

## INTERFERÊNCIA DOS NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS *Heterorhabditis indica* LPP4 e *H. baujardi* LPP7 SOBRE O PESO DA POSTURA DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ESTIRPES SENSÍVEIS E RESISTENTES

**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-** Os carrapatos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) estão entre os paralelos de 32° N e 32° S e são um dos mais importantes ectoparasitos das regiões tropicais e subtropicais atingindo mais de 75% da população mundial de bovinos. Existe boa perspectiva quanto ao uso dos nematóides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernematidae Chitwood & Chitwood, 1937 e Heterorhabditidae Poinar, 1976 (Nematoda: Rhabditida) no controle destes ectoparasitas. Estes nematóides vêm sendo usados com sucesso no controle biológico de pragas de solo. Esse trabalho teve por objetivos avaliar a influência dos nematóides *Heterorhabditis indica* LPP4 e *H. baujardi* LPP7 no peso da postura das fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpes sensíveis e resistentes a carrapaticidas. Foram testados sete tratamentos mais o controle, representados por diferentes concentrações de JIs (15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960). O peso da postura tanto de fêmeas resistentes quanto de fêmeas sensíveis foi reduzido quando foram adicionadas as duas espécies de NEPs.

**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) estão entre os paralelos de 32° N e 32° S (GONZALEZ, 2003) e são um dos mais importantes ectoparasitos das regiões tropicais e subtropicais (CASTRO E NEWSON, 1993) atingindo mais de 75% da população mundial de bovinos (CORDOVÉS, 1997).

Existe boa perspectiva quanto ao uso dos nematóides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernematidae Chitwood & Chitwood, 1937 e Heterorhabditidae Poinar, 1976 (Nematoda: Rhabditida) no controle destes ectoparasitas. Estes nematóides vêm sendo usados com sucesso no controle biológico de pragas de solo (GREWAL et al. 2005).

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, no peso da postura das fêmeas ingurgitadas 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  $\mu\text{l}$  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

- Peso da postura: Peso da massa de ovos total da fêmea;

### Análise estatística

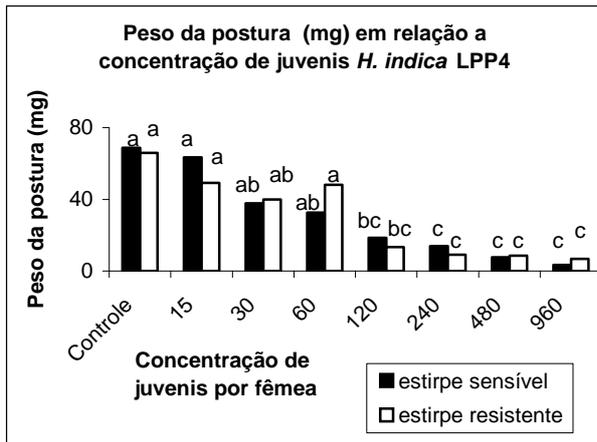
Para todos os parâmetros, foi feita análise de variância com ANOVA. Existindo significância, foi aplicado o teste de Tukey-Kramer a 5% de significância para comparar as médias dos parâmetros. Nos tratamentos em que as diferenças entre os desvios padrões caracterizavam uma amostragem de distribuição não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

### Resultados

#### - *Heterorhabditis indica* LPP4

Os tratamentos foram diferentes do controle a partir da concentração de 120 JIs/ ♀. A concentração que mais reduziu a massa de ovos foi a de 960 JIs/ ♀ (3,33 mg em média).

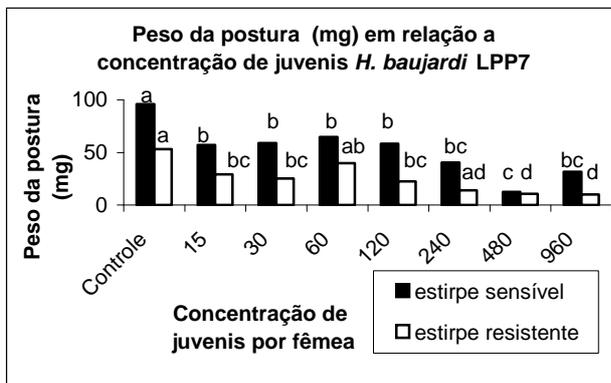
Em fêmeas resistentes o peso da massa de ovos do controle diferiu estatisticamente da maioria dos tratamentos e a partir da concentração de 120 JIs/ ♀ os tratamentos foram diferentes do controle. A concentração de 960 JIs/ ♀ foi a mais eficaz reduzindo drasticamente a massa de ovos (6,83 mg em média) em comparação ao controle (Figura 1).



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

#### - *Heterorhabditis baujardi* LPP7

A partir da concentração de 15 JIs/ ♀ os tratamentos foram diferentes do controle em fêmeas sensíveis e resistentes. A concentração de 480 JIs/ ♀ foi a que mais reduziu a massa de ovos das fêmeas sensíveis (12,58 mg em média), comparada ao controle (96,00 mg em média). A concentração que notavelmente reduziu a massa de ovos foi a de 960 JIs/ ♀ em fêmeas resistentes (Figura 2).



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

#### Discussão

##### - Peso da Postura

De acordo com Kaaya et al. (2000) a redução da massa de ovos das fêmeas ingurgitadas do carrapato provocada pelos nematóides é relevante

pelo fato de afetar o número de carrapatos da próxima geração.

O peso da massa de ovos em estirpes sensível e resistente dos grupos tratados com *H. indica* LPP4 diferiram do controle a partir da concentração de 120 JIs/ ♀ (Figura 1). Esses resultados corroboram com os de Freitas-Ribeiro et al. (2005) que relataram a diferença entre o controle e os tratamentos a partir de 600 JIs/ placa com cinco fêmeas, utilizando *S. carpocapsae* linhagens All e Santa Rosa. Similar efeito foi encontrado por Vasconcelos et al. (2004) ao mostrar que o tratamento com 1.000 JIs / ♀ de *S. glaseri* Santa Rosa foi o que mais diminuiu a massa de ovos de fêmeas sensíveis do carrapato bovino. A correlação entre diminuição do peso da massa de ovos e concentração de JIs, só foi observada em fêmeas suscetíveis. Freitas-Ribeiro et al. (2005) relataram o mesmo em seus estudos com fêmeas da mesma espécie suscetíveis utilizando JIs de *S. carpocapsae* linhagens All e Santa Rosa.

Nesse trabalho utilizando *H. baujardi* LPP7 em fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes observou-se diferenças significativas no controle em relação aos tratamentos acima de 15 JIs/ ♀. O tratamento que mais diferiu do controle reduzindo a massa de ovos foi o de 480 JIs/ ♀ para suscetíveis e 960 para resistentes (Figura 2).

Vasconcelos et al. (2004) registraram que para *H. bacteriophora* CCA não foram observadas diferenças no peso da massa de ovos em nenhum dos tratamentos em relação ao controle. Reis (2005) obteve uma redução da massa de ovos associando *S. glaseri* (1000 JIs/ ♀) com um carrapaticida, sendo que as associações com doses mais baixas do carrapaticidas foram as mais eficientes.

#### 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 tão eficiente afetando o peso da postura e 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 patogenicity 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, mimo. 3p.

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