

INFLUÊNCIA DOS NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS *Heterorhabditis indica* LPP4 e *H. baujardi* LPP7 SOBRE A ALTERAÇÃO DO PESO DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ESTIRPES SENSÍVEIS E RESISTENTES EM LABORATÓRIO

Machado, I.R.¹, Pinto C.C.S.², Minas, R.S.³, Silva, E.R.⁴, Robaina, R.R.⁵, Furlong, J.⁶, Dolinski, C.M.⁷

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

Resumo- *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) é um ectoparasito comum em bovinos que promove diminuição na produção e que pode causar a morte dos animais. Existe boa perspectiva quanto ao uso dos nematóides entomopatogênicos (NEPs) no controle destes ectoparasitas. Esse trabalho teve por objetivos avaliar a influência dos nematóides *Heterorhabditis indica* LPP4 e *H. baujardi* LPP7 na alteração do peso das fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpes sensível e resistente a carrapaticidas. Foram testados sete tratamentos mais o controle, representados por diferentes concentrações de JIs (15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960). A alteração do peso diminuiu a medida em que se aumentava a concentração de JIs de *H. indica* LPP4 em fêmeas sensíveis.

Palavras-chave: *Heterorhabditis indica* LPP4, *Heterorhabditis baujardi* LPP7 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, controle biológico, nematóides entomopatogênicos.

Área do Conhecimento: Agronomia

Introdução

Rhipicephalus (Boophilus) microplus Canestrini (Acari: Ixodidae) é um ectoparasito comum em bovinos, que ocorre em quase todo o território nacional e está relacionado a inúmeras doenças que promovem diminuição na produção ou causam a morte dos animais. Os nematóides entomopatogênicos (NEPs) vêm sendo usados com sucesso no controle biológico de pragas de solo (Grewal et al. 2005). Existe boa perspectiva quanto ao uso dos NEPs das famílias Steinernematidae Chitwood & Chitwood, 1937 e Heterorhabditidae Poinar, 1976 (Nematoda: Rhabditida) no controle destes ectoparasitas.

Trabalhos avaliando a biologia de *R. (B.) microplus* sob condições de laboratório, foram realizados. Gloria et al. (1993) realizaram um estudo avaliando os parâmetros biológicos de duas estirpes de *R. (B.) microplus* nas temperaturas de 27°C e 32°C, mas estas estirpes diferiam no fato de serem resistentes e sensíveis a acaricidas. Nesse trabalho a alteração do peso da fêmea (peso inicial - peso final) é um dos parâmetros mais relevantes para se verificar a ação do tratamento, pois quando a alteração do peso é pequena, se conclui que as fêmeas tiveram um intervalo de tempo insuficiente para liberação dos ovos, pois morreram precocemente devido justamente à ação do tratamento. Porém, quando a alteração do peso é grande conclui-se que o

tratamento não foi tão eficaz, pois a fêmea ficou viva e ovipositando.

A maioria dos trabalhos relacionados com o controle biológico de carrapatos por nematóides entomopatogênicos apresenta poucos dados sobre a interferência dos nematóides na biologia reprodutiva das fêmeas dos carrapatos. Portanto, esse trabalho teve por objetivos avaliar a influência dos nematóides *Heterorhabditis baujardi* LPP7 Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003 e *H. indica* LPP4 Poinar, Karunakar, & David, 1992, na alteração do peso das fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes de *R.(B.) microplus*.

Metodologia

Foram utilizadas no experimento, duas estirpes de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, uma sensível e outra resistente a carrapaticidas. As fêmeas sensíveis (Porto Alegre-RS), não tiveram contato com carrapaticidas e foram provenientes da colônia mantida no Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite em Coronel Pacheco, MG. As fêmeas resistentes foram provenientes de remanescentes de testes com carrapaticidas na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora-MG.

Foram utilizados os nematóides *H. baujardi* LPP7 e *H. indica* LPP4 provenientes da Floresta Amazônica (Monte Negro-RO) que foram identificadas com base na morfologia e biologia molecular (DOLINSKI et al. 2008). Os nematóides foram multiplicados em larvas no 7º instar de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)

provenientes da criação mantida no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia/Nematologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro utilizando-se 100 JIs diluídos em 0,5 mL de água destilada para cada 5 larvas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com papel filtro no fundo (Whatman nº1) e acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%, durante 48 horas.

Após a morte das larvas, estas foram transferidas para armadilhas modificadas de White (WHITE, 1927) e acondicionadas nas mesmas condições supracitadas. Após 11 a 12 dias, quando os primeiros juvenis infectantes começaram a emergir dos cadáveres de *G. mellonella*, foram realizadas coletas destes, em dias alternados, utilizando-se pipetas Pasteur. Os JIs foram acondicionados em garrafas de cultura de células (40 mL) e armazenados em câmara climatizada a $16 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80% por até uma semana antes dos testes.

Procedimento experimental

O procedimento experimental foi baseado na metodologia utilizada por Vasconcelos et al., (2004). Foram testados sete tratamentos mais o controle, representados por diferentes concentrações de JIs (15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960). Para a obtenção das concentrações de 120, 240, 480 e 960 JIs em 0,5 mL de água destilada foi utilizado o método volumétrico sob microscópio ótico, utilizando-se a lâmina de Peters para contagem, com 20 alíquotas de 10 μl cada, homogeneizando-se a solução a cada coleta. Para a obtenção das concentrações mais baixas (15, 30 e 60 JIs), os juvenis foram coletados manualmente com o auxílio de bambu.

Foram utilizadas oito placas com 24 orifícios cada, aos quais foram adicionados 4 g de areia peneirada e autoclavada. Cada placa representou um tratamento ou concentração de JI. Para o controle foi utilizada a mesma placa com areia e 1 mL água destilada isenta de nematóides. Os nematóides foram adicionados à 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, pesadas e distribuídas de forma homogênea nas placas.

As placas foram acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ a UR > 80%, durante um período de 72 horas.

As posturas foram separadas todos os dias, para se observar o último dia de postura de cada fêmea, e três dias após o final da postura a quenógina (fêmea do carrapato após ter feito a postura dos ovos) foi pesada. A postura total de

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

Parâmetro biológico analisado nas fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes

- Alteração do peso da fêmea: Alteração do peso da fêmea após final de postura (Peso inicial - Peso final);

Análise estatística

Para todos os parâmetros, foi feita análise de variância com ANOVA. Existindo significância, foi aplicado o teste de Tukey-Kramer a 5% de significância para comparar as médias dos parâmetros. Nos tratamentos em que as diferenças entre os desvios padrões caracterizavam uma amostragem de distribuição não normal, foram utilizados os testes não-paramétricos Kruskal-Wallis e Dunn (SISTEMA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS E GENÉTICAS, 1997).

Resultados

- *Heterorhabditis indica* LPP4

Na estirpe sensível, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos acima de 60 JIs/ ♀ e o controle, assim como entre a maioria dos tratamentos. A concentração que reduziu significativamente a alteração do peso foi a de 960 JIs/ ♀. Nesse tratamento, a fêmea não perdeu peso ovipositando e morreu precocemente com uma alteração de 23,16 mg em média em comparação com o controle, que teve uma alteração de peso em média de 164,71 mg.

Em fêmeas resistentes existiram diferenças entre o controle e os tratamentos a partir da concentração de 15 JIs/ ♀, assim como entre tratamentos. A concentração que mais alterou o peso foi a de 960 JIs/ ♀ com 37,04 mg em média, comparado ao controle com alteração de 97,08 mg em média (Figura 1).

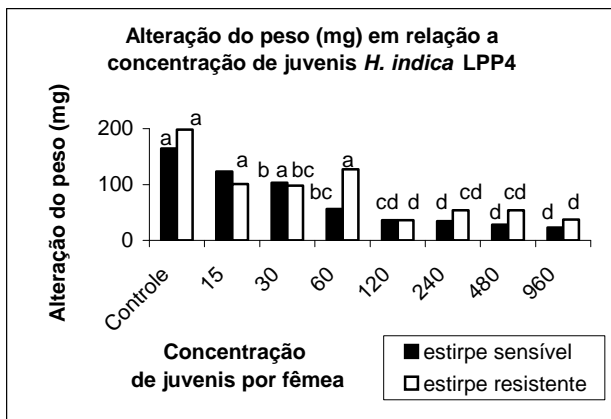


Figura 1. Alteração do peso de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação a concentração de juvenis de *H.indica* LPP4.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Foram notadas diferenças significativas em fêmeas sensíveis, o controle diferiu dos tratamentos acima de 240 JIs/ ♀ e a concentração de 480 JIs/ ♀ foi a que mais afetou a alteração de peso (76,33 mg em média) em comparação com o controle, com alteração média de 178, 50 mg.

Nas fêmeas resistentes o controle também diferiu dos tratamentos acima da concentração de 240 JIs/ ♀, e os tratamentos diferiram entre si. A concentração que mais diminuiu a alteração do peso foi a de 480 JIs/ ♀ (26,58 mg em média) em relação ao controle com 97,08 mg em média (Figura 2).

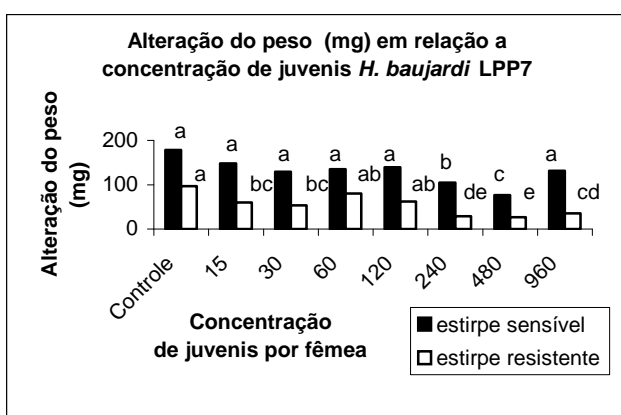


Figura 2. Alteração do peso de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação a concentração de juvenis de *H. baujardi* LPP7.

Discussão

Assim como em Silva (2006), nesse trabalho fêmeas sensíveis apresentaram diferenças significativas entre o controle e os tratamentos acima de 60 JIs/ ♀, e a alteração do peso médio foi diminuída a medida em que se elevou a concentração de JIs. Portanto, fêmeas dos tratamentos de maiores concentrações (120, 240, 480 e 960) não chegaram a perder peso com a ovoposição, por morrerem precocemente devido à ação dos JIs de *H. indica* LPP4 nos referidos tratamentos (Figura 3).

O mesmo não foi observado em fêmeas resistentes em que a alteração do peso não seguiu uma tendência de diminuição. Foram observadas diferenças entre o controle e os tratamentos a partir de 15 JIs/ ♀ (Figura 3).

Em fêmeas sensíveis do carrapato bovino registraram-se diferenças entre o controle e os tratamentos acima de 240 JIs/ ♀. Além disso, também ocorreram diferenças entre os tratamentos, sendo a concentração de 480 JIs/ ♀ a que mais se diferenciou do controle reduzindo a alteração de peso devido a morte precoce da fêmea. Diferentemente dos resultados de Freitas-Ribeiro et al. (2005) não houve tendência de diminuição na alteração do peso quando se elevou a concentração de JIs de *H. baujardi* LPP7 (Figura 4). Nesse trabalho, em fêmeas resistentes notou-se diferenças significativas nos tratamentos em relação ao controle acima de 15 JIs/ ♀, similar ao nematóide *H. indica* LPP4, quando também aplicado à fêmeas resistentes (Figura 4).

Conclusão

O peso da postura tanto de fêmeas resistentes quanto de fêmeas sensíveis foi reduzido utilizando as duas espécies de NEPs. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 foi eficiente afetando a alteração do peso de fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes de *R. (B.) microplus* quanto *Heterorhabditis indica* LPP4, isto se deve provavelmente ao mesmo ótimo de temperatura de em média 27°C tanto dos isolados de nematóides quanto das fêmeas. Aparentemente, diferentes linhagens ou espécies de nematóides podem influenciar diferentemente na fecundidade de fêmeas ingurgitadas de diferentes espécies de carrapatos. São necessários estudos a campo para verificar a ação destes isolados no controle de fêmeas resistentes de *R. (B.) microplus*.

Referências

Brovini, C.N., Furlong, J., Chagas, A.C.S. (2003) Influência dos fatores climáticos na biologia e no comportamento de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* a campo. *Biosci.J.* Uberlândia, v. 19, n. 1, p. 71-76.

- Castro, J. J.; Newson, R. M. (1993) Host resistance in cattle tick control. *Parasitology Today*, Limerick, v. 9, p. 13-7.
- Dela Vega, R. (1981) New method for determination of viability of *Boophilus microplus* (Ixodoidea, Ixodidae) larvae. *Folia Parasitologica*, v. 28, n. 4, 371-375.
- Dolinski, C., Kamitani, F., Machado, I.R., Winter C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 103 (2): 150-159.
- Freitas-Ribeiro, G. M.; J. Furlong; V.O. Vasconcelos; C. Dolinski & A. Loures-Ribeiro. (2005). Analysis of Biological Parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 Exposed to Entomopathogenic Nematodes *Steinernema carpocapsae* Santa Rosa and All Strains (*Steinernema*: Rhabditida). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48 (6): 911-919.
- Gloria, M. A.; Faccini, J.L.H.; Daemon, E.; & Grisi, L. (1993) Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *Boophilus microplus* (Can., 1887) resistente e sensível à carrapaticidas em condições de laboratório. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2 (2): 77-84.
- Gonzalez, J. C. (2003) O Controle do carrapato do boi. Passo Fundo, RS: UPF. 129.
- Kaaya, G.P.; Samish, M. and Glazer, I. (2000) Laboratory evaluation of pathogenicity of entomogenous to african ticks species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916, 303-308.
- Kocan, KM, Pidherney MS, Blouin EF, Claypool PL, Samish M, Glazer I. (1998) Entomopathogenic nematodes as a potential biological control method of ticks. *Ann N Y Acad Sci* 914: 355-364.
- Samish, M.; H. Ginsberg & I. Glazer. (2004) Biological control of ticks. *Parasitology*, 129: 389-403.
- Silva, E.R. (2006) Ação do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* isolado LPP1 sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Tese (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal) - Juiz de Fora – MG, Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF, 49 pp.
- Sonenshine, D.E. (1991) Biology of ticks. In: *The respiratory system*. (12): 212-218. New York Oxford. v. 1, 446 pp.
- Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG). (1997). Versão 9.0. Viçosa, MG: UFV. 150p.
- Souza, A. C. (1999) Comportamento e ecologia de larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *B. microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI:IXODIDAE) em pastagens de *Brachiaria decumbens*. Tese (Mestrado em Biologia) - Juiz de Fora-MG, Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF. 42p.
- Vasconcelos, V.O.; J. Furlong ; G.M. Freitas; C. Dolinski; M.M. Aguilera.; R.C.D. Rodrigues & M. Prata. (2004) *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.
- Veríssimo, C. J. (2004) Controle biológico e alternativo do carrapato do boi. APTA/SAA-SP, mime. 3p.
- White, G.F. (1927) A method for obtaining infective nematode larva