

INTERAÇÃO ENTRE *Scopulariopsis brevicaulis*, *Metarhizium anisopliae* E *Rhipicephalus microplus* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO*

Mariana Guedes Camargo¹, Fillipe Araujo de Sá², George Eduardo Gabriel Kluck³, Caio Junior Balduino Coutinho-Rodrigues⁴, Wendell Marcelo de Souza Perinotto¹, Isabele da Costa Angelo⁵, Patrícia Silva Gôlo¹, Simone Quinelato⁵, Jôsie Marcelle Lira de Albuquerque⁴ e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt⁶⁺

ABSTRACT. Camargo M.G., Sá F.A., Kluck G.E.G., Coutinho-Rodrigues C.J.B., Perinotto W.M.S., Angelo I.C., Gôlo P.S., Quinelato S., Albuquerque J.M.L. & Bittencourt V.R.E.P. [Interaction among *Scopulariopsis brevicaulis*, *Metarhizium anisopliae* and *Rhipicephalus microplus* under laboratory conditions]. Interação entre *Scopulariopsis brevicaulis*, *Metarhizium anisopliae* e *Rhipicephalus microplus* em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(Supl. 1):60-65, 2012. Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

Rhipicephalus microplus is the one of the most important cattle ectoparasites causing great concerns for the Brazilian breeders. As an alternative to the chemical acaricides, biological control has been increasingly studied. The present study aimed to evaluate a possible interaction among *Scopulariopsis brevicaulis*, *Metarhizium R. microplus* ticks, by testing if a possible *S. brevicaulis* maternal transmission would contribute for a better comprehension about the fungal infection physiopathology. *R. microplus* females were previously immersed in different concentrated suspensions of *S. brevicaulis* and the posterior virulence levels of *Metarhizium anisopliae sensu lato* (s.l.) were analyzed on larvae from eggs of these *S. brevicaulis*-treated females. *S. brevicaulis* virulence against larvae and eggs were also evaluated; although there were no significant alterations in the hatching percentage as well as in the larval mortality ($89.8\% \pm 1.6$ and $1\% \pm 0.1$ respectively). Results on virulence of the entomopathogenic fungus showed a reduced mortality of larvae from eggs of ticks' females previously treated with *S. brevicaulis* when larvae were immersed in *M. anisopliae* s.l. 10^5 conidia ml⁻¹. Therefore, *S. brevicaulis* was not pathogenic for *R. microplus*, although this fungus was able to reduce the mortality of larvae treated with low concentrations of *M. anisopliae* s.l.

KEY WORDS. Endosymbiosis, entomopathogenic fungi, cattle tick, maternal transmission.

RESUMO. *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita causador de grandes prejuízos à pecuária brasileira. Como alternativa a acaricidas químicos, o

controle biológico tem sido cada vez mais estudado. O presente trabalho objetivou a avaliação de uma possível interação entre *Scopulariopsis brevicaulis*,

*Recebido em 6 de novembro de 2012.

Aceito para publicação em 26 de dezembro de 2012.

¹ Médico-veterinário, *M.CsVs*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mails: mari_gc6@yahoo.com.br; wendellperinotto@bol.com.br; patricia_golo@yahoo.com.br

² Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: llipesa@hotmail.com

³ Curso de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brasil. E-mail: georgekluck@ig.com.br

⁴ Curso de Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mails: caio-jr@hotmail.com; lira.albuquerque@hotmail.com

⁵ Médica-veterinária, DSc. Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mails: isabeleangelo@yahoo.com.br; squinelato@gmail.com

⁶ Médica-veterinária, PhD, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000.

+Autor para correspondência. E-mail: vaniabit@ufrj.br - bolsista CNPq.

Metarhizium anisopliae e *R. microplus* em relação à patogenicidade destes fungos e a possível transmissão vertical contribuindo para um melhor conhecimento da fisiopatologia da infecção por estes fungos. Para testar a ação patogênica, ovos e larvas foram imersos em suspensões de diferentes concentrações de *S. brevicaulis*. A capacidade de transmissão vertical foi avaliada através do tratamento de fêmeas com diferentes concentrações *S. brevicaulis*, utilizadas para obtenção de larvas, que foram posteriormente expostas a diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.). Na avaliação da patogenicidade não houve alteração significativa nos percentuais de eclosão e mortalidade de larvas (com médias de $89,8 \pm 1,6\%$, e $1 \pm 0,1\%$, respectivamente). Já na avaliação da transmissão vertical, foi observada redução da mortalidade na concentração de 10^5 conídios/mL de *M. anisopliae* s.l. sobre larvas oriundas de fêmeas expostas a *S. brevicaulis*. Desta forma, *S. brevicaulis* não se mostrou patogênico a *R. microplus*, porém esse fungo foi capaz de promover diminuição da mortalidade de larvas tratadas com baixa concentração de *M. anisopliae* s.l.

PALAVRAS-CHAVE. Endossimbiose, fungos entomopatogênicos, carrapato dos bovinos, transmissão vertical.

INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* Canestrini (1888) (Murrel & Barker 2003) é um ectoparasita de bovinos, presente em áreas tropicais e subtropicais na América, África, Ásia e Austrália. No Brasil, os prejuízos causados, somente pelo parasitismo por *R. microplus* chegam a dois bilhões de dólares por ano (Grisi et al. 2002).

Carrapaticidas químicos sempre foram o principal meio de controle desses parasitos. Porém, o uso indiscriminado dessas substâncias leva a problemas como contaminação ambiental, presença de resíduos químicos na carne e leite e o desenvolvimento de cepas resistentes de carrapatos (Bullman et al. 1996, Foil et al. 2004, Kunz & Kemp 1994).

Diversas alternativas vêm sendo estudadas e novos métodos descritos, dentre eles, o controle microbiológico utilizando fungos entomopatogênicos merece destaque (Fernandes & Bittencourt 2008). *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) (Sorokin 1883) é um fungo cosmopolita comumente isolado do solo e de insetos e é conhecidamente patogênico aos diferentes estágios evolutivos de *R. microplus* (Fernandes et al. 2011, Kaaya et al. 2011, Sun et al. 2011).

O fungo *Scopulariopsis brevicaulis* é comumente isolado como saprófito no solo e em plantas, também isolado de substratos queratinizados de animais, podendo ser agente primário ou secundário de micoses, inclusive patogênico a humanos. A presença de conídios de *S. brevicaulis* nas glândulas intrategumentares e na hemolinfa foi observada no carrapato *Dermacentor variabilis*, assim como sua transmissão vertical aos ovos (Benoit & Yoder 2004). Essa relação foi caracterizada como endossimbiótica, podendo conferir ao carrapato a uma maior resistência ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae* (Yoder et al. 2008).

Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar uma possível interação entre *S. brevicaulis*, *M. anisopliae* e *R. microplus* em relação à patogenicidade destes fungos contra o carrapato e a possível transmissão vertical de *S. brevicaulis*, contribuindo para um melhor conhecimento da fisiopatologia da infecção por estes fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização do experimento

O estudo foi realizado no Laboratório de Controle Microbiano da Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Manutenção das colônias de *S. brevicaulis* e *M. anisopliae* s.l.

Foi utilizado o isolado de *M. anisopliae* s.l. Ma 959, cedido pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ). O isolado de *S. brevicaulis* foi cedido pelo Departamento de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ). Para a manutenção das colônias, os fungos foram inoculados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de extrato de levedura a 10%. Após a inoculação na placas foram mantidas em câmara climatizada, tipo B.O.D., sob $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (U.R.) $\geq 80\%$ durante 15 dias para o crescimento fúngico e produção de conídios. Posteriormente, foram armazenadas a 4°C até a realização do bioensaio.

Obtenção das suspensões de *S. brevicaulis* e *M. anisopliae* s.l.

Os conídios foram raspados das superfícies das placas e ressuspensos em água destilada estéril

e espalhante adesivo Tween 80 a 0,1% (Luz et al. 1998). A suspensão foi quantificada segundo Alves (1998) utilizando câmara de Neubauer e microscópio óptico até atingir-se a concentração de 10^8 conídios/mL. As demais suspensões foram obtidas a partir de diluições decimais seriadas até a concentração de 10^5 conídios/mL. Foram inoculados 10 μ L da suspensão inicial em meio de cultura BDA para avaliação da viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* s.l. e *S. brevicaulis* (Alves 1998).

Obtenção da colônia de *R. microplus*

Fêmeas ingurgitadas foram obtidas de infestação artificial de três bezerros mestiços estabulados (projeto submetido à Comissão de Ética da UFRRJ, protocolo 2083.011620/2011-68) na EPPWON. Foi realizada a assepsia da cutícula das fêmeas de *R. microplus*, utilizando hipoclorito de sódio a 1% e, posteriormente acondicionadas em B.O.D. ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$), para a obtenção de ovos e larvas.

Avaliação da ação patogênica de *S. brevicaulis* sobre ovos e larvas de *R. microplus*

A postura das fêmeas até o 10º dia foi pesada em alíquotas de 50 mg, acondicionada em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo e mantidos em câmara climatizada. Parte dos tubos foi distribuída em cinco grupos distintos, contendo oito repetições cada: um grupo controle, tratado com água destilada estéril + Tween 80 a 0,1% e outros quatro grupos, tratados com suspensões nas concentrações de 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios/mL. Foi inoculado em cada tubo 1 mL da respectiva suspensão conidial testada, ficando em contato com os ovos durante três minutos, posteriormente, os tubos foram invertidos para que o excesso de suspensão fosse absorvido pelo algodão que os vedava. Os grupos foram mantidos em B.O.D. ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$). O percentual de eclosão de cada grupo foi avaliado a cada cinco dias até o 30º dia após tratamento.

Os demais tubos foram utilizados no bioensaio com larvas, sendo mantidos em B.O.D. ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$) até a completa eclosão das larvas. Os tubos com eclosão inferior a 95% não foram utilizados. O tratamento e a avaliação do percentual de mortalidade das larvas foi semelhante à metodologia utilizada para ovos.

Avaliação da capacidade de transmissão vertical de *S. brevicaulis* e sua ação protetora contra *M. anisopliae* s.l.

Foram formados três grupos, contendo 100 fêmeas ingurgitadas cada: um grupo controle (água

destilada estéril + Tween 80 a 0,1%) e dois grupos tratados com suspensões de 10^8 e 10^7 conídios/mL de *S. brevicaulis*. As fêmeas foram imersas nas respectivas suspensões durante 3 minutos, sendo armazenadas posteriormente em B.O.D. ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$) para a realização da postura. Para cada tratamento realizado, alíquotas de 50 mg de ovos foram acondicionadas em tubos de ensaio até a completa eclosão das larvas. Os tubos com eclosão inferior a 95% não foram utilizados.

As larvas oriundas de fêmeas de cada tratamento foram separadas em três grupos, com 10 repetições cada: um grupo controle, tratado com água destilada estéril e Tween 80 a 0,1% e dois grupos tratados com suspensões de 10^8 e 10^5 conídios/mL de *M. anisopliae* s.l. O tratamento e avaliação do percentual de mortalidade das larvas foi semelhante ao apresentado no bioensaio de larvas anterior.

Análise estatística

Para a avaliação dos dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de Student para comparação entre as ordenações médias a 5% de significância ($p > 0,05$) (Sampaio 2002).

RESULTADOS

A viabilidade dos conídios dos isolados fúngicos estudados foi de 100% de germinação após 24 horas de incubação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$, demonstrando que os conídios apresentaram-se viáveis e aptos a serem utilizados nos bioensaios.

Os ovos de *R. microplus* tratados com diferentes concentrações de *S. brevicaulis* não apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle, o percentual de eclosão das larvas variou entre $99,62 \pm 5,25\%$ para o grupo controle e $80,12 \pm 27,20\%$ para os ovos tratados com a concentração de 10^8 conídios/mL (Figura 1). Resultado similar

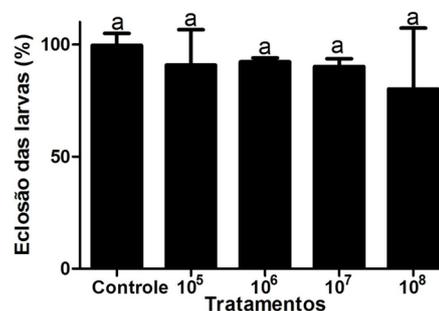


Figura 1. Média e desvio padrão do percentual de eclosão das larvas oriundas de ovos tratados com diferentes concentrações fúngicas (10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml) de *Scopulariopsis brevicaulis* e Controle (água destilada estéril e Tween 80 0,1%).

também foi observado no percentual de mortalidade de larvas, que variou entre $0,42 \pm 0,25$ para o grupo controle e $0,65 \pm 0,25$ na concentração de 10^8 conídios/mL de *S. brevicaulis* (Figura 2), evidenciando a não patogenicidade deste fungo para esta espécie de carrapato.

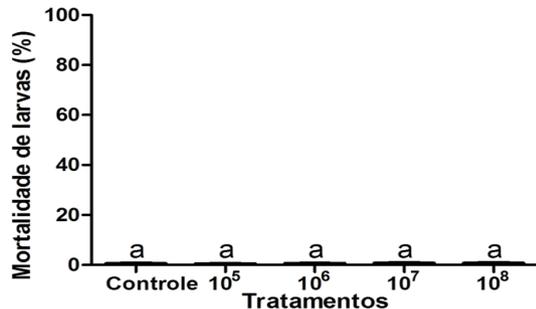


Figura 2. Média e desvio padrão do percentual de mortalidade das larvas tratadas com diferentes concentrações fúngicas (10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml) de *Scopulariopsis brevicaulis* e Controle (água destilada estéril e Tween 80 0,1%).

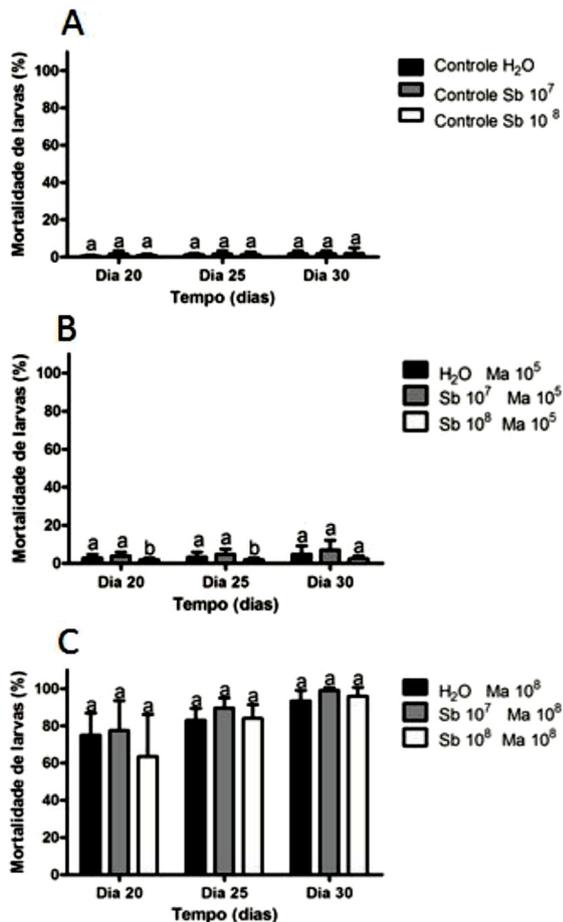


Figura 3. Percentual de mortalidade das larvas oriundas de fêmeas tratadas com *Scopulariopsis brevicaulis* (Sb 10^7 e 10^8) e água destilada estéril e Tween 80 0,1% (H_2O) tratadas com diferentes concentrações de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) após 20, 25 e 30 dias de tratamento. A= Larvas tratadas com água destilada estéril e Tween 80 0,1%; B= Larvas tratadas com *M. anisopliae* s.l. a 10^5 conídios/mL; C= Larvas tratadas com *M. anisopliae* s.l. a 10^8 conídios/mL.

Foi avaliada também a capacidade de transmissão vertical de *S. brevicaulis* e sua possível ação protetora contra *M. anisopliae* s.l. sobre larvas de *R. microplus*. As larvas do grupo controle, oriundas das fêmeas submetidas aos diferentes tratamentos, não apresentaram diferença estatística (Figura 3a). No grupo de larvas tratadas com *M. anisopliae* s.l. na concentração de 10^5 conídios/mL, pode-se observar que somente aquelas oriundas de fêmeas tratadas com *S. brevicaulis* na concentração de 10^8 conídios/mL apresentaram menor percentual de mortalidade aos 20 e 25 dias pós-tratamento, demonstrando a possível capacidade das fêmeas em transmitir esta espécie fúngica a seus estágios imaturos (Figura 3b). Não foi observada diferença significativa nos grupos de larvas tratadas com *M. anisopliae* s.l. na concentração de 10^8 conídios/mL (Figura 3c).

DISCUSSÃO

A utilização de fungos entomopatogênicos com finalidade de controle biológico tem sido alvo de inúmeras pesquisas científicas (Willadsen 2006). O fungo *S. brevicaulis* é naturalmente encontrado na microbiota de diferentes artrópodes (Perrucci et al. 2008). Yoder et al. (2008) observaram que fêmeas do carrapato *Dermacentor variabilis* que apresentavam *S. brevicaulis* em sua microbiota natural, exibiram maior resistência ao efeito entomopatogênico de *M. anisopliae* s.l.; ao contrário da ação demonstrada por Perrucci et al. (2008), que relataram ação patogênica de *S. brevicaulis* sobre *Psoroptes cuniculi*. O presente estudo evidenciou que *S. brevicaulis* não apresentou ação patogênica sobre ovos e larvas de *R. microplus*.

A capacidade deste fungo em promover ação protetora em larvas de *R. microplus* também foi analisada. Benoit et al. (2004) ao avaliarem a capacidade de *S. brevicaulis* em proporcionar proteção contra infecções fúngicas secundárias em *D. variabilis*, relataram a capacidade deste micro-organismo em reduzir ou prevenir o crescimento de conídios de diversos fungos. Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram a potencial ação protetora sobre larvas de *R. microplus*, já que foi observada menor mortalidade no grupo de larvas tratadas com *M. anisopliae* s.l. na concentração de 10^5 conídios/mL, oriundas de fêmeas submetidas aos tratamentos com *S. brevicaulis*, sugerindo uma possível relação endossimbiótica entre estas espécies. Ao 30º dia pós-tratamento, não foi observada esta proteção, possivelmente devido à baixa concentração de co-

nídios de *M. anisopliae* s.l., que necessitou de mais tempo para promover sua ação entomopatogênica. Fato evidenciado pelo maior percentual de mortalidade de larvas tratadas com a concentração mais elevada de *M. anisopliae* s.l. (10^8 conídios/mL) ao 20°, 25° e 30° dias pós-tratamento, deste modo, não sendo observada influência de *S. brevicaulis* na patogenicidade de *M. anisopliae* s.l. em altas concentrações.

Possivelmente a presença de *S. brevicaulis* promoveu alterações em larvas conferindo proteção à ação entomopatogênica de *M. anisopliae* s.l., quando em baixa concentração. Yoder et al. (2006) relatam que a alteração do equilíbrio hidroeletrólítico proporcionado por fungos entomopatogênicos a artrópodes, em especial *M. anisopliae*, é uma das principais ferramentas para a patogenicidade fúngica. Sendo assim, Yoder et al. (2008) propõem que a presença de *S. brevicaulis* no interior do carrapato realiza um bloqueio físico nos poros da cutícula do artrópode, evitando assim perda de água pela sua transpiração, além disso, a presença de hifas ricas em umidade na hemocele do ectoparasita serviria como fonte hídrica, evitando desta forma sua morte por desidratação.

Benoit & Yoder (2004) relataram a ocorrência de transmissão materna de *S. brevicaulis* para gerações seguintes de *D. variabilis*, porém de forma não transovariana e sim como um contaminante para os ovos durante a passagem destes pelo oviduto da fêmea. O baixo percentual de mortalidade observado no grupo de larvas oriundas de fêmeas tratadas com diferentes concentrações de *S. brevicaulis* demonstra a possibilidade de transmissão deste fungo pelas fêmeas de *R. microplus*. Porém, mais estudos são necessários para confirmação desta capacidade de transmissão e da ação protetora de *S. brevicaulis* para os diferentes estágios de desenvolvimento do carrapato *R. microplus*.

CONCLUSÃO

O fungo *S. brevicaulis* não se mostrou patogênico aos estágios imaturos do carrapato *R. microplus*. Em contrapartida, demonstrou-se capaz de promover diminuição da mortalidade de larvas tratadas com baixas concentrações de *M. anisopliae* s.l. quando oriundas de fêmeas tratadas por *S. brevicaulis*.

Agradecimentos. Esta pesquisa foi executada com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvi-

mento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fornecer aos M.Sc. e Doutorandos as bolsas de estudo e a Fundação Oswaldo Cruz e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por cederem os fungos utilizados neste estudo. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt é bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed. FEALQ, Piracicaba, 1998. 1163p.
- Benoit J.B. & Yoder J.A. Maternal transmission of a fungus to eggs in the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Int. J. Acarol.*, 30:77-80, 2004.
- Benoit J.B., Yoder J.A. & Zettler L.W. *Scopulariopsis brevicaulis* (Deuteromycota) affords protection from secondary fungus infection in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): inference from competitive fungal interactions in vitro. *Int. J. Acarol.*, 30:375-381, 2004.
- Bullman G.M., Muñoz Cabenas M.E. & Ambrústolo R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. *Vet. Argent.*, 8:3-15, 1996.
- Fernandes E.K.K. & Bittencourt V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp. Appl. Acarol.*, 46:71-93, 2008.
- Fernandes E.K.K., Angelo I.C., Rangel D.E.N., Bahiense T.C., Moraes A.M.L., Roberts D.W. & Bittencourt V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.*, 182:307-318, 2011.
- Foil L.D., Coleman P., Eisler M., Fragososnachez H., Garcia-Vazquez Z., Guerrero F.D., Jonsson N.N., Langstaff I.G., Li A.Y., Machila N., Miller R.J., Morton J., Pruett J.H. & Torr S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Vet. Parasitol.*, 125: 163-181, 2004.
- Grisi L., Massard C.L., Moya-Borja G.E. & Pereira J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet.*, 21:8-10, 2002.
- Kaaya G.P., Samish M., Hedimbi M., Gindin G. & Glazer I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. *Exp. Appl. Acarol.*, 55:273-281, 2011.
- Kunz S.E. & Kemp D.H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev. Off. Int. Epizoot.*, 13: 1249-1286, 1994.
- Luz C., Tigano M.S., Silva I.G., Cordeiro C.M.T. & Aljanabi S. M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93:839-846, 1998.
- Murrel, A. & Barker, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol*, 56:169-172, 2003.

- Perrucci S., Zini A., Donadio E., Mancianti F. & Fichi G. Isolation of *Scopulariopsis* spp. fungi from *Psoroptes cuniculi* body surface and evaluation of their entomopathogenic role. *Parasitol. Res.*, 102:957-962, 2008.
- Sampaio I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2ª ed. FEPMVZ, Belo Horizonte, 2002. 265p.
- Sun M., Ren Q., Guan G., Liu Z., Ma M., Gou H., Chen Z., Li Y., Liu A., Niu Q., Yang J., Yin H. & Luo J. Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.*, 180:389-393, 2011.
- Willadsen P. Tick control: Thoughts on a reseach agenda. *Vet. Parasitol.*, 138:161-168, 2006.
- Yoder J.A., Hanson P.E., Zettler L.W., Benoit J.B., Ghisays F. & Piskin K.A. Internal and External Mycoflora of the American Dog Tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), and its Ecological Implications. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:4994-4996, 2003.
- Yoder J.A., Ark J.T., Benoit J.B., Rellinger E.J., Tank J.T. Inability of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), to resist desiccation and maintain water balance following application of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycota). *Int. J. Acarol.*, 32:211-218, 2006.
- Yoder J.A., Benoit J.B., Denlinger D.L., Tank J.L. & Zettler L.W. An endosymbiotic conidial fungus, *Scopulariopsis brevicaulis*, protects the American dog tick, *Dermacentor variabilis*, from Desiccation imposed by an entomopathogenic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, 97:119-127, 2008.