

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

**FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DA MOSCA-DOS-
CHIFRES *Haematobia irritans* EM LABORATÓRIO E CAMPO**

Dinalva Alves Mochi

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIA VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DA MOSCA-DOS-
CHIFRES *Haematobia irritans* EM LABORATÓRIO E CAMPO**

Dinalva Alves Mochi

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre A. M. Sampaio

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2009

Mochi, Dinalva Alves
M688 Fungos entomopatogênicos para o controle da mosca-
f dos-chifres *Haematobia irritans* em laboratório e campo /
Dinalva Alves Mochi. -- Jaboticabal, 2009
xxi, 93 f.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Antonio Carlos Monteiro
Co-orientador: Alexandre A. M. Sampaio
Banca examinadora: Gilson Pereira de Oliveira, Katia
Denise Saraiva Bresciani, Antonio Batista Filho, Luis
Francisco Angeli Alves
Bibliografia

1. Controle Biológico. 2. Controle Microbiano. 3.
Microencapsulação. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.466

unesp



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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

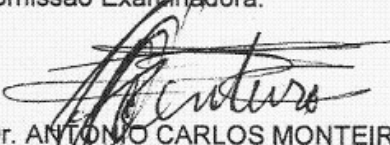
TÍTULO: FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DA MOSCA-DOS-CHIFRES *Haematobia irritans* EM LABORATÓRIO E CAMPO

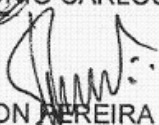
AUTORA: DINALVA ALVES MOCHI

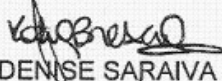
ORIENTADOR: Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO

CO-ORIENTADOR: Dr. ALEXANDRE AMSTALDEN MORAES SAMPAIO

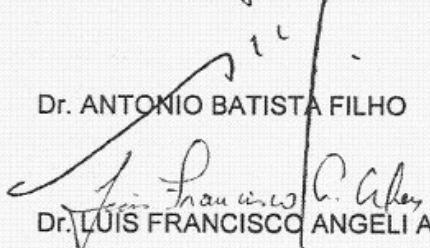
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA pela Comissão Examinadora:


Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO

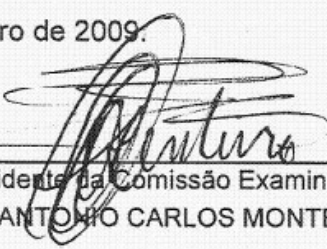

Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA


Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI


Dr. ANTONIO BATISTA FILHO


Dr. LUIS FRANCISCO ANGELI ALVES

Data da realização: 29 de janeiro de 2009.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

DINALVA ALVES MOCHI - Filha de Claudir Mochi e Rosalina Alves Mochi, nascida em 03 de janeiro de 1980, no município de Itápolis - SP. Bióloga, graduada pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Catanduva (FAFICA), em dezembro de 2001. Estagiou no Laboratório de Ecologia de Microrganismos (Departamento de Produção Vegetal) de Agosto de 2001 a março de 2003. Em 2003 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, no Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Durante o curso de Mestrado participou de congressos e fóruns publicando trabalhos na área de entomopatógenos. Obteve o título de Mestre em Microbiologia em fevereiro de 2005, ingressando em março do mesmo ano no curso de doutorado. Durante esse período publicou artigos em revistas científicas e participou de eventos apresentando trabalhos. Obteve o título de Doutora em Microbiologia na área de Microbiologia Agropecuária em Janeiro de 2009.

MINHA FÉ

Eu creio! Creio em mim mesmo.

Creio nos que trabalham comigo, creio nos meus amigos e creio na minha família!

Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar, contanto que eu me esforce para alcançar com meios lícitos e honestos.

Creio nas orações e nunca fecharei meus olhos para dormir, sem pedir antes a devida orientação a fim de ser paciente com os outros e tolerante com os que não acreditam no que eu acredito.

Creio que o triunfo é resultado de esforço inteligente, que não depende da sorte, da magia, de amigos, companheiros duvidosos ou de meu superior.

Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar.

Serei cauteloso quando eu tratar com os outros, como eu quero que eles sejam comigo. Não caluniarei aqueles que não gosto.

Não diminuirei meu trabalho por ver que os outros o fazem. Prestarei o melhor serviço de que sou capaz, porque jurei a mim mesmo triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado do esforço consciente e eficaz.

Finalmente, perdoarei os que me ofendem, porque compreendo que as vezes ofendo os outros e necessito de perdão.

E que Assim Seja!

Mahatma Gandhi

“Embora o tesouro esteja enterrado na sua casa, você só irá descobri-lo quando se afastar.” (Paulo Coelho)

Aos meus tesouros...

MEUS PAIS

CLAUDIR e ROSALINA - pelo amor, incentivo e formação moral. Por terem sempre me socorrido nas horas de desespero e comemorado minhas vitórias. Saibam que tudo que sou e tudo que conquistei, foi graças a vocês.

MEU IRMÃO

JUNIOR – Por ter vindo me fazer companhia durante o doutorado. Pelas horas de agradável conversa, pelo companheirismo e cumplicidade.

AO MEU AMADO ESPOSO, ERLEY...

“...Porque existem coisas na vida que têm um selo dizendo: Você só irá entender meu valor quando me perder - e me recuperar...” Obrigada por estar ao meu lado e ter voltado a fazer parte da minha vida.

Dedico

Aos Meus Padrinhos: Umbelina e Felix...

Que me acompanham desde meus primeiros sonhos de estudo, pelo incentivo, carinho e pelas orações. Por terem me apresentado ao **Maurício de Souza Andrade**, um dos maiores responsáveis pela idéia deste projeto, com sinceras esperanças que este primeiro estudo possa ser a base, para um dia, amenizar os problemas causados pela mosca-dos-chifres.

Ao “meu pessoal” de Borborema... “minha tia Jandira e meus primos Regiane, Mari, Pi, Emily, Márcio, Ronaldo, Rose, Jair e Anne”... pela constante companhia e por sempre estarem presentes nos meus fins de semana de descanso.

Ofereço

A **DEUS** - pelo dom da vida e oportunidade de estar, mais uma vez, aqui.

A **Espiritualidade Maior** - pela presença constante nos momentos de alegria e nas horas mais difíceis.

Agradeço

AGRADECIMENTOS

Ao Meu Orientador **Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro** - Por estes sete anos de agradável convivência, pelos valiosos ensinamentos que proporcionaram meu crescimento profissional. Pela paciência, amizade e confiança em mim e neste trabalho. Agradeço a oportunidade de poder concluir mais este projeto com a qualidade de suas orientações.

Ao **Sr. Antonio Lopes dos Santos** – Por ceder sua propriedade e seus animais durante esses anos de experimento. Pela acolhida durante o ensaio em campo e pela preocupação para que eu terminasse meus estudos a contento – agradeço a **Deus** por eu ter lhe conhecido, e peço a **Ele** que o abençoe sempre.

A **FAPESP** – pelo financiamento do projeto.

A **CAPES** - pela bolsa de Doutorado, que permitiu minha total dedicação a este trabalho.

Aos Professores **Dr. Gilson Pereira de Oliveira, Dr^a. Katia Denise Saraiva Bresciani, Dr. Antonio Batista Filho, Dr. Luis Francisco Angeli Alves**, pela participação na banca examinadora e sugestões.

Ao **Prof. Dr. Prof. Dr. Alexandre A. M. Sampaio** - pela co-orientação na realização desta Tese.

Ao **Prof. Dr. José Carlos Barbosa** - pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao bibliotecário **Fabio de Assis Pinho** - pelo auxílio nas correções da bibliografia citada.

Ao **Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira** e ao **Centro de Pesquisa de Parasitologia Veterinária (CPPAR)** e aos **Funcionários Carlão e Edison do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp de Jaboticabal** - pela concessão do sangue bovino para a alimentação diária das moscas durante os experimentos.

Aos amigos do laboratório: **Lucas, Aline A., Aline B., Carime, Flavinha, Manu, Danilo, Bia, Poliane** e aos da Faculdade: **Claudia (Portuga), Débora (Capitu) e Heloysa**. Por todos os momentos compartilhados, tanto de trabalho quando os de descontração.

A **Luciana Yoshida e Ana Carolina Ribeiro Machado** - pela ajuda nos ensaios, pelo otimismo, por estarem ao meu lado nas horas difíceis, me confortando sempre.

Aos amigos que não estão mais no Laboratório de Microbiologia, mas que me acompanharam durante esta jornada e ainda moram no meu coração - **Lanza, Marquinhos, Nancy e Mara** - pelo incentivo, bom humor e alegria contagiante.

A secretária da Microbiologia **Edna Dáquila**, pelo auxílio e amizade.

A minha equipe de coleta das moscas e do experimento em campo – **Claudir Mochi, Claudir Mochi Junior, Enir, Rafael, Erley Maik Gonçalves, Marcio Germano, Rosalina Alves Mochi e Jandira Alves da Costa**.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XV
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Os fungos entomopatogenicos.....	2
2.2 A mosca-dos-chifres (<i>Haematobia irritans</i>).....	3
2.3 Prejuízos causados	5
2.4 Métodos de controle.....	6
2.4.1 Controle microbiano.....	8
3. REFERÊNCIAS	9
CAPÍTULO 2 - EFICIÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE OVOS E LARVAS DA MOSCA-DOS-CHIFRES <i>Haematobia irritans</i>	17
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 Fungo.....	20
2.2 Preparo das suspensões	21
2.3 Coleta de <i>H. irritans</i>	22
2.4 Bioensaio.....	22
2.5 Delineamento experimntal e análise estatística.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1 Ação de fungos entomopatogênicos para ovos de <i>H. irritans</i>	25
3.2 Ação de fungos entomopatogênicos para larvas de <i>H. irritans</i>	30

	Página
4. CONCLUSÕES.....	35
5. REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO 3 - AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE PUPAS E ADULTOS DA MOSCA-DOS-CHIFRES <i>Haematobia irritans</i>.....	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Fungo.....	42
2.2 Preparo das suspensões.....	42
2.3 Obtenção de <i>H. irritans</i>	43
2.4 Bioensaio com pupas de <i>H. irritans</i>	45
2.5 Bioensaio com adultos de <i>H. irritans</i>	45
2.6 Análise estatística	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5. CONCLUSÃO.....	57
6. REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO 4 - POTENCIAL DE <i>Metarhizium anisopliae</i> PARA O CONTROLE DE LARVAS E MOSCAS DE <i>Haematobia irritans</i> EM BOVINOS NATURALMENTE INFESTADOS.....	62
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	64
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1 Fungo.....	67
2.2 Produção do fungo em arroz.....	68
2.3 Teste de viabilidade	70
2.4 Preparação dos micropelletes.....	70

	Página
2.4.1 Mucilagem de alginato de sódio com farinha de aveia	70
2.4.2 Microgranulação.....	71
2.5 Controle de <i>H. irritans</i> em condições de campo.....	71
2.5.1 Controle de larvas nos bolos fecais	74
2.5.2 Controle de adultos sobre os bovinos	75
2.6 Análise estatística	78
3. RESULTADOS	79
3.1 Controle de larvas em bolos fecais	79
3.2 Controle de adultos sobre os bovinos	83
4. DISCUSSÃO	85
5. CONCLUSÃO	88
6. REFERÊNCIAS	89

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo 2

- Figura 1.** Obtenção de ovos e larvas de *Haematobia irritans*. **A:** coleta das moscas em bovinos; **B:** moscas confinadas em sacos de plástico para fazer oviposição; **C:** coleta de ovos com auxílio de pincel; **D:** colocação de grupos de ovos em papel de filtro; **E:** tubo de plástico contendo 5 g de fezes frescas e na superfície papel de filtro com ovos; **F:** contagem de ovos inviáveis em microscópio estereoscópico, com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo. 24

Capítulo 3

- Figura 1.** Obtenção de pupas e adultos do inseto. **A:** coleta das moscas em bovinos; **B:** moscas confinadas em sacos de plástico para ensaio com pupas; **C:** ovos colocados em fezes com alto teor de umidade, para o ensaio com pupas; **D:** coleta de pupa após cinco dias de incubação; **E:** moscas coletadas, confinadas em gaiolas de isopor para ensaio com adultos; **F:** sangue bovino fresco, embebido em algodão e revestido em parafilme, oferecido para as moscas. 44
- Figura 2.** Bioensaio com adultos de *Haematobia irritans*. **A:** câmara fria usada para separação e contagem de moscas para o ensaio com adultos; **B:** pulverização de adultos; **C:** gaiolas de isopor onde moscas foram transferidas após 12 h da pulverização, **D:** gaiolas colocadas em sala climatizada alimentadas com sangue bovino, duas vezes ao dia. 46

- Figura 3.** Mortalidade de *Haematobia irritans* em função da significância da interação isolados *versus* concentração, após tratamento de adultos com isolados de *Metarhizium anisopliae*. 49
- Figura 4.** Adultos de *Haematobia irritans* mortos pelo fungo *Metarhizium anisopliae* isolado E9. **A:** vista lateral do adulto exibindo a extrusão do patógeno; **B:** vista ventral do adulto exibindo vigorosa esporulação do fungo. 49
- Figura 5.** Mortalidade total de pupas de *Haematobia irritans* em função da significância da interação isolados *versus* concentração, após tratamento de pupas com isolados de *Beauveria bassiana*. 51
- Figura 6.** *Haematobia irritans* mortas pelo fungo *Beauveria bassiana* no ensaio com adultos. **A:** Adulto morto exibindo extrusão do isolado JAB07; **B:** mosca-dos-chifes morta por JAB06; **C:** inseto exibindo vigorosa esporulação do isolado AM09. 51
- Figura 7.** Mortalidade de pupas de *Haematobia irritans* em função da significância isolados *versus* concentração, após tratamento de pupas com isolados de *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa*. 53
- Figura 8.** Pupas e moscas mortas no ensaio com pupas de *Haematobia irritans*. **A:** pupa exibindo extrusão do Isolado CG189; **B:** pupa morta pelo Isolado CG195; **C:** adulto emergido de pupa tratada por CG189; **D:** adulto emergido de pupa tratada pelo Isolado CG195. 54

Capítulo 4

- Figura 1.** Produção do fungo. **A:** isolado E9 de *Metarhizium anisopliae* em placa de Petri contendo meio BDA; **B:** arroz colonizado pelo fungo, contido em sacos de plástico, após 20 dias de

- cultivo; **C e D**: arroz colonizado pelo fungo em bandejas para secagem; **E**: extração de conídios do arroz com auxílio de uma peneira. 69
- Figura 2.** Preparo dos microgrânulos de alginato de sódio contendo conídios do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae*. **A**: mucilagem de alginato de sódio contida em funil de separação (seta 1), sendo gotejada em solução de cloreto de cálcio (seta 2), ambos sob agitação constante (setas 3 e 4); **B e C**: microgrânulos submetidos a ventilação forçada para secagem; **C**: microgânulos após secagem por algumas horas. 72
- Figura 3.** Temperatura e umidade médias diárias nos piquetes durante o ensaio de controle de larvas nas massas fecais. Piquete com animais do grupo controle (■); piquete com animais que receberam *Metarhizium anisopliae in natura* (●); piquete com animais que receberam *Metarhizium anisopliae microencapsulado* (▲). 73
- Figura 4.** Temperatura e umidade médias diárias nos piquetes durante o ensaio para o controle de adultos sobre os bovinos. Piquete com animais do grupo controle (■); piquete com animais pulverizados com *Metarhizium anisopliae* (▲). 73
- Figura 5.** Controle de larvas de *Haematobia irritans* nas massas fecais. **A**: estacas de bambu protegendo os bolos escolhidos; **B**: coleta de alíquota de fezes frescas recolhidas de massa fecal; **C e D**: coleta da massa fecal inteira, com o auxílio de uma pá e transferência para prato circular de papel alumínio, 24 horas após a marcação; **E e F**: estruturas semelhante a uma gaiola, feitas com tecido *voile*, para confinamento de moscas emergidas. 76
- Figura 6.** Controle de larvas de *Haematobia irritans* nas massas

fecais. **A:** abertura das gaiolas 20 dias após a marcação; **B:** remoção, triagem e identificação de adultos de *Haematobia irritans* para contagem. **C:** pesagem de amostra de fezes (10 g) para análise de UFCs; **D:** desagregação e diluição da amostra de fezes em 90 mL de solução salina+Tween com o auxílio de um mixer; **E:** execução das diluições seriadas a partir da suspensão inicial.

77

Figura 7. Controle de adultos de *Haematobia irritans* sobre os bovinos. **A:** transferência da calda para o pulverizador manual; **B, C e D:** pulverização dos bovinos realizada por pulverizador com bico tipo cone, sempre no final da tarde; **E:** fotografia tirada de um lado inteiro do animal; **F:** ampliação de fotografia em computador para a contagem do número de moscas no animal.

79

Figura 8. Emergência de *Haematobia irritans* de massas fecais, contendo conídios microencapsulados ou *in natura* do isolados E9 de *Metarhizium anisopliae* em função da significância obtida na interação tratamento *versus* tempo de avaliação. Tratamentos: Controle (■); *Metarhizium anisopliae in natura* (◆); *Metarhizium anisopliae* microencapsulado (▲). Médias seguidas de mesma letra, no tempo de coleta (dias), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

81

Figura 9. Ocorrência do isolados E9 de *Metarhizium anisopliae* nas fezes de bovinos em avaliações realizadas nos tempos 0, 1, 3, 6, 9 e 12 dias após administração diária de conídios microencapsulados ou *in natura* do fungo aos animais. Controle (■); *Metarhizium anisopliae in natura* (◆); *Metarhizium anisopliae* microencapsulado (▲). Análise estatística realizada com dados transformados em $\log+5$. Médias seguidas de mesma letra, no tempo (dias de coleta),

- não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). 82
- Figura 10.** Ocorrência do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae* nas amostras fecais dos bovinos. **A** e **B**: placas de Petri mostrando o crescimento de colônias do fungo; **C** e **D**: detalhe de colônias do fungo crescidas no meio de cultura. 83
- Figura 11.** Ocorrência de *Haematobia irritans* nos bovinos, em função da significância obtida na interação tratamento versus tempo de avaliação, após a segunda pulverização com suspensão de conídio do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae*. Tratamentos: Controle (■); pulverização com *Metarhizium anisopliae* (▲). Médias seguidas de mesma letra no tempo (dias após a segunda pulverização), não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). 85

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo 2	
Tabela 1. Isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Isaria fumosorosea</i> , <i>Isaria farinosa</i> , usados nos ensaios com ovos e larvas da mosca-dos-chifres.	20
Tabela 2. Mortalidade de <i>Haematobia irritans</i> após tratamento de ovos com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	25
Tabela 3. Desdobramento da interação isolados <i>versus</i> concentrações, significativa para a mortalidade total de <i>Haematobia irritans</i> obtida a partir de ovos tratados com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	26
Tabela 4. Mortalidade de <i>Haematobia irritans</i> após tratamento de ovos com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> .	27
Tabela 5. Mortalidade de <i>Haematobia irritans</i> após tratamento de ovos com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Isaria fumosorosea</i> e <i>Isaria farinosa</i> .	28
Tabela 6. Desdobramento das interações isolados <i>versus</i> concentrações, significativas para a mortalidade de pupas e para a mortalidade total de <i>Haematobia irritans</i> , após tratamento de ovos com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Isaria fumosorosea</i> e <i>Isaria farinosa</i> .	29
Tabela 7. Mortalidade de <i>Haematobia irritans</i> após tratamento de larvas com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	31

Tabela 8.	Desdobramento das interações isolados <i>versus</i> concentrações, significativa para a mortalidade de larvas de <i>Haematobia irritans</i> , após tratamento com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	32
Tabela 9.	Mortalidade de <i>Haematobia irritans</i> após tratamento de larvas com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> .	33
Tabela 10.	Mortalidade de <i>Haematobia irritans</i> após tratamento de larvas com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Isaria fumosorosea</i> e <i>Isaria farinosa</i> .	34
Tabela 11.	Desdobramento da interação isolados <i>versus</i> concentrações, significativa para a mortalidade de larvas de <i>Haematobia irritans</i> , após tratamento com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Isaria fumosorosea</i> e <i>Isaria farinosa</i> .	35

Capítulo 3

Tabela 1.	Mortalidade (%) de pupas e adultos de <i>Haematobia irritans</i> após tratamento com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	48
Tabela 2.	Mortalidade (%) de pupas e adultos de <i>Haematobia irritans</i> após tratamento com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> .	50
Tabela 3.	Mortalidade (%) de pupas e adultos de <i>Haematobia irritans</i> após tratamento com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de <i>Isaria fumosorosea</i> e <i>Isaria farinosa</i> .	52

Capítulo 4

- Tabela 1.** Emergência de moscas de *Haematobia irritans* de bolos fecais contendo conídios microencapsulados ou *in natura* do isolados E9 de *Metarhizium anisopliae*. 80
- Tabela 2.** Moscas de *Haematobia irritans* encontradas nos bovinos, após quatro pulveizações dos animais com suspensão de conídios do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae*. 84

FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DA MOSCA-DOS-CHIFRES *Haematobia irritans* EM LABORATÓRIO E CAMPO

RESUMO - A mosca-dos-chifres *Haematobia irritans* é um dos principais ectoparasitos associados a bovinos em pastagens. O presente trabalho objetivou analisar a ação patogênica dos isolados E9, IBCB425 e IBCB159 do fungo *Metarhizium anisopliae*, JAB06, JAB07 e AM09 de *Beauveria bassiana*, IBCB133 e CB75 de *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) e CG189 e CG195 de *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) para a mosca-dos-chifres *H. irritans* em laboratório e campo. Avaliou-se em laboratório, a ação de todos os isolados dos fungos sobre ovos, larvas, pupas e adultos. Grupos de 30 ovos foram inoculados com suspensões fúngicas, e colocados sobre papel de filtro esterilizado, em 5 g de fezes bovinas frescas, acondicionadas em tubos de plástico. No ensaio com larvas, pedaços de papel filtro esterilizado contendo na superfície grupos de 30 ovos foram colocados sobre 5 g de fezes bovinas frescas, contidas em tubos de plástico, às quais incorporaram-se diversas concentrações de conídios mg fezes^{-1} . No ensaio com ovos e larvas, o término do experimento ocorreu com a emergência dos adultos. Grupos de 20 pupas foram imersas por 60 segundos em suspensão do fungo, e colocadas em placas de Petri. Após a emergência, os adultos foram transferidos para gaiolas de isopor pequenas. Para o ensaio com adultos, grupos de 30 adultos foram separados e pulverizados com 0,3 mL das suspensões de conídios. Doze horas após, as moscas foram transferidas para gaiolas de isopor e avaliadas diariamente até o 15º dia. Para todos os ensaios, foram utilizadas suspensões contendo 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL^{-1} . O isolado que promoveu os melhores resultados nos ensaios anteriores, foi usado em um experimento de campo para avaliar a ação fúngica em larvas e adultos de *H. irritans* em bovinos naturalmente infestados. Para o controle de larvas, foi oferecido aos bovinos conídios de *M. anisopliae* isolado E9, microencapsulados em peletes de alginato ou *in natura* crescidos em arroz, na proporção de 2×10^{10} conídios por animal. Para o controle de adultos, bovinos

foram pulverizados com 3 L de suspensão contendo 3×10^{10} conídios mL^{-1} . Amostras de fezes e massas fecais inteiras foram coletadas para a avaliação de unidades formadoras de colônias (UFCs) e determinação do número de adultos de *H. irritans* emergidos das massas. Os bovinos pulverizados foram fotografados diariamente para contagem do número de moscas. Entre os isolados de *M. anisopliae* que foram patogênicos ao inseto, IBCB159 diminuiu a sobrevivência de larvas eclodidas de ovos tratados e a mortalidade total foi afetada pela ação de todos os isolados do fungo; no ensaio com larvas, E9 promoveu 100% de mortalidade na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} ; IBCB425 e E9 ocasionaram a morte de pupas nas concentrações de 10^7 e 10^8 conídios mL^{-1} , e novamente o isolado E9, no ensaio com adultos, causou mortalidade de 100% na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} . Não foi observada ação de *B. bassiana* tanto para ovos como para larvas do inseto; no ensaio com pupas, JAB07 e AM09, promoveram mortalidade na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} , e todos os isolados de *B. bassiana* promoveram morte de 100% das moscas no ensaio com adultos. Ambos os isolados de *I. fumosorosea* promoveram significativa ($P < 0,05$) mortalidade de ovos em todas as concentrações de conídios utilizadas. CG195 de *I. farinosa* incrementou a mortalidade de larvas e pupas vindas de ovos tratados e no ensaio com larvas, promoveu significativa mortalidade das mesmas em todas as concentrações de conídios. Com exceção de IBCB133, os isolados de *I. fumosorosea* e *I. farinosa* foram os mais efetivos na mortalidade de pupas, tendo o isolado CG195 ocasionado o maior número de mortes (56,6%) na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} ; no entanto, os isolados de *Isaria* foram menos efetivos no controle de adultos. No ensaio em campo, a emergência de moscas no tratamento com conídios microencapsulados do fungo, foi significativamente menor (11,6), quando comparado aos tratamentos com *M. anisopliae in natura* (27,9) e controle (29,5). A pulverização do fungo diminuiu a infestação de moscas nos bovinos após a segunda, terceira e quarta pulverização.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Isaria farinosa*, microencapsulação.

ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR LABORATORY AND FIELD CONTROL OF THE HORN FLY *Haematobia irritans*

SUMMARY – Horn fly *Haematobia irritans* is one of the main ectoparasites associated to cattle on pastures. The present work had the objective of analyzing the pathogenic action of the isolates E9, IBCB425 and IBCB159 of the fungus *Metarhizium anisopliae*, JAB06, JAB07 and AM09 of *Beauveria bassiana*, IBCB133 and CB75 of *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) and CG189 and CG195 of *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) for horn fly *H. irritans*, in laboratory and field conditions. The action of all the fungi isolates over the eggs, larvae, pupae and adults were evaluated in laboratory. Groups of 30 eggs were inoculated with fungal suspensions and placed over sterilized filter paper on top of 5 g of fresh bovine feces, put in plastic tubes. In the larvae assay, peaces of sterilized filter paper, containing groups of 30 eggs on the surface, were placed over 5 g of fresh bovine feces, contained in plastic tubes, in which different concentrations of conidia mg feces^{-1} were incorporated. In the eggs and larvae assay, the end of the experiment matched the emergence of the adults. Groups of 20 pupae were immersed for 60 seconds in the fungus suspension and placed on Petri dishes. After the emergence, the adults were transferred to small Styrofoam cages. In the adults assay, groups of 30 adults were separated and pulverized with 0,3 ml of the conidia suspensions. After twelve hours, the adults were transferred to Styrofoam cages and the evaluations were done daily until the 15th day. Suspensions containing 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia ml^{-1} were used for all the assays. The isolate that promoted best results on the previous assays was used in a field experiment, where the fungal action on larvae and adults of *H. irritans*, on naturally infested bovines, was evaluated. For the larvae control conidia of the E9 isolate of *M. anisopliae*, microencapsulated in alginate pellets or *in natura* grew on rice, were given to the bovines in the proportion of 2×10^{10} conidia per animal. For de adult control, the bovines were pulverized with 3 l of the suspension containing 3×10^{10} conidia ml^{-1} . Excrements samples and bovine manure were collected for evaluation

of the colonies forming units (CFU) and the number of *H. irritans* emerged from the feces. The pulverized bovines were photographed daily for the number of flies counting. Among the *M. anisopliae* isolates that were pathogenic to the insect, IBCB159 decreased the survival of larvae emerged from treated eggs and the total mortality was affected by the action of all the fungus isolates. In the larvae assay, E9 promoted 100% of mortality with the concentration of 10^8 conidia ml^{-1} . IBCB425 and E9 caused pupae mortality with the concentrations of 10^7 and 10^8 conidia ml^{-1} and once again, in the adult assay, the isolate E9 caused 100% of mortality with the concentration of 10^8 conidia ml^{-1} . The action of *B. bassiana* was not shown in either the insect eggs or larvae; in the pupae assay, JAB07 and AM09 promoted mortality with the concentration of 10^8 conidia ml^{-1} and all *B. bassiana* isolates caused 100% mortality of the flies in the adult assay. Both *I. fumosorosea* isolates proportionated significant ($P < 0,05$) egg mortality with all the tested conidia concentration. *I. fumosorosea* CG195 increased the mortality of larvae and pupae from treated eggs and, in the larvae assay, promoted significant mortality with all conidial concentration. With the exception of IBCB133, the isolates of *I. fumosorosea* and *I. farinose* were the most effective in pupae mortality, distinguishing the isolate CG195 that proportionated the biggest mortality (56,7%) with the concentration of 10^8 conidia ml^{-1} ; However, the isolates of *Isaria* were less efficient on the adults control. In the field experiment, the emergence of the flies, with the microencapsulated fungus conidia, was significantly lower (11,7), when compared to the treatments with *M. anisopliae in natura* (27,9) and control (29,5). After the second, third and fourth fungus pulverization the bovine infestation by the fly decreased.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Isaria farinosa*, microencapsulation.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo, e em relação as exportações de carne bovina e couro em 2003, canalizou-se para o país US\$ 1,51 e US\$ 2,47 bilhões, respectivamente (ANUALPEC, 2004). Em 2004 a exportação de couro cresceu algo em torno de 4 milhões de peças (ANUALPEC, 2005). Com o intenso crescimento das exportações de carne bovina desde 2000, o Brasil em 2004, ocupou a posição de maior exportador mundial, abrindo uma vantagem de mais de 1 milhão de toneladas em relação aos Estados Unidos, historicamente o líder neste comércio (ANUALPEC, 2005) e Em 2005 por mais um ano consecutivo o País continuou na liderança (ANUALPEC, 2006). Segundo ANUALPEC, 2008, a demanda internacional de carne bovina continua crescendo e esse ritmo evoluirá de 7,7 milhões de toneladas negociadas em 2007, para aproximadamente 10 milhões, em 2017.

No entanto, os prejuízos causados pelos principais ectoparasitos do rebanho bovino brasileiro, podem exceder a US\$ 2 bilhões por ano. Entre estes parasitos, destaca-se a mosca-dos-chifres *Haematobia irritans*, que representa um prejuízo anual, segundo estimativas feitas por GRISI et al. (2002), de US\$ 150 milhões para a pecuária nacional de bovinos. A mosca-dos-chifres tem causado danos e muita preocupação na pecuária mundial (LIMA et al., 2002). Os prejuízos econômicos decorrem da perturbação que demonstram os bovinos parasitados, fator que interfere na produtividade animal (MARTINS et al., 2002).

O controle de *H. irritans* se baseia quase que exclusivamente na aplicação de inseticidas químicos, o que conduz inevitavelmente, a uma seleção de indivíduos resistentes, diminuindo a eficiência do controle (BARROS et al., 2002). Além disso, o tratamento com esses químicos também tem ocasionado impacto sobre os inimigos naturais deste inseto (COOK & GERHARDT, 1977), pois não atingem somente o alvo do ataque, mas também organismos não alvos como os parasitóides, predadores (MARCHIORI et al., 2001a) e microrganismos responsáveis pela redução natural das populações da mosca.

Devido aos fatores mencionados, cresce a necessidade de estudos para se estabelecer métodos biológicos de controle, que mantenham a população de *H. irritans*, abaixo do nível de dano econômico sem ocasionar possíveis desequilíbrios ambientais.

É ampla a diversidade de microrganismos que estão presentes no ambiente. Entre estes estão os fungos entomopatogênicos que se destacam por ocorrerem naturalmente sobre insetos, em vários estádios do seu ciclo de vida, incluindo pragas importantes (ALVES, 1998).

Vários trabalhos têm relatado a eficiência destes entomopatógenos sobre dípteros como a e a e a mosca-doméstica (BARSON et al., 1994) e a mosca-das-frutas (CASTILLO et al., 2000; MOCHI et al., 2006). Os primeiros estudos sobre a patogenicidade destes fungos para a mosca-dos-chifres foram recentemente publicados (ANGEL-SAHAGÚN et al., 2005; LOHMEYER & MILLER, 2006), mas vários aspectos deste fenômeno precisam ser ainda melhor conhecidos.

O presente trabalho investigou em laboratório a ação de isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* e *I. farinosa* para os estágios de ovo, larva, pupa e adulto da mosca-dos-chifres. Em condições de campo, avaliou-se a eficiência do controle de larvas da mosca oferecendo aos animais, junto as refeições diárias, conídios do fungo microencapsulados em grânulos de alginato ou *in natura* veiculados em arroz, e também avaliou-se o controle de adultos de *H. irritans* em bovinos, por meio de pulverização do fungo sobre os animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) e *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) pertencem à classe Deuteromycetes, família Moniliaceae, se caracterizam por atacar uma grande variedade de insetos, podendo ser facilmente encontrados nos solos, por terem uma ampla distribuição na natureza (ALVES, 1998).

O ciclo biológico destes fungos apresenta duas fases distintas, uma parasitária e outra saprofítica. A parasitária se inicia com a adesão de estruturas infectivas do fungo, conídios, hifas e blastosporos, na epicutícula do inseto, seguida de penetração via tegumento que ocorre devido à ação física e enzimática, sob condições favoráveis de umidade e temperatura. Após a penetração, o fungo cresce dentro do hospedeiro secretando substâncias e colonizando todos os tecidos. Em seguida, ocorre a extrusão do patógeno formando conidióforos onde são originados os conídios que são dispersos pelo ar ou por meio de outros fatores de dispersão. A fase saprofítica ocorre no ambiente quando o fungo cresce fora do corpo do hospedeiro (ALVES, 1998).

O primeiro trabalho de controle microbiano foi realizado em 1879, usando o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* para o controle de larvas de um curculionídeo, importante praga da beterraba. Acredita-se que esse patógeno ocorre em mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens, incluindo pragas de importância econômica. A espécie *B. bassiana*, é a mais freqüente sobre insetos e amostras de solo, com ocorrência generalizada em todos os países. O gênero *Beauveria* ocorreu em mais de 200 espécies de insetos e ácaros, incluindo carrapatos. O fungo *Isaria* (= *Paecilomyces*) reúne diversas espécies, entre elas, algumas podem atacar nematóides de plantas; este gênero é conhecido por causar o chamado muscardine amarelo em insetos (ALVES, 1998).

Inúmeros trabalhos são encontrados na literatura com a utilização destes patógenos para o controle de pragas de importância agrícola e veterinária. Atualmente, está ocorrendo um expressivo aumento de pesquisas que visam melhorar o processo de produção e desenvolver formulações que mantenham estes agentes em condições de uso por longo tempo.

2.2 A mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*)

O Brasil é um país de clima predominantemente tropical e subtropical úmido, com 8 milhões de Km² de dimensão continental, que apresenta características altamente favoráveis à ocorrência de doenças parasitárias causadas por parasitos internos e

externos que podem determinar elevadas taxas de mortalidade e morbidade (GRISI et al., 2002).

Dentre os ectoparasitos que ocorrem em bovinos no Brasil, se destaca a mosca-dos-chifres *Haematobia irritans* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae) que exerce hematofagia sobre bovinos, e segundo BIANCHIN & ALVES (2002), pode atacar também bubalinos, eqüinos e animais silvestres como o cervo, mas raramente ataca o cão, o ovino e o homem.

A mosca-dos-chifres é de cor preta, semelhante à mosca do estábulo, com comprimento do corpo em torno de três a cinco milímetros. Possui aparelho bucal ou probóscide, do tipo picador e projetado entre os longos palpos, sendo estes dilatados na extremidade distal. É originária da Europa, onde foi identificada em 1758, chegando nos Estados Unidos em 1886, através de bovinos importados. No Brasil sua ocorrência foi registrada em Roraima, no início da década de 80 (VALÉRIO & GUIMARÃES, 1983), entretanto, há relatos de sua presença em Roraima desde 1976. Atualmente está distribuída no Brasil, na Argentina e em outros países próximos (MARCONDES, 2001).

A mosca adulta, de ambos os sexos, se alimenta exclusivamente de sangue e permanece no animal dia e noite. O acasalamento é único e ocorre no próprio animal, principalmente nas partes mais altas como costas e cupim. Após a fecundação as fêmeas se deslocam para partes mais baixas, como barriga e pernas, e esperam o hospedeiro ou um vizinho próximo defecar. Quando isso acontece as moscas voam rapidamente e depositam seus ovos, em grupos de 10 a 20, na borda da massa fecal e em poucos minutos retornam ao hospedeiro novamente (HONER et al., 1993).

As fêmeas colocam os ovos na massa fecal até 10 a 15 minutos após o animal ter defecado, e passado este período, as fezes perdem a atratividade para o inseto (BIANCHIN & ALVES, 2002). É nas massas fecais recém-depositadas que ocorre o desenvolvimento larval, com três ínstaes, e a empupação se dá no solo até a emergência dos adultos (BARROS, 2002).

As fezes bovinas são consideradas unidades ecológicas, isso por suportarem uma fauna de dípteros bastante diversificada, com espécies coprófagas, predadoras e parasitas de outras espécies. Estes dípteros são atraídos devido a disponibilidade de alimento, e pela presença de abrigo (MACEDO et al., 2001).

Seu ciclo de desenvolvimento é rápido, mas depende da temperatura, umidade e composição da massa fecal. Durante o inverno, época seca há uma tendência de que o ciclo se prolongue, ou até mesmo se interrompa, o que denomina-se diapausa (MENDES & LINHARES, 1999). O estágio do ciclo de vida da mosca que apresenta maior variação é o que se desenvolve na massa fecal, isso devido a diversidade em relação à composição, temperatura e umidade, interferindo diretamente nas larvas que ali se encontram.

O período de vida de uma fêmea pode ser de até 40 dias, produzindo entre 80 a 300 ovos, dependendo das condições locais, pode variar de 80 a 300 ovos (HONER et al., 1993). O período de ovo a ovo depende do desenvolvimento do inseto nas massas fecais e também do período de pré-oviposição, que varia de um a dois dias após a emergência dos adultos (LYSYK, 1991).

Em um experimento que objetivou avaliar o desenvolvimento de *H. irritans* em massas fecais de bovinos, coletadas e mantidas em laboratório, BARROS (2002) observou que o período mínimo para desenvolvimento do inseto nas fezes, até o início da emergência, é de nove dias em temperatura entre 27,3 e 30,2°C. PALMER et al. (1981) obtiveram resultados semelhantes, ao verificarem um período de desenvolvimento de 9,6 dias em temperatura constante de 27 °C. O período máximo para início da emergência pode ser de 17 dias no inverno (julho) a temperatura ambiente máxima de 19,4 °C (BARROS, 2002).

2.3 Prejuízos causados

As picadas de *H. irritans* causam perda de sangue e irritação, já que cada mosca pode picar até 40 vezes por dia. Uma infestação média de 500 moscas/animal leva à perda de cerca de 60 mL de sangue/dia e de 40 Kg de peso vivo/ano (MARCONDES, 2001).

Estes prejuízos econômicos decorrem da perturbação que demonstram os bovinos mais intensamente parasitados, interferindo no descanso, alimentação e conseqüentemente na produtividade animal (MARTINS et al., 2002).

Em um estudo realizado por BIANCHIN et al. (2004) onde se avaliou o efeito da mosca no ganho de peso de bovinos da raça Nelore, concluiu-se que mesmo com reduzidas infestações, a mosca causa prejuízo e a sua presença ou ausência é mais importante do que a intensidade de infestação, indicando que os animais não toleram a simples presença do inseto.

Além disso, altas infestações de mosca em bovinos têm gerado consideráveis prejuízos na indústria do couro. Isso porque a pele, com grande número de picadas e infecções secundárias fica espessa, ocorrendo endurecimento e perda de valor (GUGLIELMONE et al., 1999).

2.4 Métodos de controle

O controle de *H. irritans* se baseia, quase que exclusivamente, na aplicação de inseticidas químicos, pertencentes aos grupos dos piretróides e organofosforados, sendo estes usados também para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Assim, segundo BARROS et al. (2002), estratégias com enfoque para o controle de um só parasito, devem considerar a possibilidade de efeito negativo sobre outro, acelerando o surgimento de resistência. Os mesmos autores comentam ainda, que a seleção de indivíduos geneticamente resistentes a um determinado inseticida, é devido ao uso contínuo e muitas vezes indiscriminado do mesmo.

Esta situação é irreversível, pois a não utilização de piretróides por períodos de 2 a 6 anos, não retorna a suscetibilidade da mosca aos mesmo (WEINZERL et al., 1990; GUGLIELMONE et al., 2002). Isto é um indicativo de que os indivíduos resistentes não têm o potencial biótico diminuído e os genes de resistência se mantêm em níveis elevados, mesmo com o passar do tempo.

Em áreas onde já foi constatada a resistência do inseto a piretróides, os produtores utilizam inseticidas organofosforados. No entanto, além de alguns destes produtos não poderem ser utilizados em vacas leiteiras (BARROS et al., 2002), estudos conduzidos durante os anos de 1991 a 1997 (BARROS et al., 1999) e de 1989 a 1998 (BARROS et al., 2001), diagnosticaram populações de *H. irritans* resistentes também a organofosforados.

O controle integrado é uma boa estratégia para diminuir a dependência do uso exclusivo de inseticidas químicos. Ele envolve mais de uma técnica para combater uma determinada praga, contribuindo para a conservação de seus inimigos naturais (ALVES, 1998).

Assim, um experimento cujo objetivo foi quantificar a população de *H. irritans* e identificar parasitóides que se desenvolvem em suas pupas, SERENO (2000) observou, em um período de dois anos, 10% de pupas parasitadas, sendo o parasitóide *Spalangia nigroaenea*, responsável por 95% deste parasitismo. Da mesma forma, MARCHIORI et al. (2001b) relataram a ocorrência do parasitóide *Paraganapis egeria* (Hymenoptera: Eucoilidae) em pupas da mosca na região neotropical, tendo constatado que de 718 pupas de *H. irritans* examinadas, duas apresentaram a emergência do parasitóide.

Alguns estudos foram realizados sobre a importância dos besouros coprófagos *Dichotomius anaglypticus* e *Onthophagus gazella* na destruição de massas fecais e suas conseqüências para o solo e para as plantas (GALBIATI et al., 1995). O besouro de origem africana *O. gazella* (atualmente *Digitonthophagus gazella*) foi incluído no Brasil, no programa de controle integrado de helmintos e da mosca-dos-chifres em 1989 (BIANCHIN et al., 1997). Introduzido em praticamente todos os estados, este predador tem mostrado boa adaptabilidade às condições brasileiras (BIANCHIN & ALVES, 2002). De acordo com BARROS et al. (2002) o uso de predadores para controle dos estádios de *H. irritans* no meio fecal dos bovinos, aparenta ser uma boa alternativa. No entanto, métodos alternativos de controle não têm ainda comercialização em massa, e por esse motivo os produtores recorrem ao uso dos inseticidas convencionais.

A mistura do alho (*Allium sativum*) no sal mineral ou ração animal foi uma técnica amplamente divulgada por jornais e televisão para o controle de endo e ectoparasitos. Devido a inexistência de trabalhos sobre este assunto, BIANCHIN et al. (1999) realizaram um estudo utilizando 2% de alho, dose máxima recomendada pelo ministério da agricultura, na formulação mineral do gado. Após o período de avaliação, os autores concluíram que as populações de *H. irritans* e *R. (B.) microplus* não foram reduzidas com a adição do alho, evidenciando a ineficiência desta suplementação para controle de parasitos. Além disso, sugere-se que a mudança na suplementação altera a

microbiota natural do animal (NORO et al., 2003), o que é desfavorável para o desenvolvimento e manutenção normal da atividade microbiana no rúmen.

2.4.1 Controle microbiano

Os agentes microbianos estão presentes no ambiente, principalmente no solo, integrando um ecossistema complexo, com uma grande variedade de microrganismos como nematóides, fungos e bactérias, importantes para a produção agrícola e animal. Um dos ramos do controle biológico de insetos é o microbiano, que visa a utilização racional dos patógenos, que podem ser aplicados puros ou na forma em que são produzidos. Porém, muitas vezes é preciso formulá-los, acrescentando determinados inertes e adjuvantes que contribuem no incremento da estabilidade, virulência e eficácia do agente, facilitam o manuseio e a aplicação, e permitem o armazenamento em condições que diminuem o custo com perda mínima da qualidade do produto (BATISTA FILHO et al., 1998).

Existem na literatura alguns trabalhos sobre o potencial da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* para o controle de *H. irritans* (TEMEYER, 1984; 1994). Em relação a ação de fungos entomopatogênicos STEENBERG et al. (2001) relataram a ocorrência natural de várias espécies de fungos sobre *H. irritans*, entre os quais se destacam *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*, em pastagens na Dinamarca. Mais, recentemente ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005) analisaram a suscetibilidade de ovos, pupas e adultos de *H. irritans* a isolados dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. fumosorosea* em condições de laboratório. Também, LOHMEYER & MILLER (2006), versaram sobre o emprego de formulações destes mesmos fungos para o controle de adultos da mosca. Estes trabalhos contribuíram para o conhecimento científico sobre o tema, mas muitos aspectos ainda são desconhecidos e precisam ser melhor investigados, para que se possa ter um avanço efetivo na utilização de fungos entomopatogênicos para o controle da mosca-dos-chifres.

Para combater *H. irritans*, uma estratégia a ser utilizada é atingir as moscas nos bovinos. No entanto, o fato do animal ficar exposto aos raios solares ocasionando altas temperaturas na superfície do couro seria um fator limitante para a viabilidade do fungo.

Mesmo assim, a pulverização de entomopatógenos em bovinos já vem sendo utilizada, embora seja ainda uma estratégia pouco explorada. Alguns trabalhos são encontrados na literatura descrevendo essa técnica para o controle do carrapato *R. (B.) microplus* (CORREIA et al., 1998; POLAR et al., 2005; ALONZO-DIÁZ et al., 2007) com resultados promissores, mas nada se sabe sobre o uso deste método para o controle de *H. irritans*.

Outra estratégia para controlar a mosca-dos-chifres consiste em atingir as fases que ocorrem nas massas fecais, introduzindo conídios de fungos patogênicos para o inseto nestas massas. Os processos digestivos que ocorrem em ruminantes são extremamente complexos, em consequência da presença da população microbiana no rúmen formada por bactérias, protozoários e fungos (NOGUEIRA FILHO et al., 2004), do pH do rúmen que varia (5,5 a 7,0). Aspectos como o tipo de alimentação que freqüentemente pode alterar o valor para 6,8 ou 6,9, do pH do abomaso que se mantém entre 1,6 a 2,5 (MERCHEN, 1988); da temperatura que pode variar de 38 e 42 °C devido ao processo fermentativo (ANDRIGUETTO et al., 1981), e outros fatores.

Alguns trabalhos descrevem técnicas que permitem a microencapsulação de conídios de fungos patogênicos de plantas (FRAVEL et al., 1985) e micélios de fungos patogênicos de insetos (PEREIRA & ROBERTS., 1990). Outros relatam a utilização de conídios microencapsulados de fungos nematófagos para o controle de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos e ovinos; os resultados destes trabalhos mostraram eficiência dos fungos, mesmo após passagem pelo trato gastrintestinal de ruminantes (ARAÚJO et al., 2004; GRAMINHA et al., 2005). Para entomopatógenos nada se sabe a esse respeito, mas o uso de fungos resistentes à passagem pelo trato gastrintestinal que sejam capazes de atingir ovos e larvas nas massas fecais, pode se constituir em uma importante estratégia para o controle da mosca-dos-chifres.

3. REFERÊNCIAS

ALONSO-DÍAZ, M. A.; GARCÍA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R. ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, 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, p.336–340, 2007.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.289-381.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; SOUZA, G. A. de; FILHO, A. B. Digestão: processos gerais e particulares por espécie animal. In: _____. **Nutrição animal**. 4. ed. São Paulo: NOBEL, 1981. p. 41-63.

ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMINGUEZ, O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VELÁZQUEZ, W. P.; SKODA, S.R.; FOSTER, J. E. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). **Journal of Insect Science**, Wallingfort, v.5, n.50, 2005.

ANUALPEC 2004: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & AgroInformativo, 2004. p. 56-58; 196-200.

ANUALPEC 2005: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP Instituto, 2005. p. 14-16; 27-28; 30.

ANUALPEC 2006: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP Instituto, 2006. p. 31-34.

ANUALPEC 2008: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP Instituto, 2008. p. 22-32.

ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; CAMPOS, A. K.; SÁ, N. C. de; SARTI, P.; ASSIS, R. C. L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the

nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p.457-463, 2004.

BARROS, A. T. M. de. Desenvolvimento de *Haematobia irritans* em massas fecais de bovinos mantidas em laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.2, p.217-221, 2002.

BARROS, A. T. M.; ALISON Jr, M. W.; FOIL, L. D. Evaluations of a yearly insecticidal ear tag rotation for control of pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.82, p.317-325, 1999.

BARROS, A. T. M.; OTTEA, J.; SANSON, D.; FOIL, L. D. Horn fly (Diptera: Muscidae) resistance to organophosphate insecticides. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.96, p.243-256, 2001.

BARROS, A. T.; GUGLIELMONE, A. A.; MARTINS, J. R. Mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*): control sustentable y resistencia a los insecticidas. **Documento RedEctopar**, p.1-10, 2002.

BARSON, G.; RENN, N.; BYWATER, A. F. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the House Fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 64, p. 107-113, 1994.

BATISTA FILHO, A.; ALVES, S. B.; ALVES, L. F. A.; PEREIRA, R. M.; AUGUSTO, N. T. Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.917-965.

BIANCHIN, I.; ALVES, R. G. O. Mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*: comportamento e danos em vacas e bezerros Nelore antes da desmama. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.109-113, 2002.

BIANCHIN, I.; ALVES, R. G. O.; KOLLER, W. W. Efeito de alguns carrapaticidas/inseticidas de aspersão sobre os adultos de *Onthophagus gazella* (F.). **Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v.22, p.116-119, 1997.

BIANCHIN, I.; GOMES, A.; DIAS-FEIJÓ, G. L.; CAMARGOS-VAZ, E. **Effectiveness of garlic (*Allium sativum* L.) powder in the control of cattle parasites**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 1999. p.30 (Boletim de Pesquisa, v.8).

BIANCHIN, I.; KOLLER, W. W.; ALVES, R. G. de O. Efeito da mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), no ganho de peso de bovinos Nelore. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p.885-890, 2004.

CASTILLO, M. A.; MOYA, P.; HERNÁNDEZ, E.; YÚFERA, E. P. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extract. **Biological Control**, London, v.19, p.274-282, 2000.

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**, San Diego, v.71, p.189-191, 1998.

COOK, C. W.; GERHARDT, R. R. Selective mortality of insects in manure from cattle fed racion and dimilin. **Environmental Entomology**, Lanham, v.6, p.46-48, 1977.

FRAVEL, D. R.; MAROIS, J. J.; LUMSDEN, R. D.; CONNICK Jr., W. J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. **Phytopathology**, Saint Paul, v.75, n.7, p.774-777, 1985.

GALBIATI, C.; BENSI, C.; CONCEIÇÃO, C. H. C.; FLORCOVSKI, J. F.; CALAFIORI, M. H. Estudo comparativo entre besouros do esterco *Dichotomius anaglypticus* (Mann., 1829) e *Onthophagus gazella* (F.), sobre as pastagens, em condições brasileiras. **Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v.20, p.109-118, 1995.

GRAMINHA, E. B. N.; COSTA, A. J. da.; OLIVEIRA, G. P.; MONTEIRO, A. C.; PALMEIRA, S. B. S. Biological control of sheep parasite nematodes by nematode trapping fungi: in vitro activity and after passage through the gastrointestinal tract. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v.21, n.5, p.717-722, 2005.

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.

GUGLIELMONE, A. A.; GIMENO, E.; IDIART, J. Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations in cattle. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.13, p.323-328, 1999.

GUGLIELMONE, A. A.; CASTELLI, M. E.; VALPAGNI, M. M.; ANZIANI, O. S.; MANGOLD, A. J. Dynamics of cypermethrin resistance in the field in the horn fly *Haematobia irritans*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.16, p.310-315, 2002.

HONER, M. R.; BIANCHIN, I.; GOMES, A. **Mosca-dos-chifres**: histórico biologia e controle. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1993. p.34. (Documento, 45).

LIMA, L. J. F.; PRADO, A. P.; PERRI, S. H. V. Localização preferencial e índice de infestação da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em bovinos da raça Nelore. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.22, n.1, p.25-32, 2002.

LOHMEYER, K. H.; MILLER, J. A. Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (DIPTERA:MUSCIDAE). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.99, n.6, p.1943-1947, 2006.

LYSYK, T. J. Use of life history parameters to improve a rearing method for horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), on bovine hosts. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v.123, n.6, p. 119-1209, 1991.

MACEDO, D. M. de.; BRITO, L. G.; MOYA BORJA, G. E. Emergência de *Haematobia irritans* em fezes bovinas no município de Seropédica, Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.21, n.2, p.77-80, 2001.

MARCHIORI, C. H.; OLIVEIRA, A. T. de.; LINHARES, A. X. Ecologia, comportamento e bionomia: Artrópodes associados a massas fecais bovinas no sul do Estado de Goiás. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, n.1, p.19-24, 2001a.

MARCHIORI, C. H.; MENDES, J.; LINHARES, A. X. First report of *Paraganaspis egeria* Díaz & Gallardo (Hymenoptera: Eucoilidae) parasiting horn fly, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae) in the southeastern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.2, p.1-2, 2001b.

MARCONDES, C. B. Moscas. In: _____. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001. Cap.8, p.125-156.

MARTINS, J. R.; VOLPOGNI, M. M.; CASTELLI, M. E.; GUGLIELMONE, A. A. Ação da doramectina injetável sobre *Haematobia irritans* em bovinos naturalmente infestados: resultados de observações simultâneas no Brasil e Argentina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.633-636, 2002.

MENDES, J.; LINHARES, A. X. Diapause, pupation sites and parasitism of the horn fly, *Haematobia irritans*, in south-eastern Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v.13, p.185-190, 1999

MERCHEN, N. R. Digestion, absorcion y excrecion en los ruminates. In: CHURCH, D. C. **El Rumiante: fisiología digestive y nutrición**. Zaragoza: ACRIBIA, 1988. p.191-223.

MOCHI, D. A., MONTEIRO, A. C., BORTOLI de, S. A., DORIA, H. O. S. BARBOSA. J. C. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p.382-389, 2006.

NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; OLIVEIRA, M. E. M. de; CUNHA, J. A. da; TOLEDO, L. R. de. Volume líquido e taxa de *turnover* no rúmen de Zebuínos e Bubalinos submetidos a dieta com volumosos e concentrados e sua relação com protozoários ciliados. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.5, n.1, p.1-7, 2004.

NORO, M.; WOSIACKI, S. R.; LEANDRO, M. A.; CECIM, M. Influência da suplementação com alho (*Allium sativum*) em pó na flora ruminal e no ganho de peso de cordeiros confinados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.5, p.647-649, 2003.

PALMER, W. A.; BAY, D. E.; SHARPE, P. J. H. Influence of temperature on the development and survival of the immature stages of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). **Protection Ecology**, Amsterdam, v.3, n.4, p.299-309, 1981.

PEREIRA, R. M.; ROBERTS, D. W. Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.56, p.39-46, 1990.

POLAR, P.; MURO, M. A.; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R. JOHN, S. A.; ROACH-BENN, C. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.134, n.1, p.159-167, 2005.

SERENO, F. T. P. de S. Pupas de mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, em massas fecais de bovinos Nelore no Pantanal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.8, p.1685-1688, 2000.

STEENBERG, T.; JENSEN, K. M. V.; JESPERSEN, J. B. Microbial control of flies on pastured cattle. **DJF-Rapport-Markbrug**, Tjele, v.49, p.87-90, 2001.

TEMEYER, K. B. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* in the Dipteran *Haematobia irritans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.47, n.5, p.952-955, 1984.

TEMEYER, K. B. Current research to develop the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* for horn fly control. **SAAS - Bulletin Biochemistry and Biotechnology**, Cookeville, v.7, p.1-6, 1994.

VALÉRIO, J. R.; GUIMARÃES, J. H. Sobre a ocorrência de uma nova praga, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae), no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v.1, n.4, p.417-418, 1983.

WEINZERL, R. A. SCHMIDT, C. D.; FAULKNER, D. B.; CMARIK, G. F.; ZINN, G. D. Chronology of permethrin resistance in southern illinois populations of the horn fly (Diptera: Muscidae) during and after selection by pyrethroid use. **Journal Economic and Entomology**, Lanham, v.83, p.690-697, 1990.

CAPÍTULO 2 – EFICIÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE OVOS E LARVAS DA MOSCA-DOS-CHIFRES *Haematobia irritans*

RESUMO – O presente trabalho objetivou avaliar a ação patogênica dos isolados E9, IBCB425 e IBCB159 do fungo *Metarhizium anisopliae*, JAB06, JAB07 e AM09 de *Beauveria bassiana*, IBCB133 e CB75 de *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) e CG189 e CG195 de *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) para ovos e larvas da mosca-dos-chifres *H. irritans*. Grupos de 30 ovos foram inoculados com suspensões contendo 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL^{-1} dos isolados fúngicos, e colocados sobre papel de filtro esterilizado, mantidos sobre 5 gramas de fezes bovinas frescas, acondicionadas em tubos de plástico. Após 48 horas, o papel de filtro foi retirado para determinação de ovos inviáveis. No ensaio com larvas, pedaços de papel filtro esterilizado contendo na superfície grupos de 30 ovos foram colocados, em tubos de plástico, sobre 5 g de fezes bovinas frescas, às quais incorporou-se 10^8 , 10^7 e 10^6 conídios mg fezes^{-1} . Para ambos os ensaios, a partir do quinto dia após a instalação, as pupas formadas foram retiradas dos frascos e transferidas para placas de Petri com algodão umedecido, mantidas em estufa a $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$. O término do experimento ocorreu com a emergência dos adultos. Os isolados de *M. anisopliae* não ocasionaram a morte de ovos de *H. irritans*, mas IBCB159 diminuiu a sobrevivência de larvas eclodidas de ovos tratados e a mortalidade total foi afetada pela ação de todos os isolados. No ensaio com larvas da mosca, o isolado E9 de *M. anisopliae* promoveu 100% de mortalidade na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} . Não foi observada ação de *B. bassiana* tanto para ovos como para larvas do inseto. Ambos os isolados de *I. fumosorosea* promoveram significativa ($P < 0,05$) mortalidade de ovos em todas as concentrações de conídios; o isolado CG195 de *I. farinosa* incrementou a mortalidade de larvas e pupas vindas de ovos tratados e promoveu significativa ($P < 0,05$) mortalidade de larvas tratadas com todas as concentrações de conídios, e ainda todos os isolados do gênero *Isaria* incrementaram a mortalidade total de *H. irritans*.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Isaria farinosa*, controle biológico.

CHAPTER 2 – EFFICIENCY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI TO EGGS AND LARVAE CONTROL OF THE HORN FLY *Haematobia irritans*

SUMMARY – The present study assessed the pathogenic effect of isolates E9, IBCB425 and IBCB159 of the *Metarhizium anisopliae* fungus, JAB06, JAB07 and AM09 of *Beauveria bassiana*, IBCB133 and CB75 of *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) and CG189 and CG195 of *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) against eggs and larvae of the horn fly *H. irritans*. Groups of 30 fly eggs were inoculated with suspensions containing 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia ml^{-1} of the fungal isolates and were then placed on sterile filter paper. These were then placed on 5 g of fresh bovine feces, accommodated in plastic tubes and observed after 48 hours to determine which eggs were not viable. In the larvae study, pieces of sterile filter paper with groups of 30 eggs on the surface were also placed over 5 g of fresh bovine feces, contained in plastic tubes, but these feces received treatments of 10^8 , 10^7 and 10^6 conidia mg^{-1} . In both studies, five days after initial procedures all formed pupae were taken from the containers and transferred to Petri dishes containing moist cotton which were placed in an incubator at $27 \pm 0,5$ °C. Finalization of the study came with the emergence of the adult flies. The *M. anisopliae* isolates did not cause the death of *H. irritans* eggs, although IBCB159 shortened survival rates of larvae emerged from treated eggs. Total mortality rates were affected by all of the fungal isolates. In the larvae study, the E9 *M. anisopliae* isolate promoted 100% mortality at 10^8 conidia mL^{-1} . *B. bassiana* did not show any effect on the insect's eggs or larvae. Both *I. fumosorosea* isolates promoted significant ($P < 0.05$) egg mortality at all conidia concentrations; the CG195 *I. farinosa* isolate enhanced mortality in larvae and pupae that resulted from treated eggs; it also promoted significant ($P < 0.05$) mortality rates in larvae treated with all conidia concentrations. Treatments with all the *Isaria* isolates intensified total mortality rates regarding *H. irritans*.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Isaria farinosa*, biological control.

1. INTRODUÇÃO

A mosca-dos-chifres *Haematobia irritans* é considerada um importante ectoparasito de gado nos Estados Unidos e em muitos outros países (LI et al., 2007), incluindo o Brasil (BARROS et al., 2007), causam prejuízos de milhares de dólares anualmente.

O controle deste ectoparasito é baseado principalmente no tratamento do bovino com inseticidas químicos, atingindo com isso apenas o adulto da mosca, mas o desenvolvimento de população do inseto resistente a esses produtos tem reduzido sua eficiência (OREMUS et al., 2006). Além de exercerem a ação tóxica para a qual foram aplicados, os produtos químicos podem afetar organismos que não foram alvos, tornando-se um elemento prejudicial para o ambiente (MOCHI et al., 2005).

A utilização de patógenos de insetos, como fungos, bactérias, vírus, protozoários e nematóides, para o controle de pragas, oferece algumas vantagens como a redução do uso intensivo de produtos químicos, a preservação do meio ambiente, e em alguns casos, a compatibilidade com outros métodos de controle.

Existem na literatura alguns trabalhos sobre o potencial da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (TEMEYER, 1984; 1994), e fungos entomopatogênicos (ANGEL-SAHAGÚN et al., 2005; LOHMEYER & MILLER, 2006) para o controle de *H. irritans*.

Adultos de *H. irritans* se alimentam exclusivamente do sangue do hospedeiro, preferencialmente bovinos, e a maior parte das fases de seu ciclo biológico ocorre nas fezes do mesmo, onde fêmeas acasaladas depositam seus ovos, as larvas se desenvolvem e empupam dando origem às moscas.

Uma das estratégias para controlar a mosca-dos-chifres consiste em atingir as fases que ocorrem nas massas fecais, pois afetando o inseto neste período, seu ciclo de vida pode ser interrompido deixando de trazer transtorno ao animal. Alguns trabalhos evidenciaram que os estádios de ovo (CASTILLO et al., 2000; ANGEL-SAHAGÚN et al., 2005) e de larvas (WATSON et al., 1995; LECUONA et al., 2005; MOCHI et al., 2006) de diferentes espécies de moscas são susceptíveis a ação patogênica de determinados fungos.

Neste contexto, devido à necessidade de encontrar alternativas de controle e o potencial que esses microrganismos apresentam como bioagentes de controle de insetos, o presente trabalho objetivou avaliar a ação de diferentes espécies, isolados e concentrações de fungos entomopatogênicos para as fases de ovo e larva da mosca-dos-chifres em laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fungos

Os fungos e seus respectivos isolados utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Isolados de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa*, usados nos ensaios com ovos e larvas da mosca-dos-chifres.

Fungos	Isolados	Origem (inseto, local)	Procedência
<i>Metarhizium anisopliae</i>	E9	<i>Deois flavopicta</i> - Espírito Santo	IB / Unicamp
	IBCB425	Lagarta - Iporanga, SP	IB / APTA / Campinas
	IBCB159	Solo - Cascavel, PR	IB / APTA / Campinas
<i>Beauveria bassiana</i>	JAB06	<i>Atta sexdens sexdens</i> - Jaboticabal, SP	FCAV / Unesp
	JAB07	<i>Musca domestica</i> - Jaboticabal, SP	FCAV / Unesp
	AM09	<i>Deois incompleta</i> - Manaus, AM	FCAV / Unesp
<i>Isaria fumosorosea</i>	IBCB133	Solo - Pariquera-Açu, SP	IB / APTA / Campinas
	CB75	-	IB / APTA / Campinas
<i>Isaria farinosa</i>	CG189	Solo - Brasília, DF	Cenargem / Embrapa
	CG195	<i>Chlosyne lacinia saundersi</i> - Londrina, PR	Cenargem / Embrapa

Estes entomopatógenos foram mantidos em culturas estoques, a 4°C em tubo de ensaio contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA). Para utilização nos ensaios os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio BDA, acondicionadas em estufa a $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por 20 dias. A viabilidade dos isolados foi

avaliada segundo metodologia descrita por FRANCISCO et al. (2005). Os testes foram realizados em lâminas de microscopia, cuja assepsia foi realizada com álcool 70%; após demarcação de três campos na face inferior, foram acondicionadas em placas de Petri, com alta umidade relativa, mantida por dois chumaços de algodão umedecidos com água destilada. Para não tocar o fundo da placa, sob cada lâmina dispôs-se dois palitos na posição horizontal. A superfície de cada lâmina foi então recoberta por 4 mL de meio de cultura BDA; em seguida, inoculou-se em cada campo uma gota (aproximadamente 0,05 mL) da suspensão de conídios. As placas foram mantidas a $27 \pm 0,5$ °C. Após 15 horas o processo de germinação foi interrompido, adicionando-se uma gota de corante (1 g de azul de metileno em 20 mL de ácido láctico transferindo-se, em seguida, 1 mL desta solução estoque para 29 mL de ácido láctico) em cada campo. Foram contados 150 conídios por campo, entre germinados e não germinados, obtendo-se a porcentagem de conídios viáveis. Os testes foram conduzidos com três repetições para cada isolado fúngico e as viabilidades obtidas foram maiores que 92%.

2.2 Preparo das suspensões

As suspensões de conídios foram obtidas a partir de colônias jovens dos fungos. Os esporos da superfície destas colônias foram transferidos assepticamente para tubos contendo uma mistura (1:1) de solução de NaCl a 0,89% (p/v) e solução de Tween 80[®] a 0,1% (v/v). Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, as suspensões foram quantificadas, com auxílio da câmara de Neubauer.

Para os ensaios com ovos de *H. irritans* obtiveram-se as concentrações de $1,2 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ dos isolados E9, IBCB425 e IBCB159 de *M. anisopliae*, de $1,3$, $1,7$ e $1,9 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ dos isolados JAB06, JAB07 e AM09 de *B. bassiana*, respectivamente, de $1,5$ e $1,2 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ dos isolados IBCB133 e CB75 de *I. fumosorosea*, respectivamente, e de $1,6 \times 10^8$ conídios mL⁻¹ dos isolados CG189 e CG195 de *I. farinosa*. Por diluição seriada, obtiveram-se as concentrações de 10^7 e 10^6 conídios mL⁻¹ de todas as suspensões anteriores.

Para os ensaios com larvas da mosca, as suspensões foram padronizadas em $2,0 \times 10^9$ conídios mL^{-1} para os isolados E9, IBCB425 e IBCB159 de *M. anisopliae* e JAB06, JAB07 e AM09, de *B. bassiana*. Para os isolados IBCB133 e CB75 de *I. fumosorosea* as concentrações foram de $1,9$ e $1,5 \times 10^9$ conídios mL^{-1} , respectivamente e de $1,8 \times 10^9$ conídios mL^{-1} para os isolados CG 189 e CG 195 de *I. farinosa*. Obtiveram-se as concentrações de 10^8 e 10^7 conídios mL^{-1} de todas as suspensões anteriores por diluição seriada e calcularam-se as quantidades necessárias para incorporar a 5 g de fezes bovina fresca de modo a obterem-se as concentrações de 10^8 , 10^7 e 10^6 conídios mg fezes^{-1} .

2.3 Coleta de *H. irritans*

Insetos adultos foram coletados na propriedade agropecuária denominada Sítio Córrego do Pavão, localizada no município de Borborema, SP. As coletas foram realizadas com o auxílio de uma rede entomológica passada no dorso do bovino, ou demais regiões onde as moscas estavam localizadas (Figura 1 A). Os insetos capturados foram confinados em sacos de plástico onde foi feita a oviposição (Figura 1 B). Os ovos foram coletados para realização dos ensaios.

2.4 Bioensaios

Em laboratório os ovos foram cuidadosamente retirados dos sacos de plástico com o auxílio de um pincel e separados em grupos de 30, sobre pedaços de papel de filtro esterilizado (10 mm de lado) e umedecido (Figura 1 C e D). Cada grupo recebeu oito gotas de uma das suspensões de conídios, num total de 0,5 mL por repetição. Após a inoculação, os ovos foram transferidos para outro pedaço de papel de filtro (10 mm de lado) esterilizado e umedecido, que foi colocado sobre 5 g de fezes bovina fresca com teor de umidade próximo ao ponto de saturação, contida em frascos de plástico (diâmetro de 30 mm) fechados com tecido de nylon com malha de 128μ (usado para rede de plâncton) (Figura 1 E). Esta medida foi necessária para que o fungo entrasse em contato com o inseto apenas em sua fase de ovo. Em seguida, os frascos foram

mantidos em estufa a $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Decorridas 48 horas, tempo necessário para eclosão das larvas, o papel de filtro foi retirado.

Para a contagem de ovos inviáveis, o papel de filtro retirado da superfície da massa fecal foi levado ao microscópio estereoscópico e com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo foram pressionados para observar se havia ou não ocorrido a eclosão da larva (Figura 1 F).

No bioensaio com larvas, um pequeno pedaço de papel de filtro esterilizado contendo 30 ovos, previamente separados, foi colocado na superfície de porção de 5 g de fezes bovina fresca (Figura 1 D e E) que recebeu conídios em quantidade suficiente para estabelecer as seguintes concentrações (10^8 , 10^7 e 10^6) de conídios dos isolados fúngicos por miligrama de fezes. Tais preparações foram feitas em frascos de plástico, fechados com tecido de nylon com malha de 128μ (usado para rede de plâncton), que foram mantidos em estufa a $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Depois de 48 horas o papel de filtro foi retirado.

Tanto no ensaio com ovos como com larvas, a partir do quinto dia após a instalação, diariamente os frascos foram abertos e as pupas formadas foram retiradas e transferidas para câmara úmida, constituída por placas de Petri (60 x 15 mm) contendo no interior um algodão umedecido, mantidas em estufa a $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. O término do experimento ocorreu com a emergência dos adultos.

2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Os ensaios foram realizados com três repetições, para cada isolado fúngico em cada uma das concentrações utilizadas. Em cada ensaio, houve um controle, no qual ovos foram inoculados e a massa fecal recebeu apenas o veículo da suspensão. Utilizou-se um esquema fatorial com dois fatores (isolados do fungo e concentração de conídios) *versus* testemunha. O delineamento foi o inteiramente casualizado (DIC) com grupos de 30 ovos e 30 larvas por repetição. A análise de variância foi realizada pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para execução da análise estatística utilizou-se o programa SAS, 1998.

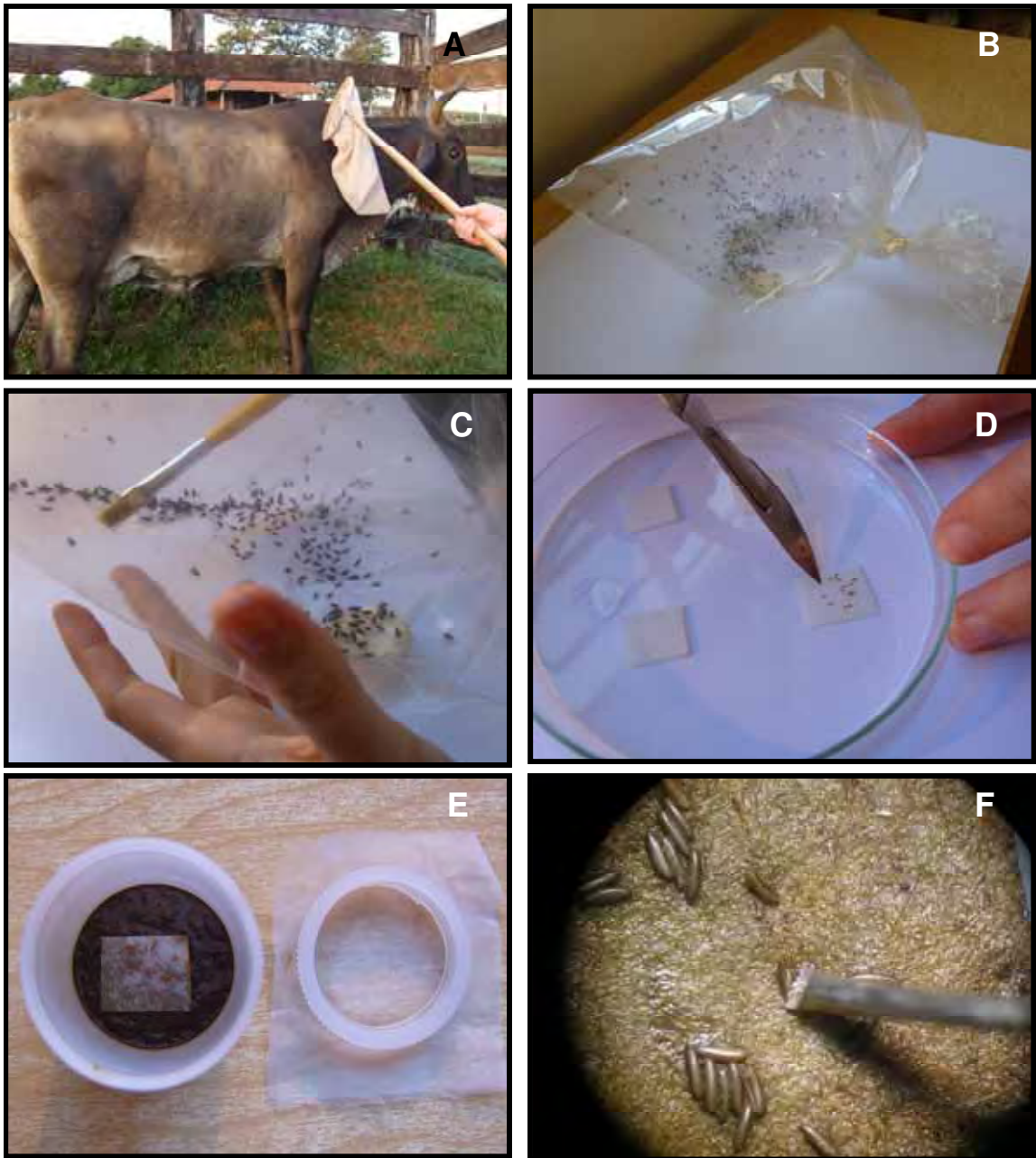


Figura 1. Obtenção de ovos e larvas de *Haematobia irritans*. **A:** coleta das moscas em bovinos; **B:** moscas confinadas em sacos de plástico para fazer oviposição; **C:** coleta de ovos com auxílio de pincel; **D:** colocação de grupos de ovos em papel de filtro; **E:** tubo de plástico contendo 5 g de fezes frescas e na superfície papel de filtro com ovos; **F:** contagem de ovos inviáveis em microscópio esterioscópico, com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ação de fungos entomopatogênicos para ovos de *H. irritans*

Não foi observada ação de *M. anisopliae* em ovos da mosca-dos-chifres, no entanto o isolado IBCB159 promoveu significativa ($P < 0,05$) mortalidade de larvas procedentes de ovos tratados. Embora IBCB425 tenha promovido 3,2 vezes mais mortes que o verificado no controle, não diferiu estatisticamente do mesmo (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade de *Haematobia irritans* após tratamento de ovos com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Metarhizium anisopliae*^a.

Fator analisado	Mortalidade (%)			
	Ovos	Larvas	Pupas	Total
Isolados do fungo (A)				
E9	11,5A	10,7B	11,5A	30,0A
IBCB425	7,8A	11,5AB	15,5A	31,1A
IBCB159	12,9A	19,9A	12,6A	28,1A
Teste F	0,32NS	3,94*	0,86NS	0,36NS
dms (5%)	8,6532	9,9542	8,7163	9,1287
Concentrações (B)				
10^6 conídios mL ⁻¹	8,9A	12,5A	11,4A	29,6A
10^7 conídios mL ⁻¹	7,8A	10,0A	13,3A	28,1A
10^8 conídios mL ⁻¹	15,5A	19,8A	15,0A	31,5A
Teste F	2,63NS	2,99NS	0,62NS	0,42NS
dms (5%)	8,6532	9,9542	8,7163	9,1287
Interação A X B	1,09NS	0,92NS	0,61NS	4,45**
Testemunha	3,3A	3,5B	14,1A	20,0B
Fatores	11,1A	14,5A	14,8A	31,9A
Testemunha X Fatores	3,65NS	6,17*	0,8NS	4,37*
C.V. (%)	46,98	40,29	30,34	15,33

^aMédias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\times/100$). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% e ** significativo a 1% de probabilidade.

A ação do fungo não foi observada em pupas, mas ao analisar a mortalidade total do inseto, verificou-se que os três isolados promoveram maior número de mortes que o obtido na testemunha. No entanto, por meio do desdobramento da interação entre os tratamentos e as diluições utilizadas, pode-se observar que o maior percentual de mortalidade (42,2%) foi promovido pelo isolado E9 na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹ (Tabela 3).

Os isolados de *M. anisopliae* não causaram a morte de ovos, mas possivelmente, afetaram o desenvolvimento das fases subseqüentes de seu ciclo de vida, pois foi observada a redução da sobrevivência total da mosca.

Tabela 3. Desdobramento da interação isolados *versus* concentrações, significativa para a mortalidade total de *Haematobia irritans* obtida a partir de ovos tratados com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Metarhizium anisopliae*^a.

Isolados	Concentrações (conídios mL ⁻¹)			Test F
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
E9	27,8ABa	20,0Ba	42,2Aa	6,44**
IBCB425	31,1Aa	30,0Aa	32,2Aab	0,60NS
IBCB159	30,0Aa	34,4Aa	20,0Ab	2,83NS
Test F	0,16NS	3,08NS	6,03**	

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\sqrt{x/100}$). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade.

A aplicação dos isolados JAB06, JAB07 e AM09 de *B. bassiana* em ovos de *H. irritans* não ocasionou a mortalidade desses ovos e não afetou a sobrevivência do inseto em nenhuma das fases do seu ciclo de vida (Tabela 4).

Os isolados IBCB133 e CB75 de *I. fumosorosea* promoveram significativa ($P < 0,05$) mortalidade de ovos de *H. irritans* em todas as concentrações de conídios utilizadas; CG 195 de *I. farinosa* foi efetivo no controle de larvas (33,3%), pupas (33,4%) e mortalidade total (55,5%) de *H. irritans*, causando significativa ($P < 0,01$) mortalidade na

concentração de 10^8 conídios mL^{-1} (Tabela 5). A inviabilidade de ovos e mortalidade de larvas ocasionadas pelo isolado CG189 não diferiu das observadas nos respectivos controles, mas foi cerca de duas vezes maior que as mesmas; tal fato foi também observado para a mortalidade de pupas e mortalidade total causados por CB75 (Tabela 5). Conforme Tabela 6, a mortalidade de pupas e a mortalidade total foram influenciadas pela concentração de conídios, obtendo-se maior número de morte em função do aumento da concentração de conídios.

Tabela 4. Mortalidade de *Haematobia irritans* após tratamento de ovos com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana*^a.

Fator analisado	Mortalidade (%)			
	Ovos	Larvas	Pupas	Total
Isolados do fungo (A)				
JAB06	7,4AB	5,5A	19,0A	29,3A
JAB07	6,3B	5,0A	14,3A	23,7A
AM09	11,5A	7,5A	12,6A	28,5A
Teste F	4,27*	1,12NS	2,19NS	1,87NS
dms (5%)	4,1725	5,1896	8,0015	8,3747
Concentrações (B)				
10^6 conídios mL^{-1}	8,1A	6,0A	15,0A	26,7A
10^7 conídios mL^{-1}	7,4A	5,5A	13,9A	24,8A
10^8 conídios mL^{-1}	9,6A	6,6A	17,1A	30,0A
Teste F	1,11NS	0,50NS	0,36NS	1,00NS
dms (5%)	4,1725	5,1896	8,0075	8,3747
Interação A X B				
Testemunha	5,5A	7,1A	13,9A	24,4A
Fatores	9,0A	6,8A	16,9A	29,9A
Testemunha X Fatores	1,25NS	0,40NS	0,04NS	0,29NS
C.V. (%)	28,29	52,01	26,24	15,68

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\times/100$). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% e ** significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 5. Mortalidade de *Haematobia irritans* após tratamento de ovos com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa*^a.

Fator analisado	Mortalidade (%)			
	Ovos	Larvas	Pupas	Total
Isolados do fungo (A)				
IBCB 133	15,2A	21,7B	23,15	49,2B
CB 75	14,1A	20,8B	27,0AB	50,7AB
CG 189	7,7AB	28,1AB	24,7B	45,9B
CG 195	4,4B	33,3A	33,4A	55,5A
Teste F	6,81**	6,22**	5,47**	7,59**
dms (5%)	7,8895	8,202	7,3416	5,3046
Concentrações (B)				
10 ⁶ conídios mL ⁻¹	8,8A	22,7B	22,1B	43,3C
10 ⁷ conídios mL ⁻¹	10,8A	25,2AB	26,9AB	50,5B
10 ⁸ conídios mL ⁻¹	11,4A	30,0A	32,4A	57,2A
Teste F	1,00NS	3,46*	9,68**	29,74**
dms (5%)	6,1879	6,4329	5,7582	4,1605
Interação A X B				
Testemunha	3,3B	13,3B	11,7B	23,3B
Fatores	10,6A	27,1A	28,1A	52,3A
Testemunha X Fatores	4,48*	9,70**	22,99**	114,04**
C.V. (%)	41,29	16,61	12,94	5,89

^aMédias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\sqrt{x/100}$). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% e ** significativo a 1% de probabilidade.

A eclosão das larvas de *H. irritans* ocorreu, em média, 15 horas após a postura. A germinação da maior parte (>90%) dos conídios de *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *I. farinosa*, é obtida 15 horas após a inoculação, enquanto para *B. bassiana* essa porcentagem é observada a partir de 18 horas de incubação.

Como os ovos foram inoculados em até seis horas após a postura, tempo necessário para manipulá-los, é possível que a eclosão das larvas ocorreu sem que houvesse tempo suficiente para que as hifas dos fungos penetrassem e colonizassem

os ovos, o que pode explicar a ausência de uma ação mais efetiva dos fungos na fase de ovo. Esta ação só foi evidenciada pelos isolados IBCB133 e CB75 que afetaram apenas os ovos, e por CG195 que promoveu a morte de larvas e pupas, incrementando a mortalidade total.

Tabela 6. Desdobramento das interações isolados *versus* concentrações, significativas para a mortalidade de pupas e para a mortalidade total de *Haematobia irritans*, após tratamento de ovos com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa*^a.

Isolados	Concentrações (conídios mL ⁻¹)			Test F
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
Mortalidade de pupas				
IBCB133	21,1Bab	16,0Bb	23,3Aa	7,21**
CB75	25,3Aa	23,6Aab	32,1Aa	1,73NS
CG189	10,7Bb	32,7Aa	30,9Aa	15,02**
CG195	31,2Aa	35,6Aa	33,3Aa	0,35NS
Test F	7,96**	7,10**	0,16NS	
Mortalidade total				
IBCB133	43,1Bb	41,1Bc	49,5Aa	8,53**
CB75	43,7Ba	43,1Bbc	49,5Aa	5,56**
CG189	30,3Ba	47,5Aa	49,5Aa	49,78**
CG195	46,9Aa	49,5Aab	48,2Aa	0,74NS
Test F	23,95**	6,69**	0,19NS	

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\sqrt{x/100}$). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade.

A atividade patogênica de isolados de *M. anisopliae* sobre ovos de *Ceratitis capitata* foi descrita por CASTILLO et al. (2000) ao observar redução de 40 a 50% na eclosão de larvas após tratamento de fêmeas. ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005) observaram redução entre 96,2 e 93,7 na emergência de adultos de *H. irritans* após

tratarem ovos com suspensões contendo 10^6 conídios mL^{-1} de cinco isolados de *M. anisopliae* e de *Isaria fumosorosea* e um de *B. bassiana*, entre nove, oito e dois isolados testados de cada espécie fúngica, respectivamente. Entretanto, o sucesso obtido por estes últimos autores no controle de ovos de *H. irritans* pode ser conseqüência da metodologia empregada, pois grupos de ovos foram colocados sobre 50 gramas de fezes bovina e em seguida pulverizados com 4 mL da suspensão fúngica. Assim, é possível que grande parte da mortalidade do inseto tenha ocorrido pela contaminação de larvas, quando essas eclodiram dos ovos, e não pela ação direta dos fungos sobre os ovos de *H. irritans*. No presente trabalho, resultados distintos dos obtidos pelos autores foram encontrados para *B. bassiana*, no entanto três isolados de *M. anisopliae* e todos do gênero *Isaria* foram capazes de afetar a sobrevivência do inseto em alguma das fases de seu ciclo de vida.

Neste sentido ao se analisar três metodologias de exposição de ovos de *Stomoxys calcitrans* a um isolado de *M. anisopliae*, MORAES (2007) constatou que na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} , ocorreu 100% de inviabilidade dos ovos, quando estes foram imersos em suspensão fúngica ou quando acondicionados em dieta onde se gotejou a suspensão. Contudo, resultados divergentes foram relatados por YOSHIDA (2007) que não observou efeito significativo no percentual de eclosão de larvas após tratar ovos de *Chysomya putoria* com isolados de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *I. fumosorosea*. As observações destes autores, aliadas aos resultados do presente trabalho, sugerem que alguns fungos entomopatogênicos possuem potencial para o controle de ovos de algumas espécies de moscas, porém mais estudos serão necessários para melhor evidenciar esta ação.

3.2 Ação de fungos entomopatogênicos para larvas de *H. irritans*

O isolado E9 de *M. anisopliae* promoveu significativa ($P < 0,01$) mortalidade de *H. irritans* nas fases de larva, pupa e mortalidade total na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} . Os isolados IBCB425 e IBCB159 causaram mortalidade de larvas 4,6 e 5,0 vezes, respectivamente, maiores que o observado no controle, e do mesmo modo, as mortalidades totais foram 2,5 e 2,3 vezes maiores, mas em ambos os casos não

diferiram estatisticamente dos controles (Tabela 7). Por meio do desdobramento da interação entre tratamentos e as diluições usadas, significativa para a mortalidade de larvas, verifica-se que o isolado E9 na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} foi mais efetivo promovendo 100% de mortalidade do inseto (Tabela 8). Novamente, como já obtido para a fase de ovo, os isolados de *B. bassiana* não mostraram nenhuma ação para larvas da mosca-dos-chifres (Tabela 9).

Tabela 7. Mortalidade de *Haematobia irritans* após tratamento de larvas com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Metarhizium anisopliae*^a.

Fator analisado	Mortalidade (%)		
	Larvas	Pupas	Total
Isolados do fungo (A)			
E9	50,4A	51,9A	52,6A
IBCB425	30,4B	19,8B	44,4B
IBCB159	33,3B	16,2B	41,1B
Teste F	19,65**	57,73**	40,49**
dms (5%)	10,9181	9,7014	5,8752
Concentrações (B)			
10^6 conídios mL^{-1}	21,8C	19,9B	37,7B
10^7 conídios mL^{-1}	32,2B	24,2B	37,4B
10^8 conídios mL^{-1}	60,0A	43,7A	63,0A
Teste F	56,80**	26,96**	136,91**
dms (5%)	10,9181	9,7014	5,8752
Interação A X B	28,31**	37,80*	118,33**
Testemunha	6,7B	11,8B	17,7B
Fatores	38,8A	30,6A	48,0A
Testemunha X Fatores	45,55**	15,10**	117,64**
C.V. (%)	16,28	18,66	7,02

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\times/100$). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% e ** significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 8. Desdobramento das interações isolados *versus* concentrações, significativa para a mortalidade de larvas de *Haematobia irritans*, após tratamento com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Metarhizium anisopliae*^a.

Isolados	Concentrações (conídios mL ⁻¹)			Test F
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
Mortalidade de larvas				
E9	13,3Ca	37,8Ba	100,0Aa	109,90**
IBCB425	24,4Aa	30,0Aa	36,7Ab	1,22NS
IBCB159	27,8Aa	28,9Aa	43,3Ab	2,28NS
Test F	2,95NS	0,72NS	72,59**	

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\sqrt{x/100}$). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade.

O isolado CG195 de *I. farinosa* promoveu significativa ($P < 0,05$) mortalidade de larvas em todas as concentrações de conídios testadas e para os isolados IBCB133 e CB75 de *I. fumosorosea* foi 1,7 vezes maior que a observada no controle, mas não diferiu estatisticamente da mesma (Tabela 9). Não foi observada ação dos fungos em pupas formadas a partir de larvas tratadas, no entanto a mortalidade total do inseto foi significativamente ($P < 0,01$) afetada por todos os isolados fúngicos em todas as concentrações utilizadas (Tabela 10).

Pelo desdobramento da interação entre isolados e concentrações, significativa para a mortalidade de larvas (Tabela 11), verifica-se que o maior número de mortes, promovido pelo isolado CG195, ocorreu na concentração de 10⁶ conídios mL⁻¹ (28,9), diferindo do resultado obtido para o isolado E9 de *M. anisopliae*, para o qual a concentração de 10⁸ conídios por mL⁻¹ foi a mais efetiva.

Resultados semelhantes aos observados no presente trabalho foram relatados por MOCHI et al. (2006) que após tratamento de larvas de *Ceratitis capitata* com o isolado E9 de *M. anisopliae* na concentração de 10⁸ conídios mL⁻¹, constataram diminuição na emergência de adultos. Entretanto, em contraste com os resultados obtidos no presente trabalho, LECUONA et al. (2005), observaram significativa mortalidade de larvas L3 de *M. domestica* após tratamento das mesmas com cinco isolados de *B. bassiana*.

Para promover a infecção das larvas, os conídios foram incorporados ao meio fecal, que além de ser um ambiente bastante complexo, possui uma grande diversidade microbiana natural que pode interferir negativamente na ação dos fungos. Contudo, esta metodologia foi empregada por ser a que mais se assemelha às condições de campo, onde as fêmeas depositam os ovos sobre fezes frescas de bovinos.

Tabela 9. Mortalidade de *Haematobia irritans* após tratamento de larvas com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana*^a.

Fator analisado	Mortalidade (%)		
	Larvas	Pupas	Total
Isolados do fungo (A)			
JAB06	10,4A	19,0A	27,4A
JAB07	9,6A	14,2A	22,6A
AM09	8,5A	20,3A	27,0A
Teste F	0,23NS	2,04NS	1,51NS
dms (5%)	5,7653	7,8683	7,7089
Concentrações (B)			
10 ⁶ conídios mL ⁻¹	9,6A	15,5A	23,7A
10 ⁷ conídios mL ⁻¹	8,1A	19,2A	25,9A
10 ⁸ conídios mL ⁻¹	10,7A	18,8A	27,4A
Teste F	0,71NS	0,74NS	0,67NS
dms (5%)	5,7653	7,8683	7,7089
Interação A X B			
Testemunha	7,8A	14,5A	21,0A
Fatores	10,4A	19,4A	28,0A
Testemunha X Fatores	0,22NS	0,73NS	1,54NS
C.V. (%)	27,51	20,72	14,37

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\times/100$). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% e ** significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 10. Mortalidade de *Haematobia irritans* após tratamento de larvas com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa*^a.

Fator analisado	Mortalidade (%)		
	Larvas	Pupas	Total
Isolados do fungo (A)			
IBCB 133	19,2AB	19,1A	34,8A
CB 75	18,9AB	21,7A	36,7A
CG 189	12,2B	21,7A	31,5A
CG 195	20,7A	19,5A	36,7A
Teste F	3,78*	0,29NS	1,87NS
dms (5%)	7,4683	9,3868	6,9733
Concentrações (B)			
10 ⁶ conídios mL ⁻¹	16,9A	18,3A	32,5A
10 ⁷ conídios mL ⁻¹	15,5A	23,1A	35,3A
10 ⁸ conídios mL ⁻¹	20,8A	20,0A	36,9A
Teste F	2,49NS	1,30NS	2,14NS
dms (5%)	5,8575	7,3622	5,4692
Interação A X B	3,32*	1,48NS	2,37NS
Testemunha	11,1B	14,7A	24,4B
Fatores	18,7A	21,7A	36,9A
Testemunha X Fatores	4,49*	1,92NS	11,20**
C.V. (%)	18,93	20,01	9,09

^aMédias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\sqrt{x/100}$). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% e ** significativo a 1% de probabilidade.

Usando metodologia semelhante, WATSON et al. (1995) verificaram que dois isolados de *B. bassiana* aplicados na concentração de 10¹⁰ conídios mL⁻¹, causaram 48 e 56% de mortalidade de larvas de *M. domestica*, quando estas foram adicionadas ao meio fecal contendo o fungo. Os isolados CG195 de *I. farinosa* e E9 de *M. anisopliae* promoveram 20,7 e 100% de mortalidade de larva, respectivamente, e ambos os gêneros fúngicos incrementaram a mortalidade total. Entretanto os resultados obtidos com *B. bassiana* para a mosca-dos-chifres divergem bastante dos obtidos por estes autores para a mosca doméstica. Possivelmente, esta divergência esteja relacionada a

especificidade dos isolados ao hospedeiro, e a variabilidade genética presente na espécie fúngica.

Tabela 11. Desdobramento da interação isolados *versus* concentrações, significativa para a mortalidade de larvas de *Haematobia irritans*, após tratamento com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa*^a.

Isolados	Concentrações (conídios mL ⁻¹)			Test F
	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
IBCB133	14,4Bb	14,4 Ba	28,9Aa	5,03*
CB75	15,5Aab	22,2Aa	18,9Aab	0,97NS
CG189	8,9Ab	13,3Aa	14,4Ab	0,90NS
CG195	28,9Aa	12,2Ba	21,1Bab	5,54**
Test F	5,85**	1,84NS	2,72NS	

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\sqrt{x/100}$). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade.

Assim, *I. fumosorosea* e *I. farinosa*, mas principalmente *M. anisopliae* se mostraram promissores agentes para o controle de *H. irritans*. A fase de larva mostrou ser a mais suscetível e as maiores concentrações de conídios foram as mais eficientes. Os resultados sugerem que a incorporação de conídios na massa fecal pode ser uma estratégia viável para obter o controle da mosca, mas ensaios de campo precisam ser conduzidos para melhor avaliação desta possibilidade.

4. CONCLUSÕES

1. Os fungos *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* e *I. farinosa* são patogênicos para ovos e larvas da mosca-dos-chifres, enquanto *B. bassiana* não afeta essas fases do ciclo da mosca.

2. Os ovos de *H. irritans* são mais suscetíveis ao isolado CG195 de *I. farinosa* e o isolado E9 de *M. anisopliae* é o mais eficiente para o controle de larvas do inseto.
3. A concentração de 10^8 conídios mL⁻¹ é a mais efetiva no controle de larvas e ovos de *H. irritans*.

5. REFERÊNCIAS

ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMINGUEZ, O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VELÁZQUEZ, W. P.; SKODA, S.R.; FOSTER, J. E. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). **Journal of Insect Science**, Wallingfort, v.5, n.50, 2005.

BARROS, A. T.; GOMES, A.; KOLLER, W. Insecticide susceptibility of horn flies, *Haematobia irritans* (DIPTERA: MUSCIDAE), in state of Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.16, n.3, p.145-151, 2007.

CASTILLO, M. A.; MOYA, P.; HERNÁNDEZ, E.; YÚFERA, E. P. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extract. **Biological Control**, London, v.19, p.274-282, 2000.

FRANCISCO, E. A.; MOCHI, D. A.; CORREIA, A. C. B.; MONTEIRO, A. C. Determination of growth media for the viability test of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, p.1309-1312, 2005.

LECUONA, R. E.; TURICA, M.; TABOCCO, F.; CRESPO, D. C. Microbial Control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected Strains of *Beauveria bassiana*. **Journal Medical Entomology**, Lanham, v.42, p.332-336, 2005.

LI, A. Y.; GUERRERO, F. D.; PRUETT, H. Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.87, p.147–155, 2007.

LOHMEYER, K. H.; MILLER, J. A. Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (DIPTERA:MUSCIDAE). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.99, n.6, p.1943-1947, 2006.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; BARBOSA, J. C. Action of Pesticides to *Metarhizium anisopliae* in Soil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.34, n.6, p.961-971, 2005.

MOCHI, D. A., MONTEIRO, A. C., BORTOLI de, S. A., DORIA, H. O. S. BARBOSA. J. C. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p.382-389, 2006.

MORAES, A.P.R. **Stomoxys calcitrans: Estabelecimento de colônia e efeito de *Metarhizium anisopliae* sobre seus estágios imaturos.** 2007. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

OREMUS, G.; GUERRERO, F. D.; ALISON Jr, M. W.; KIMBALL, M. M.; KIM, J. H.; FOIL, L. D. Effects of mid-season avermectin treatments on pyrethroid resistance in horn fly (Diptera: Muscidae) populations at three locations in Louisiana. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.141, p.156–164, 2006.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT** - User's Guide: statistic – version 6.12, Cary, 846p, 1998.

TEMEYER, K. B. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* in the Dipteran *Haematobia irritans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.47, n.5, p.952-955, 1984.

TEMEYER, K. B. Current research to develop the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* for horn fly control. **SAAS - Bulletin Biochemistry and Biotechnology**, Cookeville, v.7, p.1-6, 1994.

WATSON, D. W.; GEDEN, C. J.; LONG, S. J.; RUTZ, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). **Biological Control**, London, v.5, p.405-411, 1995.

YOSHIDA, L. **Atividade patogênica dos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* para *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae)**. 2007. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

CAPÍTULO 3 – AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE PUPAS E ADULTOS DA MOSCA-DOS-CHIFRES *Haematobia irritans*

RESUMO – O presente trabalho objetivou investigar a ação patogênica dos fungos *Metarhizium anisopliae* isolados (E9, IBCB425 e IBCB159), *Beauveria bassiana* (JAB06, JAB07 e AM09), *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (IBCB133 e CB75) e *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) (CG189 e CG195) para pupas e adultos de *H. irritans*. Grupos de 20 pupas foram imersas por 60 segundos em 10 mL de suspensão do fungo, e colocadas em placas de Petri. Após emergência, os adultos foram transferidos para gaiolas de isopor pequenas. Para o ensaio com adultos, moscas contidas em caixas de isopor foram mantidas a 0°C por três minutos, transferidas para câmara fria a 4°C, onde grupos de 30 adultos foram separados em recipientes de plástico e com o auxílio de um pequeno aspersor manual, pulverizadas com 0,3 mL das suspensões de conídios. Doze horas após, as moscas foram transferidas para gaiolas de isopor. Foram utilizadas suspensões contendo 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL⁻¹ dos isolados fúngicos. A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente até o 15º dia. Os isolados E9 e IBCB425 de *M. anisopliae* ocasionaram a morte de pupas nas concentrações de 10^7 e 10^8 conídios mL⁻¹, já os isolados JAB07 e AM09 de *B. bassiana*, promoveram maior mortalidade das pupas na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹. Com exceção de IBCB133, os isolados de *I. fumosorosea* e *I. farinosa* foram os mais efetivos na mortalidade de pupas, tendo o isolado CG195 ocasionado o maior número de mortes (56,7%) na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹. Os adultos da mosca foram mais suscetíveis à ação patogênica dos fungos, pois o isolado E9 de *M. anisopliae* e todos de *B. bassiana* causaram a morte de 100% das moscas na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹, já os isolados de *Isaria* foram menos efetivos no controle de adultos. Em ambas as fases do ciclo da mosca, mas principalmente na fase adulta, a ação patogênica foi maior quando se utilizaram as maiores concentrações de conídios.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Isaria farinosa*, mosca-dos-chifres, controle biológico.

CHAPTER 3 - ENTOMOPATHOGENIC FUNGAL ACTIVITY AGAINST PUPAE AND ADULT OF HORN FLY *Haematobia irritans*

ABSTRACT - These research investigated the pathogenic activity of *Metarhizium anisopliae* (E9, IBCB425 and IBCB159), *Beauveria bassiana* (JAB06, JAB07 and AM09), *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) (IBCB133 and CB75) and *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*) (CG189 e CG195) fungi isolates on pupae and adult *H. irritans*. Groups of 20 pupae were immersed for 60 seconds in 10mL of the fungal suspension and placed in Petri dishes. After emergence, the adults were transferred to small styrofoam cages. For the adult study, flies kept in styrofoam boxes were maintained at 0°C for three minutes and then transferred to a cold room at 4°C, where groups of 30 adults were separated into plastic containers and, using a small manual spray, sprayed with 0,3 ml of the conidia suspensions. Twelve hours later, the flies were transferred to styrofoam cages. Suspensions used contained 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia mL⁻¹ of the fungi isolates. The E9 and the IBCB425 *M. anisopliae* isolates caused pupae death at concentrations 10^7 e 10^8 conidia mL⁻¹, and the JAB07 and AM09 *B. bassiana* isolates caused higher pupae mortality at a 10^8 conidia mL⁻¹ concentration. Except for IBCB133, the *I. fumosorosea* and *I. farinosa* isolates were the most effective considering pupae mortality, with the CG195 inducing more deaths (56.7%) in the 10^8 conidia mL⁻¹ concentration suspension. Adult flies were more susceptible to the fungi's pathogenic action, since the E9 isolate of *M. anisopliae* and all of the *B. bassiana* induced death in 100% of the flies at the 10^8 conidia mL⁻¹ concentration suspension. The *Isaria* isolates, on the other hand, were less effective in controlling adult flies. In both stages, but mostly in the adult phase, the pathogenic action was more intense when higher conidial concentrations were used.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *Isaria farinosa*, horn fly, biological control.

1. INTRODUÇÃO

Entre os principais ectoparasitos do rebanho bovino, destaca-se a mosca-dos-chifres *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), que tem causado danos e preocupação na pecuária mundial. Nos EUA é considerada a maior causadora de prejuízos (BYFORD et al., 1992), sendo estes responsáveis pela perda de milhões de dólares (KUNZ et al., 1991), e no Brasil ocasiona a perda anual de US\$ 150 milhões para a pecuária de bovinos GRISI et al. (2002).

Estes prejuízos econômicos decorrem da perturbação que demonstram os bovinos parasitados, fator que interfere na produtividade animal. STEELMAN et al. (1991) estimaram que para cada 100 moscas em um animal, pode-se esperar uma diminuição de 8,1Kg no ganho de peso do animal durante o período de um ano. Grandes infestações da mosca em bovinos geram também prejuízos na indústria do couro; isso porque a pele, com grande número de picadas e infecções secundárias fica espessa, ocorrendo endurecimento e perda de valor (GUGLIELMONE et al., 1999).

O controle de *H. irritans* se baseia quase que exclusivamente na aplicação de inseticidas químicos o que conduz, inevitavelmente, a uma seleção de indivíduos resistentes, diminuindo a eficiência do controle (BARROS et al., 2002). Além disso, o tratamento com esses químicos tem ocasionado impacto sobre os inimigos naturais deste inseto (LIMARET & MARTINEZ, 2005), pois não atingem somente o alvo do ataque, mas também OUTROS organismos como os parasitóides, predadores e microrganismos responsáveis pela redução natural das populações da mosca.

É ampla a diversidade de microrganismos que estão presentes no ambiente. Entre estes, os fungos entomopatogênicos se destacam por ocorrerem naturalmente sobre mais de 300 espécies de insetos, em seus vários estágios de vida, incluindo pragas importantes (ALVES, 1998). Segundo o autor, a grande variabilidade genética desses fungos, permite selecionar isolados altamente virulentos, específicos ou não, com características favoráveis para utilização como bioagentes de controle de insetos.

Vários trabalhos têm relatado a eficiência destes entomopatógenos sobre dípteros, como a mosca-das-frutas (CASTILLO et al., 2000; MOCHI et al., 2006) e a mosca-doméstica (BARSON et al., 1994). STEENBERG et al. (2001) relataram a ocorrência

natural de fungos entomopatogênicos em adultos da mosca-dos-chifres em pastagem, mas os primeiros estudos sobre a sua patogenicidade foram publicados há poucos anos (ANGEL-SAHAGÚN et al., 2005; LOHMEYER & MILLER, 2006), e muitos aspectos deste fenômeno precisam ser ainda melhor investigados.

Devido a importância econômica deste ectoparasito e os prejuízos ambientais e de saúde pública resultantes do seu controle através de inseticidas químicos, cresce a necessidade de pesquisas para estabelecer métodos biológicos, que mantenham a população de *H. irritans* abaixo do nível de dano econômico, sem ocasionar desequilíbrios ambientais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de diferentes espécies, isolados e concentrações de fungos entomopatogênicos, em pupas e adultos de *H. irritans* em condições laboratoriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fungos

Foram utilizadas as espécies e isolados fúngicos já descritos na Tabela 1 do Capítulo 2. Estes entomopatógenos foram mantidos em culturas estoques a 4°C, em tubo de ensaio contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA).

2.2 Preparo das suspensões

Para utilização nos ensaios os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio BDA, acondicionadas em estufa a $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 20 dias. A viabilidade dos isolados, avaliada segundo metodologia descrita por FRANCISCO et al. (2005), foi sempre maior que 95%.

Os esporos da superfície das colônias foram transferidos assepticamente para tubos contendo uma mistura (1:1) de solução de NaCl a 0,89% (p/v) e solução de Tween 80[®] a 0,1% (v/v). Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, as suspensões foram padronizadas, com auxílio da câmara de Neubauer.

Para os ensaios com pupas de *H. irritans* obteve-se concentrações de conídios que variaram entre $1,2$ e $2,0 \times 10^8$ conídios mL⁻¹, e para os ensaios com adultos da

mosca, as suspensões foram padronizadas entre $1,1$ e $1,5 \times 10^8$ conídios mL^{-1} . Em ambos os ensaios e para todos os isolados, obtiveram-se as concentrações de 10^7 e 10^6 conídios mL^{-1} de todas as suspensões por diluição seriada.

2.3 Obtenção de *H. irritans*

Os insetos utilizados no experimento foram coletados em propriedade agropecuária, localizada no município de Borborema, Estado de São Paulo, Brasil. Para realização dos ensaios com pupas, coletaram-se adultos com o auxílio de uma rede entomológica, que foi passada no dorso do bovino ou demais regiões onde as moscas estavam localizadas (Figura 1 A). Os insetos capturados foram confinados em sacos de plástico onde foi feita a oviposição (Figura 1 B). Para obtenção das pupas, os ovos foram coletados nos sacos, com o auxílio de um pincel, e colocados em fezes bovinas, com teor de umidade próximo ao ponto de saturação, contidas em placas de Petri (60 x 15 mm) sem a tampa; estas placas foram acondicionadas dentro de placas maiores (90 x 15 mm) com tampa (Figura 1 C), mantidas a $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em estufa. Após cinco dias de incubação as larvas começavam a sair das fezes procurando um lugar seco (na placa maior) para empupar (Figura 1 D). Foram coletadas pupas formadas durante 48 horas, quando a quantidade das mesmas foi suficiente para instalação dos bioensaios.

Para o ensaio com adultos, as moscas foram coletadas como já descrito e mantidas por 12 h em caixas de isopor (340 x 225 x 306 mm) (Figura 1 E). Em um dos lados da caixa foi feita uma janela vedada com tecido *voile* e no lado oposto foi feita uma abertura circular vedada por uma manga de tecido *voile* para manipulação das moscas. Na parte superior da caixa, fez-se mais uma janela vedada com tela de *nylon* (malha 1 mm), sobre a qual foi oferecida dieta a base de sangue bovino fresco embebido em algodão revestido em parafilme, para evitar o ressecamento do líquido (Figura 1 F).



Figura 1. Obtenção de pupas e adultos do inseto. **A:** coleta das moscas em bovinos; **B:** moscas confinadas em sacos de plástico para ensaio com pupas; **C:** ovos colocados em fezes com alto teor de umidade, para o ensaio com pupas; **D:** coleta de pupa após cinco dias de incubação; **E:** moscas coletadas, confinadas em gaiolas de isopor para ensaio com adultos; **F:** sangue bovino fresco, embebido em algodão e revestido em parafilme, oferecido para as moscas.

2.4 Bioensaio com pupas de *H. irritans*

As pupas foram imersas por 60 segundos em 10 mL de suspensão do fungo; após retirar o excesso de umidade foram colocadas em placas de Petri (60 x 15 mm) sem tampa, contidas dentro de placas de Petri maiores (90 x 15 cm) com tampa e algodão umedecido entre as placas, mantidas em estufa a $27 \pm 0,5$ °C. Após emergência dos adultos, que ocorreu do 5^o ao 8^o dia de incubação, os mesmos foram transferidos para gaiolas de isopor pequenas (190 x 130 x 125 mm) confeccionadas como descrito no item 2.5, mantidas em sala climatizada, cuja temperatura variou entre 25 e 27°C no período experimental, e alimentados duas vezes ao dia, segundo metodologia descrita por BORJA (1992). As avaliações foram realizadas diariamente após a aplicação do fungo; pupas que não originaram adultos e adultos mortos após a emergência foram acondicionados em câmara úmida, constituída por placa de Petri com algodão umedecido, mantida em estufa a $27 \pm 0,5$ °C para observação da extrusão do patógeno. As avaliações foram realizadas até o 15^o dia após a emergência dos adultos.

2.5 Bioensaio com adultos de *H. irritans*

Moscas contidas em caixas de isopor (340 x 225 x 306 mm) foram mantidas a 0°C por três minutos para imobilização e depois transferidas para uma placa de Petri (150 x 10 mm) levada à câmara fria a 4°C (Figura 2 A), onde grupos de 30 adultos foram separados em recipientes de plástico. Em seguida, os recipientes foram retirados da câmara fria e com o auxílio de um pequeno aspersor manual, as moscas foram rapidamente pulverizadas com 0,3 mL das suspensões de conídios (Figura 2 B). Os recipientes de plástico foram então cobertos com tecido *voile* colocando-se algodão com água destilada e algodão saturado com sangue bovino sobre o mesmo. Os insetos da testemunha foram pulverizados apenas com o veículo das suspensões. Doze horas após a pulverização as moscas foram transferidas para gaiolas de isopor (190 x 130 x 125 mm) mantidas em sala climatizada, e alimentadas com sangue bovino, duas vezes ao dia, conforme já descrito (Figura 2 C e D). As avaliações foram realizadas diariamente, até o 15^o dia após a pulverização do fungo; moscas mortas foram

acondicionadas em câmara úmida mantida em estufa a $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para observação da extrusão do patógeno.

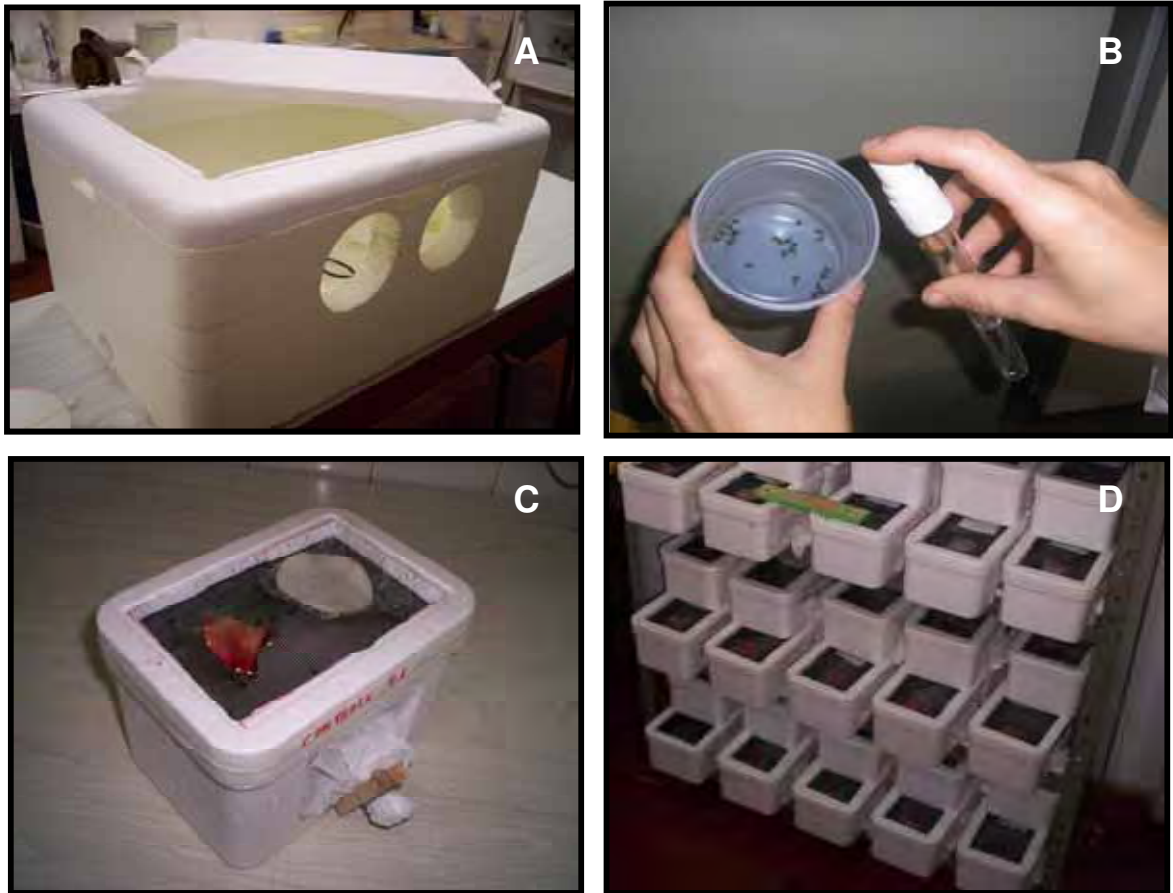


Figura 2. Bioensaio com adultos de *Haematobia irritans*. **A:** câmara fria usada para separação e contagem de moscas para o ensaio com adultos; **B:** pulverização de adultos; **C:** gaiolas de isopor onde moscas foram transferidas após 12 h da pulverização, **D:** gaiolas colocadas em sala climatizada alimentadas com sangue bovino, duas vezes ao dia.

2.6 Análise estatística

Os ensaios foram realizados com três repetições para cada isolado fúngico e para cada uma das concentrações de conídios utilizadas. Em cada ensaio houve um controle onde pupas foram imersas e adultos pulverizados apenas com o veículo da suspensão. Utilizou-se um esquema fatorial com dois fatores (isolados do fungo e concentração de conídios) *versus* testemunha. O delineamento foi o inteiramente casualizado (DIC) com grupos de 20 pupas e 30 adultos por repetição. A análise de variância foi realizada por meio do teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para execução da análise estatística utilizou-se o programa SAS, 1998.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade patogênica dos diferentes isolados durante a fase de pupa foi analisada através da mortalidade de pupas e da emergência e mortalidade dos adultos.

Os isolados IBCB425 e E9 de *M. anisopliae* promoveram significativa ($P < 0,01$) mortalidade de pupas nas concentrações de 10^7 e 10^8 conídios mL^{-1} (Tabela 1). Não foi observada ação do fungo ($P > 0,05$) em adultos emergidos de pupas tratadas por esses isolados, mas ao analisarmos a mortalidade total do inseto, os resultados mais promissores foram confirmados nas concentrações de 10^7 e 10^8 conídios mL^{-1} , embora não se tenha observado diferença estatística entre os isolados de *M. anisopliae* para o controle de pupas de *H. irritans* (Tabela 1).

A pulverização de *M. anisopliae* em adultos da mosca reduziu a sobrevivência de *H. irritans* e o isolado E9 se destacou dos demais promovendo maior mortalidade na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} (Tabela 1). Por meio do desdobramento da interação entre os tratamentos e as diluições utilizadas, verificou-se que as maiores mortalidades ocorreram na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} , sendo que para o isolado E9, obteve-se 100% de mortalidade nesta concentração e também quando se usou 10^7 conídios mL^{-1} (Figura 3) e (Figura 4 A e B).

Tabela 1. Mortalidade (%) de pupas e adultos de *Haematobia irritans* após tratamento com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Metarhizium anisopliae*^a.

Fator analisado	Pupas tratadas			Adultos tratados
	Pupas mortas	Adultos mortos	Total	Adultos mortos
Isolado do fungo (A)				
E9	18,3AB	29,0A	41,6A	84,4A
IBCB425	25,0A	23,2A	42,2A	47,4B
IBCB159	12,8B	26,0A	35,5A	48,1B
Teste F	6,50**	0,77NS	1,15NS	112,05**
dms (5%)	8,2963	13,6152	11,4771	9.6345
Concentração (B)				
10 ⁶ conídios mL ⁻¹	12,8B	19,6B	30,0B	39,6C
10 ⁷ conídios mL ⁻¹	22,2A	24,9AB	41,7AB	63,7B
10 ⁸ conídios mL ⁻¹	21,1AB	33,7A	47,8A	76,7A
Teste F	4,60*	3,28NS	7,17**	64,22**
dms (5%)	8,2963	13,6152	11,4771	9.6345
Interação A X B	3,57*	0,48NS	2,38NS	12,58**
Testemunha	10,0B	14,9A	23,3B	12,2B
Fatores	19,8A	27,7A	42,4A	61,3A
Testemunha X Fatores	4,51*	3,03NS	8,29**	119,46**
C.V. (%)	21,73	27,04	16,08	10,28

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\sqrt{x/100}$).

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% e ** significativo a 1% de probabilidade.

Os isolados JAB07 e AM09 de *B. bassiana* também foram patogênicos às pupas da mosca-dos-chifres, no entanto essa patogenicidade foi observada apenas na concentração de 10⁸ conídios mL⁻¹ (Tabela 2). A ação de *B. bassiana* em adultos emergidos de pupas tratadas não foi observada neste ensaio e quando analisou-se a mortalidade total do inseto, por meio do desdobramento da interação significativa, isolados *versus* concentração observou-se que os maiores resultados de mortalidade foram evidenciados pelo isolado AM09 na concentração de 10⁸ conídios mL⁻¹ (Figura 5). Na avaliação da atividade do fungo em adultos, observou-se que todos os isolados utilizados promoveram mortalidade na concentração de 10⁸ conídios mL⁻¹ (Tabela 2) (Figura 6 A, B e C).

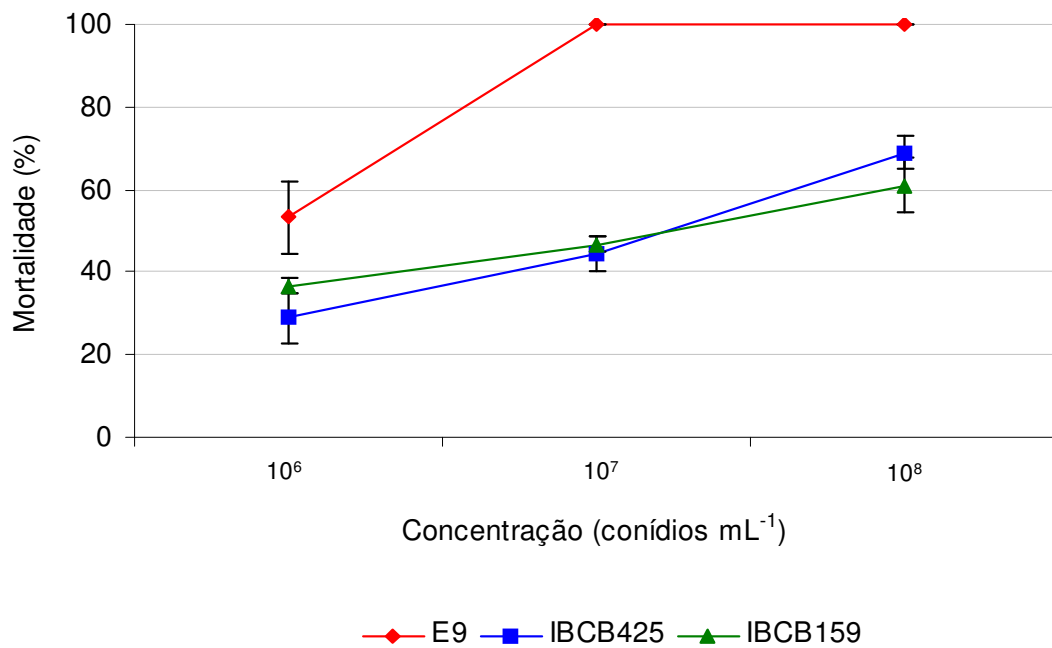


Figura 3. Mortalidade de *Haematobia irritans* em função da significância da interação isolados *versus* concentração, após tratamento de adultos com isolados de *Metarhizium anisopliae*.



Figura 4. Adultos de *Haematobia irritans* mortos pelo fungo *Metarhizium anisopliae* isolado E9. **A:** vista lateral do adulto exibindo a extrusão do patógeno; **B:** vista ventral do adulto exibindo vigorosa esporulação do fungo.

Tabela 2. Mortalidade (%) de pupas e adultos de *Haematobia irritans* após tratamento com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Beauveria bassiana*^a.

Fator analisado	Pupas tratadas			Adultos tratados
	Pupas mortas	Adultos mortos	Total	Adultos mortos
Isolado do fungo (A)				
JAB06	9,4B	15,6A	24,4A	63,0A
JAB07	15,0AB	15,1A	27,8A	70,0A
AM09	18,9A	16,9A	32,2A	65,5A
Teste F	3,94**	0,25NS	2,11NS	2,17NS
dms (5%)	7,9307	6,3045	9,3710	8.7748
Concentração (B)				
10 ⁶ conídios mL ⁻¹	8,9B	13,9A	21,7B	36,7C
10 ⁷ conídios mL ⁻¹	11,7B	16,6A	27,2AB	61,8B
10 ⁸ conídios mL ⁻¹	22,8A	17,1A	35,5A	100,0A
Teste F	9,79**	0,95NS	7,09**	343,51**
dms (5%)	7,9307	6,3045	9,3710	8.7748
Interação A X B	5,62**	0,72NS	3,56*	0,59NS
Testemunha	6,7B	10,7A	16,7B	11,1B
Fatores	15,1A	17,1A	30,0A	67,4A
Testemunha X Fatores	4,45*	2,61NS	6,69*	225,93**
C.V. (%)	24,59	18,33	15,76	7,91

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($x/100$).

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% e ** significativo a 1% de probabilidade.

Todos os isolados do gênero *Isaria*, com exceção de IBCB133, promoveram significativa ($P<0,01$) mortalidade de pupas em todas as concentrações de conídios utilizadas (Tabela 3). Por meio do desdobramento da interação entre os tratamentos e as diluições usadas, significativa para a mortalidade de pupas, verificou-se que os melhores resultados foram obtidos com os isolados CG189 e CG195 de *I. farinosa* que, nas concentrações de 10⁷ e 10⁸ conídios mL⁻¹ ocasionaram maior número de mortes (Figura 7) (Figura 8 A e B).

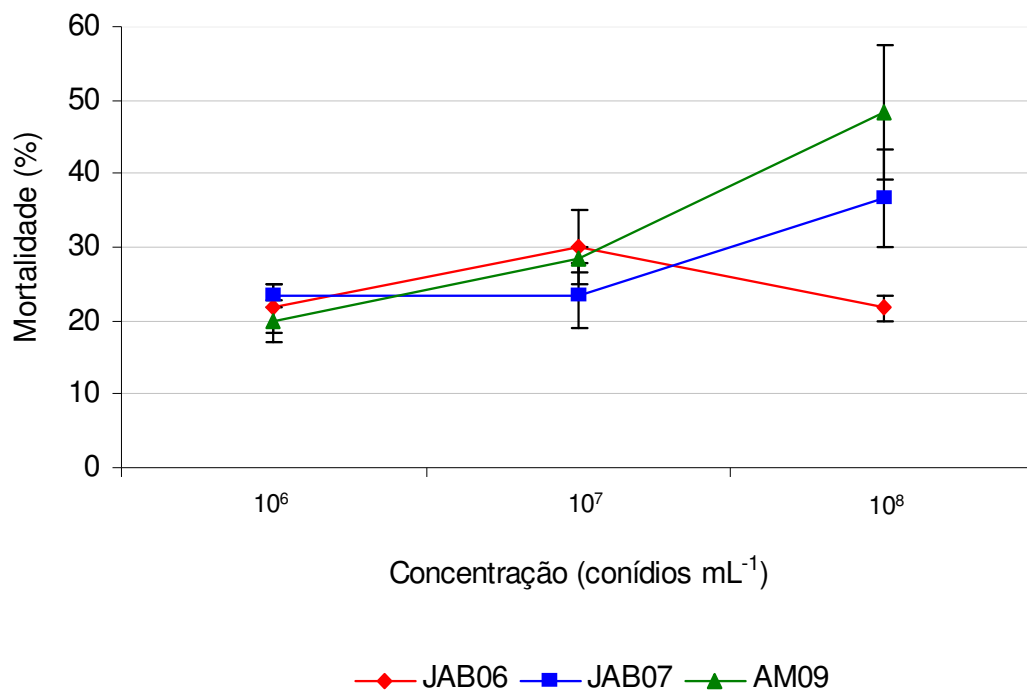


Figura 5. Mortalidade total de pupas de *Haematobia irritans* em função da significância da interação isolados *versus* concentração, após tratamento de pupas com isolados de *Beauveria bassiana*.



Figura 6. *Haematobia irritans* mortas pelo fungo *Beauveria bassiana* no ensaio com adultos. **A:** adulto morto exibindo extrusão do isolado JAB07; **B:** mosca morta por JAB06; **C:** inseto exibindo vigorosa esporulação do isolado AM09.

O efeito dos isolados de *I. fumosorosea* e *I. farinosa* na fase subsequente do ciclo da mosca pode ser observado pela redução da sobrevivência de adultos emergidos de pupas tratadas, em todas as concentrações de conídios utilizadas (Figura 8 C e D). Ao analisarmos a mortalidade total do inseto, observa-se que, com exceção de IBCB133 que promoveu menor mortalidade (46,1%), todos os demais isolados afetaram substancialmente o inseto reduzindo sua sobrevivência, principalmente CG195 que ocasionou 62,2% de mortalidade (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade (%) de pupas e adultos de *Haematobia irritans* após tratamento com suspensões contendo diferentes concentrações de conídios de isolados de *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa*^a.

Fator analisado	Pupas tratadas			Adultos tratados
	Pupas mortas	Adultos mortos	Total	Adultos mortos
Isolado do fungo (A)				
IBCB133	25,0B	30,0A	46,1B	59,6A
CB75	30,0AB	27,1A	48,3AB	65,5A
CG189	36,7AB	35,0A	58,3AB	46,3B
CG195	39,4A	37,4A	62,2A	41,5B
Teste F	3,10*	2,17NS	4,01*	11,52**
dms (5%)	14,1251	12,5172	15,151	12,5421
Concentração (B)				
10 ⁶ conídios mL ⁻¹	27,1A	29,9A	48,3A	46,7B
10 ⁷ conídios mL ⁻¹	32,9A	31,7A	53,7A	49,2B
10 ⁸ conídios mL ⁻¹	38,3A	35,5A	59,2A	63,9A
Teste F	2,58NS	1,03NS	2,62NS	10,37**
dms (5%)	11,0785	9,8174	11,8832	9,8370
Interação A X B				
Testemunha	8,3B	19,9B	26,7B	12,2B
Fatores	33,5A	34,0A	56,0A	54,2A
Testemunha X Fatores	18,26**	4,40*	15,17**	55,32**
C.V. (%)	20,99	18,43	15,07	13,28

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz (x/100).

Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS não significativo; * significativo a 5% e ** significativo a 1% de probabilidade.

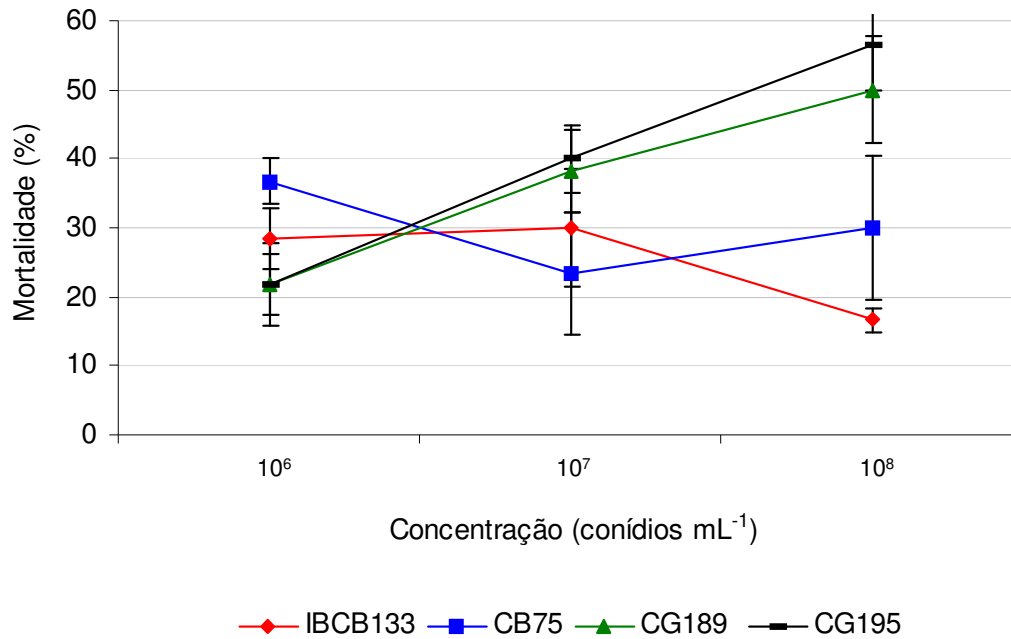


Figura 7. Mortalidade de pupas de *Haematobia irritans* em função da significância isolados *versus* concentração, após tratamento de pupas com isolados de *Isaria fumosorosea* e *Isaria farinosa*.

Considerando o gênero *Isaria*, os isolados IBCB133 e CB75 de *I. fumosorosea* foram os mais efetivos para o controle de adultos da mosca-dos-chifres, pois proporcionaram significativamente maior mortalidade do inseto. Para esta espécie a concentração de conídios que causou maior mortalidade de adultos foi 10⁸ conídios mL⁻¹, diferindo significativamente das demais (Tabela 3).

A ação de vários isolados de fungos entomopatogênicos foi analisada em pupas de *H. irritans* por ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005). Os autores verificaram que apenas três isolados de *M. anisopliae* e de *I. fumosorosea* e um de *B. bassiana*, aplicados na concentração de 10⁸ conídios mL⁻¹ proporcionaram elevada mortalidade de pupas. Contudo, a ação destes isolados para adultos emergidos de pupas tratadas não foi avaliada pelos autores.

A ação da maior parte dos isolados fúngicos utilizados neste trabalho, foi mais evidente sobre a pupa, produzindo acentuado número de mortos. Em função disso, houve pouco efeito sobre adultos emergidos de pupas sobreviventes, sendo observado apenas para os isolados de *I. fumosorosea* e *I. farinosa*. Este fenômeno é importante

para o controle de *H. irritans*, pois reduz a duração da fase reprodutiva da mosca. Fato semelhante foi observado por HAFEZ et al. (1997), que após inocularem *B. bassiana* em pupas da mariposa *Phthorimaea operculella*, observaram decréscimo na emergência e longevidade dos adultos.

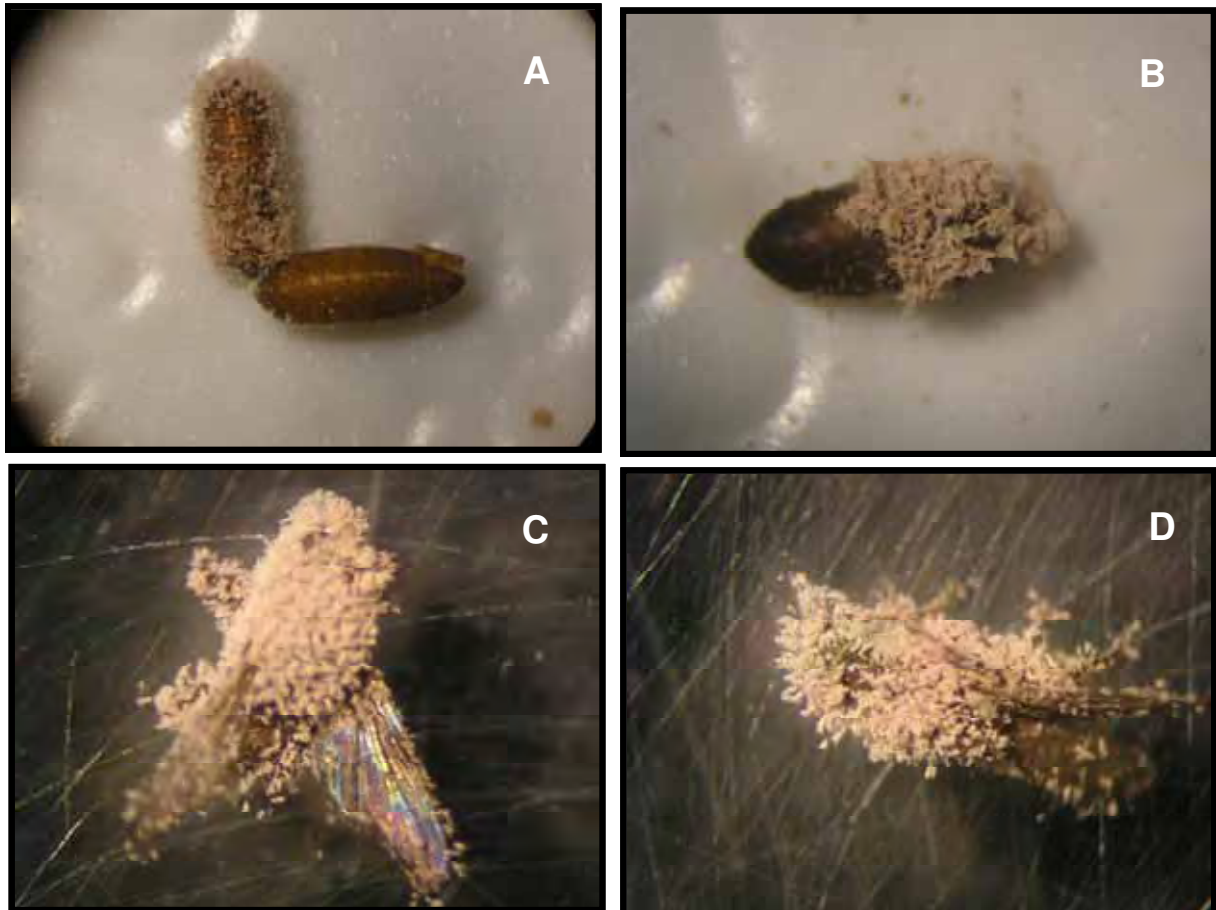


Figura 8. Pupas e moscas mortas no ensaio com pupas de *Haematobia irritans*. **A:** pupa exibindo extrusão do Isolado CG189; **B:** pupa morta pelo Isolado CG195; **C:** adulto emergido de pupa tratada por CG189; **D:** adulto emergido de pupa tratada pelo Isolado CG195.

Resultado divergente do obtido no presente trabalho foi relatado por LECUONA et al. (2005) que após tratarem pupas de *Musca domestica* com cinco isolados de *B. bassiana*, na concentração de 1×10^8 conídios mL⁻¹, não encontraram mortalidade maior que a obtida no controle. No entanto, os autores expuseram as pupas aos isolados fúngicos por apenas um segundo, enquanto no presente trabalho a imersão foi por um minuto, o que evidencia a importância do tempo de exposição.

Analisando-se a mortalidade total do inseto, observa-se que *H. irritans* foi afetada pelas três espécies fúngicas e o efeito dose-resposta ficou claramente evidenciado nos ensaios com *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Para estes fungos as diferentes concentrações de conídios utilizadas influenciaram significativamente a atividade patogênica dos isolados, mas o mesmo efeito não foi observado na ação dos isolados de *Isaria*. Fato semelhante foi relatado por BERNARDINE (2006) que, após tratar larvas de *M. domestica* com um isolado de *M. anisopliae*, obteve redução da emergência de adultos em função do aumento da concentração de conídios, mas um isolado de *B. bassiana* também avaliado não afetou esta fase do ciclo de vida do inseto.

A ação patogênica para adultos da mosca ficou melhor evidenciada do que para pupas. Todas as espécies fúngicas foram capazes de reduzir significativamente a sobrevivência de adultos. Entretanto, em algumas espécies, se observou diferença entre os isolados no que se refere a capacidade de agredir os insetos.

Do mesmo modo que ocorreu no ensaio com pupas, o efeito dose-resposta ficou evidente na ação dos fungos para os adultos de *H. irritans*. A concentração de conídios teve efeito significativo na mortalidade, pois as maiores concentrações ocasionaram maior mortalidade de adultos, sendo que a ação dos isolados foi mais efetiva na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹.

Poucos autores avaliaram a ação de fungos entomopatogênicos para adultos da mosca-dos-chifres. ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005) verificaram que cinco isolados de *I. fumosorosea* e quatro de *M. anisopliae* promoveram mortalidade de adultos de *H. irritans* maior que 90%, enquanto para os isolados Bb17 e Bb21 de *B. bassiana*, a mortalidade foi de 73,8 e 40,0%, respectivamente. Ao avaliarem formulações de três espécies de fungos entomopatogênicos para o controle de adultos da mosca-dos-chifres, LOHMEYER & MILLER (2006) constataram que *B. bassiana* promoveu 100%

de mortalidade no 7º dia após a aplicação, enquanto *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* ocasionaram 73,0 e 33,3% de mortalidade, respectivamente.

Os resultados obtidos por estes autores são parcialmente divergentes, pois de acordo com ANGEL-SAHAGÚN et al. (2005) os isolados de *I. fumosorosea* e *M. anisopliae* foram mais patogênicos para adultos da mosca, enquanto LOHMEYER & MILLER (2006) obtiveram melhor resultado com *B. bassiana*. No presente trabalho todos os isolados de *B. bassiana* e um de *M. anisopliae* (E9) foram efetivos em promover a mortalidade de 100% de adultos da mosca, e para os isolados de *I. fumosorosea* (IBCB133 e CB75) pode se observar semelhante efetividade. Entretanto, os isolados de *I. farinosa* não apresentaram ação patogênica digna de nota para adultos de *H. irritans*.

Diversos autores têm investigado a atividade patogênica de fungos para outras moscas. Segundo WATSON et al. (1995) a mortalidade de *M. domestica* tratada com as linhagens P89 e L90 de *B. bassiana* dependeu da concentração de conídios usada, obtendo mortalidade maior que 90% para ambas as linhagens, na concentração de 1×10^8 conídios, mas para *Stomoxys calcitrans* as mesmas linhagens, aplicadas na mesma concentração, mataram 70 e 84% das moscas, respectivamente.

Linhagens de *B. bassiana* se mostraram mais virulentas para adultos de *M. domestica*, produzindo mortalidade maior que 85%, em bioensaios em que foram também avaliadas linhagens de *I. fumosorosea* e *Sporothrix* sp. (LECUONA et al., 2005). A exposição de adultos da mosca varejeira *Lucilia sericata* a suspensões de conídios de *M. anisopliae* por imersão, aplicação tópica e contato do tarso em superfície tratada, resultou em altos níveis de infecções letais; a concentração de conídios teve efeito significativo nos níveis de infecção, obtendo-se o maior valor de mortalidade (64%) com a concentração de 1×10^7 conídios mL⁻¹ (WRIGHT et al, 2004). De acordo com KONSTANTOPOULOU & MAZOMENOS (2005), *Beauveria brongniartii* e *B. bassiana* foram os fungos mais patogênicos para adultos da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata*, causando 97,4 e 85,6% de mortalidade, respectivamente.

Os achados obtidos pelos diversos autores mostram que a atividade patogênica de fungos para moscas pode variar bastante. O estágio do ciclo biológico da mosca a ser atingido, as espécies de fungos usadas, as diferenças de patogenicidade entre

linhagens ou isolados e as concentrações de conídios, são alguns dos fatores que podem influenciar esta atividade. No presente trabalho tais aspectos foram também identificados e as diferenças na ação patogênica dos fungos podem ser explicadas pela diversidade entre as espécies e, provavelmente, pela variabilidade genética existente neste agente de biocontrole.

Pelos resultados obtidos no presente estudo verificou-se que *I. fumosorosea* e *I. farinosa* são mais virulentos para pupas de *H. irritans* que as outras espécies avaliadas. A fase adulta da mosca é mais susceptível a ação patogênica dos fungos, pois todas as espécies foram capazes de agredir os adultos. A maior ação patogênica foi evidenciada pelo isolado E9 de *M. anisopliae* e todos os isolados de *B. bassiana*, sendo que os isolados IBCB133 e CB75 de *I. fumosorosea*, também podem ser destacados mas com menor efetividade. Em ambas as fases do ciclo da mosca a ação patogênica foi maior quando se utilizaram as maiores concentrações de conídios, contudo este efeito foi mais evidente na fase adulta.

Os fungos entomopatogênicos constituem um grupo bastante diverso de inimigos naturais de insetos. Os resultados obtidos neste trabalho são promissores, pois mostraram sua ação patogênica para a mosca-dos-chifres, evidenciando seu potencial como agente de biocontrole deste ectoparasito. Neste sentido, novas investigações precisam ser conduzidas, inclusive em condições de campo.

4. CONCLUSÕES

1. Os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. fumosorosea* e *I. farinosa* são patogênicos para pupas e adultos da mosca-dos-chifres.
2. Os isolados de *I. farinosa* são mais efetivos no controle de pupas de *H. irritans*, e todas as espécies fúngicas são patogênicas para adultos do inseto.
3. O isolado E9 de *M. anisopliae*, nas concentrações de 10^7 e 10^8 conídios mL⁻¹, e todos os isolados de *B. bassiana*, na concentração de 10^8 conídios mL⁻¹, são os mais indicados para controlar a fase adulta da mosca-dos-chifres.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 289-381.

ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J., GALINDO-VELASCO, E.; LÓPEZ-EDWARDS, M.; REBOLLEDO-DOMINGUEZ, O.; CRUZ-VÁZQUEZ, C.; REYES-VELÁZQUEZ, W. P.; SKPDA, S. R.; FOSTER, J. E. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). **Journal of Insect Science**, Wallingfort, v.5, n.50, 2005.

BARROS, A. T.; GUGLIELMONE, A. A.; MARTINS, J.R. Mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*): control sustentable y resistencia a los inseticidas. **Documento RedEctopar**, p.1-10, 2002.

BARSON, G.; RENN, N.; BYWATER, A. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the House Fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.64, p.107-113, 1994.

BERNARDINE, D. M.; PINTO, J. S do N.; RINEIO, P. B.; SILVA, C. L. da. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento da *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, p.127-129, 2006.

BORJA, G. E. M. Criação e manutenção de colônias de *Haematobia irritans* em laboratório. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.65, p.17-19, 1992.

BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E.; CROSBY, B. L. A review of ectoparasites and their effect on cattle production. **Journal of Animal Science**, Champing, v.70, p.597-602, 1992.

CASTILLO, M. A.; MOYA, P.; HERNÁNDEZ, E.; YÚFERA, E. P. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extract. **Biological Control**, London, v.19, p.274-282, 2000.

COOK, C. W.; GERHARDT, R. R. Selective mortality of insects in manure from cattle fed racion and dimilin. **Environmental Entomology**, College Park, v.6, p.46-48, 1977.

FRANCISCO, E. A.; MOCHI, D. A.; CORREIA, A. C. B.; MONTEIRO, A. C. Determination of growth media for the viability test of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, p.1309-1312, 2005.

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, p.8-10, 2002.

GUGLIELMONE, A. A.; GIMENO, E.; IDIART, J. Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations in cattle. **Medical Veterinary Entomology**, Oxford, v.13, p.323-328, 1999.

HAFEZ, M.; ZAKI, F. N.; MOURSY, A.; SABBOUR, M. Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Seller). **Journal Pesticide Science**, Tokyo, v.70, p.158-159, 1997.

KUNZ, S. E.; MURREL, K. D.; LAMBERT, G.; JAMES, L. F.; TERRILL, C. E. Estimated losses of livestock to pests. In: PIMENTEL, D. (Ed.). **CRC Handbook of Pest Management in Agriculture**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.69-98.

KONSTANTOPOULOU, M. A.; MAZOMENOS, B. E. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. **Biological Control**, London, v.50, p.293-305, 2005.

LECUONA, R. E.; TURICA, M.; TABOCCO, F.; CRESPO, D. C. Microbial Control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected Strains of *Beauveria bassiana*. **Journal Medical Entomology**, Lanham, v.42, p.332-336, 2005.

LIMARET, J. P.; MARTINEZ, I. M. El impacto de productos veterinários sobre insectos coprófagos: consecuencias sobre la degradacion del estiércol em pastagens. **Acta Zoológica Mexicana**. v.23, n. 3, p.137-148, 2005.

LOHMEYER, K. H.; MILLER, J. A. Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera-Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.99, p.1943-1947, 2006.

MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C.; BORTOLI de, S. A.; DORIA, H. O. S.; BARBOSA, J. C. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p.382-389, 2006.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT** - User's Guide: statistic – version 6.12, Cary, 846p, 1998.

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

STEELMAN, C. D.; BROWN Jr., A. H.; GBUR, E. E.; TOLLEY, G. Interactive response of the horn fly (Diptera: Muscidae) and selected breeds of beef cattle. **Journal of Economical Entomology**, Lanham, v.84, p.1275-1282, 1991.

WATSON, D. W.; GEDEN, C. J.; LONG, S. J.; RUTZ, D. A. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). **Biological Control**, London, v.5, p.405-411, 1995.

WRIGHT, C.; BROOKS, A.; WALL, R. Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilla sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Pest Management Science**, Sussex, v.60, p.639-644, 2004.

CAPÍTULO 4 – POTENCIAL DE *Metarhizium anisopliae* PARA O CONTROLE DE LARVAS E MOSCAS DE *Haematobia irritans* EM BOVINOS NATURALMENTE INFESTADOS

RESUMO – O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de controle do isolado E9 de *M. anisopliae* para larvas e adultos de *H. irritans* em condições de campo. Para o controle de larvas, nove bovinos foram distribuídos em três grupos; um dos grupos recebeu, junto com a refeição diária, 2×10^{10} conídios microencapsulados em pelestes de alginato e outro grupo recebeu a mesma quantidade de conídios *in natura* veiculados em arroz, num total de três refeições diárias, e no grupo controle o alimento não continha o fungo. Amostras de fezes e massas fecais foram coletadas dos três piquetes, nos tempos 0 e 1, 3, 6, 9 e 12 dias, para a avaliação de unidades formadoras de colônias (UFCs) e para contagem de *H. irritans* emergidas. Para o controle de adultos, oito bovinos foram distribuídos em dois grupos onde um foi pulverizado com 3 L de uma suspensão contendo 3×10^{10} conídios mL⁻¹ e o outro com o veículo da suspensão. Quatro pulverizações foram realizadas a cada cinco dias e diariamente todos os bovinos foram fotografados lateralmente para contagem do número de moscas, até o 21º dia após a instalação do ensaio. A emergência de moscas no tratamento com conídios microencapsulados do fungo, foi significativamente ($P < 0,01$) menor (11,7), quando comparado aos tratamentos com conídios de *M. anisopliae in natura* (27,9) e controle (29,5). A presença de *M. anisopliae* nas amostras fecais dos tratamentos com o fungo, foi significativamente maior que em amostras do controle. Na 9ª avaliação, o número de UFCs encontrada nas fezes de bovinos tratadas com conídios microencapsulados foi significativa maior que o verificado no tratamento com conídios *in natura*. A pulverização do isolado E9 diminuiu significativamente ($P < 0,05$) a infestação de moscas nos bovinos, e após a segunda pulverização encontrou-se em média 22,9 moscas por animal do grupo tratado e 43 moscas em cada animal do grupo controle. Os resultados obtidos no presente trabalho são promissores, pois indicam que o isolado E9 de *M. anisopliae* é patogênico para a mosca-dos-chifres em condições de campo. Conídios microencapsulados do fungo são patogênicos para larvas de *H. irritans* em massas fecais e a pulverização de bovinos naturalmente

infestados, com suspensão do fungo é eficiente para o controle de adultos da mosca em animais confinados.

Palavras-chave: mosca-dos-chifres, ectoparasitos, controle microbiano, peletes, alginato de sódio, microencapsulação.

CHAPTER 4 – *Metarhizium anisopliae* POTENTIAL FOR LARVAE AND FLY CONTROL OF *Haematobia irritans* ON NATURALLY INFESTED BOVINES

SUMMARY - The present work had the objective of evaluating the potential control of the E9 *M. anisopliae* isolate for larvae and adults of *H. irritans*, at field conditions. For the larvae control, nine bovines were distributed in three groups; one group received, with the daily meal, 2×10^{10} microencapsulated conidia in pellets of alginate and other group received the same amount of conidia *in natura* grew on rice, 3 daily meals, in which the meals of the check group did not contain the fungus. Excrements samples and bovine manure were collected at the times of 0, 1, 3, 6, 9 and 12 days, for evaluation of the colonies forming units (CFU) and the number of *H. irritans* emerged. For the adults control, eight bovines were distributed in two groups, where one group was pulverized with 3 l of the suspension containing 3×10^{10} conidia ml⁻¹ and the other group with suspension vehicle. Four pulverizations were done each five days and for the counting of the number of flies, the bovines were daily photographed sideways until the 21st day after the assay was installed. The emergence of the flies with the microencapsulated fungus conidia, was significantly ($P < 0.05$) lower (11.7), when compared to the treatments with *M. anisopliae* conidia *in natura* (27.9) and check (29.5). The presence of *M. anisopliae* on the feces samples, of the treatments with the fungus, was significantly higher than in samples of the check. On the 9th evaluation, the number of CFU found on the bovine feces treated with microencapsulated conidia was significantly higher than the verified in the treatment with conidia *in natura*. Pulverization with the E9 isolate decreased the infestation of flies on the bovines significantly ($P < 0.05$). After the second pulverization, there were found, in average, 22.9 flies per animal of the treated group and 43 flies per animal of the check group. The results obtained in the present work are very promising, once that they indicate that the isolate E9 of *M. anisopliae* is pathogenic to the horn fly at field conditions. Conidia microencapsulated of the fungus are pathogenic to larvae of *H. irritans* in bovine manure, and the pulverization of naturally infested bovines with fungal suspension is efficient for the control of the adult fly, on confined animals.

Keywords: Horn fly, ectoparasites, microbial control, pellets, sodium alginate, microencapsulation.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos são considerados agentes promissores para o controle biológico de pragas, no entanto, o desempenho destes entomopatógenos pode ser afetado por uma variedade de fatores ambientais como, radiação solar, temperatura, umidade ambiental (INGLIS et al., 2008), entre outros. Segundo THOMAS & JEKINS (1997), a temperatura, em particular, causa efeitos prejudiciais em parâmetros biológicos de *Metarhizium anisopliae*.

A mosca-dos-chifres *Haematobia irritans* é um parasito obrigatório de bovinos, que permanece no animal durante toda a fase adulta do seu ciclo de vida, alimentando-se de sangue constantemente. Fêmeas acasaladas ovipositam nas fezes do gado, onde ocorrem as fases imaturas, ovo, larva e pupa.

Este inseto é um importante ectoparasito do rebanho de bovinos (BARROS et al., 2007; LI et al., 2007), sendo controlado quase que exclusivamente por meio de inseticidas químicos através de banho ou aspersão de bovinos. Contudo, segundo BYFORD et al., (1999) o desenvolvimento da resistência do inseto a esses produtos se tornou um problema de importância crítica.

As estratégias para combater *H. irritans* consistem em atingir as moscas adultas nos bovinos ou as fases imaturas do inseto que ocorrem nas massas fecais. Durante o dia, a temperatura na superfície do couro de um bovino pode variar de 28 a 40 °C (MONTY & GARBARENO, 1978), e é provável que possa ser um fator desfavorável para a ação eficiente de um agente de biocontrole (POLAR et al., 2005). A pulverização de *M. anisopliae* em bovinos para o controle biológico de ectoparasitos é uma estratégia ainda pouco explorada. Alguns trabalhos para o controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* encontram-se relatados na literatura (CORREIA et al., 1998; POLAR et al., 2005; ALONZO-DÍAZ et al., 2007) com resultados promissores, mas nada se sabe sobre o uso deste método para o controle de *H. irritans*.

Os processos digestivos que ocorrem em ruminantes são extremamente complexos e possivelmente restritivos à sobrevivência de conídios de fungos entomopatogênicos em consequência do pH bastante ácido do rúmen e do abomaso (MERCHEN, 1988), da alta temperatura devido ao processo fermentativo

(ANDRIGUETTO et al., 1981), e da atividade de bactérias, protozoários e fungos no rúmen do bovino (NOGUEIRA FILHO et al., 2004).

Para se contornar as dificuldades encontradas por um microrganismo entomopatogênico em condições de campo, existe a possibilidade de formulá-lo, ou seja, acrescentar a ele algumas substâncias para protegê-lo de condições adversas do meio, melhorar seu desempenho, facilitar o manuseio e a aplicação do produto (BATISTA FILHO et al., 1998). Há trabalhos que relatam o preparo e a utilização de conídios microencapsulados de fungos nematófagos para o controle de nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos e ovinos (ARAÚJO et al., 2004; GRAMINHA et al., 2005). A microencapsulação de conídios de fungos entomopatogênicos em alginato de sódio é uma técnica promissora para o controle de insetos. PEREIRA & ROBERTS (1990), já descreveram técnicas que permitem a microencapsulação de micélios desses fungos. O uso de isolados de fungos entomopatogênicos, de modo que possam resistir à passagem pelo trato gastrintestinal dos bovinos e que sejam capazes de atingir ovos e larvas nas massas fecais, e também o emprego de linhagens que sejam eficientes em agredir adultos da mosca, quando pulverizados sobre bovinos, podem constituir importantes estratégias para o controle biológico da mosca-dos-chifres.

O objetivo do presente trabalho foi analisar, em condições de campo, se o fornecimento aos bovinos de conídios de *M. anisopliae* microencapsulados em peletes de alginato ou *in natura* veiculados em arroz, é capaz de efetuar o controle de larvas de *H. irritans* nas massas fecais, e ainda, avaliar a eficiência do fungo em controlar o adulto da mosca, quando pulverizado sobre o bovino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fungo

Foi utilizado o fungo *Metarhizium anisopliae*, isolado E9, que nos ensaios conduzidos em laboratório com larvas e adultos, ocasionou 100% de mortalidade do inseto. Para utilização nos ensaios o isolado foi cultivado em placas de Petri contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA), incubadas a $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 20 dias (Figura 1 A). A

viabilidade do isolado, avaliada segundo metodologia descrita por FRANCISCO et al. (2005), foi de 100%.

2.2 Produção do fungo em arroz

Conídios formados na superfície da colônia foram retirados com auxílio de uma pequena espátula e transferidos para tubo contendo uma mistura (1:1) de solução de NaCl a 0,89% (p v⁻¹) e solução de Tween 80[®] a 0,1% (v v⁻¹), obtendo-se uma suspensão com concentração de 10⁷ conídios mL⁻¹, determinada com o auxílio da câmara de Neubauer, que serviu como inóculo para a produção do fungo.

Para produção massal usou-se a metodologia descrita por ALVES e PEREIRA (1998), modificada. Arroz agulhinha tipo 1 foi colocado em água fervente e mantido por aproximadamente 5 minutos em fogo brando. A seguir, retirou-se, com auxílio de peneira, o excesso de água, transferindo-se o arroz para sacos autoclaváveis de polipropileno de alta densidade. Com o auxílio de uma seladora para plásticos, os sacos contendo 400 g de arroz foram vedados e autoclavados a 121°C e 1Kgf cm⁻², por 45 minutos. Após a esterilização, o arroz foi desagregado por meio de manipulação externa do saco e em seguida inoculado, sob fluxo laminar, com 5 mL do inóculo, introduzido com auxílio de agulha e seringa. Logo após a inoculação, a abertura feita pela agulha foi lacrada com fita adesiva e os sacos foram incubados a 27 ± 0,5 °C por 20 dias com fotofase de 12 horas (Figura 1 B).

Após este período, os sacos foram abertos e o arroz contendo o fungo crescido foi colocado em bandejas que foram mantidas em sala com temperatura ambiente (28 a 32°C) por três dias, para secagem (Figura 1 C e D).

Concluído o processo de secagem, uma parte do fungo contido em arroz foi separada em porções para utilização no ensaio *in vivo* com o fungo *in natura*, enquanto a outra parte foi usada para a extração dos conídios com o auxílio de uma peneira com malha de 1 mm, fechada e agitada manualmente por aproximadamente 10 minutos. No recipiente sob a peneira colheu-se os conídios secos do fungo (Figura 1 E).



Figura 1. Produção do fungo. **A:** isolado E9 de *Metarhizium anisopliae* em placa de Petri contendo meio BDA; **B:** arroz colonizado pelo fungo, contido em sacos de plástico, após 20 dias de cultivo; **C e D:** arroz colonizado pelo fungo em bandejas para secagem; **E:** extração de conídios do arroz com auxílio de uma peneira.

2.3 Teste de viabilidade

A viabilidade dos conídios produzidos em arroz foi avaliada em duas condições: a) com os conídios formados em arroz após secagem: b) com os conídios em forma de pó, após secagem e extração dos mesmos.

Em tudo de ensaio contendo uma mistura (1:1) de solução de NaCl a 0,89% (p v⁻¹) e solução de Tween 80[®] a 0,1% (v v⁻¹), foi confeccionada a suspensão colocando-se 1 g de arroz com fungo ou 0,1 g do pó de conídios e vigorosamente agitado em agitador elétrico de tubo de ensaio. A suspensão formada foi diluída e padronizada na concentração de 1×10^6 conídios mL⁻¹, com o auxílio de câmara de Neubauer. A viabilidade foi avaliada segundo metodologia descrita por FRANCISCO et al. (2005).

2.4 Preparação dos micropeletes

O preparo da mucilagem foi realizado segundo metodologia descrita por GRAMINHA et al. (2005). As quantidades utilizadas foram adaptadas as necessidades deste trabalho.

2.4.1 Mucilagem de alginato de sódio com farinha de aveia

Em um béquer contendo 210 mL de água destilada, adicionou-se 6 g de alginato de sódio gradativamente, sob constante agitação manual, até a completa hidratação. Num segundo frasco, dissolveu-se 0,6 g de benzoato de sódio em 10 mL de água destilada, como agente bacteriostático. Em outro béquer contendo 20 mL de água destilada, foi diluído 0,15mL de polisorbato 80 e sob constante agitação em agitador magnético, adicionou-se cuidadosamente pó de conídio em quantidade suficiente para fornecer a cada animal, em grupo composto por três animais, 2×10^{10} conídios de *M. anisopliae*. Após alguns minutos de agitação constante, obteve-se uma suspensão homogênea na qual adicionou-se 6 g de farinha de aveia, mantendo-se a agitação constante.

No béquer contendo o alginato de sódio previamente preparado, adicionou-se a solução de benzoato de sódio e a suspensão de conídios com farinha de aveia. A mucilagem formada foi manualmente misturada com vigor e acrescida de água destilada até completar o volume de 300 mL.

2.4.2 Microgranulação

A mucilagem, foi transferida para um funil de separação, e sob agitação constante foi gotejada em 1000 mL de solução de cloreto de cálcio, que também permaneceu sob agitação constante durante todo o procedimento (adaptado de FRAVEL et al., 1985) (Figura 2 A). Os microgrânulos obtidos foram recolhidos em peneira, lavados em três alíquotas de 100 mL de água destilada e transferidos para uma peneira plana, onde foram secados por meio de ventilação forçada em temperatura ambiente, (Figura 2 B, C e D).

2.5 Controle de *H. irritans* em condições de campo

Os experimentos foram realizados na propriedade agropecuária denominada Sítio Córrego do Pavão, localizado geograficamente a 21° 35' 43,3" Sul e 49° 02' 51,3" Oeste e altitude média de 448 m, no município de Borborema – SP. O clima da região é subtropical quente, com inverno seco. Os períodos de experimento foram de 10 a 22 de Abril de 2008, para o controle de larvas nas massas fecais, e de 10 de Abril a 1 de Maio de 2008, para o controle de adultos sobre os bovinos. Diariamente, durante todo o período experimental, a temperatura e a umidade nos piquetes foram medidas as 9 e 15 horas com o auxílio de um termohigrometro digital (Figuras 3 e 4).



Figura 2. Preparo dos microgrânulos de alginato de sódio contendo conídios do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae*. **A:** mucilagem de alginato de sódio contida em funil de separação (seta 1), sendo gotejada em solução de cloreto de cálcio (seta 2), ambos sob agitação constante (setas 3 e 4); **B e C:** microgrânulos submetidos a ventilação forçada para secagem; **C:** microgânulos após secagem por algumas horas.

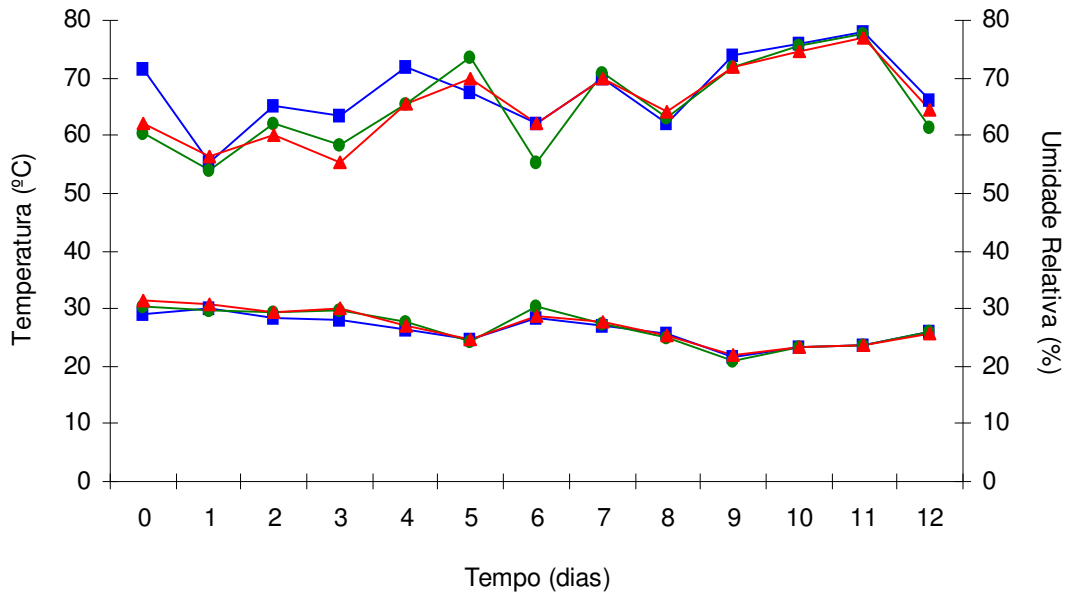


Figura 3. Temperatura e umidade médias diárias nos piquetes durante o ensaio de controle de larvas nas massas fecais. Piquete com animais do grupo controle (■); piquete com animais que receberam *Metarhizium anisopliae* in natura (●); piquete com animais que receberam *Metarhizium anisopliae* microencapsulado (▲).

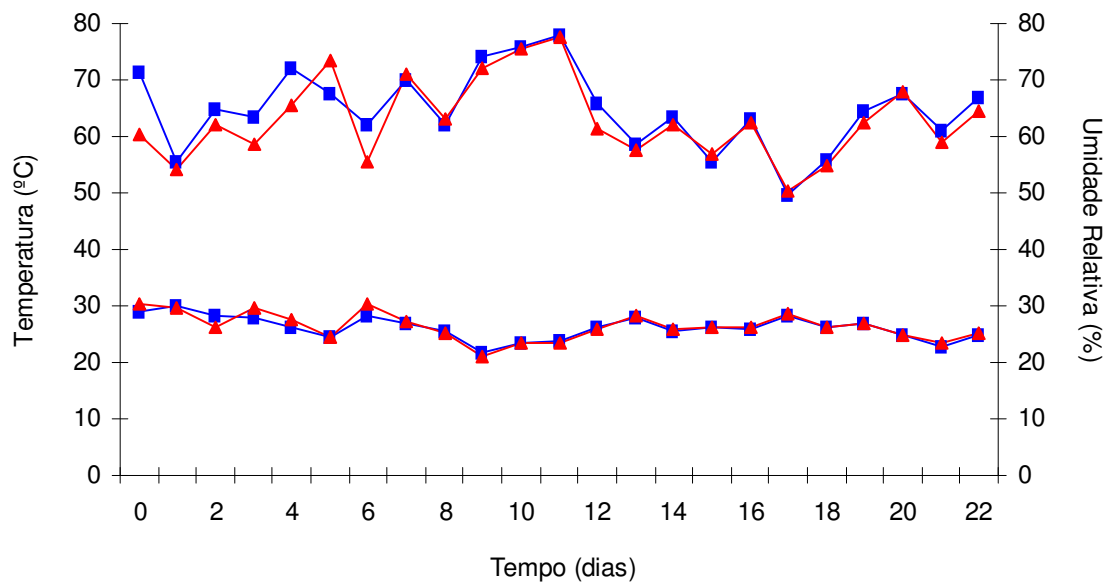


Figura 4. Temperatura e umidade médias diárias nos piquetes durante o ensaio para o controle de adultos sobre os bovinos. Piquete com animais do grupo controle (■); piquete com animais pulverizados com *Metarhizium anisopliae* (▲).

2.5.1 Controle de larvas nas massas fecais

Nove bovinos fêmeas, mestiços, com idade entre dois e meio e quatro anos, naturalmente infestados por *H. irritans*, foram distribuídos aleatoriamente em três piquetes de 300 m² cada, com distancia de 50 m entre os mesmos, formado por *Brachiaria brizantha* contendo uma árvore de porte médio no centro, para a formação dos seguintes grupos experimentais:

Grupo A – animais que não receberam o fungo

Grupo B – animais que receberam, três vezes ao dia, misturado no alimento, porções de 2×10^{10} conídios *in natura* de *M. anisopliae*, veiculados em arroz.

Grupo C – animais que receberam, três vezes ao dia, misturado no alimento, porções de 2×10^{10} conídios microencapsulados de *M. anisopliae*.

Dentro de cada piquete foi colocado um cocho para água e dois para alimentação diárias, composta de uma mistura de 60% de cana-de-açúcar moída, 20% de quirela de milho, 10% de farelo de soja e 10% de raspa de mandioca. Essa mistura foi oferecida na proporção de 10 kg por animal, três vezes ao dia, para cada grupo experimental.

Para avaliar a ação do fungo sobre as larvas, amostras de fezes frescas e massas fecais foram coletadas nos piquetes antes do fornecimento do fungo (Tempo zero) e 1, 3, 6, 9 e 12 dias após o início do tratamento. Cinco massas frescas de cada piquete foram escolhidos, entre seis e oito horas da manhã, e protegidos com três estacas de bambu (altura de 1,60 m) para evitar o pisoteio pelos animais (Figura 5 A). De cada bolo, pequenas alíquotas foram recolhidas, em dez pontos diferentes, para formar uma amostra de cerca de 30 g que foi acondicionada em tubo coletor com o auxílio de uma espátula (Figura 5 B). Após a coleta, os tubos foram imediatamente acondicionados em caixas de isopor contendo gelo, e em seguida transferidos para freezer à -20°C, para avaliação em laboratório, das unidades formadoras de colônia (UFC).

No dia seguinte à marcação com as estacas, as massas fecais inteiras foram cuidadosamente coletadas com o auxílio de uma pá, e colocadas em pratos circulares de papel (350 mm) revestido com alumínio (Figura 5 C e D).

Em seguida, foram transportados para um ambiente protegido. Cada prato foi totalmente envolvido por um pedaço de tecido *voile* preso por meio de um barbante, na

extremidade superior de uma estaca de bambu (300 mm de altura), fixada no centro da massa fecal, formando uma estrutura semelhante a uma gaiola. Desse modo, moscas emergidas permaneceram confinadas neste ambiente até a morte, que ocorreu em poucos dias devido a ausência de alimento (Figura 5 E e F).

No vigésimo dia após a marcação dos bolos nos piquetes, com a emergência e mortalidade total das moscas, as gaiolas foram abertas e com o auxílio de um pincel, todos os insetos presentes foram retirados da superfície do bolo e borda do prato para a identificação e contagem de adultos de *H. irritans* (Figura 6 A e B).

Para a avaliação de UFCs uma amostra de 10 g de fezes foi pesada, desagregada e diluída em 90 mL de uma mistura (1:1) de solução de NaCl a 0,89% (p v⁻¹) e solução de Tween 80[®] a 0,1% (v v⁻¹) com o auxílio de um mixer por 50 segundos. Obteve-se uma suspensão inicial da qual foram feitas mais duas diluições seriadas de 10⁻² e 10⁻³ (Figura 6 C, D e E).

Em cada avaliação, foram inoculados 0,1 mL da suspensão adequada em placas de Petri, contendo 20 mL do meio de cultura de JOUSSIER & CATROUX (1976) cuja composição foi modificada pela supressão do suco de legumes e oxygal, ficando: 3 g de carbonato de cálcio, 2 g de glicose, 2 g de extrato de levedura, 5 g de ágar, 125 mg de actidione, 500 mg de streptomycina, 50 mg de tetracyclina e 1000 mL de água destilada. Para cada amostra de fezes foram utilizadas três placas de Petri. As placas foram mantidas em estufa a 27 ± 0,5°C, e o número UFCs em cada placa, foi determinado até o 10^o dia de incubação.

2.5.2 Controle de adultos sobre os bovinos

Oito bovinos fêmeas, mestiços, com idade entre três e quatro anos, naturalmente infestados por *H. irritans*, foram distribuídos aleatoriamente em dois piquetes de 350 m² cada, com distancia de 200 m entre os mesmos, formados por *Brachiaria brizantha*, contendo uma árvore de porte médio no centro, para a formação dos seguintes grupos experimentais:

Grupo A (Controle) – cada animal foi pulverizado com 3 litros de solução aquosa de Tween 80[®] a 0,1 (v/v).



Figura 5. Controle de larvas de *Haematobia irritans* nas massas fecais. **A:** estacas de bambu protegendo os bolos escolhidos; **B:** coleta de alíquota de fezes frescas recolhidas de massa fecal; **C e D:** coleta da massa fecal inteira, com o auxílio de uma pá e transferência para prato circular de papel alumínio, 24 horas após a marcação; **E e F:** estruturas semelhante a uma gaiola, feitas com tecido *voile*, para confinamento de moscas emergidas.

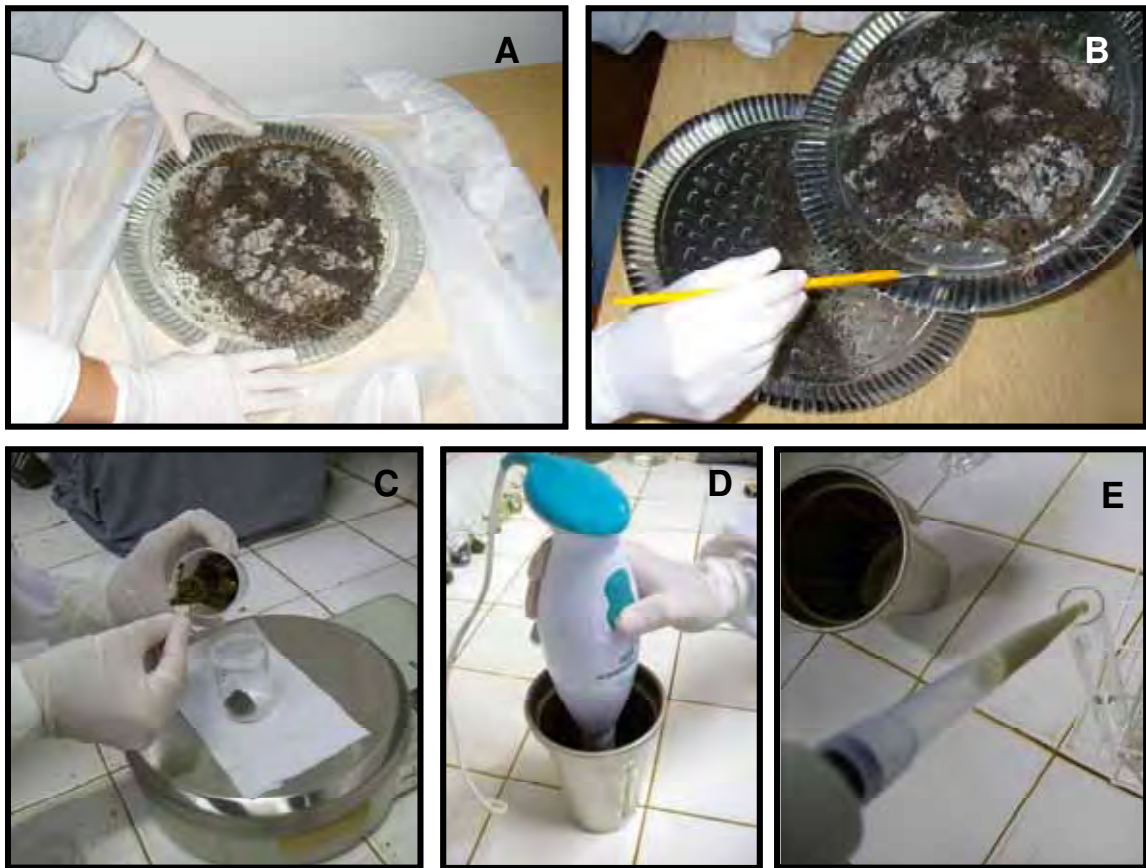


Figura 6. Controle de larvas de *Haematobia irritans* nas massas fecais. **A:** abertura das gaiolas 20 dias após a marcação; **B:** remoção, triagem e identificação de adultos de *Haematobia irritans* para contagem. **C:** pesagem de amostra de fezes (10 g) para análise de UFCs; **D:** desagregação e diluição da amostra de fezes em 90 mL de solução salina+Tween com o auxílio de um mixer; **E:** execução das diluições seriadas a partir da suspensão inicial.

Grupo B (Teste) – cada animal foi pulverizado com 3 litros de uma suspensão de *M. anisopliae* na concentração de 3×10^{10} conídios mL⁻¹.

A alimentação dos bovinos foi composta da mesma mistura e oferecida na mesma proporção por animal, como citado no item 2.5.1.

A suspensão de conídios para compor a calda utilizada no ensaio foi obtida a partir de conídios puros de *M. anisopliae*, extraídos do arroz. A calda foi preparada uma hora antes da pulverização em galões com capacidade de dez litros, onde 3 mL de Tween

80[®] foi diluído em três litros de água, adicionando posteriormente pó de conídio na quantidade adequada para se obter uma suspensão de 3×10^{10} conídios mL⁻¹ por animal (Figura 7 A).

As pulverizações foram realizadas no primeiro, sexto, décimo primeiro e décimo sexto dias após a introdução dos bovinos nos piquetes, sempre no fim da tarde entre quatro e seis horas, usando pulverizador manual com capacidade para 5 litros, com bico tipo cone (Figuras 7 B, C e D).

Diariamente durante os vinte e dois dias de experimento, todos os animais do grupo A e B foram fotografados por câmera digital Samsung[®] com capacidade de 10.1 mega pixels, entre sete e sete trinta horas da manhã. Foi fotografado um lado inteiro de cada animal com auxílio do zoom óptico de 3 vezes (Figura 7 E). As fotos foram transferidas para computador para a contagem do número de moscas (Figura 7 F). Para obter a contagem para ambos os lados do animal, utilizou-se a metodologia descrita por BIANCHIN et al. (2002).

2.6 Análise Estatística

No ensaio para o controle de larvas nas massas fecais utilizou-se um delineamento em parcelas subdivididas no tempo, considerando como tratamento principal os grupos tratados (animais que receberam conídios microencapsulados, animais que receberam conídio *in natura* em arroz e animais que não receberam o fungo) e como tratamento secundário os tempos de avaliação (0, 1, 3, 6, 9 e 12 dias após o fornecimento do fungo na alimentação).

No ensaio para o controle das moscas sobre os animais, utilizou-se um delineamento em parcelas subdivididas no tempo, considerando como tratamento principal os grupos tratados (animais pulverizados com *M. anisopliae* e animais pulverizados apenas com o veículo da suspensão) e como tratamento secundário os tempos de avaliação (de 0 ao 21^o dia). Para ambos os ensaios os resultados foram submetidos a análise de variância por meio do teste F e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para execução da análise estatística utilizou-se o programa SAS, 1998.



Figura 7. Controle de adultos de *Haematobia irritans* sobre os bovinos. **A:** transferência da calda para o pulverizador manual; **B, C e D:** pulverização dos bovinos realizada por pulverizador com bico tipo cone, sempre no final da tarde; **E:** fotografia tirada de um lado inteiro do animal; **F:** ampliação de fotografia em computador para a contagem do número de moscas no animal.

RESULTADOS

3.1 Controle de larvas em massas fecais

O número de moscas emergidas de massas fecais, no tratamento em que os animais ingeriram conídios microencapsulados do fungo, foi significativamente ($P < 0,01$) menor (11,7) quando comparado aos tratamentos com conídios de *M. anisopliae in natura* (27,9) e controle (29,5) (Tabela 1).

Tabela 1. Emergência de moscas de *Haematobia irritans* de massas fecais contendo conídios microencapsulados ou *in natura* do isolados E9 de *Metarhizium anisopliae*^a.

Tratamento	Número de moscas
Controle	29,5A
Conídio <i>in natura</i>	27,9A
Conídio microencapsulado	11,7B
Teste F	11,71**
dms (%)	9,0938
Tempo de avaliação (dias)	
Tempo 0	6,2D
1 dia	9,7CD
3 dia	15,2BC
6 dia	15,5BC
9 dia	22,1B
12 dia	69,3A
Teste F	46,15**
dms (%)	10,3224
Interação P X S	9,77**
C.V. (%) para parcelas	35,63
C.V.(%) para subparcela	26,01

^a Médias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\sqrt{x/100}$). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). NS não significativo; * significativo a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade.

Houve um aumento na população de *H. irritans* emergida de massas fecais com o decorrer dos dias em que os animais estiveram confinados. Como pode ser observado na Tabela 1, no tempo zero do experimento a quantidade de moscas emergidas das massas fecais foi, em média, de 6,2, enquanto das últimas massas recolhidas e analisadas, após 12 dias da instalação do ensaio, ocorreu emergência média de 69,3 moscas. Por meio da interação entre os tratamentos e os tempos de avaliação (Figura 8), significativa para o número de moscas emergidas de massas fecais, verifica-se que no 3º e no 12º dias após o início do ensaio, a população de *H. irritans* manteve-se significativamente menor ($P < 0,01$), com 4 e 13 moscas emergidas respectivamente, no tratamento com conídios microencapsulados de *M. anisopliae*, quando comparada a emergência de moscas nos tratamentos com conídios *in natura* de *M. anisopliae* (21,8 e 98,6) e tratamento controle (19,8 e 96,4).

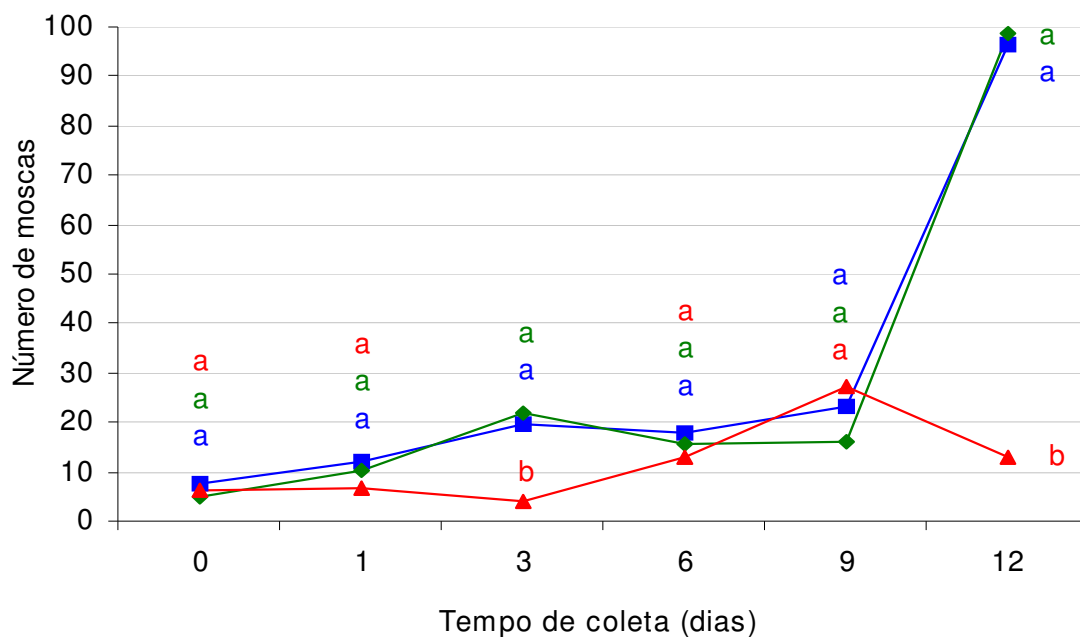


Figura 8. Emergência de *Haematobia irritans* de massas fecais, contendo conídios microencapsulados ou *in natura* de *Metarhizium anisopliae* em função da significância obtida na interação tratamento *versus* tempo de avaliação. Tratamentos: controle (■); *Metarhizium anisopliae in natura* (◆); *Metarhizium anisopliae* microencapsulado (▲). Médias seguidas de mesma letra no tempo de coleta, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Ao analisar a ocorrência de unidades formadoras de colônias (UFCs) de *M. anisopliae* encontradas nas amostras de fezes (Figura 9 e 10), pode-se observar diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos com *M. anisopliae* e o tratamento controle durante todo o período de avaliação do ensaio. Embora o tratamento contendo conídios microencapsulados do fungo, tenha apresentado número de UFCs maior que o tratamento com o fungo *in natura*, apenas na 9ª avaliação se obteve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os dois tratamentos.

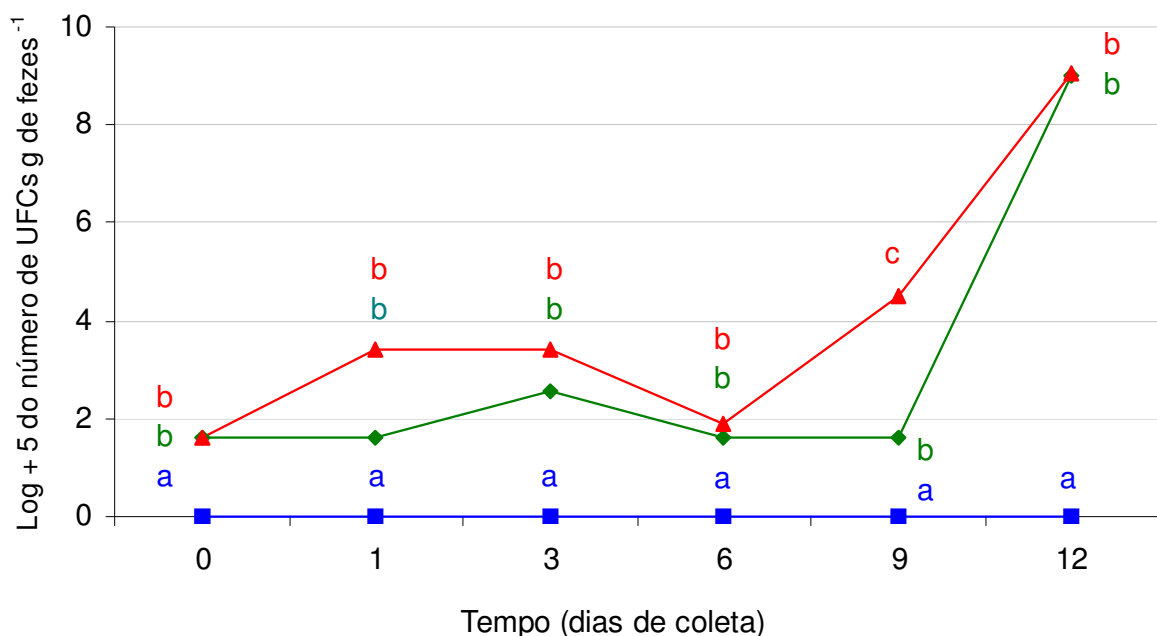


Figura 9. Ocorrência do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae* nas fezes de bovinos em avaliações realizadas nos tempos 0, 1, 3, 6, 9 e 12 dias após administração diária de conídios microencapsulados ou *in natura* do fungo aos animais. Controle (■); *Metarhizium anisopliae in natura* (◆); *Metarhizium anisopliae* microencapsulado (▲). Análise estatística realizada com dados transformados em log+5. Médias seguidas de mesma letra no tempo, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

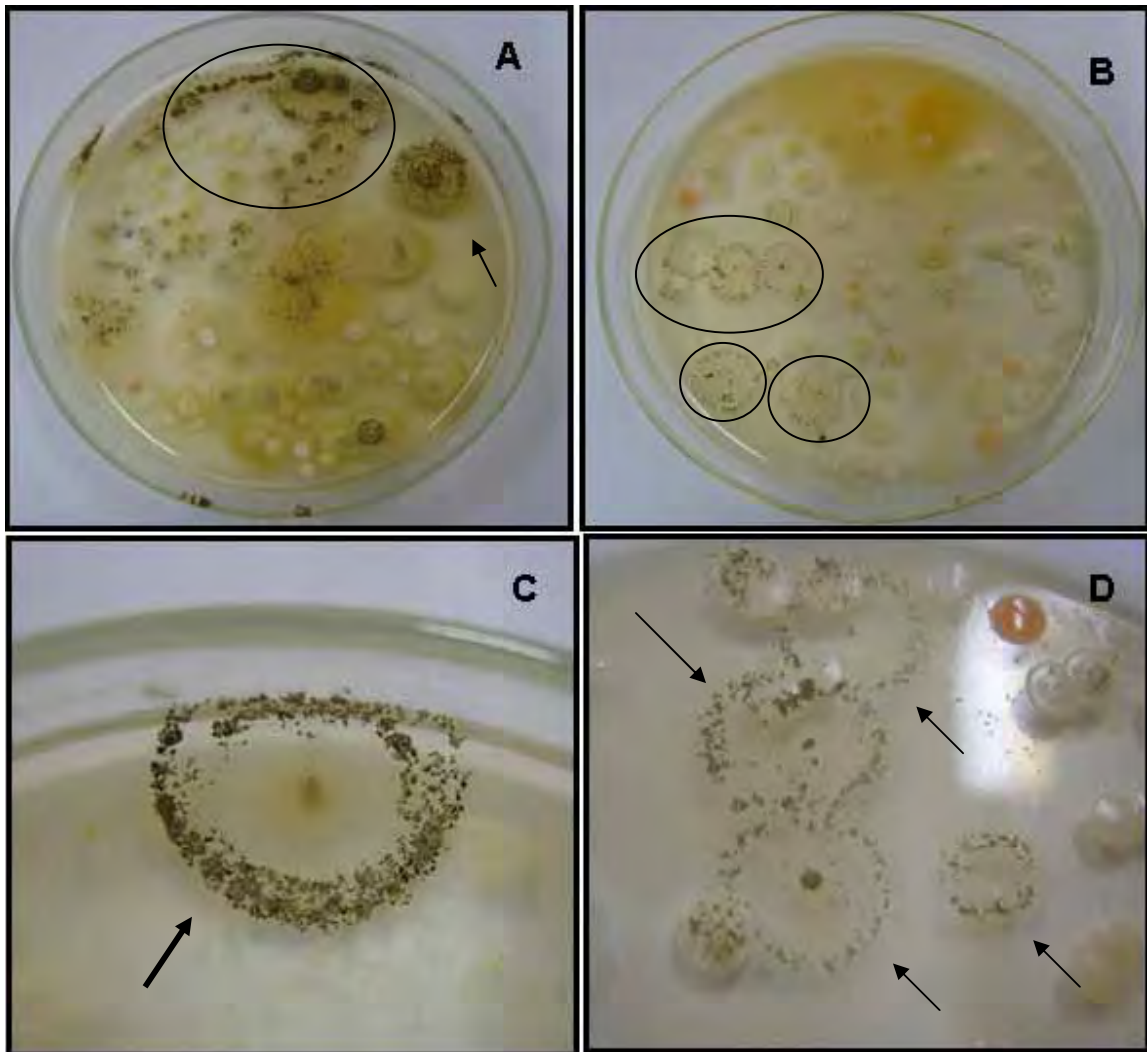


Figura 10. Ocorrência do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae* nas amostras fecais dos bovinos. **A e B:** placas de Petri mostrando o crescimento de colônias do fungo; **C e D:** detalhe de colônias do fungo crescidas no meio de cultura.

3.2 Controle de adultos sobre os bovinos

Após a segunda pulverização com *M. anisopliae*, a infestação de moscas nos animais do grupo tratado foi significativamente menor ($P < 0,05$) quando comparada ao grupo controle (22,9 e 43 moscas, respectivamente), havendo também redução

significativa do número de moscas por animal após a terceira e quarta pulverizações (Tabela 2).

Tabela 2. Moscas de *Haematobia irritans* encontradas nos bovinos, após quatro pulverizações dos animais com suspensão de conídios do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae*^a.

Tratamento	Pulverização				
	Tempo 0	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
Controle	29,0A	40,6A	43,0A	44,1A	63,0A
<i>Metarhizium anisopliae</i>	41,5A	30,6A	22,9B	23,4B	39,2B
Test F	0,73NS	4,27NS	6,62*	22,34**	6,79*
dms (%)	46,4584	15,4839	18,79	10,404	23,1892
Tempo de contagem (dias após a pulverização)					
1	-	24,2B	36,0AB	26,2B	29,5B
2	-	33,7AB	26,7B	34,5AB	45,1AB
3	-	33,7AB	24,2B	22,5B	56,7A
4	-	36,5AB	30,7B	50,9A	70,2A
5	-	49,7A	47,0A	34,6AB	54,0A
Test F	-	2,73NS	5,95**	6,56**	8,82**
dms (%)	-	23,9563	15,2683	16,9548	23,3568
C.V. (%) para parcela	38,73	26,73	38,57	21,74	30,46
C.V. (%) para subparcela	-	20,99	14,8	17,79	15,95
Interação P X S	-	10,67**	2,83*	1,77NS	1,94NS

^aMédias em valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em raiz ($\sqrt{x/100}$). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). NS não significativo; *significativo a 5% de probabilidade; **significativo a 1% de probabilidade. Tempo 0: avaliação realizada antes da primeira pulverização.

Por meio do desdobramento da interação entre os tratamentos e os tempos de avaliação após a segunda pulverização (Figura 11), observa-se que o grupo de animais pulverizados com o fungo apresentou, durante os cinco dias de análise, menor infestação por *H. irritans* (23,5, 26,5, 26,5, 19,5 e 28,5, respectivamente) quando comparado ao grupo de animais pulverizados apenas com o veículo da suspensão (48,5, 27, 32, 42 e 65,5, respectivamente).

A análise da quantidade de moscas encontradas nos bovinos nas avaliações realizadas nos períodos subseqüentes a cada pulverização mostrou, que o número de moscas encontrado nos animais variou bastante, mas foram observadas reduções acentuadas sempre no primeiro dia após as pulverizações, no 2º, 3º e 4º dias após a segunda pulverização e no 3º dia após a terceira pulverização (Tabela 2).

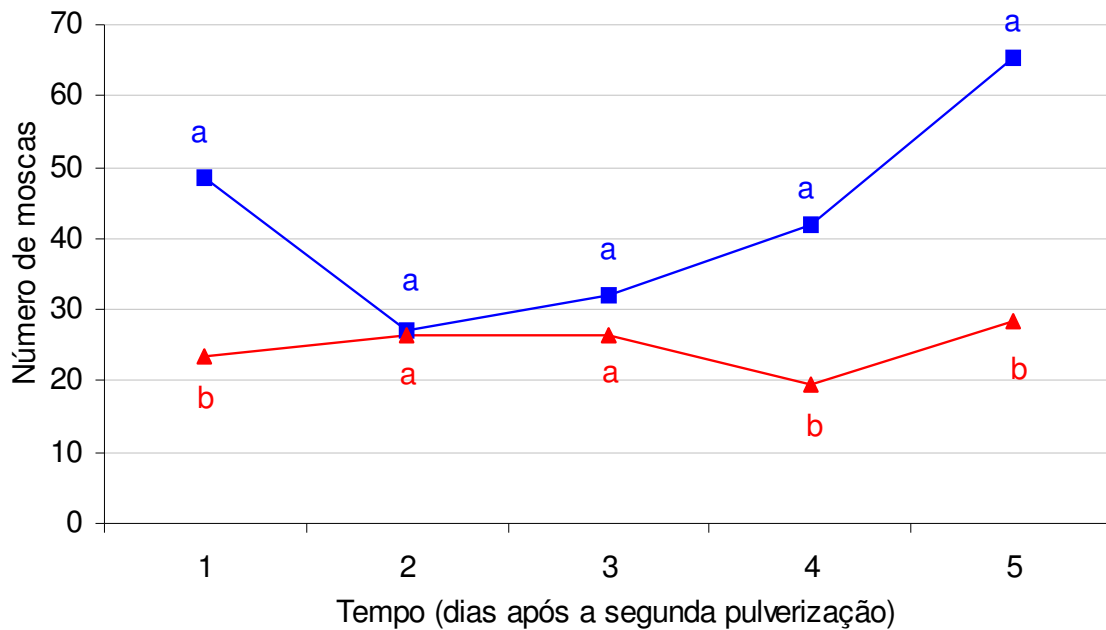


Figura 11. Ocorrência de *Haematobia irritans* nos bovinos, em função da significância obtida na interação tratamento *versus* tempo de avaliação, após a segunda pulverização com suspensão de conídio do isolado E9 de *Metarhizium anisopliae*. Tratamentos: controle (■); pulverização com *Metarhizium anisopliae* (▲). Médias seguidas de mesma letra no tempo, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Os animais permaneceram saudáveis durante o experimento, não apresentando nenhuma reação adversa aos tratamentos.

Foi observado aumento gradativo e contínuo da população de moscas emergidas de massas fecais ao longo das seis avaliações. Este fato pode ser explicado pelo confinamento dos bovinos nos piquetes durante o desenvolvimento do experimento, pois antes do mesmo, os animais permaneciam livres no pasto. No entanto, houve também grande diferença em relação ao número de *H. irritans* emergida em cada um dos tratamentos.

A preparação utilizada para a microencapsulação de conídios do isolado E9 de *M. anisopliae*, proporcionou ao fungo resistência à passagem pelo aparelho gastrointestinal do bovino. Assim como foi objetivado, a ocorrência do mesmo nos bolos fecais, ao longo dos dias em que esteve em contato com as formas imaturas do inseto, também pôde ser comprovada. Ao estudarem conídios de fungos microencapsulados em peletes de alginato de sódio para o controle de patógenos de plantas, FRAVEL et al. (1985) constataram que a persistência dos microrganismos peletizados no ambiente está associada ao tipo de microrganismo e de esporo do mesmo.

A ocorrência de UFCs nas fezes dos bovinos foi maior no 12^o dia de avaliação para os dois tratamentos com fungo, e o melhor resultado de controle foi também observado nesta avaliação. Isto sugere que um possível acúmulo do fungo no trato digestivo do bovino após sucessivas refeições com o entomopatógeno, tenha contribuído para promover o controle. Pode-se então inferir, que para controlar as formas imaturas do inseto nas massas fecais é necessário o uso contínuo e diário de *M. anisopliae* em todas as refeições dos bovinos. No entanto, apenas para o tratamento com os conídios microencapsulados se observou redução significativa da emergência de moscas das massas fecais. Embora a análise de UFCs tenham mostrado que conídios *in natura* de *M. anisopliae* obtiveram êxito na passagem pelo trato do bovino, é possível que a virulência do fungo tenha sido afetada, uma vez que, diferentemente da preparação com alginato de sódio, este tratamento não foi capaz de diminuir a emergência de *H. irritans* das massas fecais.

O trato intestinal dos bovinos é um ambiente bastante complexo. Em algumas regiões o pH é extremamente ácido, pois no rúmen pode variar de 5,5 a 7,0 e no abomaso de 1,6 a 2,5 (MERCHEN, 1988). Ocorrem também, enzimas de grande poder degradativo e há intensa atividade da microbiota devido a presença de bactérias,

protozoários e fungos (NOGUEIRA FILHO et al., 2004), que podem exercer ação inibitória sobre os conídios do patógeno. Além disso, a temperatura interna do corpo do bovino pode variar de 38 e 42 °C devido ao processo fermentativo (ANDRIGUETTO et al., 1981). Estes fatores são, a priori, restritivos a sobrevivência dos conídios e podem ter causado danos àqueles fornecidos *in natura* aos animais, afetando a virulência do fungo. A microencapsulação em peletes de alginato se mostrou capaz de proteger os conídios dos efeitos deletérios do trato digestivo, favorecendo a sobrevivência e a virulência, sugerindo que possa ser usada com sucesso para o controle de larvas de *H. irritans* nas massas fecais.

Semelhante ao presente ensaio, ARAÚJO et al. (2004) ofereceram a bovinos conídios microencapsulados do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium*, visando combater parasitos gastrintestinais. Os autores observaram redução no número de ovos por grama de fezes (OPG) no grupo tratado com a preparação do fungo, quando comparado ao grupo controle. GRAMINHA et al. (2005) verificaram que conídios microencapsulados ou *in natura* de *Artrobotrys conoides* não foram capazes de resistir a passagem pelo trato intestinal de ovinos, mas obtiveram sucesso quando usaram conídios microencapsulados e *in natura* de *A. musiformes*.

Ao oferecerem o fungo nematófago *A. robusta in natura* para bovinos, ARAÚJO et al. (1998), observaram redução do OPG e também de vermes recuperados após necropsia dos animais. Em contraste com os resultados observados por esses autores, no presente trabalho a administração de *M. anisopliae in natura* para bovinos, não foi capaz de reduzir o número de larvas nas fezes e conseqüentemente a emergência de *H. irritans* de massas fecais.

A pulverização do isolado E9 de *M. anisopliae* sobre bovinos, promoveu redução na quantidade de moscas parasitando os animais. Esse fato sempre foi observado após cada pulverização e durante os tempos de avaliação entre uma e outra pulverização.

Ao analisar a pulverização do isolado E9 de *M. anisopliae* sobre bovinos, para o controle do carrapato *R. (B.) microplus*, CORREIA et al. (1998) embora não tenha observaram efeito do fungo sobre o número de fêmeas parasitando bovinos estabulados, o fungo cresceu e esporulou em 91,7% das fêmeas coletadas, um dia após a pulverização, e incubadas em laboratório. Em contraste com os resultados

obtidos por estes autores, ao analisar dois isolados de *M. anisopliae* para o controle do carrapato em bovinos, POLAR et al. (2005) observaram que o número de *R. (B.) microplus* encontrado foi significativamente menor no tratamento com o isolado IMI386697, quando comparado ao isolado ARSEF3297 e ao controle. A diferença observada nos resultados obtidos por estes dois autores pode ser explicada pela metodologia de aplicação, na qual, os primeiros pulverizaram os animais uma única vez e avaliaram num período de 0, 1, 7, 16 dias, enquanto os últimos autores avaliaram o experimento após três semanas de pulverizações semanais.

No presente estudo as pulverizações foram realizadas a cada cinco dias e as avaliações diariamente, até o 21^o dia do ensaio, ou seja, tanto as pulverizações quanto as avaliações foram mais freqüentes quando comparadas as desses dois autores. No entanto, isso fez-se necessário em função da biologia do inseto, e por ser uma mosca, foi preciso um monitoramento mais constante. Ao analisar o efeito de *M. anisopliae* para *R. (B.) microplus* em bovinos naturalmente infestados, ALONSO-DÍAZ et al. (2007) observaram, assim como no presente trabalho, redução no número de parasitos a partir da segunda pulverização do fungo, até o término do experimento. Estes autores fizeram quatro pulverizações com intervalos de 15 dias e analisaram a presença do parasito em cinco tempos entre uma pulverização e outra.

Acredita-se que vários fatores possam influenciar a ação de fungos entomopatogênicos para o controle de adultos da mosca-dos-chifres em bovinos. No presente estudo a pulverização do isolado E9 de *M. anisopliae*, foi aplicada apenas com suspensão aquosa, desprovida de qualquer formulação, o que provavelmente desfavoreceu o controle mais efetivo do que o obtido, uma vez que o uso de formulações adequadas poderia proteger o conídio do fungo das altas temperaturas encontradas em diferentes regiões da superfície do couro dos bovinos. Segundo KAAVA (2000) formulações de *M. anisopliae* a base de óleo são mais eficazes tanto para estudos de controle de pragas em laboratório quanto em campo, quando comparada a formulações aquosa; MARANGA et al. (2005) afirmam o mesmo que os autores anteriores tanto para o fungo *M. anisopliae* quanto para *B. bassiana*.

A aderência e sobrevivência do fungo na pelagem do animal é um fator importante, pois estimava-se que, devido a grande mobilidade, efetivamente poucas

moscas seriam diretamente atingidas pelo fungo durante as pulverizações. O esperado era que por meio do tarso, o inseto entrasse em contato com conídios viáveis aderidos a pelagem do animal e a partir daí a infecção fosse estabelecida. Em um estudo sobre a flutuação da temperatura em seis regiões do corpo do bovino, POLAR et al. (2005) observaram que a média da temperatura na região espinhal do corpo do bovino foi significativamente maior (34,7^o C) que nas outras localizações, sendo a temperatura mais baixa encontrada na orelha do animal (31,9^o C). Este é um dado importante para o estabelecimento do controle de *H. irritans* por fungos entomopatogênicos uma vez que, a região dorsal do bovino costuma ser a de maior infestação da mosca nas primeiras horas da manhã e nas últimas horas da tarde.

Com base nos resultados encontrados no presente estudo, pode-se afirmar que houve sucesso no controle tanto de larvas, utilizando a preparação de conídios do fungo microencapsulados em peletes de alginato de sódio, quanto no controle de da mosca em bovinos pulverizados com *M. anisopliae*. De acordo com estes primeiros resultados de controle em campo, ficou evidenciado que os fungos entomopatogênicos são uma alternativa promissora para combater, tanto adultos em bovinos, quanto formas imaturas da mosca-dos-chifres em massas fecais. No entanto, novos estudos são necessários, principalmente para obter formulações adequadas e métodos de controle que possam ser empregados visando melhorar a eficiência do controle.

5. CONCLUSÃO

1. A microencapsulação de conídios do isolado E9 de *M. anisopliae* em alginato de sódio foi efetiva em promover a passagem pelo trato gastrointestinal dos bovinos e o controle de larvas de *H. irritans* nas massas fecais.
2. Conídios *in natura* do fungo resistiram a passagem pelo trato gastrointestinal dos bovinos, mas não foram patogênicos para as larvas da mosca nas massas fecais.

3. A pulverização de *M. anisopliae* sobre os animais reduziu o número de moscas parasitando bovinos confinados.

6. REFERÊNCIAS

- ALONSO-DÍAZ, M. A.; GARCÍA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R. ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, 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, p.336–340, 2007.
- ALVES, S. B. 1998. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.845-869.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; SOUZA, G. A. de; FILHO, A. B. Digestão: processos gerais e particulares por espécie animal. In: _____. **Nutrição animal**. 4. ed. São Paulo: NOBEL, 1981. p. 41-63.
- ARAÚJO, J. V.; GOMES, A. P. S.; GUIMARÃES, M. P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in south-eastern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.7, n.2, p.117-122, 1998.
- ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; CAMPOS, A. K.; SÁ, N. C. de; SARTI, P.; ASSIS, R. C. L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p.457-463, 2004.

BARROS, A. T.; GOMES, A.; KOLLER, W. Insecticide susceptibility of horn flies, *Haematobia irritans* (DIPTERA: MUSCIDAE), in state of Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.16, n.3, p.145-151, 2007.

BATISTA FILHO, A.; ALVES, S. B.; ALVES, L. F. A.; PEREIRA, R. M.; AUGUSTO, N. T. Formulação de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.917-965.

BIANCHIN, I.; ALVES, R. G. O. Mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*: comportamento e danos em vacas e bezerros Nelore antes da desmama. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.109-113, 2002.

BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E.; DeROUENB, S. M.; KIMBALL, M. D.; MORRISON, D. G.; WYATT, W. E.; FOILF, L. D. Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.29, p.125-135, 1999.

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**, San Diego, v.71, p.189-191, 1998.

FRANCISCO, E. A.; MOCHI, D. A.; CORREIA, A. C. B.; MONTEIRO, A. C. Determination of growth media for the viability test of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, p.1309-1312, 2005.

FRAVEL, D. R.; MAROIS, J. J.; LUMSDEN, R. D.; CONNICK Jr., W. J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. **Phytopathology**, Saint Paul, v.75, n.7, p.774-777, 1985.

GRAMINHA, E. B. N.; COSTA, A. J. da.; OLIVEIRA, G. P.; MONTEIRO, A. C.; PALMEIRA, S. B. S. Biological control of sheep parasite nematodes by nematode trapping fungi: in vitro activity and after passage through the gastrointestinal tract. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v.21, n.5, p.717-722, 2005.

INGLIS, G. D.; DUKE, G. M.; GOETTEL, M. S.; KABALUK, J. T. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.98, n.1, p.101-113, 2008.

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

KAAYA, G. P. Laboratory and field evaluation of entomogenous fungi for tick control. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.916, p. 559-564, 2000.

LI, A. Y.; GUERRERO, F. D.; PRUETT, H. Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.87, p.147–155, 2007.

MARANGA, R. O.; KAAYA, 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**, v.159, n.4, p.527-532, 2005.

MERCHEN, N. R. Digestion, absorcion y excrecion en los ruminates. In: CHURCH, D. C. **El Rumiente**: fisiología digestive y nutrición. Zaragoza: ACRIBIA, 1988. p.191-223.

MONTY, D. E.; GARBARENO, M. S. Behavioural and physiological responses of Holstein-Friesian cows to high environmental temperatures and artificial cooling in Arizona. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.39, p.877–882, 1978.

NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; OLIVEIRA, M. E. M. de; CUNHA, J. A. da; TOLEDO, L. R. de. Volume líquido e taxa de *turnover* no rúmen de Zebuínos e Bubalinos submetidos a dieta com volumosos e concentrados e sua relação com protozoários ciliados. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.5, n.1, p.1-7, 2004.

PEREIRA, R. M.; ROBERTS, D. W. Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.56, p.39-46, 1990.

POLAR, P.; MURO, M. A.; KAIRO, M. T. K.; MOORE, D.; PEGRAM, R. JOHN, S. A.; ROACH-BENN, C. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.134, n.1, p.159-167, 2005.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT** - User's Guide: statistic – version 6.12, Cary, 846p, 1998.

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