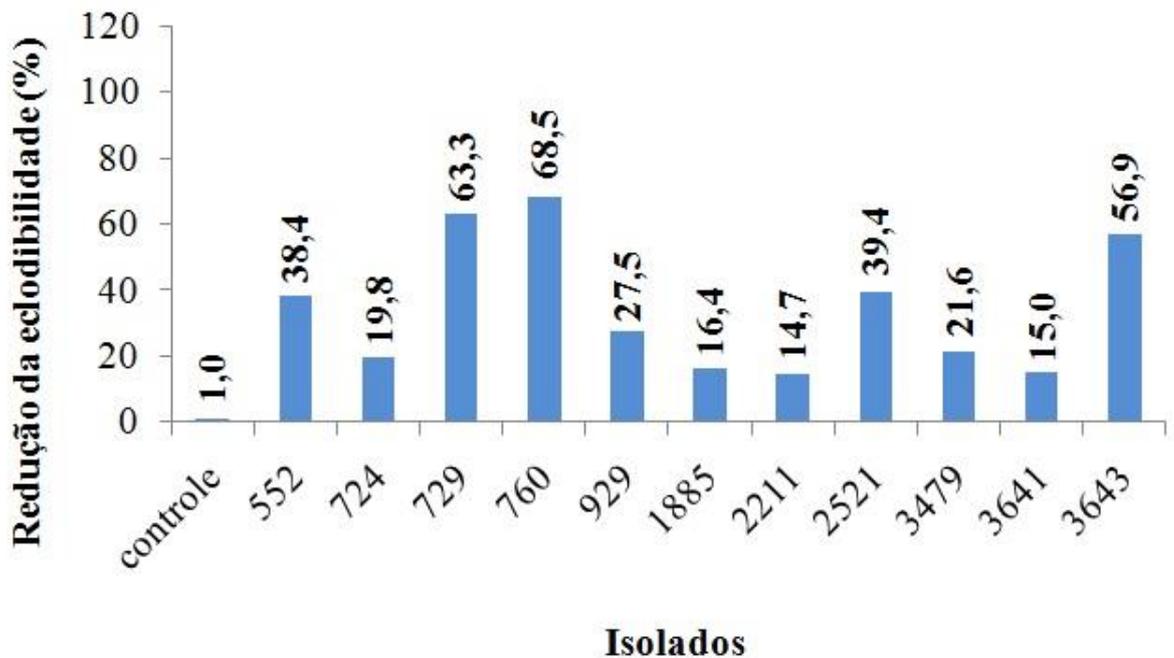
Na concentração de  $10^7$  conídios/mL, nenhum isolado demonstrou redução no percentual de eclosão de larvas superior a 50%, onde o melhor resultado, nesta concentração, foi apresentado pelo isolado ARSEF 760 com 26,8% de redução de eclosão de larvas.

Quando avaliados na concentração de  $10^8$  conídios/mL, três isolados foram capazes de reduzir mais de 50% da eclosão de larvas oriundas dos ovos tratados. Foram eles os isolados

ARSEF 3643, ARSEF 729 e ARSEF 760, com reduções de 56,9%, 63,3% e 68,5%, respectivamente.



**Figura 3** - Percentual de redução da eclosão de larvas obtidas de ovos de *Rhipicephalus microplus* após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de  $10^7$  conídios/mL no décimo dia após o início da eclosão das larvas.



**Figura 4** - Percentual de redução da eclosão de larvas obtidas de ovos de *Rhipicephalus microplus* após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de  $10^8$  conídios/mL no décimo dia após o início da eclosão das larvas.

#### 4.5 Bioensaio com larvas de *Rhipicephalus microplus*

O percentual de mortalidade das larvas foi avaliado a cada cinco dias até o 30º dia após o tratamento, no entanto, nesse momento os resultados se mostraram iguais ao apresentado no 25º dia. As larvas do grupo controle não apresentaram mortalidade durante o experimento e em geral, a mortalidade das larvas tratadas pelos isolados fúngicos ocorreu de forma diretamente proporcional à concentração de conídios testada. Desta maneira, quanto maior a concentração de conídios a qual as larvas foram expostas, maior o percentual de mortalidade das mesmas. Foram calculados, para cada avaliação, os resultados referentes a comparação dos diferentes tratamentos entre si e com o grupo controle.

No quinto dia após o tratamento (Tabela 4), apenas o isolado ARSEF 729 demonstrou diferença estatística com relação ao grupo controle na concentração de  $10^6$  conídios/mL, apresentando mortalidade de 11,1% das larvas. Os demais isolados não demonstraram mortalidade nas concentrações de  $10^5$  e  $10^6$  conídios/mL.

O isolado ARSEF 2211 foi o único a não causar mortalidade na concentração de  $10^7$  conídios/mL cinco dias após o tratamento, e o isolado ARSEF 729 se destacou nesta mesma concentração com uma média de mortalidade de 78,1% das larvas. Na concentração de  $10^8$  conídios/mL, o isolado ARSEF 760 se destacou causando mortalidade de 98,1% das larvas, seguido do isolado ARSEF 3479 que causou mortalidade de 93,7% das larvas. O isolado ARSEF 729 causou mortalidade de 80% das larvas e os isolados ARSEF 724 e ARSEF 929, causaram mortalidade de 60% das larvas.

**Tabela 4-** Percentual médio  $\pm$  desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 5 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1^\circ \text{C}$  e Umidade Relativa  $\geq 80\%$ .

Percentual de mortalidade (5 dias)					
Isolados	Controle	$10^5$ con./mL	$10^6$ con./mL	$10^7$ con./mL	$10^8$ con./mL
ARSEF 552	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	7,7 $\pm$ 5,0b	33,3 $\pm$ 18,5c
ARSEF 724	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	5,0 $\pm$ 5,0b	60,0 $\pm$ 10,3c
ARSEF 729	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	11,1 $\pm$ 4,1b	78,1 $\pm$ 5,9c	80,0 $\pm$ 18,7c
ARSEF 760	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	13,8 $\pm$ 6,0b	98,1 $\pm$ 2,3c
ARSEF 929	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	20,0 $\pm$ 5,5b	60,0 $\pm$ 21,0c
ARSEF 1885	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	4,4 $\pm$ 4,6b	11,1 $\pm$ 7,8c
ARSEF 2211	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	8,7 $\pm$ 5,8b
ARSEF 2521	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	2,2 $\pm$ 2,6b	7,2 $\pm$ 3,6c
ARSEF 3479	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	36,1 $\pm$ 34,2b	93,7 $\pm$ 6,3c
ARSEF 3641	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	6,8 $\pm$ 7,0b	18,3 $\pm$ 7,9c
ARSEF 3643	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	7,2 $\pm$ 6,6b	21,8 $\pm$ 13,0c

(\*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

No décimo dia após o tratamento (Tabela 5), os isolados ARSEF 729, ARSEF 552, ARSEF 929 e ARSEF 724 demonstraram diferença estatística com relação ao grupo controle, na concentração de  $10^5$  conídios/mL, causando morte de 6,1%, 4,4%, 3,3% e 2,2% de larvas, respectivamente. Na concentração de  $10^6$  conídios/mL apenas o isolado ARSEF 2211 permaneceu sem causar mortalidade das larvas e o isolado ARSEF 729 se destacou causando mortalidade de 77,7% das larvas. Oito isolados causaram mortalidade de mais de 50% das larvas na concentração de  $10^7$  conídios/mL, foram eles os isolados ARSEF 729, ARSEF 3643,

ARSEF 929, ARSEF 3479, ARSEF 3641, ARSEF 552, ARSEF 760, e ARSEF 724, causando mortalidade de 99,4%, 91,4%, 88,3%, 85%, 82,5%, 75,8%, 65% e 56% de larvas, respectivamente.

Os mesmos isolados apresentaram mortalidade acima de 90% para as larvas que foram expostas à concentração de  $10^8$  conídios/mL. Os isolados ARSEF 3479 e ARSEF 3641 causaram mortalidade de 100% das larvas. Os isolados ARSEF 729, ARSEF 929, ARSEF 760, ARSEF 3643, ARSEF 724 e ARSEF 552, causaram mortalidade de 99,8%, 98,8%, 98,1%, 97,5%, 92,7% e 92,1% de larvas, respectivamente.

**Tabela 5-** Percentual médio  $\pm$  desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 10 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1^\circ$  C e Umidade Relativa  $\geq 80\%$ .

Percentual de mortalidade (10 dias)					
Isolados	Controle	$10^5$ con./mL	$10^6$ con./mL	$10^7$ con./mL	$10^8$ con./mL
ARSEF 552	0,0 $\pm$ 0,0a	4,4 $\pm$ 3,9b	12,2 $\pm$ 7,9c	75,8 $\pm$ 18,5d	92,1 $\pm$ 6,5d
ARSEF 724	0,0 $\pm$ 0,0a	2,2 $\pm$ 2,6b	12,7 $\pm$ 6,1c	56,0 $\pm$ 33,6d	92,7 $\pm$ 6,1e
ARSEF 729	0,0 $\pm$ 0,0a	6,1 $\pm$ 4,8b	77,7 $\pm$ 21,7c	99,4 $\pm$ 1,6d	99,8 $\pm$ 0,3d
ARSEF 760	0,0 $\pm$ 0,0a	0,5 $\pm$ 1,6a	7,2 $\pm$ 8,3b	65,0 $\pm$ 17,1c	98,1 $\pm$ 2,3d
ARSEF 929	0,0 $\pm$ 0,0a	3,3 $\pm$ 3,5b	17,5 $\pm$ 11,6c	88,3 $\pm$ 5,0d	98,8 $\pm$ 2,2e
ARSEF 1885	0,0 $\pm$ 0,0a	2,2 $\pm$ 5,0a	5,5 $\pm$ 5,2b	45,0 $\pm$ 24,3c	75,0 $\pm$ 8,0d
ARSEF 2211	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	2,2 $\pm$ 2,6b	11,8 $\pm$ 9,2c
ARSEF 2521	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	5,0 $\pm$ 3,5b	13,8 $\pm$ 11,9c	30,0 $\pm$ 23,1d
ARSEF 3479	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	5,5 $\pm$ 4,6b	85,0 $\pm$ 13,0c	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 3641	0,0 $\pm$ 0,0a	1,1 $\pm$ 2,2a	13,3 $\pm$ 8,2b	82,5 $\pm$ 29,1c	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 3643	0,0 $\pm$ 0,0a	1,6 $\pm$ 2,5a	8,3 $\pm$ 5,5b	91,4 $\pm$ 5,5c	97,5 $\pm$ 4,1c

(\*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

No 15º dia após o tratamento, com exceção do isolado ARSEF 2211 que não apresentou mortalidade nas concentrações de  $10^5$  e  $10^6$  conídios/mL, os demais isolados a partir desta data apresentaram mortalidade diretamente proporcional à concentração testada (Tabela 6). O isolado ARSEF 729 apresentou mortalidade de 100% de larvas na concentração de  $10^7$  conídios/mL e na concentração de  $10^8$  conídios/mL, com exceção do isolado ARSEF 2211 que causou mortalidade de 12,5% de larvas, todos os demais isolados apresentaram mortalidade acima de 99% das larvas.

**Tabela 6-** Percentual médio  $\pm$  desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 15 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1^\circ \text{C}$  e Umidade Relativa  $\geq 80\%$ .

Percentual de mortalidade (15 dias)					
Isolados	Controle	$10^5$ con./mL	$10^6$ con./mL	$10^7$ con./mL	$10^8$ con./mL
ARSEF 552	0,0 $\pm$ 0,0a	5,0 $\pm$ 3,5b	13,3 $\pm$ 7,5c	96,1 $\pm$ 5,7d	99,8 $\pm$ 0,3d
ARSEF 724	0,0 $\pm$ 0,0a	2,2 $\pm$ 2,6b	12,7 $\pm$ 6,1c	61,6 $\pm$ 31,8d	99,4 $\pm$ 1,6e
ARSEF 729	0,0 $\pm$ 0,0a	7,2 $\pm$ 3,6b	87,0 $\pm$ 25,2c	100,0 $\pm$ 0,0d	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 760	0,0 $\pm$ 0,0a	1,6 $\pm$ 2,5b	8,3 $\pm$ 7,5c	91,8 $\pm$ 3,7d	99,7 $\pm$ 0,4e
ARSEF 929	0,0 $\pm$ 0,0a	3,3 $\pm$ 3,5b	20,6 $\pm$ 9,7c	97,6 $\pm$ 2,5d	100,0 $\pm$ 0,0e
ARSEF 1885	0,0 $\pm$ 0,0a	5,5 $\pm$ 5,8b	7,7 $\pm$ 5,6b	48,1 $\pm$ 25,7c	99,7 $\pm$ 0,4d
ARSEF 2211	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	4,4 $\pm$ 3,0b	12,5 $\pm$ 8,4c
ARSEF 2521	0,0 $\pm$ 0,0a	5,5 $\pm$ 5,2b	10,0 $\pm$ 3,5c	95,0 $\pm$ 6,1d	99,2 $\pm$ 1,7d
ARSEF 3479	0,0 $\pm$ 0,0a	0,5 $\pm$ 1,6a	7,7 $\pm$ 5,6b	90,0 $\pm$ 9,3c	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 3641	0,0 $\pm$ 0,0a	2,2 $\pm$ 2,6b	16,2 $\pm$ 6,4c	85,0 $\pm$ 28,1d	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 3643	0,0 $\pm$ 0,0a	4,4 $\pm$ 3,9b	11,6 $\pm$ 4,0c	97,7 $\pm$ 3,8d	99,8 $\pm$ 0,3d

(\*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

No 20º dia após o tratamento, a mortalidade das larvas expostas às concentrações de  $10^5$  e  $10^6$  conídios/mL se manteve baixa, com destaque apenas para o isolado ARSEF 729 que demonstrou média de 99% de mortalidade das larvas na concentração de  $10^6$  conídios/mL (Tabela 7). Na concentração de  $10^7$  conídios/mL, o isolado ARSEF 2211 apresentou mortalidade de apenas 7,7% das larvas e os demais isolados apresentaram mortalidade de larvas superior a 80%, com os isolados ARSEF 729 e ARSEF 929 causando mortalidade de 100% das larvas.

Na concentração de  $10^8$  conídios/mL, com execução do isolado ARSEF 2211 que causou mortalidade de 14,3% das larvas, e dos isolados ARSEF 760 e ARSEF 2521 que causaram mortalidade de 99,8% e 99,3% respectivamente, os demais isolados foram capazes de matar 100% das larvas.

**Tabela 7-** Percentual médio  $\pm$  desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 20 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1^\circ$  C e Umidade Relativa  $\geq 80\%$ .

<b>Percentual de mortalidade (20 dias)</b>					
<b>Isolados</b>	<b>Controle</b>	<b>10<sup>5</sup> con./mL</b>	<b>10<sup>6</sup> con./mL</b>	<b>10<sup>7</sup> con./mL</b>	<b>10<sup>8</sup> con./mL</b>
ARSEF 552	0,0 $\pm$ 0,0a	6,1 $\pm$ 3,3b	17,8 $\pm$ 5,6c	98,7 $\pm$ 3,5d	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 724	0,0 $\pm$ 0,0a	4,4 $\pm$ 3,0b	13,3 $\pm$ 5,5c	80,0 $\pm$ 21,2d	100,0 $\pm$ 0,0e
ARSEF 729	0,0 $\pm$ 0,0a	8,8 $\pm$ 3,3b	99,0 $\pm$ 2,0c	100,0 $\pm$ 0,0d	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 760	0,0 $\pm$ 0,0a	2,2 $\pm$ 2,6b	9,4 $\pm$ 6,8c	93,6 $\pm$ 5,0d	99,8 $\pm$ 0,3e
ARSEF 929	0,0 $\pm$ 0,0a	3,8 $\pm$ 3,3b	20,6 $\pm$ 9,7c	100,0 $\pm$ 0,0d	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 1885	0,0 $\pm$ 0,0a	6,1 $\pm$ 6,0b	8,8 $\pm$ 6,5b	80,8 $\pm$ 16,8c	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 2211	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	7,7 $\pm$ 4,4b	14,3 $\pm$ 9,4c
ARSEF 2521	0,0 $\pm$ 0,0a	6,1 $\pm$ 4,8b	11,1 $\pm$ 3,3c	99,0 $\pm$ 2,2d	99,3 $\pm$ 1,6d
ARSEF 3479	0,0 $\pm$ 0,0a	1,6 $\pm$ 2,5a	7,7 $\pm$ 5,6b	93,2 $\pm$ 6,4c	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 3641	0,0 $\pm$ 0,0a	2,7 $\pm$ 3,6b	16,6 $\pm$ 6,8c	95,0 $\pm$ 8,3d	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 3643	0,0 $\pm$ 0,0a	5,5 $\pm$ 5,8b	11,8 $\pm$ 3,7c	99,1 $\pm$ 1,8d	100,0 $\pm$ 0,0d

(\*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

No 25º dia após o tratamento (Tabela 8), na concentração de  $10^5$  conídios/mL, apenas os isolados ARSEF 2211 e ARSEF 3479 não causaram mortalidade significativa, e os demais isolados variaram de 2,2% para o isolado ARSEF 760 a 9,4% para o isolado ARSEF 729. Na concentração de  $10^6$  conídios/mL, com exceção do isolado ARSEF 2211 que não causou mortalidade, as médias de mortalidade de larvas variaram de 7,7% para o isolado ARSEF 3479 e 99,1% para o isolado ARSEF 729 que se destacou já nesta concentração.

Na concentração de  $10^7$  conídios/mL, o isolado ARSEF 2211 foi o único que apresentou mortalidade abaixo de 80% com média de 7,7% e os isolados ARSEF 729 e ARSEF 929 mataram 100% das larvas.

Na concentração mais alta de  $10^8$  conídios/mL, o isolado ARSEF 2211 obteve a menor média de mortalidade (14,3%), o isolado ARSEF 2521 apresentou mortalidade de 99,3% das larvas e os demais isolados foram capazes de matar 100% das larvas. No 30º dia de tratamento os resultados não foram alterados.

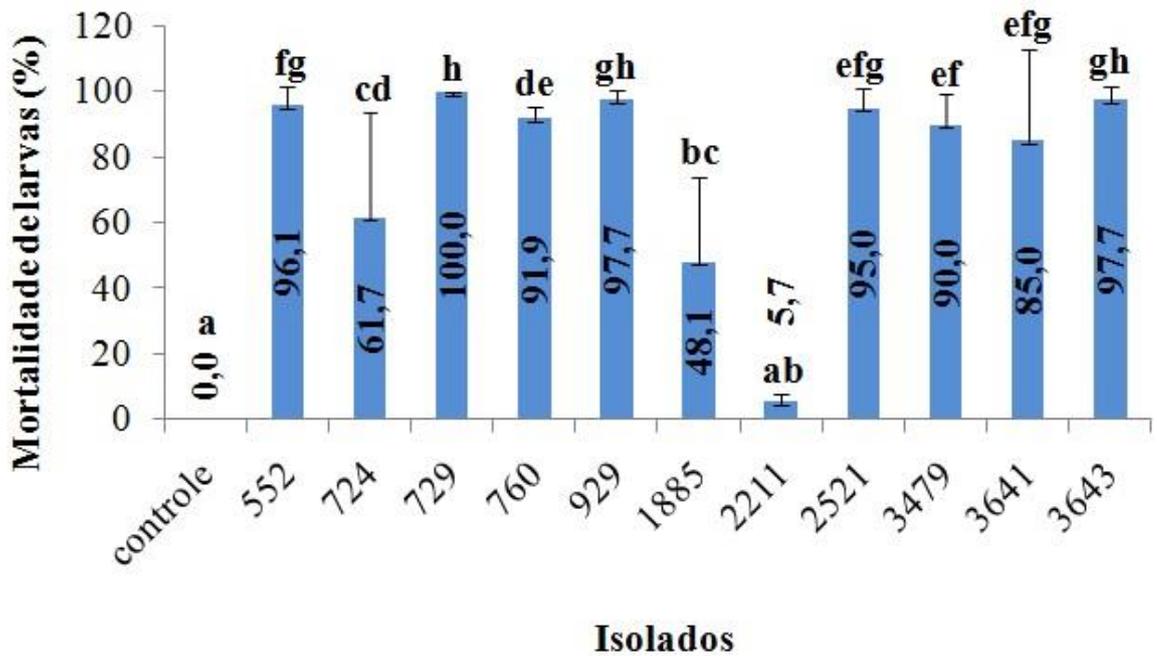
**Tabela 8** - Percentual médio  $\pm$  desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 25 dias após a exposição aos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1^\circ$  C e Umidade Relativa  $\geq 80\%$ .

Percentual de mortalidade (25 dias)					
Isolados	Controle	$10^5$ con./mL	$10^6$ con./mL	$10^7$ con./mL	$10^8$ con./mL
ARSEF 552	0,0 $\pm$ 0,0a	7,2 $\pm$ 2,6b	18,5 $\pm$ 4,7c	99,3 $\pm$ 1,7d	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 724	0,0 $\pm$ 0,0a	4,4 $\pm$ 3,0b	13,5 $\pm$ 4,7c	93,0 $\pm$ 6,7d	100,0 $\pm$ 0,0e
ARSEF 729	0,0 $\pm$ 0,0a	9,4 $\pm$ 3,0b	99,1 $\pm$ 2,0c	100,0 $\pm$ 0,0c	100,0 $\pm$ 0,0c
ARSEF 760	0,0 $\pm$ 0,0a	2,2 $\pm$ 2,6b	9,4 $\pm$ 6,8c	95,5 $\pm$ 4,8d	100,0 $\pm$ 0,0e
ARSEF 929	0,0 $\pm$ 0,0a	4,4 $\pm$ 3,0b	20,6 $\pm$ 9,7c	100,0 $\pm$ 0,0d	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 1885	0,0 $\pm$ 0,0a	7,2 $\pm$ 6,1b	8,8 $\pm$ 6,5b	80,8 $\pm$ 16,8c	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 2211	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	0,0 $\pm$ 0,0a	7,7 $\pm$ 4,4b	14,3 $\pm$ 9,4c
ARSEF 2521	0,0 $\pm$ 0,0a	6,1 $\pm$ 4,8b	11,6 $\pm$ 3,5c	99,0 $\pm$ 2,2d	99,3 $\pm$ 1,6d
ARSEF 3479	0,0 $\pm$ 0,0a	1,6 $\pm$ 2,5a	7,7 $\pm$ 5,6b	93,3 $\pm$ 6,1c	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 3641	0,0 $\pm$ 0,0a	6,1 $\pm$ 3,3b	16,6 $\pm$ 6,8c	95,0 $\pm$ 8,3d	100,0 $\pm$ 0,0d
ARSEF 3643	0,0 $\pm$ 0,0a	7,2 $\pm$ 6,6b	11,8 $\pm$ 3,7c	99,1 $\pm$ 1,8d	100,0 $\pm$ 0,0d

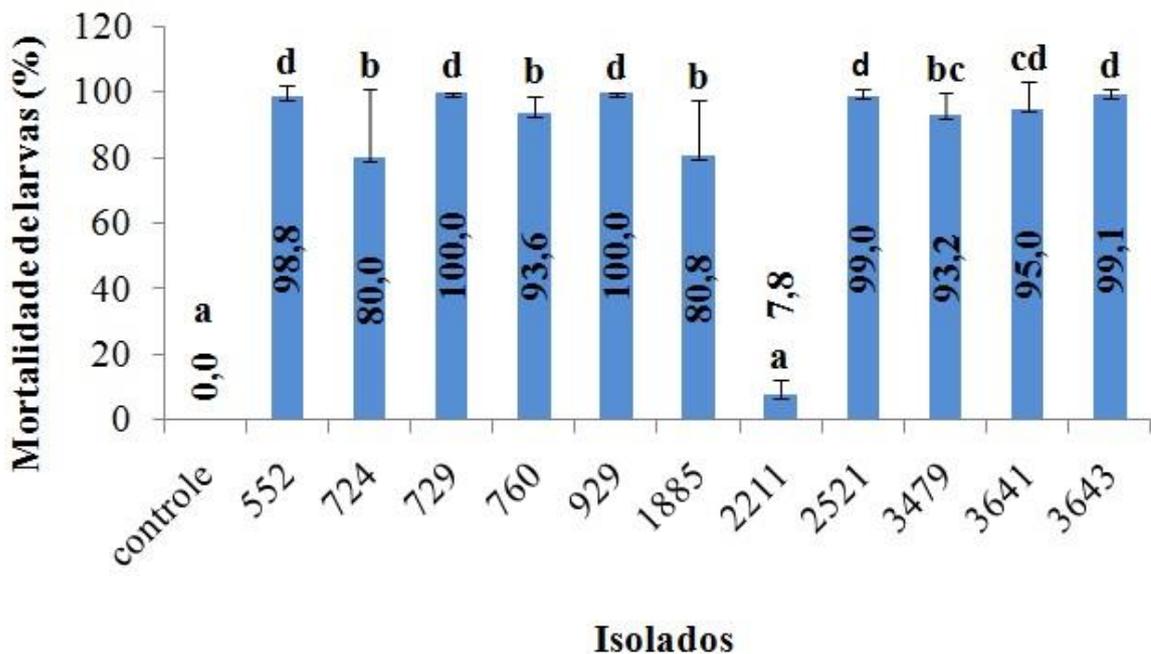
(\*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

Também foram avaliados os resultados provenientes da comparação entre os diferentes isolados, nas concentrações de  $10^7$  conídios/mL e  $10^8$  conídios/mL nos dias 15, 20 e 25 após o tratamento.

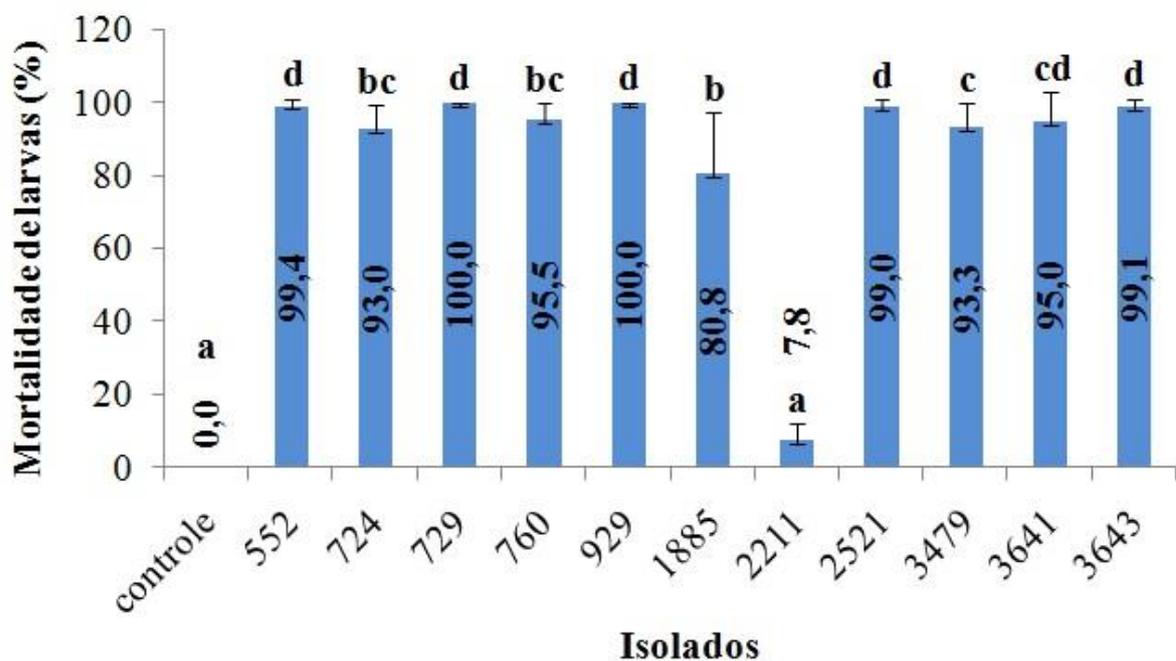
Quando comparamos os diferentes isolados na concentração de  $10^7$  conídios/mL, no 15º dia após o tratamento (Figura 5), o isolado ARSEF 729 se mostrou o mais eficiente com 100% de mortalidade de larvas. No 20º dia após o tratamento (Figura 6), o isolado ARSEF 929 também foi capaz de matar 100% das larvas e os isolados ARSEF 2521 e ARSEF 3643 mais de 99%. Na última avaliação, 25 dias após o tratamento (Figura 7), o isolado ARSEF 552 também passou a apresentar mais de 99% de mortalidade de larvas na concentração de  $10^7$  conídios/mL.



**Figura 5-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de  $10^7$  conídios/mL no 15º dia após o tratamento.

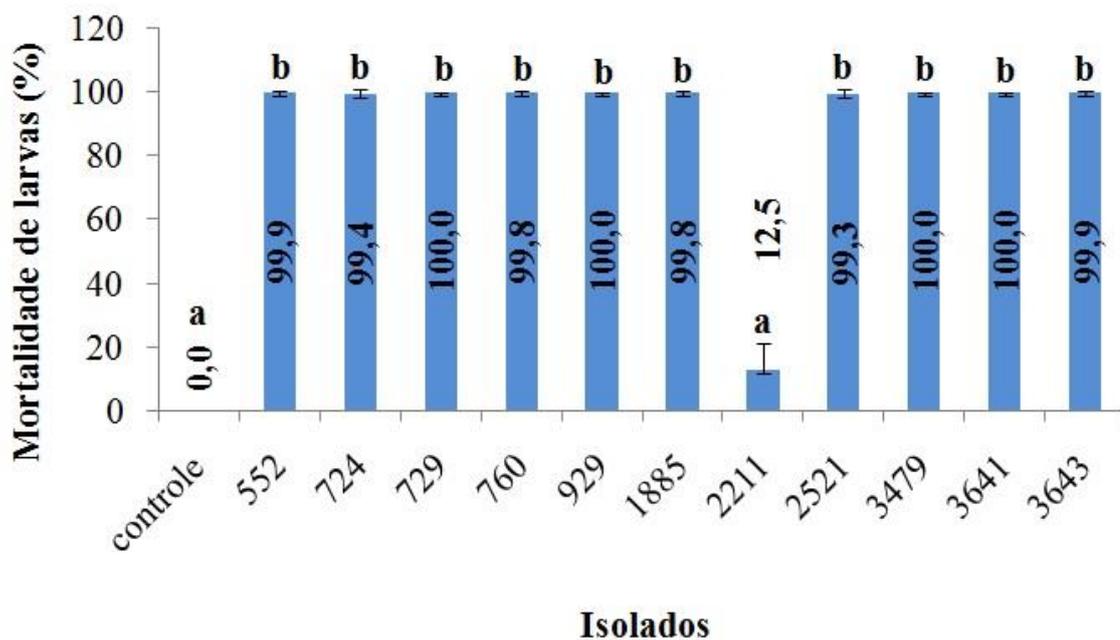


**Figura 6-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de  $10^7$  conídios/mL no 20º dia após o tratamento.

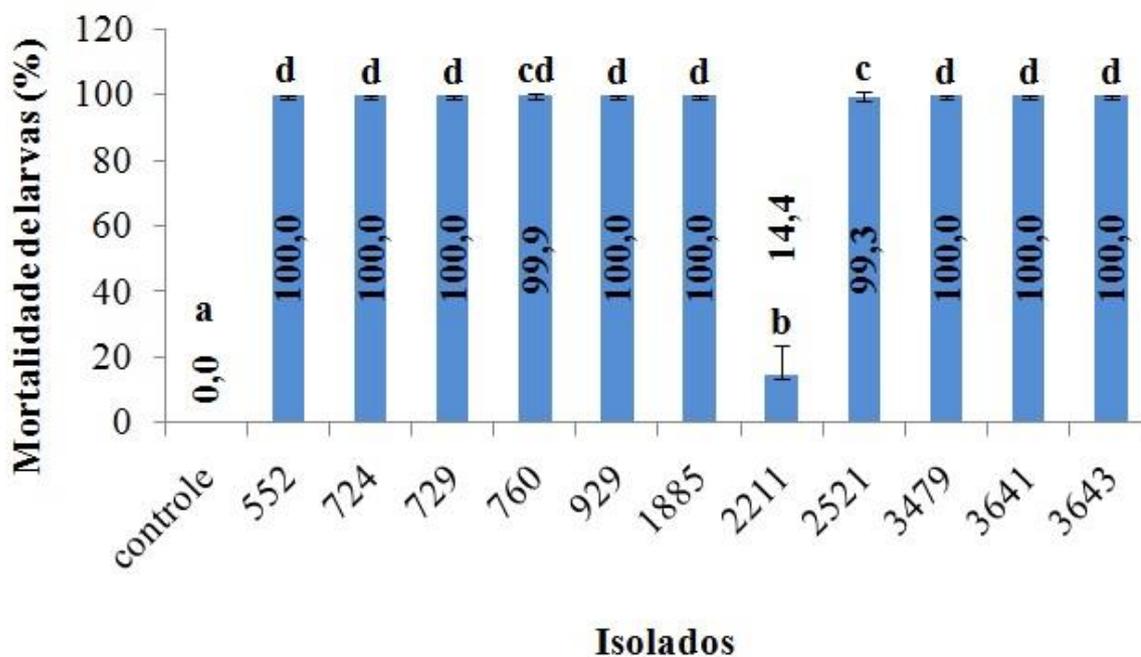


**Figura 7-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de  $10^7$  conídios/mL no 25º dia após o tratamento.

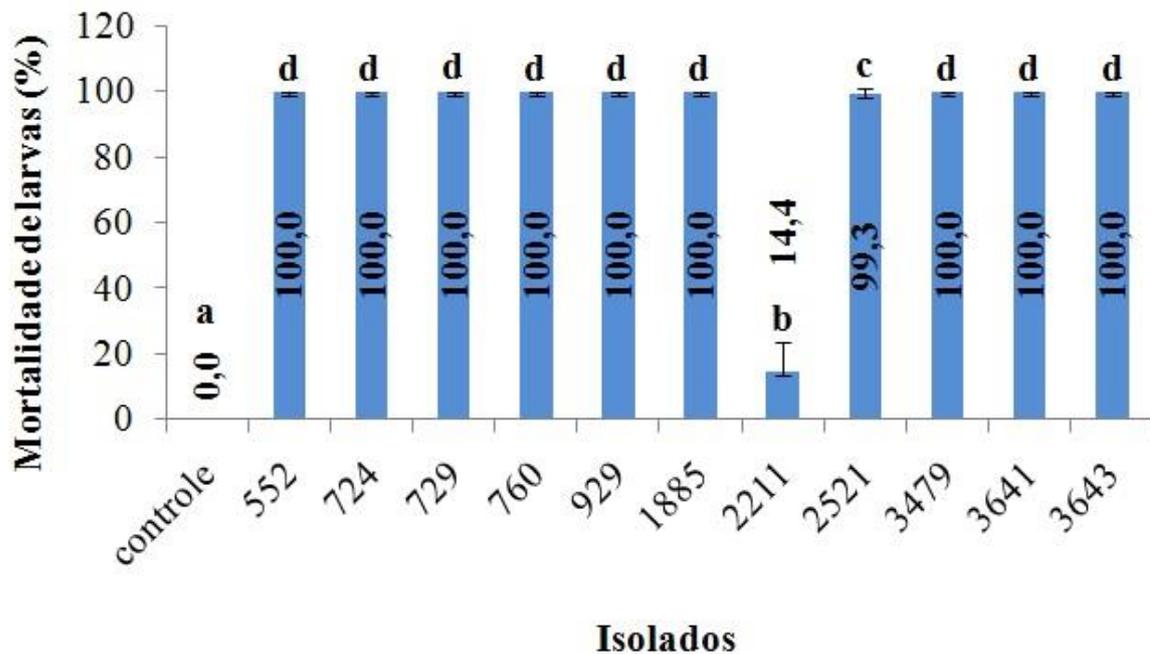
Na concentração de  $10^8$  conídios/mL, quando comparados 15 dias após o tratamento (Figura 8), os isolados ARSEF 729, ARSEF 929, ARSEF 3479 e ARSEF 3641 apresentaram mortalidade de 100% das larvas. Todos os demais isolados, com exceção do ARSEF 2211, causaram mortalidade de larvas superior a 99%. No 20º dia após o tratamento (Figura 9), os resultados seguiram se estabilizando sem muitas alterações até que no 25º dia após o tratamento (Figura 10), com exceção do isolado ARSEF 2521 que matou 99,3% das larvas e do isolado ARSEF 2211 que apresentou mortalidade de apenas 14,4% das larvas, todos os demais isolados causaram mortalidade de 100% das larvas.



**Figura 8-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de  $10^8$  conídios/mL no 15º dia após o tratamento.



**Figura 9-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de  $10^8$  conídios/mL no 20º dia após o tratamento.



**Figura 10-** Percentual médio e desvio padrão da mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* obtidos após tratamento com isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. na concentração de  $10^8$  conídios/mL no 25º dia após o tratamento.

Foram avaliadas as concentrações letais (CL50 e CL90) obtidas no 25º dia após tratamento (Tabela 9).

A maioria dos isolados foram capazes de matar 50% das larvas com uma concentração de  $10^6$  conídios/mL, com exceção dos isolados ARSEF 552 que necessitou de uma concentração de  $1 \times 10^7$  conídios/mL e ARSEF 2211 necessitando de uma concentração de  $7,321 \times 10^{24}$  conídios/mL. O isolado ARSEF 729 foi capaz de causar a morte de 50% das larvas com apenas  $3,733 \times 10^5$  conídios/mL.

Dos 11 isolados avaliados, oito foram capazes de ocasionar a morte de 90% das larvas com uma concentração igual ou inferior a  $10^7$  conídios/mL (ARSEF 724, ARSEF 729, ARSEF 760, ARSEF 929, ARSEF 2521, ARSEF 3479, ARSEF 3641 e ARSEF 3643). O isolado ARSEF 729 demonstrou a maior eficiência, ocasionando a morte de 90% das larvas com a concentração de  $2,837 \times 10^6$  conídios/mL. O isolado ARSEF 2211 demonstrou o resultado menos satisfatório, necessitando de uma concentração de  $7,321 \times 10^{40}$  conídios/mL para matar 90% das larvas.

**Tabela 9-** Concentração letal (CL 50 e CL 90) dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. obtida no bioensaio de larvas de *Rhipicephalus microplus* 25 dias após o tratamento. Experimento realizado sob condições controladas de  $27 \pm 1^\circ$  C e Umidade Relativa  $\geq 80\%$ .

Isolados	Concentração Letal (CL)	
	CL (conídios/mL)	Intervalo de Confiança (conídios/mL)
ARSEF 552	CL50= $1,002 \times 10^7$ CL90= $4,004 \times 10^9$	$1,526 \times 10^7 - 3,530 \times 10^7$ $7,972 \times 10^9 - 1,598 \times 10^{10}$
ARSEF 724	CL50= $1,952 \times 10^6$ CL90= $1,612 \times 10^7$	$1,699 \times 10^6 - 2,205 \times 10^6$ $1,150 \times 10^7 - 2,074 \times 10^7$
ARSEF 729	CL50= $3,733 \times 10^5$ CL90= $2,837 \times 10^6$	$3,508 \times 10^5 - 3,959 \times 10^5$ $2,737 \times 10^6 - 2,936 \times 10^6$
ARSEF 760	CL50= $2,027 \times 10^6$ CL90= $1,497 \times 10^7$	$1,702 \times 10^6 - 2,352 \times 10^6$ $1,115 \times 10^7 - 1,879 \times 10^7$
ARSEF 929	CL50= $1,510 \times 10^6$ CL90= $1,033 \times 10^7$	$1,251 \times 10^6 - 1,768 \times 10^6$ $8,878 \times 10^6 - 1,178 \times 10^7$
ARSEF 1885	CL50= $6,000 \times 10^6$ CL90= $7,203 \times 10^8$	$1,644 \times 10^6 - 1,364 \times 10^7$ $9,647 \times 10^8 - 2,405 \times 10^9$
ARSEF 2211	CL50= $7,321 \times 10^{24}$ CL90= $7,321 \times 10^{40}$	$8,849 \times 10^{24} - 2,349 \times 10^{25}$ $8,849 \times 10^{40} - 2,349 \times 10^{41}$
ARSEF 2521	CL50= $1,756 \times 10^6$ CL90= $1,297 \times 10^7$	$1,676 \times 10^6 - 1,837 \times 10^6$ $1,036 \times 10^7 - 1,559 \times 10^7$
ARSEF 3479	CL50= $2,354 \times 10^6$ CL90= $1,919 \times 10^7$	$1,850 \times 10^6 - 2,858 \times 10^6$ $1,179 \times 10^7 - 2,659 \times 10^7$
ARSEF 3641	CL50= $1,900 \times 10^6$ CL90= $1,594 \times 10^7$	$1,467 \times 10^6 - 2,334 \times 10^6$ $7,741 \times 10^6 - 2,414 \times 10^7$
ARSEF 3643	CL50= $1,881 \times 10^6$ CL90= $1,558 \times 10^7$	$1,544 \times 10^6 - 2,219 \times 10^6$ $1,067 \times 10^7 - 2,049 \times 10^7$

#### 4.6 Avaliação da produção de conídios

Na análise da conidiogênese dos 11 isolados de *Metarhizium* spp. que foram testados, os isolados ARSEF 929 e ARSEF 3479 apresentaram as menores produções de conídios comparados aos demais isolados, com  $25 \times 10^5$  conídios/mL e  $53,66 \times 10^5$  conídios/mL, respectivamente, não apresentando diferença estatística entre si (Tabela 10). Em ordem crescente de produção de conídios, segue o isolado ARSEF 729 com média de  $305,83 \times 10^5$  conídios/mL que é estatisticamente semelhante ao ARSEF 760 com média  $383,5 \times 10^5$  conídios/mL. Este por sua vez, assemelha-se estatisticamente com os isolados ARSEF 724 e ARSEF 3643 com  $444,33 \times 10^5$  conídios/mL e  $453,83 \times 10^5$  conídios/mL respectivamente.

Ainda em ordem crescente de produção de conídios, seguem os isolados ARSEF 2211 com  $581,33 \times 10^5$  conídios/mL, ARSEF 552 com  $587,16 \times 10^5$  conídios/mL e ARSEF 3641 com  $668 \times 10^5$  conídios/mL que não diferem estatisticamente entre si. Por fim, os isolados ARSEF 1885 e ARSEF 2521 apresentaram os maiores valores de produção de conídios com médias de  $769,50 \times 10^5$  conídios/mL e  $835 \times 10^5$  conídios/mL respectivamente não diferindo estatisticamente entre si.

**Tabela 10-** Média e desvio padrão da produção de conídios dos isolados de *Metarhizium* spp.

Isolado	N x 10 <sup>5</sup>
ARSEF 929	25,00 ± 9,86 <b>a</b>
ARSEF 3479	53,66 ± 12,80 <b>a</b>
ARSEF 729	305,83 ± 67,29 <b>b</b>
ARSEF 760	383,50 ± 66,83 <b>bc</b>
ARSEF 724	444,33 ± 67,54 <b>c</b>
ARSEF 3643	453,83 ± 70,14 <b>c</b>
ARSEF 2211	581,33 ± 83,29 <b>d</b>
ARSEF 552	587,16 ± 126,36 <b>d</b>
ARSEF 3641	668,00 ± 100,11 <b>d</b>
ARSEF 1885	769,50 ± 113,28 <b>e</b>
ARSEF 2521	835,00 ± 60,58 <b>e</b>

(\*) Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $P \geq 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

O controle biológico de carrapato é uma alternativa muito atraente devido a preocupação com a contaminação ambiental e saúde humana, gastos com produtos químicos e o desenvolvimento de populações resistentes aos pesticidas (SAMISH, 2004). A busca por métodos alternativos para controle de *R. microplus* é um grande desafio para os pesquisadores devido à sua importância na pecuária mundial e, neste contexto, o controle biológico de artrópodes utilizando fungos artropodopatogênicos tem recebido grande destaque.

Rotineiramente, a primeira triagem para identificação de *Metarhizium* spp. antes de lançar mão de técnicas moleculares, baseia-se na análise das características macromorfológicas das colônias crescidas em meios artificiais bem como na avaliação micromorfológica de seus conídios e conidióforos através de microscopia óptica (BRIDGE et al., 1997). Os isolados utilizados durante o presente estudo apresentaram características macro e micromorfológicas condizentes com o que é descrito na literatura para o gênero (TULLOCH, 1976; ALVES, 1998; DRIVER et al., 2000; BISCHOFF et al., 2009).

A viabilidade dos conídios presentes nas suspensões que foram utilizadas durante os tratamentos é de extrema importância, pois possibilita o sucesso do início da penetração do fungo pela cutícula do carrapato (BITTENCOURT et al., 1999; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). As suspensões utilizadas no presente estudo apresentaram 100% de germinação, garantindo assim, a qualidade dos conídios que foram utilizados nos tratamentos.

Apesar de não serem considerados patógenos específicos de ácaros, os fungos *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp. são os gêneros mais estudados para controle de carrapatos (CHANDLER et al., 2000; MANIANIA et al., 2007). A eficiência dos fungos artropodopatogênicos para diversas fases de vida de carrapatos como ovos, larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas já foi testada em diversos estudos demonstrando resultados muito satisfatórios (CHANDLER et al., 2000; SAMISH et al., 2004; FERNANDES; BITTENCOURT, 2008; LEEMON; JONSSON, 2008a).

Testes laboratoriais utilizando *Metarhizium* spp. contra o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* (Canestrini 1888) indicaram que esses fungos são alternativas eficazes aos acaricidas químicos (FRAZZON et al., 2000; OJEDA-CHI et al., 2010; CAMARGO et al., 2012; QUINELATO et al., 2012). Porém os mesmos trabalhos também demonstram que existe diferença na virulência entre os diversos isolados do gênero *Metarhizium* spp. Dessa forma, estudos que investiguem as respostas do hospedeiro quando exposto a diferentes isolados é fundamental para a seleção de bons candidatos a serem utilizados em formulações a campo.

Com relação ao bioensaio com fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, os percentuais de controle dos 11 isolados de *Metarhizium* spp. testados variaram significativamente demonstrando que o potencial patogênico dos isolados é bastante diversificado. Apesar dessa diferença entre os diferentes isolados, os resultados tenderam a ser melhores na concentração de  $10^8$  conídios/mL com relação à concentração de  $10^7$  conídios/mL, o que demonstra que a concentração utilizada nas suspensões durante os tratamentos teve grande importância.

O resultado menos satisfatório foi demonstrado pelo isolado ARSEF 2211 que apresentou apenas 5,32% de percentual de controle das fêmeas mesmo quando testado na concentração mais alta de  $10^8$  conídios/mL. Os isolados ARSEF 729, 3641 e 3643 na concentração de  $10^8$  conídios/mL foram capazes de apresentar percentual de controle de fêmeas de *R. microplus* superior a 50%. O grupo testado pelo isolado ARSEF 3643 na concentração de  $10^8$  conídios/mL, além de apresentar o maior percentual de controle (58,77%), foi capaz de alterar todos os parâmetros biológicos avaliados, inclusive o

percentual de eclosão das larvas oriundas da postura das fêmeas tratadas. Apesar de não causar a morte imediata das fêmeas, o tratamento utilizando isolados de *Metarhizium* spp. com alta virulência é extremamente útil, já que isso causaria alterações em diversos parâmetros biológicos das fêmeas e, conseqüentemente, a diminuição das gerações futuras no ambiente.

Ovos de carrapatos são altamente susceptíveis à infecção por *Metarhizium* spp. apresentando uma alta porcentagem de mortalidade de ovos e reduzindo drasticamente a sua eclodibilidade (MENT, et al., 2010). Quando expostos pelos mesmos isolados de *Metarhizium* spp., os ovos de *R. microplus*, independente do isolado utilizado, apresentaram taxa de eclosão inversamente proporcional à concentração testada, ou seja, quanto maior a concentração do fungo utilizada na suspensão, menor a taxa de eclosão de larvas oriundas dos ovos tratados, demonstrando que a concentração de conídios utilizada para os tratamentos é de extrema importância para o sucesso do tratamento. Os isolados ARSEF 3643, 729 e 760 na concentração de  $10^8$  conídios/mL, apresentaram os melhores resultados com redução de mais de 50% da eclosão de larvas e, mais uma vez, o isolado ARSEF 2211 apresentou o resultado menos satisfatório com eclosão de 84,5% de larvas. Obter menores taxas de eclosão de larvas é extremamente vantajoso quando se visa diminuir o seu número nas pastagens.

Estudos anteriores envolvendo formulações a base de entomopatógenos demonstraram que a susceptibilidade de ovos, larvas e fêmeas de carrapatos é diferente, sendo as larvas mais susceptíveis (KAAYA; HASSAN, 2000; ABDEL-SHAFY; SOLIMAN, 2004; PERINOTTO, 2012). Isso se deve ao fato de que, de acordo com Odhiambo (1982) a epicutícula ou camada externa da cutícula dos carrapatos só é formada a partir da ecdise da ninfa estando presente em maior quantidade no adulto. Portanto, isso explica porque o estágio larval é mais sensível à ação do fungo.

No presente estudo, as larvas de *R. microplus* também apresentaram maior susceptibilidade à ação do fungo em comparação com os ovos e fêmeas ingurgitadas, estando de acordo com a literatura anteriormente citada. Da mesma forma que também foi observado por outros autores, a mortalidade das larvas aumenta proporcionalmente à concentração utilizada nas suspensões fúngicas (FERNANDES et al., 2003; CAMARGO et al., 2012; QUINELATO et al., 2012).

A maioria dos isolados testados no presente estudo apresentaram alta taxa de mortalidade no décimo dia após o tratamento, estando de acordo com resultados anteriores envolvendo o tratamento de larvas de *R. microplus* com *M. anisopliae* s.l. (BITTENCOURT et al., 1994a; LEEMON et al., 2008). Quinelato et al., (2012) obtiveram baixo percentual de mortalidade de larvas neste mesmo período de tempo, reforçando o fato de que o sucesso da infecção de um fungo no artrópode depende de diversos fatores como a variabilidade genética dos isolados e a susceptibilidade da população de carrapatos que foi testada (FERNANDES et al., 2009; PERINOTTO et al., 2012).

O isolado ARSEF 2211 foi o único a apresentar resultados insatisfatórios com CL50 e CL90 de  $7,321 \times 10^{24}$  conídios/mL e  $7,321 \times 10^{40}$  conídios/mL, respectivamente. Todos os demais isolados demonstraram possuir alta virulência para larvas de *R. microplus* com destaque para o isolado ARSEF 729 que obteve CL50 de  $3,733 \times 10^5$  conídios/mL e CL90 de  $2,837 \times 10^6$  conídios/mL, respectivamente. Isolados que sejam capazes de causar alta mortalidade de larvas em menor espaço de tempo é de extrema valia já que isso diminuiria a quantidade de larvas nas pastagens e, conseqüentemente, a futura infestação dos animais no pasto.

Dextruxinas são metabólitos secundários produzidos por diversas espécies de fungos artropodopatogênicos e fitopatogênicos e são os compostos mais produzidos por *M. anisopliae* s.l. em fermentação (PEDRAS et al., 2002; LIU; TZENG, 2012; MOON et al.,

2008). Gôlo et al., (2014) avaliaram os níveis de dextruxinas dos mesmos isolados de *Metarhizium* spp. utilizados no presente estudo e não encontraram relação entre a produção desses metabólitos e a virulência para larvas de insetos.

De acordo com os resultados de Golo et al., (2014) os isolados ARSEF 724, 760 e 3479 não produziram dextruxinas enquanto os isolados ARSEF 552, 729, 929, 1885, 2211, 2521, 3641, e 3643 foram capazes de produzir o metabólito. No presente trabalho também não foi observada relação entre a virulência de isolados produtores ou não de dextruxinas para as diversas fases de vida do carrapato *R. microplus*. O isolado ARSEF 2211, por exemplo, apresentou baixa virulência para todas as fases de vida do carrapato e é produtor de dextruxina. Em contra partida, o isolado ARSEF 760 que não produz o metabólito, apresentou alta virulência entre os isolados testados.

De uma maneira geral, os isolados de *Metarhizium* spp. utilizados no presente estudo, demonstraram de forma individual, uma virulência equivalente quando comparados entre os diferentes estágios de vida do carrapato *R. microplus*. Dessa forma, o mesmo isolado que se mostrou ineficiente para o estágio de fêmea ingurgitada, também o foi para os demais estágios de ovo e larva como foi o caso do isolado ARSEF 2211. Em contra partida, os isolados ARSEF 729 e ARSEF 3643 apresentaram os resultados mais eficientes para todos os estágios testados.

A utilização de ensaios biológicos *in vitro* é de extrema importância para selecionar isolados fúngicos virulentos para determinados artrópodes-alvo, além de ser essencial para compreender os fatores envolvidos na virulência do artropodopatógeno. O presente estudo permitiu a seleção de isolados de *Metarhizium* spp. mais virulentos para o controle *in vitro* de fêmeas, ovos e larvas de *R. microplus* a fim de selecionar isolados adequados para uma futura utilização a campo.

Apesar da virulência dos fungos artropodopatogênicos em ensaios laboratoriais já ter sido comprovada, a sua eficácia a campo é afetada significativamente. Isto se deve ao fato de que a ação do fungo sofre interferência de diversos fatores ambientais como temperatura, umidade, radiação solar e chuvas (INGLIS et al., 2001; HUANG; FENG, 2009; MENT et al., 2010). Portanto, o avanço do controle biológico de carrapatos deve incluir pesquisas em formulações que possam manter a viabilidade e patogenicidade do fungo nas condições ambientais (CAMARGO, et al., 2012).

A análise dos conídios de fungos entomopatogênicos é muito importante, não apenas como característica de diferenciação de táxons, mas também por serem responsáveis pelo início da infecção no hospedeiro sendo, portanto, o ingrediente ativo nas formulações de biopesticidas (JEFFS et al., 1999). Dessa maneira, quando se visa a seleção de isolados para o uso comercial é importante que, além de virulento para o artrópode alvo, o mesmo isolado também seja bom produtor de conídios.

Trabalhos anteriores já demonstraram que existe uma grande variabilidade na produção de conídios entre os diferentes isolados de *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp. e, além disso, que não existe correlação entre a produção de conídios e a virulência de um isolado (LIU et al, 2003; FERNANDES et al., 2011; QUINELATO et al., 2012). O presente estudo avaliou a conidiogênese dos 11 isolados de *Metarhizium* spp. utilizados nos bioensaios e associou esses resultados com a sua virulência para ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*.

Como esperado, os isolados apresentaram produção de conídios bastante diversificada, com médias variando de  $25 \times 10^5$  conídios/mL, como foi o caso do isolado ARSEF 929 ao ARSEF 2521 com média de  $835 \times 10^5$  conídios/mL. Baseando-se no fato de os conídios serem as estruturas fúngicas mais utilizadas em produtos para controle biológico,

é de extrema importância para a produção industrial a larga escala dos mesmos, selecionar isolados que tenham alta capacidade conidiogênica.

A virulência dos isolados testados demonstrou não estar relacionada com a sua produção de conídios, visto que os isolados que demonstraram maior potencial virulento para todas as fases de vida do carrapato *R. microplus*, como foi o caso dos isolados ARSEF 729 e 3643, apresentaram uma menor taxa de produção de conídios quando comparados ao isolado ARSEF 2211 que apresentou potencial patogênico insatisfatório durante todos os bioensaios. Portanto, não foi demonstrado no presente estudo, qualquer relação entre a capacidade de produzir conídios dos isolados de *Metarhizium* spp. testados com a sua virulência para *R. microplus*.

Novas estratégias de controle de carrapatos são necessárias e o uso de fungos artropodopatogênicos contra diferentes estágios de vida do carrapato é uma delas (WASSERMANN, 2016). A variabilidade genética existente entre os isolados artropodopatogênicos gerando diferentes potenciais de patogenicidade e virulência para insetos e ácaros praga, demonstra a importância de estudos que visem selecionar isolados com características adequadas para programas de controle biológico de pragas agrícolas e veterinárias (BARCI et al., 2009).

O presente trabalho foi capaz de selecionar isolados de *Metarhizium* spp que sejam bons produtores de conídios e também virulentos para ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*. Isso se mostra de extrema importância, visto que estudos que envolvam a seleção de isolados que sejam ideais para futuros estudos e sua aplicação à campo é imprescindível para o sucesso do controle biológico.

## 6 CONCLUSÕES

Após todas as avaliações, foi possível concluir do presente trabalho que:

- Os isolados brasileiros de *Metarhizium* spp. avaliados apresentaram diferenças na virulência quando comparados entre si;
- Os diferentes estágios de vida do carrapato *Rhipicephalus microplus* apresentaram diferentes susceptibilidades entre si quando testados com os mesmos isolados, sendo as larvas o estágio mais susceptível;
- A concentração fúngica utilizada nas suspensões foi determinante para a virulência, onde a concentração de  $10^8$  conídios/mL demonstrou ser a mais eficiente;
- Para todos os estágios de vida de *R. microplus*, os isolados ARSEF 3643 e 729 foram os mais virulentos e o isolado ARSEF 2211 o menos virulento;
- Existem diferenças entre a quantidade de conídios produzidos entre os diferentes isolados testados;
- Não foi observada relação entre a virulência e a conidiogênese para os isolados fúngicos avaliados neste experimento.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SHAIFY, S.; SOLIMAN, M. M. M. Toxicity of some essential oils on eggs, larvae and females of *Boophilus annulatus* (acari: ixodida: amblyommidae) infesting cattle in Egypt. **Acarologia**, v. 44, p. 23-30, 2004.
- ALONSO-DÍAZ, M.A.; GARCIA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGUN, C.A.; RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; FRAGOSO-SANCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, 147, p. 336–340, 2007.
- ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.
- ANDREOTI, R. **Situação atual da resistência do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas no Brasil** – Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 1 edição, 2010. 36p.
- ARRUDA, W; LUBECK, I; SCHRANK, A; VAINSTEIN, M.H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 37, p. 231-244, 2005.
- AZEVEDO, J.L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 239-268.
- BAHIENSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 319–324, 2006.
- BARCI, L.A.G.; ALMEIDA, J.E.M.; NOGUEIRA, A.H.C.; ZAPPELINI, L.O.; PRADO, A.P.; Selection of isolates of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 18, p.7-13, 2009.
- BARROS-BATESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, H. G. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação das espécies**. 1 ed., São Paulo, SP: Butantã, 2006, 223p.
- BASSO, L.M.D.; MONTEIRO, A.C.; BELO, M.A.A.; SOARES, V.E.; GARCIA, M.V.; MOCHIL, D.A. Control of *Boophilus microplus* larvae by *Metarhizium anisopliae* in artificially infested pastures. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40 (6), p. 595–600, 2005.
- BENNETT, G. F. Ovoposition of *Boophilus microplus* (CANESTRINI) (ACARIDA: IXODIDAE) I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, 1974.
- BIDOCHKA, M.J.; SMALL, C.L.; SPIRONELLO, M. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Environmental Microbiology**, v.7, p.1361-1368, 2005.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. **Mycologia**, 98(5), p. 737–745, 2006.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, p. 512-530, 2009.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 41-47, 1994.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; C.L. MASSARD, A.F. LIMA. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 16, p. 49-55, 1994b.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v. 29, p. 351-354, 1999.

BRIDGE, P.D.; PRIOR, C.; SAGBOHAN, J.; LOMER, C.J.; CAREY, M.; BUDDIE, A. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. **Biodiversity and Conservation**, v. 6, p. 177-189, 1997.

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

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

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

CHARNLEY, A. K. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a du Coleoptere *Oryctes rhinoceros* par le champignon en tomopa thogene *Metarhizium anisopliae*. **Entomophaga** 22, p. 289-294, 1984.

CHARNLEY, A. K. In *Biotechnology of Fungi for improving Plant Growth*, ed. J. M. Whipps & R. D. Lumsden. **Cambridge University Press**, Cambridge, pp. 85-125, 1989.

CHARNLEY, A. K. ; ST. LEGER, R. J. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*, ed. G. T. Cole & H. C. Hoch. **Plenum Press**, New York, p. 267-86, 1991.

CORREIA, A.C.B.; FIORIN, A.C.; MONTEIRO, A.C.; VERÍSSIMO, C.J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. **Journal of Invertebrate Pathology**, 71, p. 189–191, 1998.

COSTA, G.L.; SARQUIS, M.I.M.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, p. 207-209, 2002.

DÍAZ, M.P.; MACÍAS, A.F.; NAVARRO, S.R.; TORRE, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Interciencia**, v. 31, p. 856-860, 2006.

DRIVER, F.; MILNER, R.J. PCR applications to the taxonomy of entomopathogenic fungi. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P. Applications in PCR mycology. **CABI Publishing**, p. 153-186, 1998.

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

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

ECOBICHON D.J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**; v. 160(1-3): p. 27-33, 2001.

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237–256, 2007.

FERNANDES, E.K.K.; COSTA, G.L.; SOUZA, E.J.; MORAES, A.M. L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Beauveria bassiana* isolated from engorged females and tested against eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 393-398, 2003.

FERNANDES, É.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p.71-93, 2008.

FERNANDES, É. K. K.; MORAES, Á. M. L.; PACHECO, R. S.; RANGEL, D. E. N.; MILLER, M. P.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 760-774, 2009.

FERNANDES, É.K.K.; KEYSER, C.A.; CHONG, J.P.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; ROBERTS, D.W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.115-128, 2010.

FERNANDES, E.K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIENSE, T.C.; MORAES, A. M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307-318, 2011.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERT, D.W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology** v. 130, p. 300–305. 2012.

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

FREIMOSER F.M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; ST LEGER, R.J. Expresses sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology**, v. 149, p. 239-247, 2003.

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

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Circular Técnica n. 59-Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2000. 25p.

GINSBERG, H. S.; LEBRUN, R. A.; HEYER, K. & ZHIOUA, E. Potential non target effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) used for biological control of ticks (Acari: Ixodidae). **Environmental Entomology** v. 31, p. 1191–1196, 2002.

GOLO, P. S.; GARDNER, D. R.; GRILLEY, M. M.; TAKEMOTO, J. Y.; KRASNOFF, S. B.; PIRES, M. S.; FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Production of Dextruxins from *Metarhizium* spp. Fungi in Artificial Medium and in Endophytically Colonized Cowpea Plants. **PLoS ONE** v. 9(8): p. 104946, 2014.

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

GONZALES, J. C. **O controle dos carrapatos do boi**. 2. Ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 79p.

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

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potencial economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 150-156, 2014.

HAJEK, A.E.; ST. LEGER, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 293-322, 1994.

HEMMATI, F.; PELL, J.K.; MCCARTNEY, H.A.; DEADMAN, M.L. Airborne concentrations of conidia of *Erynia neoaphidis* above cereal fields. **Mycological Research**, v. 105: p. 485–489, 2001.

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

HUANG, B. F.; FENG, M. G. Comparative tolerances of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. **Mycopathologia**. v. 168, p. 145-152, 2009.

INGLIS, G. D.; GOETTEL, M. S.; TARIQ, M. B.; STRASSER, H. **Fungi as Biological Control Agents**. CAB International, Wallingford, pp. 23–69, 2001.

JEFFS, L.B.; XAVIER, I.J.; MATAI, R.E.; KHACHATOURIANS, G.G. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolyposcladium* e *Verticillium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 936-948, 1999.

JONSSON N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1-10, 2006.

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

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

KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to ixodidae species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 705-711, 2004.

KOCAN, K.M. Targeting ticks for control of selected haemoparasitic diseases of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 121-151, 1995.

LEEMON, D.M.; JONSSON, N.N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **J. Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 40–49, 2008a.

LEEMON, D.M.; TURNER, L.B.; JONSSON, N.N. Pen studies on the control of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). **Veterinary Parasitology**, 156, 248–260, 2008b.

- LIU, H.; SKINNER, M.; BROWNBRIGDE, M.; PARKER, B.L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.82, p.139-147, 2003.
- LIU, B-L; TZENG, Y-M. Development and applications of destruxins: a review. *Biothecnology Advances*, v. 30, p. 1242-1254, 2012.
- LOMER, C.J.; BATEMAN, R.P.; JOHNSON, D.L.; LANGEWALD, J.; THOMAS, M. Biological control of locusts and grasshoppers. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p. 667- 702, 2001.
- LÓPEZ, E.; LÓPEZ, G.; ORDUZ, S. Control de la garrapata *Boophilus microplus* com *Metarhizium anisopliae*, estudos de laboratório y campo. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 35 (1), p. 42–46, 2009.
- LORD, J.C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 89, p. 19–29, 2005.
- LUBECK, I.; ARRUDA, W.; SOUZA, B.K.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C.R.; SCHANK, A.; VAINSTAIN, M.H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as a potential biocontrol of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. **Fungal Ecology**, v. 1, p. 78-88, 2008.
- LUZ, C.; TIGANO, M. S.; SILVA, I. G.; CORDEIRO, C. M. T.; ALJANABI, S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolate to control *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 839-846, 1998.
- MANIANIA, N.K.; NCHU, F.; EKESI, S. Fungal pathogen for biocontrol of ticks. In: Ekesi, S., Maniania, N.K. (Eds.), Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. **Research Signpost, Kerala**, p. 275–294, 2007.
- MATA, R.F.F. **Efeito de extratos aquosos de *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss) Penn. (Meliaceae) no controle biológico de *Brevycorine brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) e *Ascia monuste orseis* (Godart) (Lepidoptera: Pieridae)**. 2007. 66p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.
- MENT, D.; GINDIN, G.; GLAZER, I.; PERL, S.; ELAD, D.; SAMISH, M. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. **Fungal Biology**, v. 114, p. 49-56, 2010.
- MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; CORREIA, A.C.B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Mestsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Revista de Microbiologia*, v. 29, p. 109-112, 1998.
- MOON, Y-S.; DONZELLI, B.G.G.; KRASNOFF, S.B.; McLANE, H.; GRIGGS, M.H.; COOKE, P.; VANDENBERG, J.D.; GIBSON, D.M.; CHURCHILL, A.C.L. Agrobacterium-

mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 4366-4380, 2008.

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

OAKESHOTT, J.G.; HOME, I.; SUTHERLAND, T.D.; RUSSEL, R.J. The genomics of insecticide resistance. **Genome Biology**. v. 4: p. 202, 2003.

OJEDA-CHI, M. M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 348–354, 2010.

OLIVEIRA, G.P.; ALENCAR, M.M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*D. hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, p. 127-35, 1990.

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

PEDRAS, M.S.C.; ZAHARIA, L.I.; WARD, D.E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, v. 59, p. 579596, 2002.

PARRA, J. R.; BOTELHO, P. S. M.; BENTO, J. M; FERREIRA, B. S. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Editora Manole, São Paulo, 2002. 609p.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GOLO, P. S.; QUINELATO, S. B.; CAMARGO, M. G.; SA, F. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 257- 260, 2012.

PERINOTTO, W. M. S.; GÔLO, P. S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; SÁ, F. A.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A.; SALLES, C. M. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 189-196, 2014.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, A.S. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia** 160, 151–157, 2005.

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

QUINELATO, S.; GOLO, P. S.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A.; CAMARGO, M. G.; ANGELO, I. C.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence potential of

*Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 556–565, 2012.

REBELO, R.M.; VASCONCELOS, R.A.; BUYS, B.D.M.C.; REZENDE, J.A.; MORAES, K.O.C.; OLIVEIRA, R.P. Pesticides and Related Commercialized in Brazil in 2009. An Environmental Approach; **IBAMA Press**: Brasilia, Brazil, pp. 30–84, 2010.

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

ROCHA, C.M.B.M. O carrapato dos bovinos. Boletim Técnico: Série Extensão da Universidade Federal de Lavras. Lavras, ano VI, n. 6, 1997. 27p.

ROY, H.E.; PELL, J.K.; ALDERSON, P.G. Targeted dispersal of the aphid pathogenic fungus *Erynia neoaphidis* by the aphid predator *Coccinella septempunctata*. **Biocontrol Science Technology** 11:99–110, 2001.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**. v. 129, p. 389-413, 2004.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C. Two new *Beauveria* spp. from South America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 39, p. 93-97, 1982.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* s.l. enzymes and toxins. **Toxicon**. v. 56, p. 1267-1274, 2010.

SHAH, P.A.; PELL, J.K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 61, p. 413-423, 2003.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; FUXA, J.R.; LACEY, L.A.; ONSTAD, D.W.; KAYA, H.K. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 88, p. 1-7, 2005.

SILVA, A.M.; ALENCAR, M.M.; REGITANO, L.C.A.; OLIVEIRA, M.C.S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1477-1482, 2010.

ST. LEGER, R.J.; MAY, B.; ALLEE, L.L.; FRANK, D.C.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 89-101, 1992.

ST LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 93, p. 6349-6354, 1996.

THOMAS, M.B.; READ, A.F. Fungal bioinsecticide with a sting. **Nature Biotechnology** v. 25, p. 1367-1368, 2007.

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

WASSWEMANN, M.; SELZER, P.; STEIDLE, J.L.M.; MACKENSTEDT, U. Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2016.

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

WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W.; TURNER, H.G. Resistance to the cattle tick, *B. microplus*, in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assessment and herdability. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 21, p. 163-81, 1970.

WHARTON, R. H. **Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus***. In: PAL, R.; WHARTON, R. H. Control of arthropods of medical and veterinary importance. New York, Plenum Publishing, 1974, p. 36-52.

ZHIOUA, E.; M. BROWNING, P. W.; JOHNSON, H. S.; GINSBERG, AND R. A. LEBRUN. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**. v. 83, p. 815-818, 1997.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. **Pesticide Science**. v. 37, p. 375–379, 1993.