

EFEITO DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS *METARHIZIUM ANISOPLIAE* E *BEAUVERIA BASSIANA* EM OVOS DE *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (ACARI:IXODIDAE)

EFFECT OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGI *METARHIZIUM ANISOPLIAE* AND *BEAUVERIA BASSIANA* ON EGGS OF *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (ACARI:IXODIDAE)

Sílvia Gonzalez Monteiro¹ Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt²
Erik Daemon² João Luiz Horácio Faccini³

RESUMO

Este experimento foi conduzido para conhecer os efeitos de duas espécies de fungos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em ovos do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sob temperatura e umidade constantes ($27 \pm 1^\circ \text{C}$ e $> 80\%$ de umidade relativa (UR)) e variáveis ($25 \pm 5^\circ \text{C}$ e $> 60\%$ UR). Ovos de *R. sanguineus* foram imersos em quatro concentrações (10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios/ml) de dois isolados de *B. bassiana* (Bb 986 e Bb 747) e três isolados de *M. anisopliae* (Ma 959, Ma E9 e Ma 319). Os períodos de incubação e eclosão das larvas de todos os ovos tratados foram estatisticamente não significantes ($P > 0,05$). Entretanto, a porcentagem de eclosão das larvas, oriundas dos ovos tratados, foi inversamente proporcional à concentração de conídios/ml. A porcentagem de eclosão variou entre 0 à 26,66% para a concentração 10^8 conídios/ml, e 6,66 à 100% para a concentração 10^5 conídios/ml. A porcentagem de eclosão das larvas de ovos mantidos em temperatura e umidade variáveis foi menor quando comparada com a das larvas de ovos mantidos em temperatura de 27°C e umidade $> 80\%$ UR ($P < 0,05$). A CL 50 e 90 para inibição da eclosão das larvas também foi menor em temperatura e umidade variáveis ($P < 0,05$).

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, fungos entomopatogênicos, controle microbiano.

SUMMARY

This experiment was conducted to evaluate the effects of two species of fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the eggs of the tick *Rhipicephalus sanguineus* at constant ($27 \pm 1^\circ \text{C}$ and $> 80\%$ RH) and variable ($25 \pm 5^\circ \text{C}$ and $> 60\%$ RH), temperatures and humidities. Eggs of *R. sanguineus* were immersed in four concentrations (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 conidia/ml) of two isolated of *B. bassiana* (Bb 986 and Bb 747) and three isolated of *M. anisopliae* (Ma 959, Ma E9 and Ma 319). The incubation and hatch periods of all treated eggs and controls were statistically not significant ($P > 0.05$). Otherwise, the percentage of hatch of larvae in all treated eggs was inversely proportional to the concentration of conidia/ml. The percentage of hatch ranged from 0 to 26.66% for the 10^8 concentration and from 6.66 to 100% for the 10^5 concentration. The percentage of eclosion of eggs maintained at variable temperatures and humidities were lower as compared with eggs maintained at $27 \pm 1^\circ \text{C}$ and $> 80\%$ RH ($P < 0.05$). The DL 50 and 90 for inhibition of eclosion of larvae were also lower at variable temperatures and humidities ($P < 0.05$).

neus at constant ($27 \pm 1^\circ \text{C}$ and $> 80\%$ RH) and variable ($25 \pm 5^\circ \text{C}$ and $> 60\%$ RH), temperatures and humidities. Eggs of *R. sanguineus* were immersed in four concentrations (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 conidia/ml) of two isolated of *B. bassiana* (Bb 986 and Bb 747) and three isolated of *M. anisopliae* (Ma 959, Ma E9 and Ma 319). The incubation and hatch periods of all treated eggs and controls were statistically not significant ($P > 0.05$). Otherwise, the percentage of hatch of larvae in all treated eggs was inversely proportional to the concentration of conidia/ml. The percentage of hatch ranged from 0 to 26.66% for the 10^8 concentration and from 6.66 to 100% for the 10^5 concentration. The percentage of eclosion of eggs maintained at variable temperatures and humidities were lower as compared with eggs maintained at $27 \pm 1^\circ \text{C}$ and $> 80\%$ RH ($P < 0.05$). The DL 50 and 90 for inhibition of eclosion of larvae were also lower at variable temperatures and humidities ($P < 0.05$).

Key words: *Rhipicephalus sanguineus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, entomopathogenic fungi, microbial control.

INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, pertencem à subdivisão Deuteromycotina, Classe Hyphomycetes, Família Moniliaceae, sendo patogênicos para várias pragas de plantas cultivadas no Brasil e têm sido testados no controle de espécies das famílias Musci-

¹Aluna do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Parasitologia Veterinária Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

²Professor Adjunto do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil, 23890-000. E-mail: vaniabit@ufrj.br. Autor para correspondência.

³Professor Titular do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

dae, Reduviidae, Culicidae e Ixodidae, artrópodes de relevada importância médica e veterinária (BITTENCOURT, 1992). Uma grande vantagem desses fungos sobre os pesticidas convencionais é a sua persistência sobre a população hospedeira, redução da longevidade e altas taxas de mortalidade em larvas e adultos das populações de insetos (ROBERTS & CASTILLO, 1980).

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) é um ixodídeo, trioxeno, parasito de canídeos e transmissor de uma variedade de agentes patogênicos, além de ocasionar ferimentos de pele susceptíveis a infecções bacterianas secundárias. Em grandes infestações pode causar anemia severa e até morte. Por isso a importância do estudo dessa espécie que está amplamente distribuída nas regiões tropicais e sub-tropicais (HOOKER *et al.*, 1912).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* de dois isolados do fungo *B. bassiana* e três isolados de *M. anisopliae* sobre ovos do carrapato *R. sanguineus* em temperatura controlada e ambiente.

MATERIAIS E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido na Estação para Pesquisas Parasitológicas do curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) no período de março de 1995 à setembro de 1996. O estudo da fase não-parasitária do carrapato *R. sanguineus* foi realizado em condições controladas e ambientais, no laboratório de Ixodologia e no laboratório de Controle Biológico, ambos localizados na Estação para Pesquisas Parasitológicas.

Duzentas e vinte fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram coletadas de cães (*Canis familiaris*, L. 1758), naturalmente infestados e sem contato recente com carrapaticidas, no bairro de Campo Grande, cidade do Rio de Janeiro. Após a coleta, as mesmas foram lavadas em água corrente, secas, identificadas, pesadas e acondicionadas em placas de Petri, por meio de fita adesiva. Metade dessas fêmeas foram colocadas em câmara climatizada regulada a $\pm 27^\circ\text{C}$ e umidade relativa superior a 80% para obtenção da postura. A outra metade (110 fêmeas), também acondicionada em placas de Petri, foi conservada em meio ambiente. Após o início da postura, os ovos foram pesados, e postos cada 100mg em tubos de ensaio devidamente identificados, em temperatura ambiente e controlada.

Os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, utilizados no experimento, foram cedidos pelo

Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (USP). Foram avaliados três isolados de *M. anisopliae*, denominados 959, 319 e E9 e dois isolados de *B. bassiana*, denominados 986 e 747. As suspensões de conídios de cada isolado foram preparadas a partir de fungos produzidos em meio de arroz em sacos de polipropileno. Placas de Petri contendo o isolado puro em meio BDA (Batata, dextrose e ágar) foram utilizadas para preparação de uma suspensão, contendo 3×10^8 conídios/ml para posterior inoculação de 10 ml da suspensão no saco contendo arroz (100 gramas) e água destilada (30 ml), previamente autoclavado, durante 30 minutos a 120°C e já resfriado.

Depois da inoculação do fungo, foi realizada a homogeneização do saco, e estes foram levados à câmara climatizada regulada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 16 horas. Quinze dias após a inoculação, os sacos contaminados foram eliminados e os selecionados, utilizados para elaboração das diferentes concentrações utilizadas.

As contagens de conídios foram feitas através de contagem direta ao microscópio, com auxílio de câmara de Neubauer (MORAES & ALVES, 1986). Uma porção de arroz, contendo o fungo, foi homogeneizada em becker graduado com 100ml de água deionizada e três gotas de espalhante adesivo. Após agitação, uma amostra da suspensão foi posta na câmara de Neubauer e levada ao microscópio para avaliação do número de conídios encontrados. Desta forma, obteve-se quatro suspensões (10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios/ml). No grupo controle, foi utilizado apenas 100ml de água deionizada e 3 gotas de espalhante adesivo (Polyoxethylene Sorbitan Tween 80).

Cada experimento com ovos foi constituído de dois grupos: um realizado em condições ambientais e outro em temperatura e umidade controladas, ambos com quatro diferentes tratamentos (10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 conídios/ml) e um grupo controle para cada isolado (Bb 986, Bb 747, Ma 959, Ma E9, e Ma 319); sendo que para cada tratamento foram feitas três repetições e utilizados 100mg de ovos em cada uma das repetições do tratamento, num total de 150 avaliações. Os tubos de ensaio, contendo 100mg de ovos cada e vedados com algodão hidrófilo, foram identificados com concentração, condição climática, e amostra utilizada.

Após agitação da suspensão a ser testada, cada tratamento recebeu dez mililitros da suspensão, sendo mantidos imersos durante 2 minutos. Após esse tempo, o excesso da suspensão foi eliminado através da inversão do tubo de ensaio, e foram mantidos nas diferentes condições de temperatura e umidade já descritas.

Na avaliação dos efeitos das diferentes amostras dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre os ovos de *R. sanguineus* foram observados: a) Período de incubação dos ovos, compreendido entre o primeiro dia de postura e o início de eclosão dos ovos (PEREIRA, 1980); b) Período de eclosão, compreendido entre o primeiro e o último dia da eclosão das larvas (BELLATO, 1995); c) Percentual de eclosão, que foi realizado 30 dias após o início da mesma e estimado visualmente (DAVEY *et al.*, 1984).

O material não eclodido foi retirado do tubo de ensaio, lavado em hipoclorito de sódio por um minuto, enxaguado em água deionizada, seco em papel filtro e colocado em câmara úmida, em câmara climatizada nas condições já descritas para posterior isolamento do fungo. Os ovos colocados em câmara úmida, que tiveram conidiogênese de fungos na sua estrutura, foram separados e colocados em meio de cultura (BDA) para crescimento do micélio.

Para avaliação dos dados obtidos foram feitas análises de variância (ANOVA) para saber se

houve variações dentro de um mesmo tratamento e entre os outros tratamentos com os diferentes isolados, concentrações e condições climáticas. A ANOVA foi seguida por aplicação do teste de TUKEY para comparação entre as médias, calculando-se o coeficiente de variação para verificar a precisão dos dados. Para calcular a concentração letal, CL 50 e CL 90, foi realizada a análise de próbites, segundo FINNEY (1964 e 1971) e LITCHFIELD & WILCOXON (1949).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O período de incubação dos ovos tratados com as suspensões elaboradas com os diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* e o período de eclosão das larvas, oriundas desses ovos, não variaram quando comparados ao grupo controle e/ou entre os tratamentos neste experimento (Tabelas 1 e 2), porém BOYCEV & RIZVANOV (1960) obtiveram um aumento do período de incubação após o

Tabela 1 - Valores médios dos aspectos biológicos de ovos de *Rhipicephalus sanguineus* tratados com diferentes concentrações dos isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Temperatura	Concentração conídios/ml		Isolados								
			Período de incubação (dias)			Período de eclosão (dias)			Eclosão (%)		
			E9	319	959	E9	319	959	E9	319	959
27°C	Controle	☒	23,66	24,66	23,33	9,66	12,33	9	86,66	100	93,33
		s	0,57	0,57	1,15	1,15	1,52	1	11,54	0	11,54
	10 ⁸	☒	-	22	23	-	14	14	0	20	26,66
		s	-	0	0	-	0	0	0	34,64	46,18
	10 ⁷	☒	23	24	23,55	11	12	11,55	20	20	53,33
		s	0	0	2,12	0	0	0,70	34,64	34,64	46,18
	10 ⁶	☒	-	22	32,5	-	11	11	0	26,66	46,66
		s	-	0	0,70	-	0	2,82	0	46,18	50,33
	10 ⁵	☒	23	24,33	23	10	11	11,33	66,66	53,33	60
		s	0	1,15	2,64	2,82	1	0,57	57,73	23,09	20
Ambiente	Controle	☒	23,66	18,33	21,33	12,33	7,66	8,66	86,66	80	73,33
		s	1,15	1,52	1,15	2,08	0,57	1,52	11,54	0	11,54
	10 ⁸	☒	-	20	-	-	14	-	0	20	0
		s	-	0	-	-	0	-	0	34,64	0
	10 ⁷	☒	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		s	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	10 ⁶	☒	23,5	19	20	11	11	12	20	13,33	6,66
		s	0,70	1,41	0	1,41	2,82	0	20	11,54	11,54
	10 ⁵	☒	23	19	21	10,05	10,66	11	33,33	80	46,66
		s	2,82	1	1,73	0,70	3,05	1	30,51	0	30,55

Legenda: ☒ : Média
s : Desvio padrão
- : Sem eclosão

Tabela 2 - Valores médios dos aspectos biológicos de ovos de *Rhipicephalus sanguineus* tratados com diferentes concentrações dos isolados de *Beauveria bassiana* (Bb).

Temperatura	Concentração conídios/ml		Período de Incubação (dias)		Isolados		Período de eclosão (dias)		Eclosão (%)	
			747	986	747	986	747	986	747	986
27°C	Controle	☒	22	24,33	9	6,6	100	100		
		s	0	0,57	1,73	0,57	0	0		
	10 ⁸	☒	26	26	15	13	20	6,66		
		s	0	0	0	0	34,64	11,54		
	10 ⁷	☒	-	24,55	-	10	0	60		
		s	-	0,70	-	0	0	52,91		
	10 ⁶	☒	-	27	-	10	0	6,66		
		s	-	0	-	0	0	11,54		
	10 ⁵	☒	24	23	9,66	9,33	100	93,33		
		s	1	1	3,05	2,08	0	11,54		
Ambiente	Controle	☒	20,33	22,33	11,33	8,66	60	46,66		
		s	2,51	1,15	2,30	0,57	20	11,54		
	10 ⁸	☒	19	-	14	-	26,66	0		
		s	0	-	0	-	46,18	0		
	10 ⁷	☒	19	-	11	-	20	0		
		s	0	-	0	-	34,64	0		
	10 ⁶	☒	-	-	-	-	0	0		
		s	-	-	-	-	0	0		
	10 ⁵	☒	18	21	13,66	8	80	6,66		
		s	2	0	1,52	0	0	11,54		

Legenda: ☒ : Média
 S : Desvio padrão
 - : Sem eclosão

tratamento de *Ixodes ricinus* com *B. bassiana* (nova identificação de *Botrytis cinerea*). GORSKOVA (1966) verificou que o tratamento com três espécies de fungo (*B. bassiana*, *P. insectivorum* e *Botrytis cinerea*) também ampliou o período de incubação dos ovos de *I. ricinus*, em relação ao grupo controle. BITTENCOURT (1992) observou no seu trabalho com ovos de *Boophilus microplus* imersos em diferentes suspensões de isolados de *M. anisopliae*, o aumento do período de incubação dos grupos tratados em relação ao grupo controle em 38 e 23 dias respectivamente. O autor também relatou que, quanto maior fosse a concentração do isolado na suspensão, maior era o período de incubação. BITTENCOURT *et al.* (1996) também obtiveram um aumento no período de incubação conforme aumentava-se a concentração do isolado, mas a concentração 4,13 x 10⁸ conídios/ml foi a que apresentou maior diferença significativa no período de incubação, em relação às outras concentrações e ao

grupo controle, e o período de eclosão variou entre 5,3 a 5,6 dias para os grupos controle e 6,3 a 9,6 dias para os grupos tratados.

Os resultados obtidos com o grupo controle, com relação ao período de incubação em temperatura controlada, foram semelhantes aos obtidos por MAHADEV (1977) e COELHO (1993) e o período de eclosão das larvas, mantidas em temperatura controlada dos grupos controle, foi semelhante ao trabalho de BELLATO (1995), indicando que os dados obtidos no presente trabalho estão dentro da normalidade.

O percentual médio de eclosão de larvas, oriundas dos ovos tratados com as diferentes suspensões, foi bastante inferior ao observado nos grupos controle (Tabelas 1 e 2 e Figuras 1 e 2). Nos trabalhos de BELLATO (1995) e COELHO (1993) foram observados resultados semelhantes aos obtidos no grupo controle deste experimento mantido em temperatura controlada de 27°C. Os grupos tratados

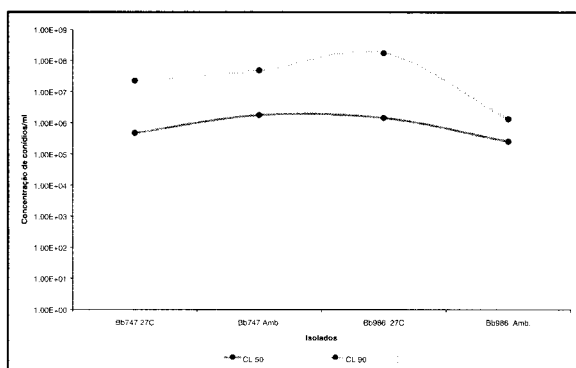


Figura 1 - Concentração para inibição de 50 a 90% de *Rhipicephalus sanguineus*, oriundos de ovos tratados com *Beauveria bassiana* (Bb) em diferentes temperaturas.

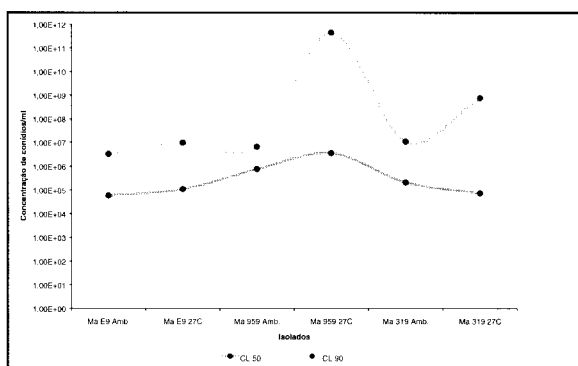


Figura 2 - Concentração para inibição de 50 a 90% de *Rhipicephalus sanguineus* oriundos de ovos tratados com *Metarhizium anisopliae* (Ma) em diferentes temperaturas.

apresentaram uma porcentagem de eclosão inversamente proporcional à concentração de conídios da suspensão, o que também ocorreu nos trabalhos de BITTENCOURT (1994, 1994, 1995, 1996) e BOYCEV & RIZVANOV (1960). GORSKOVA (1966) observou um percentual de eclosão baixo quando tratou *I. ricinus* com *B. bassiana*, apesar de não ter quantificado a suspensão utilizada; e KAAYA *et al.* (1996) evidenciaram em testes com *B. bassiana* e *M. anisopliae* *in vitro* que a concentração 1×10^8 conídios/ml inibiu a eclosão de larvas de *Amblyomma variegatum* oriundas de fêmeas ingurgitadas tratadas; as fêmeas tratadas com *M. anisopliae* tiveram um índice de eclosão de larvas de 3,92% e nas tratadas com *B. bassiana* não houve eclosão, o que revelou uma grande redução se comparado ao grupo controle onde o índice de eclosão larval foi de 68,33%.

A concentração letal para inibição de 50% (CL50) de eclosão de larvas apresentou pequena

diferença (entre $5,8 \times 10^4$ e $3,5 \times 10^6$) nos bioensaios com ovos mantidos nas diferentes temperaturas; já as CL90 variaram na inibição da eclosão das larvas oriundas de ovos tratados com os diferentes isolados (entre $1,32 \times 10^6$ e $4,4 \times 10^{11}$), onde a maioria das CL90 foram mais elevadas para ovos mantidos em temperatura controlada, o que pode sugerir que ovos mantidos em condições variáveis de temperatura e umidade tornam-se mais susceptíveis à infecção do que aqueles mantidos em condições contínuas de temperatura e umidade. Todos estes resultados verificados na literatura são similares ao presente trabalho, o que reforça a evidência da patogenicidade destes entomopatógenos para ovos de *R. sanguineus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELLATO, V. Efeitos de diferentes temperaturas no desenvolvimento de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) em condições de laboratório. 59 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 105 p., 1992.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., MASSARD, C.L., LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 16, n. 1-2, p. 41-47, 1994.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. Ação do *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural - Série Ciências da vida*, v. 16, p. 39-45, 1994.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., PERALVA, S.L.F.S., VIEGAS, E.C. Eficácia *in vitro* dos isolados 747 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* no carrapato *Boophilus microplus*. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, v. 4, sup. 1.1, p. 86, 1995.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., PERALVA, S.L.F.S., VIEGAS, E.C. *et al.* Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, v. 5, n. 2 (no prelo), 1996.
- BOYCEV, D., RIZVANOV, K. Relation of *Botrytis cinerea* to Ixodid ticks. *Zoologie Zeitschrift Ukranien*, 39: 460, 1960.
- COELHO, C.F. Biologia da fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) sob condições de laboratório: aspectos da oviposição. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 52 p., 1993.
- DAVEY, R.B., OSBURN, R.L., MILLER, J.A. Ovipositional and morphological comparisons of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from different geographical areas. *Annals of Entomological Society of America*, v. 77, n. 1, p. 1-5, 1984.

- FINNEY, D.J. **Statistical Method in Biological Assay**. 2. ed., London : Charles Griffin, 1964. 668 p.
- FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. 3. ed., Cambridge: University Press, 1971. 333 p.
- GORŠKOVA, G.J. Reduction of fecundity of ixodid ticks females induced by fungal infection. **Vetsnik Leningraskogo Universitika**, v. 21, p. 13-16, 1966.
- HOOKE, W.A., BISHOP, F.C., WOOD, H.P. **The Life History and Bionomics of Some North American Ticks**. United State Reportment of Agriculture, 239 p., 1912.
- KAAYA, G.P., MWANGI, E.N., OUNA, E.A. Prospects for Biological Control of Livestock Ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, Using the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 15-20, 1996.
- LITCHFIELD, J.T., WILCOXON, F. Simple method of fitting dose effect curve. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v. 95, p. 99-113, 1949.
- MAHADEV, P.V.M. Life cycle, feeding behaviour and ovipositional ability of *Rhipicephalus sanguineus* and *R. turanicus* (Acarina: Ixodidae). **Indian Journal of Acarology**, 2, 12-20, 1977.
- MORAES, S.A., ALVES, S.B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. (Coord.) **Controle Microbiano de Insetos**. Manole, São Paulo. cap. 14, p. 278-288, 1986.
- PEREIRA, M.C. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887); **Revisão taxionômica e morfológica**. 1980. 126 p. Tese (Mestrado), Universidade de São Paulo, 1980.
- ROBERTS, D.W., CASTILLO, J.M. Bibliography on pathogens of medically important arthropods. **Bulletin World Health Organization**, Geneva, v. 58, 1980.