

NEMATÓIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis indica* LPP4 NO CONTROLE DE ESTIRPES RESISTENTES DE FÊMEAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Machado I.R.¹, Pinto C.C.S², Minas R.S³, Silva E.R⁴, Furlong, J.⁵, Dolinski, C.M⁶

¹UENF/ Lab. de Entomologia e Fitopatologia, inesuenf@yahoo.com.br

²UENF / Lab. de Entomologia e Fitopatologia, carlacristinapinto@yahoo.com.br

³UENF / Lab. de Entomologia e Fitopatologia, ramonminas@bol.com.br

⁴UFJF/ Lab. de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, edilenars@yahoo.com.br

⁵Embrapa Gado de Leite/ Lab. de Parasitologia, john@cnppl.embrapa.br

⁶UENF /Lab. de Entomologia e Fitopatologia, cláudia.dolinski@censanet.com.br

Resumo - Os carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* são ectoparasitos (Acari: Ixodidae). O método mais utilizado para o controle tem sido o uso de produtos químicos, embora estas aplicações muitas vezes sejam feitas de forma incorreta, causando prejuízos para o produtor que busca produtos cada vez mais fortes selecionando os carrapatos mais resistentes. Os nematóides entomopatogênicos têm sido apontados como excelentes candidatos ao controle biológicos de insetos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da espécie *Heterorhabditis indica* LPP4 (Poinar, Karanukar & David, 1992) sobre estirpes resistentes a carrapaticida de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tendo em vista resultados mais próximos de experimentos a campo. Os tratamentos foram as concentrações de 15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 nematóides por fêmea com 24 repetições cada, sendo cada fêmea uma unidade experimental. A maioria dos tratamentos teve um percentual de controle acima de 90%, sendo o melhor tratamento o de 960 nematóides por fêmea com 96% de controle.

Palavras-chave: fêmeas ingurgitadas, Nematoda, controle biológico.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (CANESTRINI, 1887) são ectoparasitos preferenciais de bovinos, distribuídos pelo mundo entre os paralelos 30° S e 40° N, não sendo encontrados em áreas muito áridas (CORDOVÉS, 1996).

No Brasil, a pecuária vem sofrendo grandes prejuízos econômicos em função desse carrapato. O uso de acaricida pelos produtores vem sendo empregado constantemente como medida de controle profilático e terapêutico (BORGES, 2006). O uso indiscriminado de acaricidas acarreta problemas como desenvolvimento de linhagens resistentes de carrapatos, aparecimento de resíduos químicos nos produtos de origem animal (principalmente leite e carne) e a poluição ambiental (BULLMAN et al., 1996).

Samish et al. (2004), mostraram que os carrapatos apresentam vários patógenos e inimigos naturais. Contudo, poucos foram utilizados com sucesso no controle biológico do carrapato até o momento. Existe boa perspectiva quanto ao uso dos nematóides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) no controle destes ectoparasitas. Estes nematóides são comumente usados com

sucesso no controle biológico de pragas de solo (GREWAL et al., 2005).

Estudos com NEPs vem demonstrando que espécies da família Heterorhabditidae são mais virulentas do que os da família Steinernematidae e alguns atributos que podem explicar este fato são, como: a presença de um dente quitinoso na região anterior do nematóide que ajuda na penetração ativa deste através da cutícula dos hospedeiros; e a presença da bactéria simbiote com alta virulência. Assim sendo, é possível que espécies desta família possam ser promissores agentes de controle biológico para o carrapato bovino. Com o objetivo de testar a linhagem *Heterorhabditis indica* LPP4 no controle biológico de estirpes resistentes a carrapaticida.

Metodologia

O estudo foi realizado no período de abril a junho de 2007 no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), setor de Nematologia na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos, RJ.

As fêmeas ingurgitadas de *R.(B). microplus* (estirpe resistente a carrapaticida) utilizadas no estudo foram provenientes de teste de carrapaticida da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora- MG.

Multiplicação do nematóide *H. indica* LPP4

Para multiplicação do nematóide *H. indica* LPP4 foram utilizadas lagartas do último instar de *Galleria mellonella* (Lineu, 1759) (Lepidoptera: Pyralidae) da colônia mantida no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia/Nematologia. As lagartas foram infectadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, forradas com duas folhas de papel filtro com dois mL de uma suspensão de nematóides com aproximadamente 200 juvenis (Jis). As placas de Petri foram seladas com filme plástico, identificadas e acondicionadas em câmara climatizada à $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%, durante um período de 72 horas. Após a morte, as lagartas foram transferidas para armadilhas modificadas de White (WHITE, 1927). Depois de 11 a 12 dias os primeiros juvenis infectantes de *H. indica* LPP4 começaram a emergir dos cadáveres. Estes foram coletados utilizando-se pipetas Pasteur em dias alternados, identificados quanto à data de coleta, acondicionados em garrafas de cultura de células de 40 mL e armazenados em câmara climatizada à $15 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%.

Procedimento experimental

Todo o procedimento experimental foi baseado na metodologia utilizada por Vasconcelos et al. (2004). A quantificação foi feita sob microscópio ótico, usando a lâmina de Peters, com 20 repetições de alíquotas de 10 μl cada, homogeneizando-se a solução a cada coleta. Para a obtenção da concentração desejada foi feita uma regra de três simples. As concentrações de 120, 240, 480 e 960 Jis em 0,5 mL de água destilada foram obtidas através deste método. Contudo para a obtenção das concentrações mais baixas (15, 30 e 60 Jis), os juvenis foram "pescados" manualmente.

Foram utilizadas 8 placas com 24 orifícios, nos quais em cada foram adicionados 2 g de areia peneirada e autoclavada. Cada placa representou um tratamento/ concentração de JI. Para o controle foi utilizada a mesma placa com areia e 0,5 mL de água destilada isenta de nematóides. Os nematóides foram adicionados a areia antes dos carrapatos.

Cada tratamento teve 24 repetições, sendo cada fêmea uma unidade experimental. Foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *R.(B). microplus* desprendidas naturalmente do hospedeiro no dia anterior. As fêmeas foram separadas e pesadas individualmente.

As placas foram acondicionadas em câmara climatizada à $27 \pm 1^\circ \text{C}$ a UR > 80%, durante um período de 72 horas. Após o tempo de exposição, as fêmeas foram individualmente acondicionadas em placas de Petri (5 cm). A postura total de cada

fêmea foi pesada, identificada, acondicionada em seringa plástica adaptada e incubada em câmara climatizada à $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%.

Depois de 15 dias de incubação as posturas foram revisadas diariamente, para observar a eclosão das larvas. Após o final da eclosão de todas as larvas foi feita uma estimativa visual da taxa de eclosão de larvas de cada massa de ovos, para se obter o percentual de eclosão.

Parâmetros Biológicos analisados

Para o cálculo do percentual de controle (%C)

os seguintes parâmetros foram analisados:

- Peso inicial (PI): peso inicial da fêmea ingurgitada
- Peso da postura (PP): peso da massa de ovos total da fêmea.
- Percentual de eclosão (%EC): estimativa visual de larvas eclodidas em relação à massa de ovos de cada fêmea.
- Reprodução estimada (RE): obtida pela fórmula $(PP/ PI) \times \%EC \times 20.000$ (Drummond et al. 1973).

O percentual de controle (%C): foi calculado segundo fórmula de Drummond et al. (1973): $(\%C = RE \text{ grupo controle} - RE \text{ grupo tratado} / RE \text{ grupo controle} \times 100)$.

Resultados

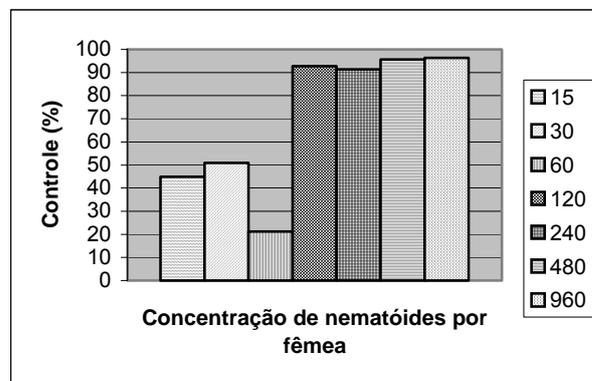


Figura 1- Gráfico da eficácia do controle de estirpes resistentes de fêmeas de *R. (B). microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%.

Acima de 120 Jis / fêmea o percentual de controle foi em sua maioria acima de 90%. Os melhores tratamentos foram os de 480 e 960 Jis por fêmea onde ambos atingiram um percentual de 96% de controle.

Discussão

MAULÉON et al. (1993) mostraram que o carrapato *R.(B). microplus* foi resistente a 17 cepas de nematóides entomopatogênicos (8 de *Steinernema* e 9 de *Heterorhabditis*).

No entanto, os resultados do presente trabalho mostram que quando foi utilizado a concentração de 480 e 960 Jis por fêmea houve um percentual de controle de 96% seguindo os resultados do que os obtidos por VASCONCELOS et al. (2004), com a utilização de variadas concentrações de nematóides entomopatogênicos para controle de fêmeas ingurgitadas de *R.B. microplus*, onde a eficácia de 100% foi obtida apenas na maior concentração, com 25.000 nematóides.

Houve também um resultado superior aos obtidos por GLAZER et al. (2001), que usou a concentração de 5.000 *S. glaseri*, em experimento de *B. annulatus*, obtendo apenas 20% de controle.

Conclusão

Em comparação a outros trabalhos realizados, nossos resultados mostram que concentrações menores também controlam de maneira eficiente as fêmeas de estirpes resistentes de *R.(B).microplus* e que nematóides da espécie *H.indica* LPP4 podem ser eficientes no controle de *R.(B).microplus* devido a sua alta virulência. A utilização de estirpes resistentes deixa os resultados mais próximos das condições de campo. Entretanto, mais estudos são necessários para mostrar o potencial destes nematóides sob condições de campo.

Referências

BITTENCOURT, V. R. E. P. Controle biológico de carrapato: p. 145-171. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 388, 2000.

BORGES, L.J.H. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em gado de leite do Norte e Noroeste Fluminense: Eficácia dos acaricidas e percepção dos produtores rurais sobre o tema. Monografia de conclusão de curso apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2006.

BULLMAN, G.M, MUNOS, C.M.E, AMBRÚSTOLO, R.R. El impacto ecológico de las lactonas macrocíclicas (endectocidas): una actualización comprensiva y comparativa. **Veterinária Argentina**; 8(127): 3-15,1996.

CORDOVÉS, C. O. 1996. Carrapato: Controle ou erradicação. Alegrete, Ed. Gralha, 130 p. Teodoro, R.L.; Martinez, M.L.; Silva, M.V.G.B.; Machado, M.A.; Verneque, R.S. Resistência bovina ao

carrapato *Boophilus microplus*: Experiência Brasileira. V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. Pirassununga-SP. 1-7 pp.

DRUMMOND R.O.; S.E. ERNEST; J.L. TREVINO; W.J. GLADNEY & O.H. GRAHAM.1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. **J. Econ. Entomol.** 66: 130–133.

GLAZER, I.; E. ALEKSEEV & M. SAMISH. Factors affecting the virulence of entomopathogenic nematodes to engorged females *Boophilus annulatus* ticks. **J. Parasitol.** 87 (4): 808-812, 2001.

GREWAL P.S.; EHLERS R-U; SHAPIRO-ILAN D.I. Nematodes as biocontrol agents. **CABI Publishing**, Wallingford, Oxfordshire. 505 pp, 2005.

MAULÉON, H.; BARRÉ, N. & PANOMA, S. Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *oophilus annulatus* (Say). **Experimental & Applied Acarology** 17: 831-838, 1993.

SAMISH, M.; H. GINSBERG & I. GLAZER. Biological control of ticks. **Parasitology**, 129: 389-403, 2004.

WHITE,G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Sci.* 30: 302-303.

VASCONCELOS, V.O.; FURLONG J. ; FREITAS G.M.; DOLINSKI C.; AGUILLERA M.M.; RODRIGUES R.C.D. & PRATA M.. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 94: 201-206, 2004.