

Estudo morfológico de isolados de *Beauveria bassiana* antes e após reisolamento em *Rhipicephalus microplus**

Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues¹, Maria Clemente de Freitas², Wendell Marcelo de Souza Perinotto³, Fernanda da Silva Santos⁴, Jéssica Fiorotti de Paulo², Simone Quinelato⁵, Mariana Guedes Camargo⁶, Isabele da Costa Angelo⁷ e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt⁶⁺

ABSTRACT. Coutinho-Rodrigues C.J.B., de Freitas M.C., Perinotto W.M.deS., Santos F.S., de Paulo J.F., Quinelato S., Camargo M.G., Angelo I.daC. & Bittencourt V.R.E.P. [Morphological study and conidia production of *Beauveria bassiana* isolates before and after reisolation in *Rhipicephalus microplus*.] Estudo morfológico de isolados de *Beauveria bassiana* antes e após reisolamento em *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(supl.3):91-97, 2016. Departamento de Parasitologia Animal, Anexo 1, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, KM 47, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

Beauveria bassiana is a cosmopolitan arthropod pathogenic fungus that possesses the cattle tick *Rhipicephalus microplus* as host. In this context, studies involving morphology and production of conidia on culture medium may indicate isolates that have potential for using in wide-scale. The present study evaluated the macro and the micromorphology, in addition to the conidia production of ten *B. bassiana* isolates before and after one passage (development cycle) on *R. microplus*. Macroscopically, variations in diameter, surface, texture, exudation and reverse coloration were observed after reisolation. On the other hand, the process did not alter the development of conidiophores, the shape and size of conidia. Regarding the conidiation, six isolates increased the number of conidia counted per area. Highlighting, the isolate Bb 02, which has the tick as the original host, presented an increase of the powdery and conidia production posteriorly of a single passage. Thus, it is believed that for future commercial evaluations, studies involving more passages in potential hosts, as well as their association to pathogenicity and enzymatic activity analyzes, may express more relevant results for biological control.

KEY WORDS. Arthropod pathogenic fungus, morphological changes, cattle tick.

*Recebido em 21 de julho de 2016.

Aceito para publicação em 17 de novembro de 2016.

¹ Médico-veterinário, MSc. Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), *Campus* Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: caio-jr@hotmail.com

² Médica-veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Anexo 1, Instituto de Veterinária, UFRRJ, *Campus* Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mails: mariamedvetufrj@hotmail.com; jeskvni@gmail.com

³ Médico-veterinário, DSc. Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA 44380000. Email: wendellufrj@hotmail.com

⁴ Bióloga, Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-900. E-mail: fernanda.santos@ioc.fiocruz.br

⁵ Médica-veterinária, DSc. Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-900. E-mail: simone.quinelato@ioc.fiocruz.br

⁶ Médica-veterinária, DSc. Departamento de Parasitologia Animal, Anexo 1, IV, UFRRJ, *Campus* Seropédica, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: mariacamargo@gmail.com; *Autora para correspondência. E-mail: vaniabit@ufrj.br

⁷ Médica-veterinária, DSc. Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, IV, UFRRJ, *Campus* Seropédica, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: isabeleangelo@yahoo.com.br

RESUMO. *Beauveria bassiana* é um fungo artropodopatogênico cosmopolita que possui o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus microplus* como hospedeiro. Neste cenário, estudos morfológicos e de produtividade conidial em meio de cultura podem indicar isolados que possuam potencial para produção em larga escala. O presente trabalho avaliou a macromorfologia e micromorfologia, além da produção conidial de dez isolados de *B. bassiana* antes e após uma passagem (ciclo de desenvolvimento) sobre *R. microplus*. Macroscopicamente, variações de diâmetro, aparência, aspecto de colônia, exsudação e cor de reverso foram observadas após o reisolamento. Por outro lado, o processo não alterou parâmetros como desenvolvimento dos conidióforos, formato e tamanho de conídios. Em relação à produção conidial, seis isolados aumentaram significativamente o número de conídios contados por área. Como destaque, o isolado Bb 02, que possui o carrapato como hospedeiro original de isolamento, apresentou aumento da pulverulência e produção conidial após apenas uma única passagem. Assim, acredita-se que para avaliações futuras com cunho comercial, estudos que envolvam mais passagens em hospedeiros em potencial, bem como sua associação a análises de patogenicidade e atividade enzimática, podem expressar resultados mais relevantes para o controle biológico.

PALAVRAS-CHAVE. Fungo artropodopatogênico, alterações morfológicas, carrapato dos bovinos.

INTRODUÇÃO

Beauveria bassiana é um micro-organismo comumente utilizado como pesticida biológico que apresenta distribuição cosmopolita e pode ser isolado do solo, rizosfera de plantas e artrópodes (Zimmermann 2007). Amplas são as pesquisas na área agrícola, todavia, o estudo do controle biológico na agropecuária ainda carece de informações mais detalhadas, especialmente aquelas direcionadas à realidade dos atuais sistemas de produção brasileiros. Em carrapatos, excelentes resultados foram descritos *in vitro* (Bittencourt et al. 1997), porém tratamentos quando realizados *in vivo* tendem a apresentar redução de eficácia (Campos et al. 2010).

Considerando os aspectos morfológicos, *Beauveria bassiana* é um fungo filamentosos que apresenta células eucarióticas quitinizadas e crescimento satisfatório em meios de cultura como batata-dextrose-ágar (BDA) e Sabourand-dextrose-ágar (SDA). Macroscopicamente, as colônias apresentam coloração inicial esbranquiçada, podendo variar até branco-amarelada, no geral de aparência lanosa e

superfície levemente almofadada. O diâmetro geral de crescimento a 23°C por 10 dias varia de 15-32 mm, espessura média de 5 mm e reverso variando de incolor a branco amarelado (Rehner et al. 2011). Microscopicamente, apresenta hifas septadas, hialinas e de parede lisa, com tamanho variando de 1-2 µm. Os conídios encontram-se aglomerados (cinco ou mais por grupo), com formato ovóide e base variando de subesférica a ampuliforme de tamanho médio entre 3 e 6 µm (Rehner et al. 2011).

De maneira geral, o processo de desenvolvimento no ambiente se inicia com a adesão e germinação dos conídios ao tegumento do hospedeiro, no qual envolve produção de enzimas e diferenciação celular para garantir uma colonização e dispersão eficazes (Alves 1998). Embora, na atualidade, o uso da biologia molecular facilite a identificação e o agrupamento de espécies (Rehner et al. 2011), a observação de características morfológicas, desde que não utilizada de forma isolada e como única diretriz, orienta a seleção de isolados com potencial para produção em larga escala além de indicar aqueles que apresentam facilidade de adaptação à biotecnologia (Krull et al. 2013).

Para uso rotineiro nos laboratórios, o repique contínuo é a técnica de propagação mais utilizada, visto que é considerada de fácil manipulação e permite uma rápida obtenção do espécime quando necessário. Porém, sabe-se que a constante manutenção de fungos artropodopatogênicos em meios de cultura pode afetar diretamente seu fenótipo (Crecy et al. 2009), virulência e atividade enzimática (Shah et al. 2007). Em contrapartida, passagens sucessivas sobre hospedeiros artrópodes podem reinstaurar tais características consideradas importantes para o processo de colonização (Song & Feng 2011).

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a influência de uma passagem (ciclo de desenvolvimento) sobre *R. microplus* na macromorfologia, micromorfologia e produção de conídios de diferentes isolados de *B. bassiana*.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização de Realização do Experimento

Os experimentos foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Controle Microbiano (LCM) localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz, pertencente ao Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ e do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, localizado na Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. Os exemplares

de *R. microplus* utilizados para o reisolamento foram obtidos a partir de infestação artificial realizada pelo LCM seguindo diretrizes previamente aprovadas pela Comissão de Ética sob o nº 113/2014.

Obtenção e Seleção dos Isolados de *Beauveria bassiana* s.l.

A partir de trabalhos prévios realizados por Fernandes et al. (2011), foram selecionados dez isolados brasileiros de *B. bassiana* obtidos de diferentes regiões geográficas do Brasil (Tabela 1). Como exceção do isolado Bb 02, que pertence ao LCM, os demais foram gentilmente cedidos pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e pela Coleção de Fungos de Invertebrados - Cenargen (CG) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF, Brasil.

Manutenção, Reisolamento e Formação dos Grupos Experimentais

Para a formação dos grupos experimentais, os isolados foram repicados em meio BDA e crescidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$ por 15 dias. Após o completo desenvolvimento fúngico, as placas foram armazenadas sob refrigeração a 4°C até a realização dos experimentos (Grupo Micoteca). Já para o reisolamento fúngico, fêmeas totalmente ingurgitadas de *R. microplus* foram tratadas por imersão em formulação oleosa (5% de óleo mineral estéril (Vetec®) acrescido em água destilada estéril e Tween 80 0,01%) dos respectivos isolados já esporulados. Após 15 dias de manutenção sob as mesmas condições controladas acima descritas, aquelas que apresentavam crescimento fúngico foram externamente esterilizadas em solução de hipoclorito a 1%, álcool 70 GL e água destilada estéril. Como etapa seguinte, foram depositadas em placas de Petri contendo BDA acrescido de 0,1 % de extrato de levedura (Vetec®) e 0,05% de Cloranfenicol (Sigma®) para exteriorização fúngica (Grupo Reisolado). A confirmação do reisolamento foi realizada a partir da observação das características macroscópicas e microscópicas da colônia (Rehner et al. 2011).

Avaliação macromorfológica

Para a análise macromorfológica, em meio BDA, foi realizado a técnica de ponto único de inóculo. Após dez dias de crescimento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.R. $\geq 80\%$, caracte-

rísticas como o diâmetro total, aparência, aspecto e coloração da massa conidial, presença de exsudato, além de aspecto e coloração do reverso foram observadas em ambos os grupos.

Avaliação micromorfológica

A avaliação das características micromorfológicas foi realizada a partir da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula em meio BDA, com posterior acondicionamento em câmara úmida por cinco dias a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U. R. $\geq 80\%$ (Ridell, 1950).

Avaliação da produção de conídios

A produção de conídios foi realizada segundo descrita por Fernandes et al. (2011) em meio BDA acrescido de 0,1 % de extrato de levedura. Os experimentos foram repetidos três vezes para a obtenção de média e erro padrão das contagens, sendo os dados paramétricos analisados através do teste T-Student ($p < 0,05$) com auxílio do programa GraphPad Prism® 5.0. Para uma classificação qualitativa do número de conídios produzidos, os valores obtidos foram divididos em três classes distintas baseado em estudo prévio realizado por Fernandes et al. (2011): baixo potencial (inferior a 5000×10^4 conídios), médio potencial ($5000 - 10000 \times 10^4$ conídios) e alto potencial (acima de 10000×10^4 conídios).

RESULTADOS

Macromorfologia

Após dez dias de crescimento (Figura 1), o diâmetro das colônias do grupo Micoteca variou de 15,47 mm (CG 154) a 32,96 mm (CG 234), apresentando valor médio de $24,35 \pm 4,92$ mm. Já para o grupo Reisolado, a variação observada esteve entre 17,40 mm (CG 478) e 26,47 mm (CG 500), com valor médio de $22,03 \pm 3,50$ mm. Dois dos dez isolados estudados apresentaram aumento do diâmetro das colônias (CG 154 e CG 471) após a passagem e reisolamento em *R. microplus* (Tabela 1).

O aspecto geral apresentado das colônias dos grupos Micoteca e Reisolado esteve entre flocoso, lanoso e aveludado, sendo observado variações após o reisolamento de lanoso para aveludado (Bb 02 e CG 206) e aveludado para lanoso/flocoso (CG 234, CG 481 e CG 500). A forma do crescimento variou entre liso e rugoso, sendo observado variações de rugoso a liso (Bb 02 e CG 478) e liso a rugoso (Esalq 986 e CG 500). Todas as colônias apresentaram coloração esbranquiçada, com pequenas regiões variando em tonalidade para branco-amareladas. A presença de exsudato hialino observada somente no isolado CG 471 foi mantida em ambas as situações (Figura 1 - 1F e 2F). No mesmo contexto, a coloração do reverso variou de branco a amarelo escuro, sendo CG 234 o único que apresentou reverso incolor antes e após reisolamento (Tabela 2).

Tabela 1. Isolados de *Beauveria bassiana*, hospedeiros, origem e ano de isolamento.

Isolado	Hospedeiro do isolamento	Origem Geográfica	Ano
Bb 02	Acari: Ixodidae	Paracambi, RJ	1999
Esalq 986	Acari: Ixodidae	Piracicaba, SP	1990
CG 154	Homoptera: Cercopidae	Jataí, GO	1983
CG 206	Hymenoptera: Vespidae	Costa do Arapapa, AM	1981
CG 234	Homoptera: Cicadellidae	Ponta Porã, MS	1983
CG 471	Coleoptera: Curculionidae	Ijuí, RS	1984
CG 478	Coleoptera: Curculionidae	Campinas, SP	1983
CG 479	Hymenoptera: Vespidae	Santana do Ipanema, AL	1985
CG 481	Coleoptera: Chrysomelidae	Ribera do Pombal, BA	1985
CG 500	Coleoptera: Chrysomelidae	Goiânia, GO	1985

Micromorfologia

Foi possível observar após dez dias de crescimento que ambos os grupos (Micoteca e Reisolado) apresentaram características microscópicas semelhantes, como a presença de hifas septadas e com coloração cristalina. Os conídios apresentaram-se

de formato variando do globoso ao subgloboso (Figura 2), com tamanho médio de aproximadamente 2,5 µm de diâmetro. O conidióforo apresentava a parte basal levemente dilatada que servia de sustentação para o desenvolvimento das fiáldes e crescimento dos conídios.

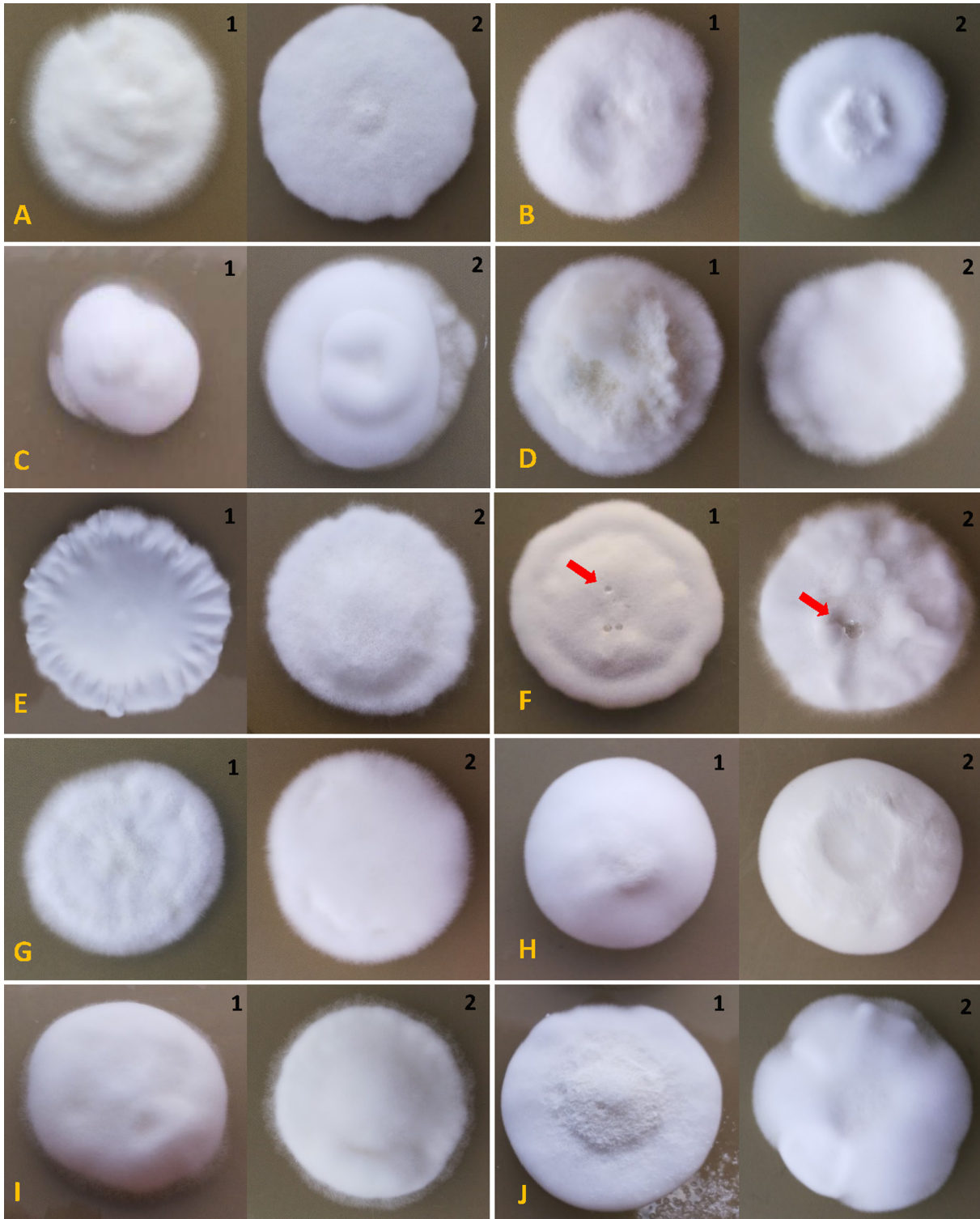


Figura 1. Colônias dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* dos grupos Micoteca (1) e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* (2) (10 dias). Bb 02 (A); Esalq 986 (B); CG 154 (C); CG 206 (D); CG 234 (E); CG 471 (F); CG 478 (G); CG 479 (H); CG 481 (I) e CG 500 (J). Notar exsudação hialina do isolado CG 471 em ambas as condições de estudo (seta vermelha).

Tabela 2. Características macromorfológicas dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana* s.l. dos grupos Micoteca (M) e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* (R) crescidos a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e U. R. $\geq 80\%$ em BDA (10 dias).

Isolado	Condição	Diâmetro (mm)	Aparência	Aspecto	Coloração	Exsudato	Reverso
Bb 02	M	26,92	lanosa	rugosa	branca	-	amarelo claro
	R	23,50	aveludada/ centro pulverulento	lisa	branca	-	amarelo claro
Esalq 986	M	20,46	lanosa	lisa	branca	-	amarelo claro
	R	17,46	lanosa	rugosa	branca	-	amarelo claro
CG 154	M	15,74	aveludada	rugosa	branca	-	amarelo escuro
	R	21,67	aveludada	rugosa	branca	-	amarelo claro
CG 206	M	21,53	lanosa	rugosa	branca	-	amarelo médio
	R	17,52	aveludada e centro lanosa	rugosa	branca	-	amarelo claro
CG 234	M	32,96	aveludada e centro flocoso	centro liso/ borda rugosa	branca	-	incolor
	R	22,97	lanosa	lisa	branca	-	incolor
CG 471	M	22,94	aveludada	rugosa	branca	presente	amarelo claro
	R	24,58	flocosa	rugosa	branca	presente	amarelo claro
CG 478	M	23,25	lanosa	rugosa	branca	-	amarelo claro
	R	17,40	lanosa	lisa	branca	-	amarelo médio
CG 479	M	23,87	aveludada	lisa	branca	-	amarelo claro
	R	22,43	aveludada	lisa	branca	-	branco
CG 481	M	29,54	aveludada	lisa	branca	-	amarelo claro
	R	26,32	lanosa	lisa	branca	-	amarelo claro
CG 500	M	26,58	aveludada e centro pulverulento	lisa	branca	-	amarelo claro
	R	26,47	lanosa	rugosa	branca	-	amarelo claro

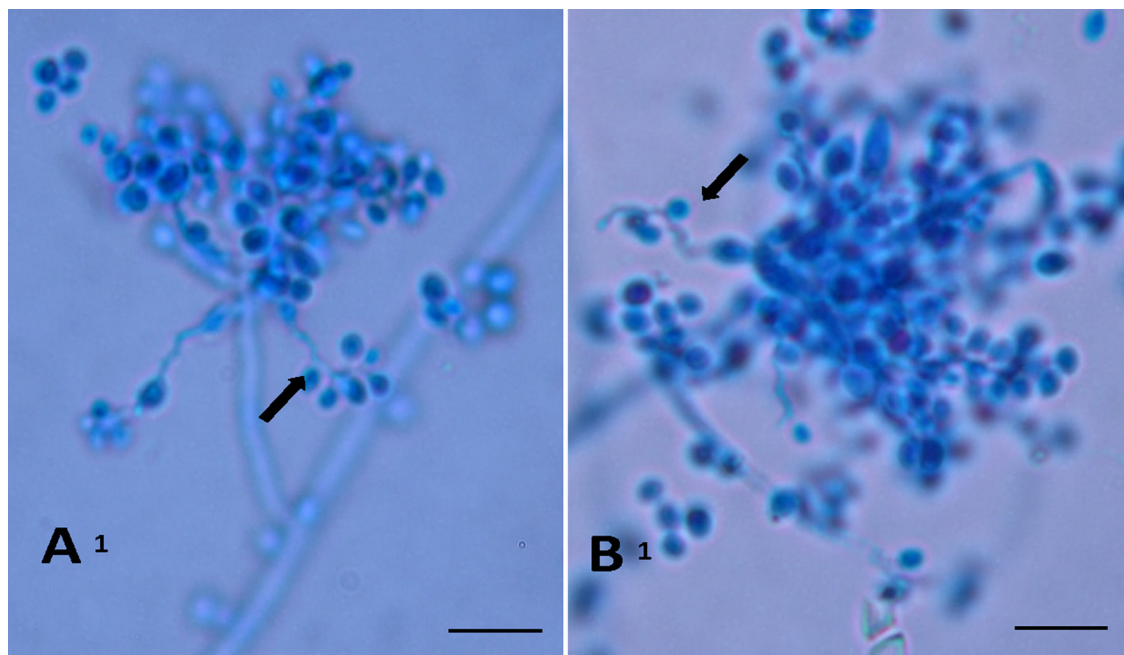


Figura 2. Isolado de *Beauveria bassiana* (Bb 02) Micoteca (A) e Reisolado em *Rhipicephalus microplus* (B). Barras = 10 μm . Notar a manutenção das características micromorfológicas através da presença de conidióforo, fiálides e conídios de formato arredondado dispostos aos pares (seta).

Além disto, em nenhum dos grupos avaliados foi possível observar variações micromorfológicas antes e após o reisolamento (Figura 2).

Avaliação da produção de conídios

Os isolados apresentaram variabilidade na quantidade de conídios produzidos (Figura 3). No grupo Micoteca, os valores encontrados variaram

entre 2890×10^4 conídios/mL (Esalq 986) e 13910×10^4 conídios/mL (CG 206). Três isolados (Bb 02, Esalq 986 e CG 479) apresentaram baixo potencial, quatro isolados (CG 234, CG 471, CG 481 e CG 500) moderado e três isolados (CG 154, CG 206 e CG 478) alto potencial de produção de conídios em $0,582 \text{ cm}^2$. Para o grupo Reisolado, os valores variaram entre 4210×10^4 conídios/mL (CG 471) e 18680

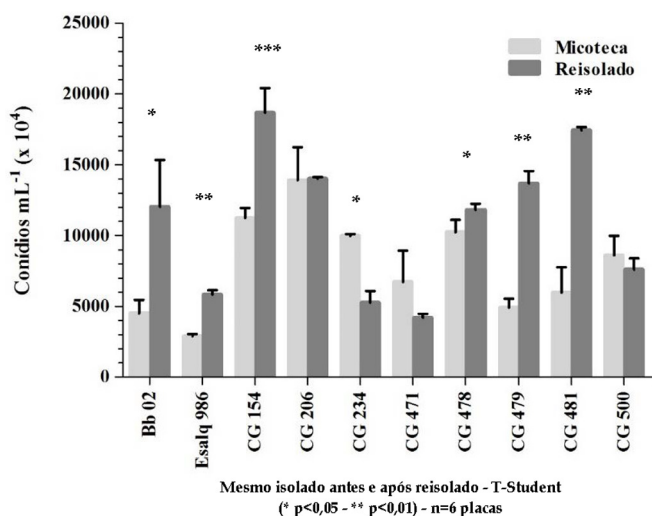


Figura 3 - Média e erro padrão da produção de conídios de *Beauveria bassiana* (Micoteca e Reisolado) em *Rhipicephalus microplus* cultivados em meio BDA acrescido de 0,1% de extrato de levedura a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U. R. $\geq 80\%$ durante 20 dias.

$\times 10^4$ conídios/mL (CG 154), sendo que um isolado (CG 471) apresentou baixo, três isolados (Esalq 986, CG 234 e CG 500) moderado e seis isolados (Bb 02, CG 154, CG 206, CG 478, CG 479 e CG 481) apresentaram alto potencial de produção. O processo de reisolamento foi capaz de aumentar significativamente a capacidade produtiva de seis isolados (Bb 02, Esalq 986, CG 154, CG 478, CG 479 e CG 481).

DISCUSSÃO

Estudos morfológicos (macro e micromorfologia) de fungos filamentosos possuem a capacidade de orientar a identificação taxonômica. Além disto, direcionam a seleção de espécimes para a realização de testes de patogenicidade (Alves 1998). Contudo, seu uso associado à engenharia molecular auxilia e complementa na diferenciação das espécies (Rehner et al. 2011). Varela & Morales (1996) relataram que a seleção de isolados somente em função das características morfológicas não deve ser utilizada para *B. bassiana*, considerando a ampla variação observada entre linhagens (Liu et al. 2003), embora esta ferramenta seja útil como indicadora da taxa de crescimento e pulverulência nos meios de cultura tradicionais (Krull et al. 2013).

A avaliação da macromorfologia deve partir do exame visual das colônias, com a observação da coloração de verso e reverso, presença de pigmentação, detecção de bordas irregulares, avaliação do tipo e da velocidade de crescimento, superfície, textura, topografia, aspecto e diâmetro da colônia. Entretanto, faz-se necessário a associação a aspectos micromorfológicos, no qual parâmetros

como formato e tamanho de conídios, disposição e presença de septações nas hifas, desenvolvimento de células conidiogênicas ou observação de formas de resistência complementam informações pertinentes para a diferenciação entre gêneros e espécies (Sidrim & Rocha 2004). *Beauveria bassiana* possui alta capacidade de preservar suas características macroscópicas e microscópicas em função de sucessivas passagens em meio de cultura (Safavi 2012). No presente trabalho, todos os isolados, avaliados sob as diferentes condições do estudo, apresentaram características condizentes às reportadas por De Hoog (1972), Fernandes et al. (2011) e Rehner et al. (2011), apesar das variações de diâmetro, aparência, aspecto de colônia, exsudação e cor de reverso que foram observadas. Safavi (2012) notou que o desenvolvimento das hifas e a cor da colônia mantinham-se inalterados até a 15ª passagem por meio de cultura, embora houvesse redução da pulverulência. Por outro lado, passagens sucessivas sobre hospedeiros artrópodes podem interferir positivamente na macromorfologia (colônias mais pulverulentas) (Fernandes et al. 2011; Santoro et al. 2015). Aqui, foi observado que o processo de reisolamento em *R. microplus* alterou em pequena escala a morfologia das colônias de *B. bassiana*. Bb 02, que tem o carrapato (Acari: Ixodidae) como hospedeiro original de isolamento, apresentou alterações importantes como aumento da pulverulência e presença de colônia menos lanosa e mais aveludada.

Em relação à produção conidial, seis dos dez isolados avaliados apresentaram aumento do número de conídios contados por área. Estudos como os de Shah et al. (2007) e Santoro et al. (2015) não observaram aumento significativo após a 15ª passagem por *Alphitobius diaperinus*. Para nossos achados, acredita-se existir alguma relação de predileção do fungo pelo hospedeiro do estudo (*R. microplus*), visto que somente em um ciclo de crescimento, a produtividade foi aumentada. Entretanto, para a seleção comercial, testes com crescimento em arroz devam ser realizados para garantir resultados mais aplicáveis e fidedignos às realidades de mercado (alta produtividade e baixo custo) (Santoro et al. 2015).

Em suma, o efeito de um ciclo de desenvolvimento sobre *Rhipicephalus microplus* foi capaz de alterar a morfologia e a produção conidial de isolados de *Beauveria bassiana*. Este estudo evidencia a importância de estudos morfológicos para fungos artropodopatogênicos, todavia, para resultados mais expressivos, números maiores de passagens devam ser realizados. Como sequência, testes de

patogenicidade para os diferentes estágios (ovos, larvas e adultos) dos hospedeiros e avaliação de atividade enzimática atuariam como informações complementares para a determinação e escolha de isolados com possível aplicação comercial.

Agradecimentos. Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Vânia R.E.P. Bittencourt é bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

REFERÊNCIAS

- Alves S.B. Quantificação de inóculo de patógenos de inseto. In: Alves, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª ed., FEALQ, Piracicaba, 1998, p.765-777.
- Bittencourt V.R.E.P., Peralva S. L. F. S., Souza, E. J., Mascarenhas, A. G. & Alves, S. B. Ação de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre algumas características biológicas de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* em laboratório. *Rev. Univ. Rural: Cienc. Vida*, 19: 65-71, 1997.
- Campos R.A., Boldo J.T., Pimentel, I.C., Dalfovo V., Araújo, W.L., Azevedo, J.L., Vainstein M.H. & Barros N.M. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genet. Mol. Res.*, 9: 1421-1430, 2010.
- Crecy E., Jaronski S., Benjamin L., Lyons T.J. & Nemat O.K. Directed evolution of a filamentous fungus for thermotolerance. *BMC Biotechnol.*, 9: 1-11, 2009.
- De Hoog G.S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Stud. Mycol.*, 1: 1-41, 1972.
- 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.
- Krull R., Wucherpfenning T., Esfandabadi M. E., Walisko R., Melzer, G., Hempel D. C.; Kampen, I, Kwade, A. & Wittmann C. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J. Biotechnol.*, 3: 112-123, 2013.
- Liu H, Skinner, M., Brownbridge M. & Parker B.L. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J. Invertebr. Pathol.*, 82: 139-147, 2003.
- Rehner S. A., Minnis A. M., Sung G., Luangsa-Ard J. J., Devotto L. & Humber R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103: 1055-1073, 2011.
- Riddell R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, 42: 265-270, 1950.
- Safavi S. A. Attenuation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* following serial in vitro transfers. *Biologia*, 67: 1062-1068, 2012.
- Santoro P.H., Zorzetti J., Constanski K. & Neves P. M. O. J. Quality of *Beauveria bassiana* conidia after successive passages through *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Rev. Colomb. Entomol.*, 41: 87-94, 2015.
- Shah F. A., Allen N., Wright C. L. & Butt T. M. Repetead in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 276: 60-66, 2007.
- Sidrim J. J. C. & Rocha M. F. G. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, 408p.
- Song T. T. & Feng M. G. *In vivo* passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 106: 211-216, 2011.
- Varela A. & Morales E. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.*, 67: 147-152, 1996.
- Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sc. Techn.*, 17: 553-596, 2007.