

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**APLICAÇÃO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* EM
PASTAGEM VISANDO O CONTROLE DO CARRAPATO
Boophilus microplus EM BOVINOS**

**Marcos Valerio Garcia
Biólogo**

JABOTICABAL - SP – BRASIL
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**APLICAÇÃO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* EM
PASTAGEM VISANDO O CONTROLE DO CARRAPATO
Boophilus microplus EM BOVINOS**

Marcos Valerio Garcia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Co-orientador: Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro de 2008

DADOS CURRICULARES

Marcos Valério Garcia - Filho de Elysio Garcia e Ruvandir de Almeida Garcia, nasceu em 29 de Janeiro de 1967, em Jaboticabal, SP. Em 1991 concluiu o curso de Ciências Biológicas no Centro de Excelência Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP recebendo o título de Biólogo, obteve o título de mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp - Jaboticabal, SP. Publicou e apresentou 34 trabalhos em anais de congressos e simpósios científicos e dez artigos completos em periódicos científicos. Exerceu a função de professor responsável pela disciplina de Biologia, junto à Rede Oficial do Ensino de 1º e 2º Graus da Secretaria da Educação do Estado de São Paulo. Exerce a função de pesquisador convidado junto ao Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR) da FCAV/Unesp.

OFEREÇO

Aos meus pais:

Elysio Garcia

Ruvandir de Almeida Garcia

DEDICO

**Ao Prof. Matias Pablo Juan Szabó e
Prof. Antonio Carlos Monteiro**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

Ao Prof. Antonio Carlos Monteiro, professor, orientador e amigo, pela paciência e dedicação;

Ao Prof. Matias Pablo Juan Szabó, pela co-orientação, amizade e por acreditar em mim;

Aos Professores Marcelo Bahia Labruna, Marcio Botelho de Castro, Ely Nahas e Luis Garrigós Leite, pela participação na banca examinadora e sugestões;

A Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pelas instalações e toda infraestrutura cedida para a realização deste trabalho;

Aos funcionários da Fazenda do Glória (UFU) pela paciência e grandiosa colaboração, Flavio Pereira da Costa, Onacir Jorge da Costa, Rubens Marcelino Rezende e especialmente ao Marcio Franco de Rezende;

Aos amigos da Microbiologia Dinalva Alves Mochi, Lucas Detogni Simi, Ana Carolina Ribeiro Machado e Carime Moraes;

Aos amigos do Labix Uberlândia: Maria Marlene e família, Suzana Akemi, William Mendes Carvalho e Beatriz, pela extrema colaboração para a realização deste trabalho;

Aos meus queridos irmãos, Nice, Julia, Cristina, Paulo, Horacio, Gilson, cunhados, cunhadas e sobrinhos;

Aos Professores Dr. Alvimar José da Costa e Dr. Gilson Pereira de Oliveira, pela oportunidade concedida, apoio e amizade;

Aos amigos pesquisadores do CPPAR Artur, Carolina, Cláudio, Cecília, Marina, Rafael, Roberto, Thais, Luis Fernando, Tatisa, Heloisa, Welber e Vando;

À secretária do CPPAR Jouvana pela sua eficiência e amizade;

A secretária da Microbiologia Edna D'Aquila pela amizade;

Aos amigos do CPPAR Danilo da Matta, Alexandre Fortunato, Ana Lúcia, Ariadne, Danieli, Edimilson, Matheus, Gabriel (Azeitona), João (Vacilão), Fernando (Reco-reco), Talita (Horacio), Luiza e Daniel (Sasa);

Aos amigos de casa, Adriano, Meire, Patrícia, Tricia, Eliete, Joãozinho, Mateus, Alex, Paula, Karina, Nancy, Stael, Maria Banzatto, Elaine Roveri e Carlinhos, Marlei, Alexandre, Cacá, Jaiminho, Lais, Geórgia, Sofia, Moema Ogasawara e Lucia Padilha;

Ao amigo Fabio F. Tofanelli pela colaboração;

Aos amigos de Uberlândia, Rafael Rodrigues Correa, Marcos Jose Jesus de Queiroz e Guilherme Fazan Rossi, pelo respeito, companhia e pelos momentos de alegria;

Ainda aos amigos de Uberlândia: Fernanda, Rafael, Victor, Fernando, Marquinhos, Mariene, Sávio, Ana Paula;

A Capes pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. 1 O carrapato <i>Boophilus microplus</i>	3
3. 2 O ambiente da pastagem.....	5
3. 3 O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	6
3. 4 Controle biológico.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4. 1 Local de desenvolvimento do projeto.....	12
4. 2 Pastagem, parasito e hospedeiro.....	14
4. 3 O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
4. 4 Preparo da suspensão conidial.....	16
4. 5 Aplicação da suspensão.....	19
4. 6 Avaliação dos hospedeiros.....	21
4. 7 Avaliação da infestação de larvas na pastagem.....	21
4. 8 Avaliação da ocorrência do fungo na gramínea e no solo.....	21
4. 9 Atividade do fungo “in vitro”.....	23
4.10 Análise estatística dos dados.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. 1 Bioensaios para a recuperação da virulência do fungo.....	24
5.2 Aplicação da suspensão do fungo na pastagem de <i>B. decumbens</i>	24
5.3 Aplicação da suspensão do fungo em teleóginas de <i>B. microplus</i> em laboratório.....	32
6. CONCLUSÕES	34
7. REFERÊNCIAS	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Umidades relativas médias ocorridas no município de Uberlândia no período em que a pastagem foi pulverizada.....	13
Figura 2. Temperaturas médias ocorridas no município de Uberlândia no período em que a pastagem foi pulverizada..	13
Figura 3. Precipitações médias ocorridas no município de Uberlândia no período em que a pastagem foi pulverizada.....	14
Figura 4. Remoção dos conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> do arroz e desagregação das cadeias de conídios para formar uma suspensão a ser aplicada na pastagem.....	17
Figura 5. Coagem da suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> em tecido de algodão.....	18
Figura 6. Acondicionamento da suspensão de <i>Metarhizium anisopliae</i> até o momento da pulverização.....	18
Figura 7. Aplicação da suspensão conidial de <i>Metarhizium anisopliae</i> na pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com pulverizador de barra.....	20
Figura 8. Ocorrência de <i>Metarhizium anisopliae</i> na haste de <i>Brachiaria decumbens</i> em avaliações realizadas no 1 ^o , 7 ^o e 14 ^o após cada pulverização com o fungo. No 1 ^o dia após a 10 ^a pulverização a avaliação não foi efetuada em consequência de forte chuva.....	25
Figura 9. Ocorrência de <i>Metarhizium anisopliae</i> no solo da pastagem em avaliações realizadas no 1 ^o , 7 ^o e 14 ^o após cada pulverização com o fungo. Após a 8 ^a e 9 ^a pulverizações não se encontrou este isolado no solo.....	27

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Número de fêmeas ingurgitadas de <i>Boophilus microplus</i> obtido no procedimento de randomização dos bovinos naturalmente infestados na pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i>	15
Tabela 2. Seqüência e data das pulverizações, intervalo entre pulverizações e concentrações das suspensões conidiais de <i>Metarhizium anisopliae</i> aplicadas na pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i>	19
Tabela 3. Mortalidade de teleóginas de <i>Boophilus microplus</i> obtida nos bioensaios realizados para recuperação da virulência do isolado E9 de <i>Metarhizium anisopliae</i>	24
Tabela 4. Densidade populacional do isolado selvagem de <i>Metarhizium sp.</i> encontrado no solo da pastagem durante o período experimental.....	27
Tabela 5. Larvas do carrapato <i>Boophilus microplus</i> encontradas por metro quadrado de gramínea após doze pulverizações da pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com <i>Metarhizium anisopliae</i>	29
Tabela 6. Fêmeas do carrapato <i>Boophilus microplus</i> encontradas nos bovinos após doze pulverizações da pastagem de <i>Brachiaria decumbens</i> com <i>Metarhizium anisopliae</i>	31

APLICAÇÃO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* EM PASTAGEM VISANDO O CONTROLE DO CARRAPATO *Boophilus microplus* EM BOVINOS

RESUMO – Este trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação de *Metarhizium anisopliae* em pastagem de *Brachiaria decumbens* naturalmente infestada, submetida ao pastejo com bovinos, visando o controle do carrapato *Boophilus microplus*. O estudo foi realizado no período de maio de 2006 a março de 2007, em pastagem de *B. decumbens*, implantada em solo de textura argilosa da Fazenda do Glória, pertencente à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em Uberlândia, MG. Utilizou-se população de *B. microplus* naturalmente existente na pastagem com área de 12.000 m² e 24 novilhos mestiços com cerca de 1 ano de idade, como hospedeiros experimentais. A randomização dos animais foi feita pela contagem de fêmeas ingurgitadas (instar entre 4,5 a 8 mm de comprimento), no terceiro, segundo e primeiro dias anteriores à primeira aplicação do fungo na pastagem. A área da pastagem foi então dividida em dois pastos com 6.000 m², e grupos homogêneos de 12 animais foram introduzidos em cada pasto, determinando-se por sorteio o pasto tratado e o controle. Para pulverizar o pasto tratado, foram utilizados 5 a 6 kg de arroz contendo o isolado E9 de *M. anisopliae* esporulado, com os quais se produziu 400 L de suspensão conidial, quantidade suficiente para pulverizar, em média, 66,7 mL de suspensão por metro quadrado de pasto ou 666,67 L ha⁻¹. O pasto tratado foi pulverizado por 12 vezes, em intervalos em torno de 21 dias, com suspensão contendo 10⁷ conídios viáveis mL⁻¹ de *M. anisopliae* não formulado, e o pasto controle foi pulverizado por igual número de vezes e volume apenas do veículo da suspensão de conídios. A aplicação foi realizada com pulverizador de barra, com bico tipo cônico, a 50 cm de altura do solo. Durante a pulverização os animais permaneceram no pasto. As pulverizações foram efetuadas a partir das 17 horas, e durante o horário de verão ocorreram a partir das 18 horas. Avaliou-se a persistência do fungo no solo e na gramínea da pastagem por meio de coletas de solo e hastes da gramínea nos 1^o,

7^o e 14^o dias após a pulverização. A infestação da gramínea com larvas do carrapato foi avaliada pelo método estatístico do quadrado e a infestação dos bovinos por contagens de fêmeas do carrapato em um dos lados do animal no 17^o, 19^o, 21^o, 26^o e 33^o dias após a pulverização. As mesmas suspensões conidiais usadas para pulverizar o pasto foram também usadas, na concentração de 1×10^7 conídios mL⁻¹, para banhar fêmeas ingurgitadas do carrapato em laboratório, avaliando-se o peso da massa de ovos, a taxa de eclosão e a eficiência reprodutiva. O fungo apresentou baixa persistência na pastagem, sendo encontrado na haste da gramínea apenas no 1^o dia após a pulverização, e no solo, no 7^o e 14^o dias após a aplicação. A aplicação do fungo por 12 vezes não reduziu o número de larvas na pastagem e não se observou diferença nas contagens de fêmeas nos bovinos do pasto controle e tratado. A pulverização com *M. anisopliae*, na concentração de 10^7 conídios viáveis mL⁻¹ não formulados, não foi suficiente para reduzir a infestação da pastagem com larvas de *B. microplus* e o número de fêmeas que parasitam o bovino. Entretanto, a aplicação das mesmas suspensões em fêmeas ingurgitadas do carrapato em laboratório reduziu significativamente o peso da massa de ovos, a taxa de eclosão e a eficiência reprodutiva.

Palavras-chave: controle biológico, controle microbiano, fungo entomopatogênico, carrapato, *Brachiaria decumbens*, pastagem.

Spraying of pasture with the fungus *Metarhizium anisopliae* to control the cattle tick *Boophilus microplus*

ABSTRACT – In this work the efficacy of spraying *Brachiaria decumbens* pasture with *Metarhizium anisopliae* against natural infestation with the cattle tick *Boophilus microplus* was evaluated. The study was conducted from May 2006 to March 2007 at the Gloria farm from the Federal University of Uberlândia, in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Experimental pasture of 12.000 m², naturally infested with *B. microplus* and had 24 one year old mixed breed bovines was used. The area was halved in two pastures of 6.000 m² and each pasture received 12 animals. Tick susceptibility of bovines of each area was similar. Pastures were then sprayed with either a conidial suspension of E9 *M. anisopliae* isolate (treated pasture) or the conidial suspension vehicle without the fungus (control pasture). Pastures were sprayed 12 times with 21 day intervals between applications. Bovines remained on the pasture during the spraying. Fungus persistence on the soil and the grass was evaluated on first, seven and 14 days after each spraying. Pasture infestation with larvae and animal infestation with engorging female ticks were evaluated 17, 19, 21, 26 and 33 days after each pasture treatment. Conidial suspensions used for pasture spraying were also used for evaluating its efficacy against ticks in the laboratory, by bathing engorged female in the suspension for five minutes. Overall it was observed the fungus had a low persistence in the pasture being found on the grass only one day and on the soil seven and 14 days after the spraying. The 12 sprayings of the pasture did not decrease either the pasture tick infestation or animal infestations. The same suspension, however, significantly decreased egg mass weights, egg hatching rate and reproduction efficiency of the tick in the laboratory.

Keywords: biological control, microbial control, entomopathogenic fungus, tick, *Brachiaria decumbens*, pasture.

1. INTRODUÇÃO

Boophilus microplus (Acari: Ixodidae) é um carrapato que tem a espécie bovina como seu hospedeiro preferencial. Trata-se de um ectoparasita que se caracteriza pela hematofagia em animais de sangue quente, sendo uma espécie monoxena com único hospedeiro em seu ciclo de vida (ROCHA, 1984). Os carrapatos são importantes vetores de arboviroses, espiroquetoses e protozooses para o homem e animais domésticos (KAUFMAN, 1989). No Brasil destacam-se dois gêneros de grande importância: a rickettsia *Anaplasma* e o protozoário *Babesia*, responsáveis pelo complexo denominado de “tristeza parasitária bovina” que acarreta grandes prejuízos ao sistema de produção. Ao picar, o carrapato causa irritação nos animais, provocando estresse e perda de sangue devido a sua ação hematófaga. Grandes infestações levam à diminuição na produção de leite, aumento da mortalidade, redução da natalidade, perda de peso e da qualidade do couro, gastos com mão-de-obra e consumo de carrapaticidas.

O controle deste ectoparasita é, indiscutivelmente, necessário, e o tratamento sanitário de rebanhos é realizado durante a fase parasitária com carrapaticidas sintéticos. No entanto, a prática do uso destes acaricidas como forma profilática e terapêutica tem acarretado problemas a respeito do desenvolvimento de populações resistentes de carrapatos frente às diversas gerações de acaricidas (SOARES et al., 2001), o aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal, principalmente leite e carne, e a poluição ambiental proveniente do uso indiscriminado de acaricidas no controle (BULLMAN et al., 1996).

No Brasil, o carrapato *B. microplus* representa um grande problema na produção de bovinos em diferentes regiões e, segundo GRISI et al. (2002), os prejuízos causados de forma direta e indireta relacionados a esta ectoparasitose, foram estimados em 2 bilhões de dólares/ano.

Uma das alternativas de controle é baseada no emprego de vacinas comerciais, mas estas são ainda caras, de uso complexo e com eficiência variada conforme a cepa do parasito. Atualmente, as vacinas são desenvolvidas a partir

de uma proteína denominada BM 86, conferindo proteção parcial aos bovinos contra futuras infestações por *B. microplus*, diminuindo o número de carrapatos, a produção de ovos e fertilidade (RODRIGUES et al., 1995). No entanto, esses resultados não asseguram a proteção desejada na produção bovina, sugerindo a necessidade de mais um antígeno protetor (WILLADSEN et al., 1996). A tentativa de se identificar determinantes antigênicos que consigam estimular eficientemente o sistema imunológico dos animais contra as mais variadas cepas, tem constituído um grande desafio a comunidade científica (FRISCH, 1999).

Essa situação, aliada à preocupação com a proteção ambiental frente aos acaricidas e à necessidade de buscar uma relação custo/benefício mais favorável, promoveu o interesse por métodos alternativos de controle. Uma das alternativas promissoras e de grande interesse para a pecuária é o controle biológico feito com agentes microbianos (PAIÃO et al., 2001). A atividade patogênica de fungos para *B. microplus* já foi amplamente investigada em estudos *in vitro*, onde a ação dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para as diversas fases do ciclo de vida do carrapato ficou plenamente caracterizada (CASTRO et al., 1997; MONTEIRO et al., 1998; PAIÃO et al., 2001; MELLO et al., 2006).

Em contraste com a rica investigação *in vitro*, a eficácia de fungos no controle de carrapatos em condições de campo, foi pouco explorada. Os poucos estudos realizados versaram sobre a aplicação de fungo em bovinos estabulados (CASTRO et al., 1997; CORREIA et al., 1998; BITTENCOURT et al., 1999; ALONSO-DÍAZ et al., 2007), ou no controle da fase parasitária nas pastagens, através de ensaios de curta duração realizados em canteiros, sem a presença do hospedeiro e com uma ou poucas aplicações do fungo (CASTRO et al., 1999; BITTENCOURT et al., 2003; BASSO et al., 2005).

Apesar de alguns resultados promissores, estes estudos não foram suficientes para determinar as condições adequadas para o uso de *M. anisopliae* no controle de *B. microplus* em condições de campo. Segundo CORDOVÉS (1997), o principal problema das infestações dos bovinos pelos carrapatos está na pastagem. Assim sendo, novos estudos são necessários para investigar os vários

fatores que interferem na atividade patogênica do fungo para o carrapato na pastagem e estabelecer as bases para o seu uso em programas de controle integrado do ácaro.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da aplicação de *M. anisopliae* em pastagem de *B. decumbens* naturalmente infestada, submetida ao pastejo com bovinos, visando o controle do carrapato *B. microplus*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O carrapato *Boophilus microplus*

O *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) é um das 860 espécies de carrapatos conhecidas mundialmente (WALKER et al., 2000), que obrigatoriamente parasitam e espoliam seus hospedeiros, podendo parasitar animais domésticos, selvagens e até mesmo seres humanos.

O *B. microplus* é originário da Ásia, notadamente da Índia e da Ilha de Java, entretanto, em função das expedições exploradoras registradas na História, com a movimentação de animais e mercadorias, ocorreu sua introdução nas regiões tropicais e subtropicais: Austrália, México, América Central, América do Sul e África, tendo se estabelecido dentro dos climas demarcados pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul, com alguns focos no 35° Sul (NUÑES et al., 1982).

A introdução deste ectoparasita no Brasil, provavelmente ocorreu no início do século XVIII, sendo atualmente encontrado em todas as regiões, variando de intensidade de acordo com as condições climáticas e raças de bovinos explorados (GONZALES, 1995)

Há uma nítida divisão de seu ciclo em uma fase parasitária que se realiza no corpo do hospedeiro e uma fase de vida livre desenvolvida na cobertura vegetal. Neste contexto é relevante mencionar que nas infestações pelo *B.*

microplus estima-se que 5% dos carrapatos estão presentes no hospedeiro e 95% no ambiente, em fase não parasitária (CORDOVÉS, 1997).

Segundo GUGLIELMONE et al. (2006), as larvas infestam o gado na pastagem e se alimentam por 6 a 8 dias até sofrerem muda para ninfas, as quais atingem a idade de adulto entre 7 a 9 dias. A fêmea, uma vez fertilizada, ingurgita e cai ao solo para realizar a ovipostura. A fase não parasitária depende do clima regional e em condições apropriadas uma fêmea produz 2000 a 4000 ovos e que resultará numa taxa de eclosão de 85 a 95%. De modo geral, o início e o término deste ciclo ocorre quase sempre no pasto, onde se integram o parasito, o hospedeiro e o meio ambiente (GOMES, 1998).

O rebanho bovino comercial do Brasil é o maior do mundo e determinante para a economia do país. Este rebanho, entretanto, sofre enormes prejuízos causados por carrapatos sendo estimados em US\$ 2 bilhões/ano (GRISI et al., 2002). Este prejuízo é, em sua maioria, atribuído ao carrapato *B. microplus*, este ectoparasito causa reduções consideráveis na produção de leite, redução da natalidade, gastos elevados com carrapaticidas, perdas de peso, gastos com mão-de-obra, perda na qualidade do couro (EMBRAPA, 2004; INDICADORES RURAIS, 2001). Além disso, o *B. microplus* é um importante vetor de agentes patogênicos, muitas vezes letais, aos bovinos. Dentre os agentes destacam-se os agentes da “tristeza parasitária” como protozoários do gênero *Babesia* e rickettsias do gênero *Anaplasma* (GUGLIELMONE et al., 2006).

Considerados os prejuízos em função do desenvolvimento comum de infestações elevadas nas condições climáticas do Brasil, o controle deste ectoparasita é essencial. Este controle é contemporaneamente realizado durante a fase parasitaria com acaricidas como organofosforados, piretróides e formamidas. O emprego indiscriminado destes carrapaticidas, entretanto, resultou na seleção de cepas resistentes (SOARES et al., 2001) e leva ao acúmulo ambiental de resíduos químicos (KIRKLAND et al., 2004).

3.2 O ambiente da pastagem

O ecossistema do carrapato e os fatores que interferem na sua sobrevivência tais como condições climáticas, manejo do rebanho, manejo do pasto e tipo de vegetação, são importantes aspectos a serem estudados com vistas ao controle de sua população, e conseqüentemente, dos prejuízos que causam. O manejo incorreto, associado ao uso indevido e exacerbado de acaricidas, ocasionam resistência dos carrapatos às drogas disponíveis e contribuem para o agravamento do problema.

GONZÁLES (1995) descreve os seguintes fatores que influenciam na sobrevivência do carrapato dos bovinos: manejo dos animais e dos campos, raças de bovinos, clima (temperatura e umidade relativa do ar), localização geográfica, vegetação, predadores e parasitas dos carrapatos, carrapaticidas, intervalos de banhos, instalações, quimioterápicos e vacinas contra o carrapato.

Todos esses fatores exercem alguma forma de pressão na população de carrapatos. Nas regiões próximas ao paralelo 32Norte e 32Sul, ditas marginais, o principal fator do ecossistema que interfere, e às vezes, anula completamente a população de carrapatos é a distribuição geográfica. Outro fator de real importância é o tipo de vegetação em que se encontram populações de carrapato.

Entre as forrageiras mais comumente usadas no Brasil destacam-se as Brachiarias que apresentam um total de quinze espécies, mas a mais usada em pastagem é a *Brachiaria decumbens* também chamada de capim-braquiaria que se caracteriza por ser uma planta perene, muito entouceirada, ereta de 30-100 cm de altura, folhas densamente pubescentes, de 10-20 cm de comprimento, reprodução por sementes, rizoma e estolões (KISSMANN, 1997). Estudos realizados com *B. decumbens* demonstraram que esta forrageira oferece um microclima ideal para sobrevivência de larvas de *B. microplus* na pastagem quando comparadas com *Andropogon goganus* (SAUERESSIG, 1994). De acordo com SONENSHINE (1993) o microclima determinado pela vegetação atua como uma proteção contra as condições adversas do meio ambiente.

GAUSS & FURLONG (2002) observaram o comportamento de larvas de *B. microplus* em pastagem de *B. decumbens* com diferentes dias de descanso para

pastoreio bovino, em experimento conduzido na Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG. Brasil. Os resultados indicaram que são necessários, pelo menos, 60 dias de descanso para reduzir a população de larvas infestantes e permitir que essa prática seja utilizada como medida complementar para o controle do carrapato.

FURLONG et al. (2002) verificaram que a pastagem composta por *Pennisetum purpureum* proporciona um microambiente favorável para larvas infestantes de *B. microplus*. BARROS & EVANS (1989), relataram que *Brachiaria brizantha* não mostrou ser repelente para a larva do carrapato. Isso constitui um fator favorável uma vez que, se fosse repelente, as larvas evitariam a gramínea. Tal constatação justifica a realização de estudos adicionais com o *B. brizantha*, sob condições naturais e experimentais, a fim de avaliar seu real valor no controle biológico, assim como sua inclusão no manejo integrado de pragas (IPM) nas regiões tropicais.

3.3 O fungo *Metarhizium anisopliae*

Entre os fungos usados no controle biológico de pragas ou com potencialidade para tanto, indubitavelmente o fungo *M. anisopliae* apresenta-se como um agente microbiano de extrema importância dentro do programa de controle biológico. Sua ação é amplamente conhecida, ocorrendo em diversas regiões, desde ambientes de clima temperado até clima tropical. Pertencente à classe Deuteromycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae, foi descrito por Metschnikoff em 1879 pela primeira vez como *Entomophthora anisopliae*. Este pesquisador realizou o primeiro trabalho de controle microbiano utilizando este fungo para o controle de larvas do besouro *Anisopliae austriaca*, e foi finalmente classificado por Sorokin em 1883 como *Metarhizium anisopliae*. A partir de então, a utilização deste patógeno vêm sendo estudada sobre muitas espécies de insetos, com grandes potencialidades para o controle biológico, tendo como hospedeiros mais de 300 espécies de insetos (ALVES, 1998).

Descrito desde a muitos anos por vários pesquisadores (BARON, 1958

apud SILVA, 1985; BALFOUR-BROWNE, 1960; LATCH, 1965), o fungo apresenta um corpo de frutificação semelhante a um esporodóquio agregado a hifas intimamente entrelaçadas, contendo uma massa compacta de conidióforos, simples ou ramificados, resultando em células esporogênicas denominadas fiálides, das quais se originaram os fialospóros que não são separados, tem forma cilíndrica, são hialinos ou levemente pigmentados e são produzidos em cadeias.

O fungo *M. anisopliae* tem mostrado ser um promissor agente no controle de artrópodes, merecendo destaque o carrapato, que foi amplamente estudado em ensaios de laboratório e comprovada sua eficiência no controle de várias espécies como *Rhipicephalus sanguineus*, *Anocentor nitens*, *Amblyomma variegatum*, *Amblyomma cajennense* (KAAYA et al., 1996; MONTEIRO et al., 1998; BITTENCOURT et al., 1999; BITTENCOURT, 2000; PAIÃO et al., 2001; GARCIA et al., 2004; LOPES et al., 2007).

No entanto sabe-se que os fungos entomopatogênicos quando aplicados no campo estão sujeitos a fatores bióticos e abióticos que podem influenciar na sua sobrevivência, propagação e infecção do hospedeiro (GOETTEL et al., 2000). Entre os fatores abióticos, o de maior importância é a radiação solar UV (FARGUES et al., 1996; BRAGA et al., 2001a, CAGAN & SVERCEL, 2001), que pode inativar o conídio, provocar danos letais ao DNA e mutações (NICHOLSON et al., 2000). Em geral, os efeitos deletérios da radiação UV reduzem a eficiência do fungo no campo (BRAGA et al., 2001b). Outros fatores de importância vital sobre os fungos são a temperatura e umidade, que são os fatores físicos mais estudados. Altas temperaturas são prejudiciais a sobrevivência do fungo, enquanto que baixas temperaturas aumentam a sua persistência, característica essa desejável (MONTEIRO, 1995; RATH, 1992). Já entre os fatores bióticos, vários trabalhos relatam a ação fungistática de microorganismos presentes na microbiota do solo inibindo a ação ou sobrevivência de fungos entomopatogênicos (GRODEN & LOCKWOOD, 1991). O efeito fungistático sobre a população de fungos no solo pode ser provocado por substâncias fitotóxicas, ou pela elaboração de substâncias inibidoras por bactérias e actinomicetos (OLIVEIRA et al., 1981).

SHARAPOV & KALVISH (1984) estudaram o efeito fungistático do solo na germinação, crescimento e desenvolvimento dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosoroseus*. Os autores verificaram que em todos os solos estudados houve ação fungistática sobre os fungos, sendo que o mais afetado foi o *M. anisopliae*.

3.4 Controle biológico

Denomina-se de controle biológico natural a regulação espontânea, sem a necessidade de intervenção humana, por organismos vivos (antagonistas) da população de outras espécies animais. Este tipo de controle não deve ser subestimado, já que populações de muitos protozoários, artrópodes e helmintos parasitos podem apresentar crescimento descontrolado na ausência de seus respectivos antagonistas naturais (GRONVOLD, 1996). Com base neste comportamento natural, surgiu o conceito de controle biológico, agora com a intervenção humana, para controlar e/ou combater as chamadas pragas parasitárias, observadas tanto na agricultura quanto em medicina veterinária.

Segundo ALVES (1998), a alta patogenicidade apresentada por alguns microrganismos, a capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, o caráter enzoótico e a não toxicidade são atributos favoráveis para que este tipo de estratégia possa fazer parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, sejam capazes de reduzir populações de insetos indesejáveis para níveis que não provoquem prejuízos. Além disso, este mesmo autor afirma que o controle biológico possibilita a associação de microrganismos com formulações medicamentosas sem resíduos ou toxicidade para animais e ambiente, bem como o menor custo e diminuição da possibilidade de aparecimento de resistência, haja vista a variedade de mecanismos envolvidos e compostos produzidos e empregados por estes agentes no controle de pragas-alvo. Vale também ressaltar que os fungos entomopatogênicos apresentam uma grande variabilidade genética e que isso implica em uma das principais vantagens no controle microbiano de artrópodes, tanto que é possível por meio de técnicas

apropriadas, selecionar isolados de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos (ALVES 1998).

A busca de alternativas que auxiliem no controle de artrópodes com menor impacto ambiental, diminuindo a utilização de compostos químicos, têm sido uma constante na pesquisa nos últimos anos. Dentre as estratégias estudadas está a utilização de fungos entomopatogênicos, o que parece ser uma alternativa eficiente e segura (PAIÃO et al., 2001; SILVA, 2001).

As pesquisas com fungos entomopatogênicos como controladores biológicos têm sido realizadas visando auxiliar o estabelecimento de estratégias racionais e eficazes de controle de artrópodes (CHANDLER et al., 2000; ALVES, 1998). Merecem destaque os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, que revelaram-se patogênicos contra diferentes espécies de carrapatos, tais como *Amblyomma cajennense* (REIS et al., 2004), *Amblyomma cooperi* (REIS et al., 2003), *Amblyomma variegatum* (MARANGA et al., 2005), *Rhipicephalus sanguineus* (GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2005; PRETTE et al., 2005) e *B. microplus* (FRAZZON et al., 2000; BITTENCOURT et al., 2003)

M. anisopliae é um fungo deuteromiceto patogênico para uma grande quantidade de espécies de artrópodes, sendo o primeiro microorganismo com reconhecida importância para o controle biológico de pragas na agricultura (FRAZZON et al., 2000). O fungo não demonstra preferência por orifícios naturais, sendo assim ele penetra no hospedeiro através da cutícula, auxiliado sinergicamente pela ação hidrolítica de enzimas como proteases, quitinases e lípases (PINTO et al., 1997; BITTENCOURT et al., 1999).

Segundo GARCIA et al. (2004), a penetração do fungo *M. anisopliae* ocorre pelo tegumento, e após a penetração, ocorre a colonização do corpo do hospedeiro de forma difusa, sem preferência aparente por tecidos específicos, entretanto lesões internas provocadas pelo fungo ficaram evidentes apenas em fêmeas ingurgitadas.

Após a penetração da cutícula pelos tubos germinativos, o fungo rapidamente invade os órgãos internos, causando a morte do hospedeiro (KAAYA et al., 1996; GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2005). Outro fator importante é a produção de micotoxinas pelos fungos, que muitas vezes, contribuem para a morte do hospedeiro, redução do peso de ingurgitamento, fecundidade e percentagem de eclosão dos ovos, sendo estes fatores proporcionalmente relacionados à concentração de esporos depositados sobre os mesmos (KAAYA et al., 1996). De acordo com GARCIA et al. (2004), após o processo de colonização do hospedeiro, a extrusão e conidiogênese do patógeno sobre o cadáver da fêmea do carrapato *R. sanguineus* ocorreu entre o 6^o e 7^o dia após a infecção, com grande crescimento micelial e conseqüentemente grande produção de conídios sobre o corpo do hospedeiro. Além disso, os conídios dos fungos possuem capacidade de disseminação horizontal e podem ser levados por diferentes agentes para outros lugares distantes (ALVES, 1998)

BITTENCOURT et al. (1995) verificaram a patogenicidade in vitro dos isolados 986 e 747 de *B. bassiana* em ovos e larvas não alimentadas de *B. microplus*, observando uma diminuição acentuada do percentual de eclosão e maior taxa de mortalidade das larvas. CASTRO et al. (1997), verificaram uma outra importante característica no parasitismo do fungo *M. anisopliae* em *B. microplus*, em que uma atividade maior do fungo é exercida após as ecdises, provavelmente, devido ao crescimento de uma nova cutícula e saída da exúvia do instar anterior. A patogenicidade de diferentes isolados de *M. anisopliae* para *B. microplus* em condições de laboratório, foi evidenciada por MONTEIRO et al. (1998), tendo os isolados E9 e AM9 promovido redução na oviposição e elevada mortalidade de fêmeas do carrapato

PAIÃO et al. (2001) constataram redução no período de pré-oviposição e peso da postura, e no índice de produção de ovos de fêmeas de *B. microplus* inoculados com suspensões de diferentes concentrações de conídios de vários isolados de *B. bassiana*. MELO et al. (2006) observaram em estudos recentes que as fases não parasitárias do *B. microplus* sofreram ação deletéria do fungo *M.*

anisopliae, quando fêmeas, ovos e larvas foram submetidos a imersão em suspensão conidial e mantidos em condições laboratoriais,

Em estudos com bovinos estabulados, CASTRO et al. (1997) obtiveram 54,8 e 50,4% de eficácia no controle de fêmeas ingurgitadas, usando as concentrações de 10^7 e 10^8 con. mL⁻¹ do isolado 959 de *M. anisopliae*, respectivamente. Segundo CORREIA et al. (1998), a aplicação do isolado E9 de *M. anisopliae* não reduziu o número de fêmeas de *B. microplus* que parasitavam os animais, porém causou aumento do período de pré-oviposição e redução de 52% no peso da postura das fêmeas. BITTENCOURT et al. (1999) pulverizaram suspensão de conídios do isolado Ma 959 de *M. anisopliae* em animais naturalmente infestados com *B. microplus*, mas não verificaram diferença significativa em relação ao controle. ALONSO-DIÁZ et al. (2007) obtiveram redução no número de fêmeas ingurgitadas, variando entre 40,0 a 91,2% após pulverizarem, por quatro vezes, bovinos estabulados com suspensão de conídios de *M. anisopliae*.

O controle das fases não parasitárias na pastagem também foi pouco investigado. CASTRO et al. (1999) não obtiveram redução significativa no número de larvas na pastagem de *B. decumbens* tratada com *M. anisopliae*. De acordo com BITTENCOURT et al. (2003) a aplicação de *M. anisopliae* em pastagem de *B. decumbens* infestada com larvas de *B. microplus*, teve efeito deletério sobre o carrapato reduzindo o número de larvas. BASSO et al. (2005) verificaram que *M. anisopliae* controlou a população de larvas de *B. microplus* em pastagens de *Brachiaria brizantha* e do híbrido Tifton 85 (*Cynodon spp.*), obtendo acentuada redução na quantidade de larvas recuperadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de desenvolvimento do projeto

O trabalho foi realizado no período de maio de 2006 a março de 2007, em pastagem de *B. decumbens*, implantada em solo de textura argilosa da Fazenda do Glória, pertencente à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), situada a 18° 56' 53" Sul e 48° 12' 25" Oeste e altitude média de 910 m, no município de Uberlândia, MG. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Aw, isto é, tropical semi-úmido, seco e frio no inverno, com verão quente e úmido, com precipitação média anual em torno de 1600 mm e temperatura média anual próxima de 22 °C, variando entre 18,8 e 24,7 °C. No período em que a pastagem foi pulverizada, a amplitude de variação mensal da temperatura, da precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar foram, respectivamente, entre 19 e 25,4 °C, 86,7 e 153,5 mm e 70,7% e 75,5%. Os dados climatológicos obtidos junto a Estação Climatológica da UFU, se encontram nas Figuras 1, 2 e 3.

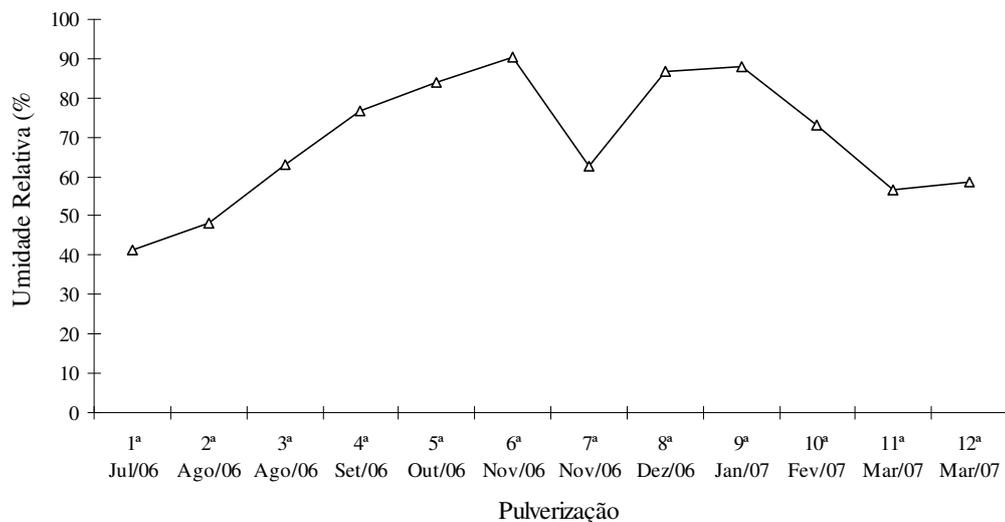


Figura 1. Umidades relativas médias ocorridas no município de Uberlândia no período em que a pastagem foi pulverizada.

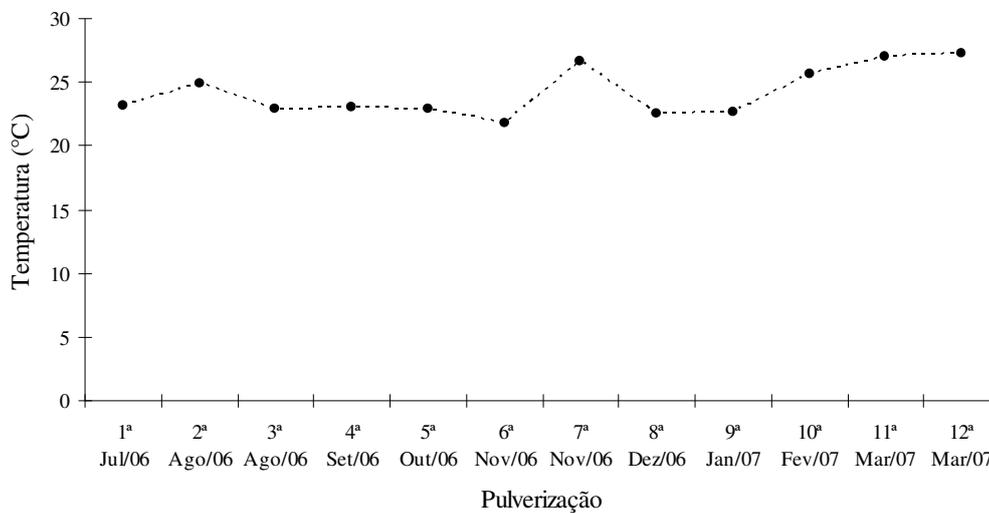


Figura 2. Temperaturas médias ocorridas no município de Uberlândia no período em que a pastagem foi pulverizada.

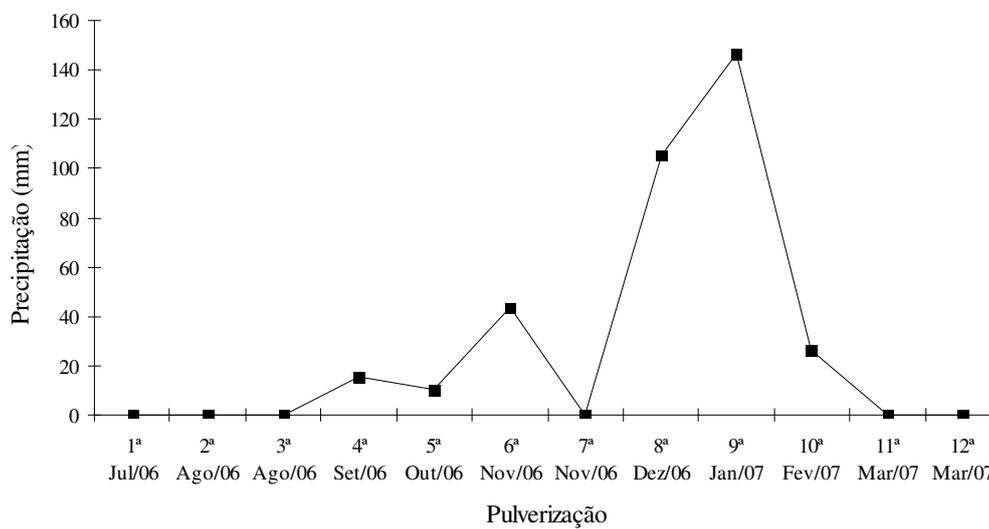


Figura 3. Precipitações médias ocorridas no município de Uberlândia no período em que a pastagem foi pulverizada.

4.2 Pastagem, parasito e hospedeiro

Utilizou-se população de *B. microplus* naturalmente existente na pastagem de *B. decumbens*, com área de 12.000 m² e 24 novilhos mestiços (zebuíno x holandês) com cerca de um ano de idade, isentos de tratamento com acaricidas, como hospedeiros experimentais. O experimento foi iniciado com a introdução dos bovinos na pastagem, por dois meses, para infestação natural. Após este período, no terceiro, segundo e primeiro dias anteriores à primeira aplicação do fungo na pastagem, fez-se a contagem de fêmeas ingurgitadas nos animais (ínstar entre 4,5 a 8 mm de comprimento). Paralelamente, a área da pastagem foi dividida em dois piquetes com 6.000 m², separadas por uma cerca. Em ambos os lados desta cerca foram mantidas, durante todo o período experimental, faixas de 3 m sem a gramínea para isolamento das pastagens. Terminada a contagem de carrapatos, efetuou-se a randomização dos animais em dois grupos homogêneos, com média de 19 fêmeas ingurgitadas por grupo/animal (Tabela 1).

Tabela 1. Número de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus obtido no procedimento* de randomização dos bovinos naturalmente infestados na pastagem de *Brachiaria decumbens*

Animais do grupo A		Animais do grupo B	
Identificação do animal	N° de fêmeas ¹	Identificação do animal	N° de fêmeas ¹
186	44,5	505	42,5
508	29,5	456	32,5
519	27,5	564	22,5
213	20,0	556	21,5
502	19,0	566	19,0
204	18,0	608	19,0
504	17,0	489	15,5
547	13,0	609	14,0
201	13,0	505	11,5
210	9,5	577	11,5
480	9,5	212	9,0
521	5,5	568	7,0
Média	19,0	Média	19,0

¹Média de três dias de contagem

Os grupos, com 12 animais foram introduzidos um em cada pastagem, determinando-se, por sorteio, os grupos teste e controle. Durante o período experimental fez-se a complementação alimentar dos animais fornecendo silagem uma vez ao dia e também não houve tratamento dos animais de ambos os grupos com acaricidas, ao longo do experimento.

4.3 O fungo *Metarhizium anisopliae*

Foi utilizado o isolado E9 de *M. anisopliae*, mantido na coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal pertencente a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, SP. A escolha deste isolado foi efetuada com base em resultados promissores obtidos em ensaios “in vitro” (MONTEIRO et al., 1998; GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2005) e ensaios em campo (CORREIA et al., 1998; BASSO et al., 2005)

O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio de batata, dextrose e ágar (BDA), acondicionadas em estufa a $27 \pm 0,5$ °C, sem fotoperíodo. A partir destas placas, foram realizados três bioensaios para recuperação da virulência do isolado. Em cada bioensaio foram utilizados três grupos de 10 fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, onde as mesmas eram banhadas com suspensão conidial de *M. anisopliae* na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹, durante 3 minutos. Grupos idênticos de fêmeas foram banhados apenas com o veículo da suspensão (controle). Em seguida o excesso de líquido foi retirado e as fêmeas foram fixadas em fita adesiva dupla face aderidas em placas de Petri, e mantidas em estufa tipo B.O.D a 27 °C e umidade relativa acima de 80%. Após a morte das fêmeas e extrusão do patógeno, o fungo foi reisolado em placas contendo BDA.

Este processo ocorreu até que a ação do fungo sobre as teleóginas produzisse um percentual de mortalidade maior que de 90%. Quando isso aconteceu, o fungo foi novamente reisolado e a cultura pura foi levada à empresa Biocontrol Sistema de Controle Biológico, localizada em Sertãozinho, SP, para

produção em massa, segundo metodologia descrita por LEITE et al. (2003). Sacos contendo 1 kg de arroz seco com o fungo crescido, recebidos da empresa, foram mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

Durante o período em que ocorreram as pulverizações foram feitas duas produções massais. A primeira em junho/julho de 2006, utilizada até a 5^a pulverização, e a segunda em outubro/06, usada da 6^a até a 12^a pulverização.

4.4 Preparo da suspensão conidial

Dois dias antes da data prevista para cada pulverização, coletou-se uma amostra dos sacos de arroz com o fungo e juntou-se-as formando uma amostra composta. Desta amostra coletaram-se alíquotas de 1 g que foram colocadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução de Tween 80. Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubo para remoção dos conídios do arroz e desagregação das cadeias, fez-se a contagem em câmara de Neubauer para determinação da quantidade de conídios por grama de arroz. Estas mesmas suspensões foram usadas para determinação da viabilidade dos conídios, segundo metodologia descrita por MARQUES et al. (2004). Com base nestes dados, calculou-se a quantidade de arroz necessário para padronizar a suspensão a ser aplicada na pastagem.

Na manhã do dia de cada pulverização, os sacos foram retirados do freezer e colocados em geladeira para descongelar. Cerca de 3 a 4 horas antes da pulverização o arroz de cada saco (1Kg) foi transferido para saco de plástico com capacidade para 5 litros. Sob condições assépticas, estes sacos receberam 3 litros de solução aquosa de Tween 80[®] a 0,1% (v/v), seguida de vigorosa manipulação externa para remoção dos conídios do arroz e desagregação das cadeias. Logo após, a suspensão obtida foi coada em pano fino de algodão para evitar o entupimento do bico do pulverizador na aplicação (Figura 4, 5 e 6).



Figura 4. Remoção dos conídios de *Metarhizium anisopliae* do arroz e desagregação das cadeias de conídios para formar a suspensão a ser aplicada na pastagem.



Figura 5. Coagem da suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* em tecido de algodão.



Figura 6. Acondicionamento da suspensão de *Metarhizium anisopliae* até o momento da pulverização.

As suspensões obtidas de cada saco foram então misturadas e a mistura diluída em água para se obter a suspensão conidial a ser pulverizada na pastagem. Uma alíquota desta suspensão foi coletada para determinação de sua concentração em câmara de Neubauer e, concomitantemente, para avaliação da atividade do fungo “in vitro”

4.5 Aplicação da suspensão

Para pulverizar a pastagem do grupo tratado, foram utilizados 5 a 6 kg de arroz, com os quais se produziu 400 L de suspensão conidial, quantidade suficiente para pulverizar, em média, 66,7 mL de suspensão por metro quadrado de pastagem ou 666,67 L ha⁻¹.

A seqüência de pulverizações, a data, o intervalo (dias) em relação à seguinte e a concentração da suspensão estão expressas na Tabela 2. Considerando a concentração de conídios e o volume da suspensão usados, foram aplicados, em

11 pulverizações, quantidade de conídios que variaram entre 1,06 a $1,47 \times 10^9$ conídios viáveis por metro quadrado de pasto, e apenas na 6ª pulverização esta quantidade foi de $0,91 \times 10^8$ conídios por metro quadrado do pasto

Tabela 2. Seqüência e data das pulverizações, intervalo entre pulverizações e concentrações das suspensões conidiais de *Metarhizium anisopliae* aplicadas na pastagem de *Brachiaria decumbens*.

Puverização (N° e data)	Intervalo (dias)	Concentração da suspensão (x 10^7 conídios viáveis mL ⁻¹)
1ª - 20/07/06	21	2,20
2ª - 10/08/06	20	2,15
3ª - 30/08//06	22	1,59
4ª - 21/09/06	20	1,87
5ª - 11/10/06	21	1,60
6ª - 01/11/06	22	1,37
7ª - 23/11/06	25	1,76
8ª - 18/12//06	21	1,60
9ª - 08/01//07	31	1,92
10ª - 08/02//07	28	2,00
11ª - 08/03//07	21	1,61
12ª - 29/03//07	0	1,83

Algumas pulverizações foram feitas com intervalos maiores que 22 dias porque chuvas torrenciais ocorridas no período impediram a entrada do trator com o pulverizador de barra na pastagem. A pastagem do grupo controle foi pulverizada apenas com o veículo da suspensão de conídios.

A aplicação foi realizada com pulverizador de barra, com bico tipo cônico, a 50 cm de altura do solo (Figura 7). Durante a pulverização os animais permaneceram no pasto. As pulverizações foram efetuadas a partir das 17 horas, mas durante o horário de verão (novembro/06 a fevereiro/07) ocorreram a partir das 18 horas



Figura 7. Aplicação da suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* na pastagem de *Brachiaria decumbens*, com pulverizador de barra.

4.6 Avaliação dos hospedeiros

A infestação dos animais do grupo teste e do controle foi avaliada pela contagem de fêmeas ingurgitadas presentes nos bovinos no 17^o, 19^o, 21^o, 26^o, 33^o dias após cada pulverização em consideração ao ciclo natural da fase parasitaria do acaro que aproximadamente ocorre em 21 dias.

Utilizou-se o sistema adotado em 1984 pela FAO para o monitoramento das infestações por *B. microplus*, que é baseado no trabalho de WHARTON & UTECH (1970) e utiliza a contagem de fêmeas de 4,5 a 8,0 mm de diâmetro, de um lado do hospedeiro. Fêmeas desse tamanho representam à fase final do ciclo parasitário do ácaro sobre o animal.

4.7 Avaliação da infestação de larvas na pastagem

Para avaliar a infestação das pastagens com larvas do carrapato foi utilizada a técnica estatística do quadrado (1 m²), que foi lançado aleatoriamente por 20 vezes em cada pasto. Todas as hastes de gramínea contendo larvas do carrapato, dentro de cada quadrado, foram coletadas em saco de plástico e levadas ao laboratório, onde se realizou a contagem das larvas, segundo metodologia descrita por BASSO et al. (2005). Dois dias antes da primeira pulverização foi feita coleta de material para determinação do grau de infestação. As coletas seguintes foram realizadas periodicamente no 5^o, 12^o e 19^o dias após cada pulverização.

4.8 Avaliação da ocorrência do fungo na gramínea e no solo

A ocorrência de *M. anisopliae* na gramínea e no solo de cada pasto foi avaliada escolhendo-se, aleatoriamente, 20 pontos em cada pastagem. Em cada ponto, coletou-se, ao acaso, 10 hastes da gramínea e cinco porções com cerca de 0,3 kg de solo, retiradas da camada de 0 a 10 cm. As hastes foram divididas em cinco sacos de plástico contendo duas hastes de gramínea por ponto de coleta, e cada porção de solo foi colocada em um balde. Obteve-se uma amostra composta de gramínea por pasto, com cinco replicas contendo 40 hastes da gramínea, e uma amostra composta de solo por pasto, com cinco replicas (baldes) contendo 6 Kg de solo. As coletas de amostras foram realizadas no dia anterior à primeira pulverização e no 1^o, 7^o e 14^o dias após cada pulverização.

Todas as hastes de cada replica de gramínea, foram cuidadosamente lavadas, com ajuda de um pincel, em 150 mL de solução salina esterilizada, obtendo-se uma suspensão. Após vigorosa agitação para homogeneização, fez-se uma diluição decimal, e desta, três alíquotas de 0,1 mL foram semeadas individualmente em placas de Petri contendo o meio de JOUSSIER & CATROUX (1976), modificado pela supressão do suco de legumes e oxygal. Em seguida as placas foram mantidas a 27 °C e a contagem de colônias formadas foi feita do

terceiro ao quinto dia após a semeadura. A partir deste valor determinou-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC) por haste de gramínea.

O solo contido em cada balde sofreu vigorosa mistura manual para homogeneização. De cada replica coletou-se cerca de 0,5 kg e acondicionou-se em saco de plástico. Depois de seco ao ar livre e peneirado em malha de 1 mm, retirou-se uma alíquota de 10 g que foi suspensa em 90 mL de solução salina esterilizada. Após vigorosa agitação em agitador elétrico e diluição apropriada, semeou-se 0,1 mL da suspensão em três placas de Petri contendo o meio de JOUSSIER & CATROUX (1976), modificado conforme já citado. Em seguida as placas foram mantidas a 27 °C e a contagem de UFCs foi feita do terceiro ao quinto dia após a semeadura. A diferenciação entre o isolado E9 e isolado selvagem (*Metarhizium sp*) do solo foi feita pela morfologia das colônias, claramente distintas.

4.9 Atividade do fungo “in vitro”

Para controle da atividade acaricida da suspensão conidial do fungo usada na pastagem, 30 fêmeas de *B. microplus* ingurgitadas nos bovinos do pasto controle foram coletadas no dia de cada pulverização e tratadas com alíquota da mesma suspensão conidial do fungo aplicado na pastagem, mas em condições laboratoriais. Para isso, as fêmeas ingurgitadas foram levadas ao laboratório, lavadas em água corrente, secas em papel toalha e pesadas. Em seguida 15 fêmeas foram imersas durante 3 minutos sob agitação constante, em 5 mL de suspensão conidial de *M. anisopliae* na concentração expressa na Tabela 2, e 15 fêmeas foram imersas no veículo da suspensão de conídios, o excesso de líquido foi retirado com o auxílio de papel de filtro. Em seguida os carrapatos foram acondicionados individualmente em tubos de plástico e mantidos em estufa B.O.D. com temperatura em 28 °C e umidade relativa do ar superior a 80%, para avaliação do peso da massa de ovos, da taxa de eclosão e da eficiência reprodutiva. A taxa de eclosão foi estimada pela média obtida pela inspeção visual

de dois observadores e a eficiência reprodutiva (ER) foi calculada conforme a seguinte fórmula:

$$ER = \text{Peso da massa de ovos} \times 100 / \text{peso da fêmea ingurgitada.}$$

4.10 Análise estatística dos dados

Os dados das contagens de fêmeas ingurgitadas nos bovinos e das larvas na pastagem foram organizados segundo um delineamento em parcelas subdivididas no tempo, sendo considerado o pasto tratado e controle como tratamento principal e os tempos de coleta como tratamento secundário. Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para verificar a existência de relação entre a presença do fungo no solo e sua presença ou a presença da larva na gramínea, utilizou-se a análise de correlação linear simples.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bioensaios para recuperação da virulência do fungo

Os resultados expressos na Tabela 3 mostram que após o tratamento das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* com a suspensão conidial de *M. anisopliae* durante os três bioensaios houve uma recuperação gradativa da virulência do fungo, pois o percentual de mortalidade que no primeiro bioensaio foi de 46,7%, atingiu 96,7% no terceiro bioensaio. Deste modo, a produção massal foi feita a partir de material fúngico com alto grau de patogenicidade para o carrapato, isto é, material reisolado de fêmeas mortas no 3^o bioensaio.

Tabela 3. Mortalidade de teleóginas de *Boophilus microplus* obtida nos bioensaios realizados para recuperação da virulência do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae*.

Bioensaio	Tratamento	Nº de teleóginas banhadas	Nº de teleóginas mortas	Mortalidade (%)
1º	<i>M. anisopliae</i>	30	14	46,7
	Controle	30	1	3,3
2º	<i>M. anisopliae</i>	30	22	73,3
	Controle	30	3	10,0
3º	<i>M. anisopliae</i>	30	24	96,7
	Controle	30	2	6,7

5.2 Aplicação da suspensão do fungo na pastagem de *B. decumbens*

A quantidade de conídios do isolado E9 de *M. anisopliae* encontrado nas hastes da gramínea do pasto tratado, foi maior que a observado no pasto controle, onde não se encontrou conídios do fungo. Contudo, isso só ocorreu nas avaliações realizadas no primeiro dia após a aplicação, mas para a 6ª, 8ª e 12ª pulverizações não se encontrou conídios nas hastes da gramínea após o tratamento do pasto, e a avaliação após a 10ª pulverização não foi feita em razão de fortes chuvas no período. No sétimo e no 14º dias após a aplicação não se encontrou conídios nas hastes da gramínea, exceto da coleta realizada no sétimo dia após a 11ª pulverização (Figura 8). Conídios de isolamento selvagem de fungo não foram encontrados nas hastes da gramínea, tanto do pasto tratado como do controle, antes ou após as pulverizações.

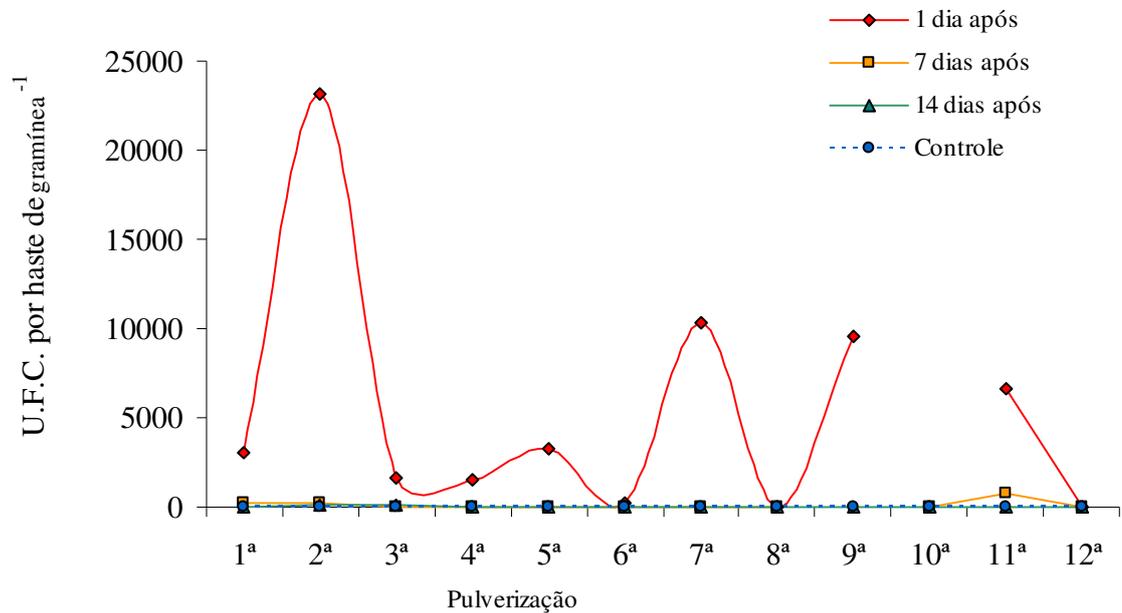


Figura 8. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* na haste de *Brachiaria decumbens* em avaliações realizadas no 1º, 7º e 14º dias após cada pulverização com o fungo. No 1º dia após a 10ª pulverização a avaliação não foi efetuada em consequência de forte chuva.

Conídios de *M. anisopliae* foram capazes de germinar sobre o tegumento da larva de *Rhipicephalus sanguineus* em até 18 horas após a adesão (GARCIA et al., 2003). Assim, o curto período de permanência do fungo na gramínea pode estar relacionado à ausência de contato com a larva na pastagem, deixando-o exposto, já na manhã do dia seguinte, às intempéries climáticas, como as variações diurnas de temperatura e sobretudo à radiação ultra-violeta (UV), o que pode explicar a pequena sobrevivência dos conídios que foram aplicados puros, isto é, sem qualquer formulação.

A radiação pode provocar danos diretos e indiretos nos conídios diminuindo sua eficiência contra os insetos, podendo atuar sobre a germinação e estágios iniciais do tubo germinativo (BRAGA et al., 2001a). Os danos diretos incluem a inativação dos conídios e danos letais ao DNA e mutações; entre os danos indiretos estão o aquecimento e dessecação dos esporos (NICHOLSON, et

al., 2000). Segundo FRANCISCO (2004), bioinseticidas à base de *M. anisopliae* apresentaram sensibilidade à radiação UV-A e UV-B capaz de acarretar acentuado decréscimo na porcentagem de germinação dos conídios.

Outro fato que pode ter contribuído para a pequena sobrevivência de conídios do fungo nas hastes da gramínea foi a provável remoção promovida pela chuva, por vezes torrencial, ocorrida em algumas ocasiões poucas horas após a aplicação, a partir da 8^a pulverização. Além disso, a 1^a coleta de material para análise foi realizada no dia seguinte ao da aplicação e as demais foram feitas no 7^o e 14^o dias. Tais intervalos se mostraram demasiadamente longos, sugerindo a coleta em dias sucessivos ou com menor espaço de tempo, para melhor avaliação da sobrevivência ou permanência do fungo nas hastes da gramínea.

A partir da 1^a pulverização foi possível verificar a ocorrência do isolado E9 no solo do pasto tratado, mas isso não ocorreu no pasto controle. Contudo, isso ocorreu nas avaliações realizadas no 7^o e 14^o dias, e não no 1^a dia como verificado para a haste da gramínea. Após a 8^a e 9^a pulverizações não se encontrou este isolado no solo, mas a precipitação de fortes chuvas no período pode ter removido os conídios (Figura 9). A presença deste isolado no solo do pasto tratado não contribuiu para ação patogênica sobre a larva, pois não houve correlação com a sua presença na gramínea ($F = 0,0^{ns}$) ou com a presença da larva na gramínea ($F = 1,33^{ns}$). A presença de isolado selvagem de *Metarhizium spp* foi detectado tanto no solo do pasto tratado como no pasto controle, mas em baixa densidade populacional e apenas após algumas pulverizações (Tabela 4).

Antes da primeira pulverização a quantidade média de larvas encontradas por metro quadrado de gramínea nos pastos controle e tratado foram, respectivamente, de 42,3 e 24,8.

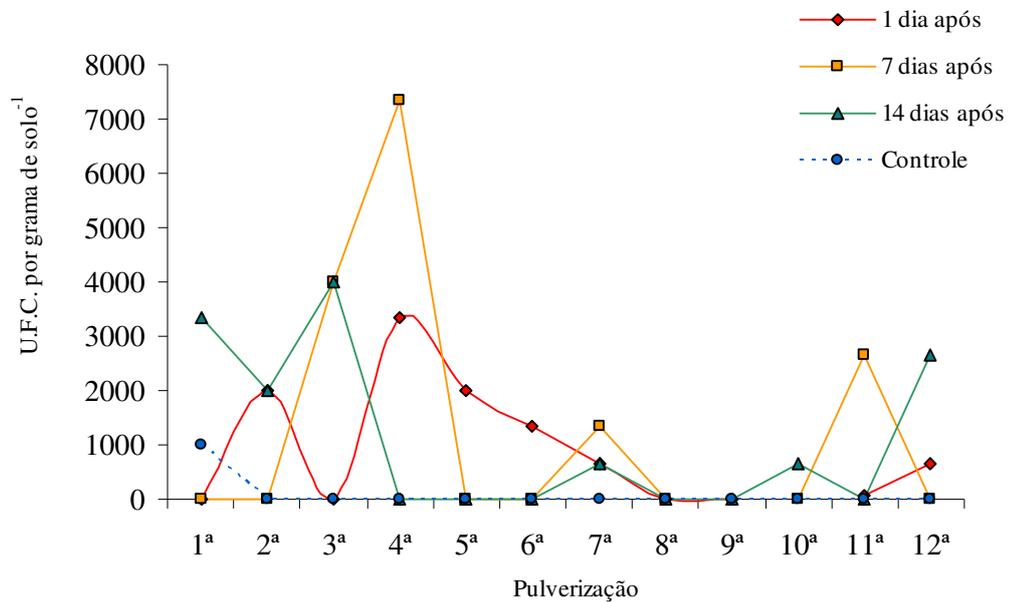


Figura 9. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* no solo da pastagem em avaliações realizadas no 1º, 7º e 14º dias após cada pulverização com o fungo. Após a 8ª e 9ª pulverizações não se encontrou este isolado no solo.

Tabela 4. Densidade populacional do isolado selvagem de *Metarhizium spp.* encontrado no solo da pastagem durante o período experimental.

Pulverização (Nº e data)	Ocorrência de <i>Metarhizium spp.</i> (U.F.C. g. de solo ⁻¹)	
	Pasto tratado	Pasto controle
1ª - 20/07/2006	-	220
2ª - 10/08/2006	-	440
3ª - 30/08/2006	-	440
4ª - 21/09/2006	220	-
5ª - 11/10/2006	-	670
6ª - 01/11/2006	440	220
7ª - 21/11/2006	-	-
8ª - 18/12/2006	-	-
9ª - 08/01/2007	-	-
10ª - 08/02/2007	-	-
11ª - 08/03/2007	220	220
12ª - 29/03/2007	220	1110

- Não detectado

Com as pulverizações esperava-se atingir as larvas infestantes de *B. microplus* presentes na pastagem e assim provocar a sua morte pela ação patogênica do fungo. Como as aplicações da suspensão conidial foram feitas, na

maioria das vezes, com intervalos de cerca de vinte e um dias, havia a expectativa de se obter um possível efeito cumulativo aumentando a população do fungo na gramínea e, conseqüentemente, reduzindo no número de larvas infestantes na pastagem. No entanto, tal fato não ocorreu como mostra o resultado expresso na Tabela 5, pois as análises de variância não demonstram diferenças significativas entre o número de larvas infestantes encontrado no pasto tratado com o fungo e no pasto controle.

Segundo GARCIA et al. (2003), *M. anisopliae* iniciou o processo de penetração e colonização da larva de *R. sanguineus* em até 2 dias após sua adesão ao tegumento. Desse modo, a pequena sobrevivência do fungo na pastagem, seja pelo efeito da radiação UV ou pela remoção de conídios ou efeito deletério provocado pelas chuvas, parece ter sido o fato que mais contribuiu para o resultado. Além disso, a concentração (10^7 con. viáveis mL^{-1}) e o volume de suspensão aplicado ($66,67 \text{ mL m}^{-2}$) podem não terem sido adequados para deixar sobre a gramínea quantidade suficiente de conídios para promover a infecção das larvas.

CASTRO et al. (1999) não encontraram diferença no número de larvas recuperadas em canteiros de *B. decumbens* tratados com suspensões entre 10^5 a 10^{10} con. mL de *M. anisopliae*, mas concluíram que uma única pulverização não foi suficiente para eliminar as larvas do carrapato. Avaliando a ação de *M. anisopliae* aplicado em pastagem de *B. decumbens* infestada com larvas de *B. microplus*, BITTENCOURT et al. (2003) verificaram redução de 17,9 e 17,4% no número de larvas presentes na gramínea com a aplicação respectiva de 10^7 e 10^9 con. mL^{-1} no primeiro ensaio, de 22,53 e 52,26% no segundo, e de 37,84 e 53,78% no terceiro ensaio. BASSO et al. (2005) obtiveram uma redução respectiva de 87 e 94% no número de larvas infestantes em pastagens de *B. brizantha* e do híbrido Tifton 85, artificialmente infestadas com téleoginas de *B. microplus*. Entretanto, foi efetuada apenas uma aplicação do fungo em canteiro de 1 m^2 , usando 200 mL de suspensão

Tabela 5. Larvas do carrapato *Boophilus microplus* encontradas por metro quadrado de gramínea, após doze pulverizações da pastagem de *Brachiaria decumbens* com *Metarhizium anisopliae*.

Tratamento	Pulverização											
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a
Controle	32,1667A	24,8167A	122,7167A	181,7500A	30,5667A	0,0000A	31,0667A	5,1500A	6,3167A	0,7167A	1,5167A	55,1500A
<i>M. anisopliae</i>	5,3000A	25,0000A	74,1833A	89,6000A	35,0333A	0,5833A	5,1333A	12,600A	5,5167A	7,8500A	13,4000A	59,8000A
Teste F	0,54 ^{NS}	0,20 ^{NS}	5,90*	2,58 ^{NS}	1,06 ^{NS}	1,00 ^{NS}	0,73 ^{NS}	1,30 ^{NS}	0,20 ^{NS}	2,33 ^{NS}	0,66 ^{NS}	0,54 ^{NS}
dms (%)	0,3734	0,4142	0,6825	0,8263	0,3657	0,7020	0,3630	0,3286	0,2415	0,2117	0,2486	0,5768
Tempo de coleta (dias após a pulverização)												
5	1,2250A	29,5250A	137,9500A	119,4250A	58,1250A	0,8750A	2,0500A	-	9,2750A	2,2250A	0,6000A	40,1000A
12	43,3250A	13,6250A	27,1750A	181,3000A	59,7250A	0,0000A	8,6000A	14,5250A	0,5750A	2,2250A	0,7000A	91,2500A
19	11,6500A	31,5750A	130,2250A	106,3000A	0,5500A	0,0000A	43,6500A	3,2250A	7,9000A	8,3750A	21,0750A	41,0750A
Teste F	2,04 ^{NS}	0,05 ^{NS}	2,55 ^{NS}	0,83 ^{NS}	2,98 ^{NS}	1,00 ^{NS}	2,05 ^{NS}	0,35 ^{NS}	0,94 ^{NS}	0,38 ^{NS}	3,52*	2,64 ^{NS}
dms (%)	0,4671	0,5719	0,8935	0,8871	0,5830	0,1015	0,4698	0,3700	0,3500	0,3007	0,3087	0,6786
Teste F para P x S	1,64 ^{NS}	2,09 ^{NS}	0,40 ^{NS}	0,32 ^{NS}	0,25 ^{NS}	1,00 ^{NS}	0,14 ^{NS}	0,31 ^{NS}	2,41 ^{NS}	0,01 ^{NS}	0,52 ^{NS}	1,52 ^{NS}
C.V. (%) para parcelas	52,63	53,65	66,11	70,75	50,28	11,67	50,68	38,96	36,23	32,59	37,43	67,94
C.V. (%) para subparcelas	45,52	51,21	59,84	52,51	55,42	11,67	45,35	43,86	36,31	32,01	32,14	55,26

Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em Ln de (x+5).

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS: não significativo; * e **: significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente. P: parcela principal = pastagem; S: parcela secundária = tempo. C.V.: coeficiente de variação.

com concentração de 10^8 con. mL⁻¹, e não havia bovinos para permitir a continuidade do ciclo do carrapato.

O resultado obtido neste trabalho está congruente com o encontrado por CASTRO et al. (1999) mas diverge bastante do obtido por BITTENCOURT et al. (2003) e BASSO et al. (2005). Contudo existem diferenças substanciais quanto ao tipo, dimensões e metodologias empregadas nos trabalhos que dificultam sobremaneira as comparações. Os trabalhos realizados por esses autores foram feitos em canteiros experimentais com pequenas areas, poucas aplicações do fungo (de uma a três no máximo), as avaliações foram feitas por curto período de tempo (dois a três meses no máximo) e sem a presença do hospedeiro do ácaro, o que impossibilitou o desenvolvimento de seu ciclo biológico tornando-o, possivelmente, mais suscetível a ação do fungo. Nestes aspectos, as condições deste trabalho foram mais próximas do que efetivamente ocorre no campo, e a presença do hospedeiro, permitindo o desenvolvimento do ciclo biológico do carrapato por algumas gerações, pode ter influenciado substancialmente o resultado.

De acordo com CORDOVÉS (1997), é necessário controlar a infestação da pastagem, pois 95% dos carrapatos (fase não parasitária) estão no ambiente e apenas 5% estão presentes no hospedeiro, sendo que a população de larvas infestantes pode viver por até 82 dias na pastagem (GAUSS & FOURLONG, 2002). Como 12 pulverizações com o fungo não promoveram a redução da população de larvas na pastagem, este fato pode explicar que não tenham sido encontradas diferenças significativa entre as contagens de fêmeas ingurgitadas realizadas nos bovinos do pasto controle e do pasto tratado (Tabela 6), apesar de terem sido feitas contagens em dias pré-determinados de acordo com o ciclo biológico natural do carrapato.

Neste experimento, conduzido por nove meses, as variações encontradas nas populações de larvas na gramínea e fêmeas nos bovinos, tanto no pasto tratado como no controle, e ainda, de um em relação ao outro, podem ser atribuídas ao ciclo biológico do carrapato, pois houve tempo e condições suficientes para que o ciclo se completasse por pelo menos duas ou três vezes (CORDOVÉS, 1997). O fungo foi encontrado na haste da gramínea e também no solo, onde as fêmeas ingurgitadas

Tabela 6. Fêmeas do carrapato *Boophilus microplus* encontradas nos bovinos após doze pulverizações da pastagem de *Brachiaria decumbens* com *Metarhizium anisopliae*.

Tratamento	Pulverização											
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a
Controle	41,55 A	25,37 A	44,60 A	75,40 A	75,17 A	25,80 A	55,53 A	81,78 A	34,2 B	112,48 A	89,90 A	168,15 A
<i>M. anisopliae</i>	42,13 A	18,33 A	56,80 A	79,53 A	59,13 A	34,50 A	53,93 A	67,80 A	64,90 A	111,07 A	92,00 A	153,83 A
Teste F	0,00 NS	2,15 NS	0,58 NS	0,00 NS	1,78 NS	1,16 NS	0,00 NS	1,72 NS	8,36**	0,72 NS	0,05 NS	0,67 NS
dms (5%)	1,30	1,03	1,68	2,29	1,85	1,25	1,84	1,35	1,50	2,09	1,89	2,31
Tempo de contagem (dias após a pulverização)												
17	58,54 A	21,58 B	39,17 C	61,00 B	77,75 AB	46,08 A	24,50 D	128,08 A	60,13 A	118,50 A	127,75 A	155,63 AB
19	54,00 A	15,08 B	42,33 BC	62,75 B	83,91 A	29,08 BC	40,67 C	111,58 A	71,08 A	103,83 A	67,79 C	187,63 A
21	40,25 B	18,42 B	54,17 AB	89,75 A	69,42 AB	38,33 AB	49,25 C	55,75 B	41,63 B	129,04 A	82,63 BC	156,92 AB
26	34,92 B	23,75 AB	58,17 A	86,58 A	63,00 B	25,83 C	68,58 B	40,58 B	38,75 B	120,13 A	80,71 BC	165,96 AB
33	21,50 C	30,42 A	59,67 A	87,25 A	41,67 C	11,42 D	90,67 A	37,96 B	36,17 B	112,38 A	95,88 B	138,83 B
Teste F	27,82**	3,85**	5,68**	9,02**	14,75**	40,99**	39,02**	33,42**	17,90**	1,80 NS	12,10**	4,27**
dms (5%)	0,88	1,00	1,12	1,15	1,03	0,78	1,02	1,60	1,02	1,34	1,30	1,30
Teste F para P x S	0,08 NS	4,62**	0,48 NS	3,41*	3,48*	2,44 NS	6,25**	0,15 NS	5,23**	4,09**	3,90**	1,60 NS
C. V. (%) para parcelas	55,12	61,10	65,21	72,45	62,25	63,76	70,27	43,74	59,66	52,7	54,54	49,33
C. V. (%) para subparcelas	17,62	27,91	20,51	17,17	16,31	18,6	18,33	24,48	19,12	15,92	17,65	13,12

Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz de (x+1).
Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. NS: não significativo; * e **: significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente. P: parcela principal = pastagem; S: parcela secundária = tempo. C. V.: coeficiente de variação.

fazem a postura e de onde eclodem as larvas. A priori, haveria condições para o desenvolvimento da ação patogênica do fungo no solo atingindo a fêmea e/ou os ovos, e na haste da gramínea atingindo a larva, provocando conseqüentemente, a redução do número de fêmeas ingurgitadas nos bovinos. Entretanto, isso não ocorreu.

5.3 Aplicação da suspensão do fungo em teleóginas de *B. microplus* em laboratório

Os resultados da avaliação do efeito do fungo sobre teleóginas do carrapato *B. microplus* realizada em laboratório estão apresentados na Tabela 7. Por ocasião das pulverizações 1, 7 e 9 a avaliação não foi realizada pela não disponibilidade de teleóginas. Observa-se efeito significativo do fungo sobre a ovipostura, eclosão de larvas e eficiência reprodutiva das teleóginas. A diminuição da ovipostura ocorreu nos tratamentos com as suspensões da 2^a, 3^a, 4^a, 6^a e 11^a pulverizações. A taxa de eclosão teve uma diminuição significativa nos tratamentos com as suspensões da 4^a, 8^a, 10^a e 11^a pulverizações. A eficiência reprodutiva diminuiu significativamente nos tratamentos com as suspensões usadas nas pulverizações 2 a 6 e 9 a 12.

Como se observa pelos resultados da Tabela 7, quando as mesmas suspensões aplicadas na pastagem de *B. decumbens* foram usadas para inocular fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* em laboratório, verificou-se que o isolado E9 de *M. anisopliae* afetou substancialmente vários parâmetros do ciclo biológico do carrapato, mostrando sua ação patogênica sobre o mesmo. Efeito similar com a mesma linhagem (MONTEIRO et al., 1998; GARCIA et al., 2004; GARCIA et al., 2005) e com outras linhagens de *M. anisopliae* (BITTENCOURT et al., 2003; MELO et al., 2006) foi previamente relatado. Entretanto, tais resultados promissores obtidos em laboratório não se repetiram quando o fungo foi usado nas aplicações sucessivas no campo. Muito provavelmente o efeito ambiental sobre os conídios foi o fator determinante.

Tabela 7. Médias e desvios padrões dos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* inoculado com as suspensões conidiais de *Metarhizium anisopliae* usadas nas sucessivas pulverizações das pastagens.

Pulverização	Peso da massa de ovos (mg)		Taxa de eclosão (%)		Eficiência reprodutiva (%)	
	Controle	Teste	Controle	Teste	Controle	Teste
1 ^a	-	-	-	-	-	-
2 ^a	60 ± 10A	7 ± 19B	17 ± 32A	0,3 ± 1A	34 ± 17A	4 ± 11B
3 ^a	76 ± 37A	39 ± 33B	43 ± 41A	37 ± 43A	35 ± 12A	19 ± 42B
4 ^a	68 ± 32A	15 ± 23B	75 ± 38A	18 ± 31B	39 ± 12A	8 ± 11B
5 ^a	68 ± 33A	63 ± 25A	13 ± 26A	6 ± 18A	38 ± 12A	29 ± 12B
6 ^a	45 ± 32A	4 ± 5B	3 ± 7A	-	24 ± 16A	4 ± 4B
7 ^a	-	-	-	-	-	-
8 ^a	105 ± 29A	100 ± 32A	36 ± 38A	60 ± 32B	59 ± 90A	40 ± 13A
9 ^a	-	-	-	-	-	-
10 ^a	133 ± 54A	109 ± 37A	94 ± 28A	76 ± 37B	47 ± 12A	41 ± 12B
11 ^a	79 ± 42A	34 ± 44B	75 ± 40A	44 ± 48B	40 ± 20A	17 ± 21B
12 ^a	123 ± 29A	100 ± 33A	98 ± 4A	97 ± 10A	52 ± 8A	40 ± 13B

- Avaliação não realizada.

Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Este é um estudo pioneiro, e embora os resultados não tenham sido promissores, são ainda preliminares. Vários aspectos como a concentração de conídios e o volume de suspensão, o emprego de formulações e de tecnologias adequadas de aplicação do fungo, o intervalo entre aplicações, o emprego de linhagens com rusticidade adequada para resistir às intempéries climáticas etc, são alguns dos aspectos que necessitam serem melhor analisados. Nesse sentido, outras investigações precisam ser conduzidas para se estabelecer as condições adequadas de uso de fungos em programas de manejo integrado de *B. microplus*.

6. CONCLUSÕES

1. A aplicação de *M. anisopliae* por sucessivas vezes na pastagem de *B. decumbens*, não promoveu sua persistência na gramínea e possibilitou, por curto período, a sobrevivência do fungo no solo da pastagem.

2. A pulverização da pastagem com *M. anisopliae*, por sucessivas vezes não reduziu o número de larvas infestantes de *B. microplus* e nem o número de fêmeas que parasitam os bovinos.

3. O fungo mostrou sua atividade patogênica para o carrapato quando as suspensões aplicadas na pastagem foram usadas para inocular fêmeas ingurgitadas em laboratório.

7. REFERÊNCIAS

ALONSO-DÍAZ, M.A., GARCÍA, L., GALINDO-VELASCO, E., LEZAMA-GUTIERREZ, R., ANGEL-SAHAGÚN, C.A., RODRIGUEZ-VIVAS, R.I., FRAGOSO-SÀNCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.147, n.3-4, p.336-340, 2007.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 289 p.

BALFOUR-BROWNE, F. The green muscardine disease of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in Eritrea. **Proceedings of the Entomological Society of London (Série A)**. London, v. 35, p. 65-74, 1960.

BASSO, L.M.; MONTEIRO, A.C.; BELO, M.A. de A.; SOARES, V.E.; GARCIA, M.V.; MOCHI, D.A.. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.6, p.595-600, 2005.

BARROS, T.A.M.; EVANS, D.E. Ação de gramíneas forrageiras em larvas infestantes do carrapato de bovinos, *Boophilus microplus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.9, n.1/2, p.17-21, 1989.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L. F.da S.; VIEGAS, E. de C. Eficácia in vitro dos isolados 747 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* no carrapato *Boophilus*

microplus. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.4, supl.1.1, p.86, 1995.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; SOUZA, E.J. de; PERALVA, S.L.F.S.; REIS, R.C.S. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 em teste de campo com bovinos infestados por carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1883) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.20, n.2, p.78-82, 1999.

BITTENCOURT, V.R.E.P. Controle Biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J, L. **Controle biológico de carrapatos**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 2000, cap. 4, p.145-175.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; BAHIENSE, T.C., FERNANDES, E.K.K., SOUZA, E.J. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.12, n.1, p.38-42, 2003.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.78, n.2, p.98-108. 2001a.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effects of UV-B irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v.72, n.2, p.140-146, 2001b.

BULLMAN, G.M.; MUÑOS CABENAS, M.E.; AMBRÚSTOLO, R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. **Veterinária Argentina**, Buenos Aires, v.8, p.3-15, 1996.

CAGAN, L.; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet Light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, Konossu Saitama, v.2, n.4, 2001.

CASTRO, A.B.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; DAEMON, E.; VIEGAS, E.C. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, Seropédica, v.19, n.1, p.73-82, 1997.

CASTRO, A.B.A.; BITTENCOURT, V.R.E.T.; DAEMON, E.; VIEGAS, E.C. Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas não alimentadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae). **Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, Seropédica, v.21, n.1-2, p. 95-102, 1999.

CHANDLER, D.; DAVIDSON,G.; PELL, J.K.; BALL, B.V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K.D. Fungal biocontrol of acari. **Biocontrol Science and Technology**, London, v.10, n.4, p.357-384, 2000.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 1997. 130p.

CORREIA, A. do C.B.; FIORIN, A.C.; MONTEIRO, A.C.; VERISSIMO, C.J. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.71, n.2, p.189-191, 1998.

EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Carrapto -de-boi**. Disponível: <www.cnpqg.embrapa.br/publicações/divulga/GCD42.html>. Acesso em: 23 abr. 2004.

FARGUES, J.; GOETTEL, M.S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C.J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. **Mycopathologia**, Amsterdam, v.135, p.171-181, 1996.

FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R. E.P.; ROBERTS, D.W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria spp.* isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.96, n.3, p.237-243, 2007.

FRANCISCO, E.A. **Tolerância de bioinseticidas comerciais à base de *Metarhizium anisopliae* à radiação UV-A e UV-B e efeito do tempo de cultivo dos conídios**. 2004. 68p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FRAZZON, A.P.G.; VAZ, I.S.; MASUDA, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.94, n.1-2, p.117-125, 2000.

FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal of Parasitology**, Amsterdam, v. 29, n.1, p.57-71, 1999.

FURLONG, J.; BROVINI, C.N.; CHAGAS, A.C.S. Comportamento de larvas de *Boophilus microplus* em passagem de *Pennisetum purpureum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.18, n.1, p.23-31, 2002.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1513-1518, 2004.

GARCIA, M.V. MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J.; PRETTE, N.; BECHARA, G.H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.36, n.4, p.368-372, 2005.

GAUSS, C.L.B.; FURLONG, J. Comportamento de larvas infestantes de *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.3, p. 467-472, 2002.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRAIGHT, S.P. Fungi. In: **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 2000, cap.4, p.255-282, 2000.

GOMES, A.O. Carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: Ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. (Eds.) Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande: **EMBRAPA-CNPGC**, p.10-37, 1998.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2. Ed. Porto Alegre: Edição do autor, 1995. 235p.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.21, n.125, p.8-10, 2002.

GRODEN, E.; LOCKWOOD, J.L. Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.57, n.1, p.7-16, 1991.

GRONVOLD, J. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, London, v.70, n.4, p.291-297 1996.

GUGLIELMONE, A.A.; SZABÓ, M.P.J.; MARTINS, J.R.S.; ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: Barros-Battesti, D.M.B.; Arzua, M.; Bechara, G.H. (Eds.). **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo/BR, 2006. p. 115-138.

INDICADORES RURAIS. Brasília: CNA, v.5, n.29, 2001. 6p.

JOUSSIER, D.; CATROUX, G. Mise au point d'un milieu de culture pour le dénombrement de *Beauveria tenella* dans le sols. **Entomophaga**, Amsterdam, v.21, n.3, p.223-225, 1976.

KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum* using the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.67, n.1, p.15-20, 1996.

KAUFMAN, W.R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, Oxford, v.5, n.2, p.47-56, 1989.

KIRKLAND, B.H.; WESTWOOD, G.S.; KEYHANI, N.O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **Journal of Medicine Entomology**, v.41, n.4, p.705-711, 2004.

KISSMANN, K.G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo, BASF, 1997. v.2, 825p.

LATCH, G.C.M.; *Metarhizium anisopliae* (Metschikoff) Sorokin, strains in New Zealand and their possible use for controlling pastures-inhabiting insects. **Journal Agricultural Research**, New Zealand, v.8, p.384-396, 1965.

LEITE, J.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. 1. Ed. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2003, 92p.

LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; P´REZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.16, n.1, p.27-31, 2007.

MARANGA, R.O.; KAAIA, G.P.; MUEKE, J.M.; HASSANALI, A. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. **Mycopathologia**, Amsterdam, v.159, n.4, p.527-532, 2005.

MARQUES, R.P.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadiracta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.6, p.1675-1680, 2004.

MELLO, D.R. de; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF, 1879) SOSKIN, 1883, SOBRE O CARRAPATO *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.15, n.4, p.157-162, 2006.

MONTEIRO, A.C. Ecologia de fungos entomopatogênicos no solo. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 4, 1995, Campinas. **Anais...: 1995.** p.110-122.

MONTEIRO, A.C.; FIORIN, A.C.; CORREIA, A. do C.B. Pathogenicity of isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin towards the cattle tick *Boophilus microplus* (can.) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Revista de Microbiologia**, v.29, n.2, p.109-112, 1998.

NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H.J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p.548-572, 2000.

NUÑES, J.L.; MUÑOZ COBENAS, M.E.; MOLTEDO, H.L. ***Boophilus microplus*, la garrapata comun del Ganado vacuno**. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982. 19p.

OLIVEIRA, D.P.; CHAVES, G.M.; LOURES, E.G. Estudo comparativo da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes tipos de solo. **Theobroma**, Itabuna, v.11, n.4, p.233-239, 1981.

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**, Chicago, v.62, n.9, p.1478-1480, 2002.

PAIÃO, J.C.V.; MONTEIRO, A.C.; KRONKA, S.N. Susceptibility of the cattle tick of the *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, n.2, p.245-251, 2001.

PINTO, A.S.; BARRETO, C.C.; SCCHRANK, A.; ULHOA, C.J.; VAAINSTEIN, M.H. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.322-327, 1997.

PRETTE, N.; MONTEIRO, A.C.; GARCIA, M.V.; SOARES, V.E. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.855-861, 2005.

RATH, A.C.; KOEN, T.B.; YIP, H.Y. The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n.5, p.378-384, 1992.

REIS, R.C.S.; CHACON, S.C.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; FACCINI, J.L.H. Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* (Balsamo) e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, 1883

na ecdise ninfal de *Amblyomma cooperi* (Nuttal; Warbuton, 1908)(Acari-Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.12, n.2, p.68-70, 2003.

REIS, R.C.S.; MELO, D.R.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efeitos de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsc) Sorok sobre fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) em condições de laboratório. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.6, p.788-791, 2004.

ROCHA, U.F. **Biologia e controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini)**. Jaboticabal: Unesp, 1984. 35p. (Boletim Técnico Unesp, 3).

RODRIGUEZ, M.; MASSARD, C.; FONSECA, A.H. da.; FONSECA, R.N.; MACHADO, H.; LABARTA, V.; FUENTE, J. Effect of vaccination with recombinant Bm 86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, Surrey, v.13, p.1804-1808, 1995.

SAUERESSIG, T. M. **Estudo da fase não parasitária do carrapato de bovinos em pastagens cultivadas e nativa no Distrito Federal**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados.1994. 15p. (Boletim de Pesquisa, 37)

SHARAPOV, V.M.; KALVISH, T.K. Effect of soil fungistasis on zoopathogenic fungi. **Mycopathology**, v. 85, n.1-2, p.121-128, 1984.

SILVA, J.C. **Virulência de mutantes exoenzimáticos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e seus revertentes a *Rhodnius prolixus***. 1985. 137p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, C.A.D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.36, n.2, p.243-247, 2001.

SOARES, V.E.; SILVEIRA, D.M.; NUNES, T.L.S.; OLIVEIRA, G P.; BARBOSA, O.F; COSTA, A.J. da. In vitro analysis of the action of acaricides on *Boophilus microplus* strain take from dairy cattle from the north-east area of Sao Paulo State. **Semina-Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.1, p.71-75, 2001.

SONENSHINE, D.E. **Biologia of ticks**. New York: Oxford University Press, 1993, 316p.

VALLE, C. B. do. **Coleção de germoplasma de especies de *Brachiaria* no CIAT**: estudos básicos visando ao melhoramento genetic. Campo Grande: EMBRAPA/CNPGC, 1990. p.16 (Documentos, 46).

WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E.; HORAK, I.G. **The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae)** a guide to the brown ticks of the world. Cambridge, Cambridge University Press, 2000. p.643.

WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W. Resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus*, in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: its assessment and heritability. **Journal of Agricultural Research**, Australian, v.21, n.1, p.163-181, 1970.

WILLADSEN, P.; COBON, G.; McKENNA, R.V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen BM86 or in combination with recombinant Bm 91. **Parasite Immunology**, Oxford, v.18, n.5, p.241-246, 1996.