

# AÇÃO DO NEMATÓIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis baujardi* LPP7 NO CONTROLE DE ESTIRPES RESISTENTES DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Machado I.R.<sup>1</sup>, Pinto C.C.S<sup>2</sup>, Minas R.S<sup>3</sup>, Silva E.R<sup>4</sup>, Furlong, J.<sup>5</sup>, Dolinski, C.M<sup>6</sup>

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

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

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

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

<sup>5</sup>Embrapa Gado de Leite/ Lab. de Parasitologia, john@cnpqgl.embrapa.br

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

**Resumo-** Os carrapatos têm sido o principal problema para os produtores e o problema só tem aumentado no Brasil. O uso de carrapaticida têm gerado grande resistência e contaminação do ambiente. No entanto, o uso de nematóides entomopatogênicos como agentes para o controle biológico tem sido uma alternativa para a diminuição de produtos químicos tanto no ambiente quanto resíduos nos alimentos. Os nematóides entomopatogênicos têm sido apontados como excelentes promissores ao controle biológicos de insetos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da espécie *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003) sobre o controle biológico de estirpes resistentes 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. O percentual de controle foi acima de 90% nas concentrações de 120 e 480 nematóides por fêmea. Sendo o melhor tratamento o de 960 nematóides por fêmea com 100% de controle.

**Palavras-chave:** Nematoda, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, controle biológico, carrapato

**Área do Conhecimento:** Ciências Agrárias

## Introdução

No Brasil, a pecuária vem sofrendo grandes prejuízos econômicos em função do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Os carrapaticidas têm sido o principal meio de controle de *R.(B). microplus*, mas a presença de poucas bases químicas disponíveis no mercado, aliada à forma incorreta da utilização destes produtos levou à dispersão generalizada da resistência das populações de carrapatos, chegando a ponto da maioria dos produtos comercializados no Brasil não apresentarem eficiência superior a 75% (FURLONG, 1999).

Estudos nas últimas décadas têm mostrado que os nematóides entomopatogênicos (NEPs) são patogênicos a carrapatos (SAMISH and GLAZER, 1992, 2001; MAULEON et al., 1993; ZHIOUA et al., 1995; HILL, 1998; SAMISH et al., 2000). Os nematóides entomopatogênicos pertencem a duas famílias, Steinernematidae e Heterorhabditidae. Estes nematóides apresentam um estágio de vida livre encontrado no solo, que corresponde ao estágio de juvenil 3, também chamado de juvenil infectante (Ji), sendo os outros estágios obrigatoriamente encontrados nos artrópodes.

Os NEPs foram testados em várias fases e estágios de vida do carrapato. A fêmea ingurgitada

demonstrou ser mais susceptível aos nematóides (SAMISH et al., 2004). Estudos vêm demonstrando que espécies da família Heterorhabditidae são mais virulentas do que os da família Steinernematidae e alguns atributos que podem explicar este fato, 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 de uma espécie de 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 propor uma forma alternativa de controle foi testado o nematóide *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003) contra fêmeas ingurgitadas de *R.(B). microplus* resistentes a carrapaticida.

## Metodologia

O estudo foi realizado no período de junho a julho 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. baujardi* LPP7

Para multiplicação de *H. baujardi* LPP7 foram utilizadas lagartas do último instar de *Galleria mellonella* (Lineu, 1759) (Lepidoptera: Pyralidae) da criação 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 umedecida com 2 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 infetantes começaram a emergir dos cadáveres e foram coletados utilizando-se pipetas Pasteur em dias alternados. Foram então identificados quanto à data de coleta, acondicionados em garrafas de cultura de células de 40mL e armazenados em câmara climatizada à  $15 \pm 1^\circ \text{C}$  a 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  $\mu\text{l}$  cada, homogeneizando-se a solução a cada medida. 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

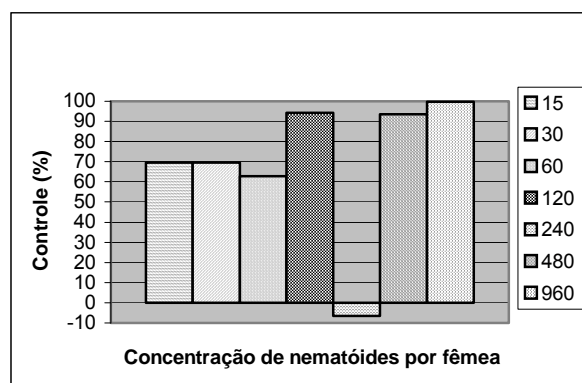


Figura 1- Gráfico da eficácia do controle de estirpes resistentes de fêmeas de *R. (B). microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a  $27 \pm 1^\circ \text{C}$  a UR >80%.

As concentrações mais baixas (15, 30 e 60 nematóides por fêmea) tiveram um percentual de controle acima de 60%. O percentual de controle foi acima de 90% nas concentrações de 120, 480 e 960 nematóides por fêmea. Não houve um

controle na concentração de 240 juvenis (-6%) por fêmea ingurgitada, possuindo uma média de massa de ovos elevada, no entanto, houve uma baixa percentagem de eclosão dos ovos.

### Discussão

A concentração de 15 nematóides por fêmea apresentou um resultado superior (70%) aos de Alekseev *et al.* (2006) em que obteve um controle de 50% na concentração de 20 juvenis por fêmea (Jis/♀) de *Heterorhabditis* spp. enquanto que no presente trabalho a eficácia do controle foi de 70% na concentração de 15 Jis/ ♀.

No entanto, Glazer *et al.* (2001) observaram uma taxa de mortalidade de 90% para *B. annulatus* na concentração com 1000 JI/♀ de *Heterorhabditis* spp, em 24 horas de exposição. Resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho numa concentração próxima (960 Jis por fêmea) houve 100% de controle num tempo de exposição maior (72 horas).

### Conclusão

Diferentemente de outros trabalhos, os resultados obtidos mostram que concentrações menores como: 15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 também controlam de maneira eficiente as fêmeas de estirpes resistentes de *R.(B).microplus* tendo resultados mais próximos das condições de campo e que nematóides da espécie *Heterorhabditis baujardi* LPP7 podem ser eficientes no controle de *R.(B).microplus*. Mais estudos são necessários para mostrar o potencial destes nematóides sob condições de campo.

### Referências

ALEKSEEV, E.; I. GLAZER & M. SAMISH. Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against females *Boophilus annulatus* ticks. **BioControl** 51: 507-518, 2006.

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

FURLONG, J. 1999. Diagnostico de la susceptibilidad de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* a los acaricidas en lo estado de Minas Gerais, Brasil. In: Seminario Internacional de Parasitologia Animal, 4. Puerto Vallarta. Resumos. Puerto Vallarta. 41-46.

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.

HILL, D.E., Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. **J. Parasitol.** 84: 1124-1127, 1998.

MAULEON, H., N. BARRE AND S. PANOVA, 1993. Pathogenicity of 17 isolates of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say). **Exp. Appl. Acarol.** 17: 831-838, 1993.

SAMISH, M. AND I. GLAZER, 1992. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Arachnida: Ixodidae). **J. Med. Entomol.** 29: 614-618, 1992.

SAMISH, M. AND I. GLAZER. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. **Trends Parasitol.** 17: 368-371, 2001.

SAMISH, M., E. ALEKSEEV AND I. GLAZER. Interaction between ticks and pathogenic nematodes: the susceptibility of various tick species at different developmental stages. **J. Med. Entomol.** 36: 733-740, 2000.

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.

ZHIOUA, E., R.A. LEBRUN, H.S. GINSBERG AND A. AESCHLIMANN, Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* and *S. glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.** 32: 900-905, 1995.