

AÇÃO DO NEMATÓIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis baujardi* LPP7 NA MORTALIDADE DAS 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* são ectoparasitos de bovinos de grande importância, pois causam prejuízos econômicos para os produtores. Estudos em laboratório mostraram que os nematóides são eficazes no controle de carrapatos, mas são necessários experimentos a campo para demonstrar este potencial. O trabalho teve por objetivo avaliar a mortalidade causada pelos nematóides *H. baujardi* LPP7 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). Foram utilizadas oito placas com 24 orifícios cada. Cada placa representou um tratamento ou concentração de JI. Os nematóides da espécie *H. baujardi* LPP7 aqui testado demonstraram serem mais eficientes na mortalidade do carrapato bovino do que outros nematóides testados, independente dos carrapatos serem sensíveis ou resistentes.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, controle biológico, nematóides entomopatogênicos.

Área do Conhecimento: Agronomia

Introdução

Rhipicephalus (Boophilus) microplus são ectoparasitos de bovinos, sendo de grande importância, pois causam prejuízos econômicos para os produtores. Além da transmissão de agentes patogênicos, o elevado custo com produtos para o controle destes animais acarretam perdas significativas. O mau uso destes produtos traz conseqüências como carrapatos resistentes, produtos cada vez mais fortes, contaminação do ambiente e dos alimentos (BITTENCOURT, 2000). Grisi *et al.* (2002) relataram que *B. microplus* acarretam prejuízos de cerca de dois bilhões de dólares ao ano à economia brasileira. Para os produtores causam perda de 10% a 15% na produção de leite, além de outros prejuízos como mortalidade, redução do ganho de peso, danos ao couro e gastos com carrapaticidas.

Estudos com organismos entomopatogênicos laboratório mostraram que os nematóides são eficazes no controle de carrapatos, mas são necessários experimentos a campo para demonstrar este potencial. Um fator que favorece o desenvolvimento de nematóides como agentes anticarrapatos é a preferência por habitat similares (SAMISH & GLAZER, 2001).

Estudos têm mostrado que os carrapatos são susceptíveis à infecção por nematóides entomopatogênicos. Treze espécies de carrapatos ixodídeos e duas espécies de argasídeos são comprovadamente susceptíveis aos nematóides,

sendo os adultos aparentemente mais susceptíveis (SAMISH, 2000). Em outro estudo foi observada a susceptibilidade de cinco espécies de carrapatos aos nematóides entomopatogênicos, sendo os adultos mais susceptíveis que os estádios imaturos (GODWIN *et al.*, 2000).

Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo avaliar a mortalidade causada pelos nematóides da espécie *H. baujardi* LPP7 ao longo dos dias em fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino estirpes sensíveis e resistentes, visando conhecer os efeitos da ação patogênica desse nematóide.

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 e outra resistente. 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 nematóides da espécie *H. baujardi* LPP7 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 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 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 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%.

O parâmetro biológico analisado nas fêmeas ingurgitadas sensíveis a carrapaticidas e de campo foi 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 averiguação da ocorrência de reflexos nas patas e pela coloração geral do corpo das fêmeas.

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 de mortalidade cumulativa.

Resultados

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

A avaliação do percentual de mortalidade em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível durou 32 dias, e durante os três primeiros dias (72 horas) as fêmeas foram expostas aos juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7.

No sétimo dia foi registrada uma mortalidade de 100% na concentração de 480 JIs/ ♀, enquanto que com 240 JIs/ ♀ houve 75% de mortalidade. O mesmo não ocorreu para a maior concentração (960 JIs/ ♀) que gerou uma mortalidade de 67%, enquanto que no sexto, este percentual foi de 71%. Além disso, tanto as concentrações de 30 quanto as de 60 JIs/ ♀ apresentaram 54% de mortalidade. Por fim, a mortalidade das fêmeas do carrapato bovino nas concentrações de 15 e 120

JIs/ ♀ foram de 42 e 33%, respectivamente (Figura 1).

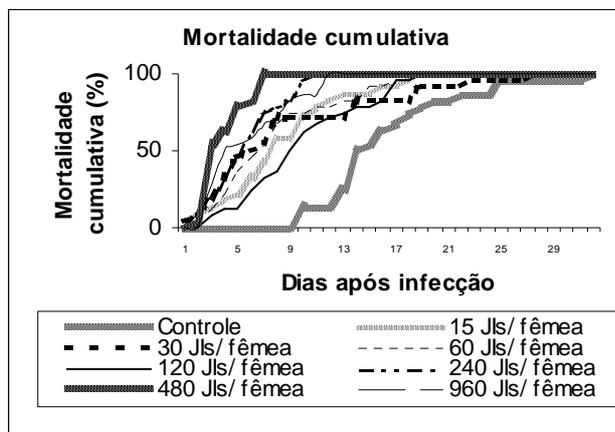


Figura 1. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

A avaliação do porcentual de mortalidade em fêmeas ingurgitadas resistentes durou 27 dias, e durante os três primeiros dias (72 horas) as fêmeas foram expostas aos juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7.

No sexto dia observou-se uma mortalidade de 100, 96, 92, 79, 71, 71% para as concentrações de 960, 480, 240, 120, 30 e 15 JIs/ ♀, respectivamente (Figura 2).

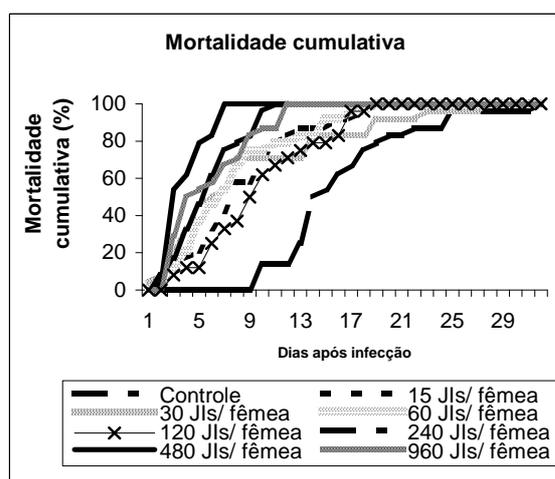


Figura 2. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas resistentes de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

Discussão

- *H. baujardi* LPP7 X fêmeas ingurgitadas estirpe sensível

Samish et al. (1999a) verificaram um aumento de mortalidade de *R. sanguineus*, *Hyalomma excavatum* e *Rhipicephalus bursa* com a elevação da concentração de nematóides. Todavia, neste trabalho o mesmo não foi observado em relação a mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível quando se aumentou a concentração de JIs de *H. baujardi* LPP7 (Figura 3).

Segundo Samish et al. (2001) 80% das fêmeas de *Rhipicephalus bursa* foram mortas com a concentração de 5.000 JIs de *Heterorhabditis sp.* IS-3 no sexto dia. Nesse estudo, na concentração de 480 JIs/ ♀ de *H. baujardi* LPP7 ocorreu 83% de mortalidade em fêmeas no sexto dia (Figura 3).

Freitas- Ribeiro et al. (2005) registrou 60% de mortalidade em fêmeas sensíveis do carrapato bovino utilizando 600 JIs de *S. carpocapsae* linhagem All no sétimo dia. Porém, no presente trabalho observou-se no sétimo dia 100% de mortalidade em fêmeas sensíveis do carrapato bovino utilizando JIs de *H. baujardi* LPP7 numa concentração menor (480 JIs/ ♀) (Figura 3). De acordo com Glazer et al. (2001) 90% das fêmeas de *B. annulatus* morreram injetando-se apenas um juvenil no sétimo dia.

No sexto dia, 50% das fêmeas sensíveis do carrapato bovino morreram devido a concentração de 30 JIs/ ♀ enquanto que Vasconcelos et al. (2004) utilizando sua concentração máxima (25.000 JIs/ placa) de *H. bacteriophora* alcançou os mesmos 50% no segundo dia.

- *H. baujardi* LPP7 X fêmeas ingurgitadas resistentes

Zihoua et al. (1995); Kaaya et al. (2000) e Samish et al. (1999b) não verificaram uma correlação positiva em relação à mortalidade com o aumento da concentração de nematóides. Esta observação também foi verificada neste estudo, em que foram utilizadas crescentes concentrações de JIs de *H. baujardi* LPP7 para avaliar a mortalidade de fêmeas ingurgitadas resistentes de *R. (B.) microplus* (Figura 4).

Neste estudo, observou-se que ao sexto dia ocorreu 100% de mortalidade das fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe resistente na concentração de 480 JIs/ ♀. Além disso, na concentração de 30 JIs/ ♀ houve 71% de mortalidade, enquanto que com 60 JIs/ ♀ 54% (Figura 4). Isso se deve, provavelmente, segundo Máuleon et al. (1993), a existência de alguma secreção cuticular com atividade nematicida que deve ter repelido ou inibido a multiplicação destes nematóides no tratamento (60 JIs/ ♀), ou

possivelmente à barreira mecânica gerada por uma cutícula mais espessa das fêmeas resistentes que impediu a penetração destes juvenis gerando uma menor mortalidade.

De acordo com Freitas-Ribeiro et al. (2005) não foi observada nenhuma mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe resistente no terceiro dia, na concentração de 600, 3000 e 6000 JIs/placa de *S. carpocapsae* linhagem Santa Rosa. No entanto, no presente trabalho ao terceiro dia a concentração de 480 JIs/♀ suscitou em 87% de mortalidade em fêmeas ingurgitadas resistentes de *R. (B.) microplus*.

Conforme Glazer et al. (2001) a mortalidade do hospedeiro está mais relacionada ao aumento da bactéria do que com o número de nematóides que invadem a hemocele do carrapato, pois nenhuma relação foi encontrada entre o percentual de mortalidade e o número de JIs recuperados nos carrapatos.

Conclusão

Os nematóides da espécie *H. baujardi* LPP7 aqui testado demonstraram serem mais eficientes na mortalidade do carrapato bovino do que outros nematóides testados, independente se os carrapatos são sensíveis ou resistentes.

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

Referências

Bittencourt, V. R. E. P. (2000) Controle Biológico De Carrapatos: P. 145 – 171. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (Eds.). Controle Biológico. Jaguariúna, Sp: Embrapa Meio Ambiente, 388 P.

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

Godwin, P. K.; Samish, M. & Glazer, I. 2000. Laboratory evaluation of pathogenicity of entomogenous nematodes to African tick species. *Annals of the NY Academy of Sciences* 916: 303-308.

Grisi, L.; Massard, C. L.; Moya Borja, G. E. & Pereira, J. B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária* 21(125): 8- 10.

Kaaya, G.P.; Samish, M. and Glazer, I. (2000) Laboratory evaluation of patogenicity of entomogenous to african ticks species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916, 303-308.

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

Samish, M.; Alekseev, E. & Glazer, I. 2000. Biocontrol of ticks by entomopathogenic nematodes: Research update. *Ann. NY Acad. Sci* 916: 589-594.

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.; 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.; E. Alekseev & I. Glazer. (2001) Mortality rate of adult ticks due to infection by entomopathogenic nematodes. *Journal of Parasitology*, 4 (86): 679 – 684.

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

Zhioua E, Lebrun R.A., Ginsberg H.S., Aeschllimann A. (1995) Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* and *S. glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 32: 900-905.