

## POTENCIAL DO NEMATÓIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis indica* LPP4 NA MORTALIDADE DAS FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ESTIRPES SENSÍVEIS E RESISTENTES EM LABORATÓRIO

**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>, Robaina, R.R.<sup>5</sup>, Furlong, J.<sup>6</sup>, Dolinski, C.M.<sup>7</sup>**

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

**Resumo-** É unânime a afirmação que dentre os ectoparasitos, o carrapato bovino é um dos que maiores prejuízos causa à pecuária bovina do Brasil. Atualmente o controle do carrapato em bovinos, envolve o uso intensivo de produtos químicos, que podem deixar resíduos tóxicos na carne e leite, sendo ainda nocivos ao animal e ao ambiente. Organismos como os nematóides entomopatogênicos (NEPs) tem sido avaliados como ferramentas no controle biológico dos carrapatos, já que tem se mostrado eficientes no controle de insetos. O trabalho teve por objetivo avaliar a mortalidade causada pelos nematóides *H. indica* LPP4 ao longo dos dias em fêmeas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) estirpes sensíveis e resistentes. Foram testados sete tratamentos mais o controle, representados por diferentes concentrações de JIs (15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960). Aparentemente *Heterorhabditis indica* LPP4 mostrou ser eficaz no controle destas fêmeas causando uma maior mortalidade em menos dias, principalmente em fêmeas resistentes.

**Palavras-chave:** *Heterorhabditis indica* LPP4, controle biológico, nematóides entomopatogênicos, Rhabditida.

**Área do Conhecimento:** Agronomia

### Introdução

É unânime a afirmação que dentre os ectoparasitos, o carrapato é um dos que maiores prejuízos causa à pecuária bovina do Brasil (SOUZA, 1985). Atualmente o controle do carrapato em bovinos, envolve o uso intensivo de produtos químicos, que podem deixar resíduos tóxicos na carne e leite, sendo ainda nocivos ao animal e ao ambiente. A resistência do carrapato *Boophilus microplus* aos carrapaticidas disponíveis no mercado, também é motivo de preocupação. Organismos como os nematóides entomopatogênicos (NEPs) tem sido avaliados como ferramentas no controle biológico dos carrapatos, já que tem se mostrado eficientes no controle de insetos (SAMISH & GLAZER, 2001).

É possível que NEPs possam ser promissores agentes de controle biológico para o carrapato bovino. Estes já foram testados em várias fases e estágios de vida do carrapato e a fêmea ingurgitada demonstrou ser a fase mais susceptível aos nematóides. Durante a fase parasitária os carrapatos foram resistentes e seus ovos também não foram afetados (SAMISH et al., 2004).

No Brasil, estudos em laboratório utilizando NEPs vêm demonstrando a eficácia no uso destes nematóides no controle do carrapato bovino (VASCONCELOS et al., 2004; FREITAS-RIBEIRO et al., 2005; REIS, 2005; SILVA, 2006).

Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo avaliar a mortalidade causada pelos nematóides *H. indica* LPP4 e *H. baujardi* LPP7 ao longo dos dias em fêmeas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) estirpes sensíveis e resistentes, visando conhecer os efeitos da ação patogênica desses nematóides.

### Metodologia

#### Local de realização dos experimentos, obtenção e manutenção do material vivo

O estudo foi realizado no período de março de 2006 a fevereiro de 2008 no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos, RJ.

Foram utilizadas no experimento, duas estirpes de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, uma sensível a carrapaticidas e outra de campo. As fêmeas sensíveis Porto Alegre, 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) e 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 UENF 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 ou 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 contar 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 um 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 desprendidas naturalmente do hospedeiro no dia anterior ao experimento. 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 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 seringas plásticas adaptadas e incubadas em câmara climatizada a  $27 \pm 1^\circ \text{C}$  e UR > 80%.

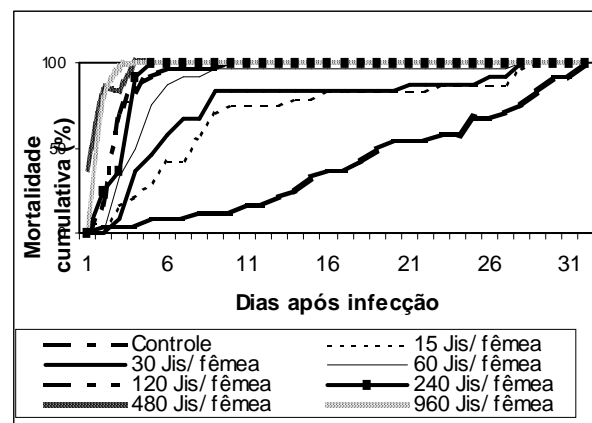
### Parâmetro biológico analisado nas fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes

Foi avaliada a mortalidade cumulativa, que é o percentual da mortalidade acumulada ao longo dos dias de todos os tratamentos e controle. A mortalidade foi registrada diariamente e constatada por meio da ocorrência de reflexos nas patas e pela coloração geral do corpo das fêmeas.

### Análise estatística

A mortalidade acumulada ao longo dos dias foi avaliada e foi feito o cálculo do percentual da mortalidade cumulativa.

### Resultados



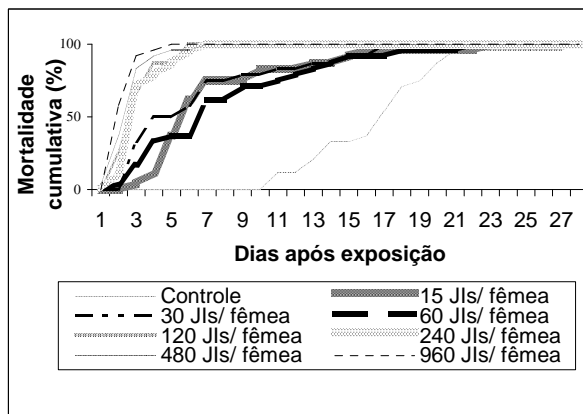
**Figura 1.** Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4.

### - *Heterorhabditis indica* LPP4

A avaliação da mortalidade em fêmeas ingurgitadas estirpe sensível durou trinta e dois dias, sendo que durante os três primeiros dias (72 horas) as fêmeas ficaram expostas aos juvenis de *Heterorhabditis indica* LPP4.

No quinto dia, nas concentrações de 240, 480 e 960 JIs/ ♀ ocorreu 100% de mortalidade. Também no quinto dia, as concentrações de 60 e 120 JIs/ ♀

causaram 75 e 92% de mortalidade, respectivamente, enquanto que no sexto dia nessas mesmas concentrações, houve 87 e 96% de mortalidade, respectivamente. As menores concentrações (15 e 30 Jls/ ♀) causaram a mortalidade de 29 e 46% das fêmeas do carrapato bovino, respectivamente no quinto dia. Já no sexto dia, houve um aumento da mortalidade de 42 e 67%, respectivamente para essas mesmas concentrações (Figura 1).



**Figura 2.** Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4.

A avaliação do porcentual de mortalidade em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* de campo durou 28 dias, e durante os três primeiros dias (72 horas) as fêmeas ficaram expostas aos juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4.

No quinto dia, os Jls de *H. indica* LPP4 causaram 100% de mortalidade nas fêmeas do carrapato bovino na concentração de 960 Jls/ ♀. Tanto no quinto como no sexto dia, uma mortalidade de 96% das fêmeas foi obtida utilizando-se a concentração de 480 Jls/ ♀. No quinto dia também se observou 87% de mortalidade das fêmeas em ambas as concentrações de 120 e 240 Jls/ ♀, sendo que no sexto dia o porcentual de mortalidade aumentou para 100 e 96%, respectivamente. Uma mortalidade de 37% ocorreu nas concentrações de 15 e 60% Jls/ ♀ no quinto dia, enquanto que a concentração de 30 Jls/ ♀ atingiu 50% de mortalidade no mesmo dia (Figura 2).

## Discussão

Segundo Samish et al. (2000) o tempo transcorrido entre a infecção e a morte da fêmea ingurgitada deve ser curto, pois assim a fêmea não terá tempo para realizar a postura e transmitir patógenos hemoparasitos aos vertebrados. A

mortalidade do hospedeiro está mais relacionada com o aumento da bactéria do que com o número de NEPs que invadem a hemocele do carrapato, pois não há relação entre o porcentual de mortalidade e o número de Jls recuperados no carrapato (GLAZER & SAMISH 1993).

Freitas-Ribeiro et al. (2005) observaram que com o aumento da concentração de nematóides de *S. carpocapsae* linhagem All ocorreu uma maior porcentagem de mortalidade de carrapatos.

No presente trabalho, esta correlação positiva em relação à mortalidade também foi observada. Quando se aumentou a concentração de Jls de *H. indica* LPP4 ocorreu maior taxa de mortalidade em fêmeas ingurgitadas resistentes de *R. (B.) microplus* (Figura 1).

Vasconcelos et al. (2004) observaram uma mortalidade de 90% das vinte fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível utilizando 5.000 juvenis por placa (Jls/ placa) de *S. glaseri* no terceiro dia. Entretanto, neste estudo 96% das fêmeas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível foram mortas no terceiro dia utilizando uma concentração menor (960 Jls/ ♀) (Figura 1).

Samish et al. (1999a) obtiveram 100% de mortalidade numa concentração de 200 Jls de *S. carpocapsae* Mexican em fêmeas de *B. annulatus* no sétimo dia. Contudo, neste trabalho nas três maiores concentrações (240, 480 e 960 Jls/ ♀) houve 100% de mortalidade no sétimo dia utilizando Jls de *H. indica* LPP4 em fêmeas do carrapato bovino estirpe sensível.

Com relação a infecção das fêmeas resistentes, Vasconcelos et al. (2004) observaram um aumento linear na mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível com o aumento da concentração de Jls de *S. glaseri*. No entanto, nos testes com *H. bacteriophora* esta mesma correlação linear não foi observada. Assim como observado por Vasconcelos et al. (2004), nesse trabalho não houve uma correlação positiva na mortalidade em fêmeas resistentes de *R. (B.) microplus* com o aumento da concentração de Jls de *H. indica* LPP4 (Figura 2). Isto provavelmente pode estar relacionado a algum fator intrínseco que algumas fêmeas resistentes do carrapato bovino tenha desenvolvido após exposição a carrapaticidas, já que estas, segundo Nolan (1985) apresentam alterações como cutícula mais espessa e também alterações metabólicas que dificultam a ação da maioria dos agentes controladores.

Hill (1998) testando 5.000 Jls de *S. riobrave* registrou 100% de mortalidade no sexto dia. Em contraposição às observações supracitadas, neste estudo notou-se 100% de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* no sexto dia numa menor concentração (120 Jls/ ♀) (Figura 2).

## Conclusão

Os nematóides aqui testados demonstraram serem eficientes na mortalidade do carrapato bovino do que outros nematóides testados, independente dos carrapatos serem sensíveis ou resistentes.

São necessários estudos a campo para verificar a ação destes isolados no controle de fêmeas resistentes de *R. (B.) microplus*.

### Referências

- Dolinski, C., Kamitani, F., Machado, I.R., Winter C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabdit 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.
- Glazer I, Samish M. (1993) Suitability of *Boophilus annulatus* replete female ticks as hosts of the nematode *Steinernema carpocapsae*. *J Invert Pathol* 61: 220-222.
- Glazer, I.; E. Alekseev & M. Samish. (2001) Factors affecting the virulence of entomopathogenic nematodes to engorged females *Boophilus annulatus* ticks. *J. Parasitol.* 87 (4): 808-812.
- Hill D.E. (1998) Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black legged tick, *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 84: 1124-1127.
- Nolan, J. 1985. Resistance mechanisms to chemical products in arthropods parasites of veterinarian importance. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.18, n. 2, p.155-166.
- Reis, C. M. R. (2005) Associação entre o nematóide entomopatogênico *Steinernema glaseri* (Steiner,1929) (Rhabditida: Steinernematidae) e um acaricida no controle de *Boophilus microplus* (Canestrini,1887) (Acari: Ixodidae). Tese (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal)-Juiz de Fora-MG, Universidade Federal de Juiz de Fora- UFJF, 61p.
- Samish, M. & I. Glazer. (2001) Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*, 8 (17): 368-371.
- Samish, M.; Aleseev, E. and Glazer, I. (1999a) Interaction between ticks (Acari: Ixodidae) and pathogenic nematodes (Nematoda): susceptibility of tick species at various developmental stages. *Journal of Medical*, 36: (6), 733-740.
- Samish, M.; Alekseev, E. and Glazer, I. (1999b) Efficacy of entomopathogenic nematode strains against engorged *Boophilus annulatus* females (Acari: Ixodidae) under simulated field conditions. *Journal of Medical Entomology*, 36: (6), 727-732.
- Samish, M.; E. Alekseev & I. Glazer. (2000) Mortality rate of adult ticks due to infection by entomopathogenic nematodes. *Journal of Parasitology*, 4 (86): 679-684.
- Samish, M.; E. Alekseev & I. Glazer. (2001) Mortality rate of adult ticks due to infection by entomopathogenic nematodes. *Journal of Parasitology*, 4 (86): 679 – 684.
- 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.
- Souza, A P. Carrapato dos bovinos (Can. 1887). In: Beck, A. A. H, coord. Manual de parasitoses dos animais por A.A.H. Beck, E.C.T. Garcia e P.C.C. Borges. Florianópolis, Secr. Da Agricultura e do Abastecimento, p.65-80, 247p, 1985.
- 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.
- White, G.F. (1927) A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Sci.* 30: 302-303.