

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Caio Márcio de Oliveira Monteiro

**NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE)
NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI,
IXODIDAE)**

Juiz de Fora
2009

CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO

**NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE)
NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI,
IXODIDAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Dr. John Furlong

Co-orientadora: Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata

Juiz de Fora

2009

CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO

**NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE)
NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI,
IXODIDAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Alexander Auad Machado
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Erik Daemon
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. John Furlong (Orientador)
Embrapa Gado de Leite

A Camila, Yêdda, meus pais e irmãos por tudo que representam para mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos orientadores Dr. John Furlong e a Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata pelos preciosos ensinamentos, incentivos e, sobretudo pela amizade e exemplos de profissionais a serem seguidos. Pessoas por quem tenho grande admiração e gratidão.

Ao professor Dr. Erik Daemon e a o Dr. Alexander Machado Auad pelos preciosos ensinamentos, incentivos e contribuições.

À Dra. Cláudia Dolinski, á Dra. Vanessa Andaló e ao Dr. Alcides Moino-Jr que gentilmente cederam os nematóides utilizados neste estudo.

Aos técnicos, Éder Sebastião Reis e Klinger Aparecido de Souza, pessoas especiais com quem pude contar com a ajuda e auxílio em diferentes partes práticas realizadas durante o desenvolvimento da dissertação.

Aos amigos(as) de laboratório, Carolina, Débora, Livia e Danielle, pela ajuda e amizade durante as atividades do mestrado e em especial para Ana Elisa, Aline, Andressa e Elder pela ajuda fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de mestrado com os quais passei por importantes momentos de aprendizagem e amizade.

Ao programa de Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de fora, MG e aos professores do programa, pelos ensinamentos e momentos vividos durante estes dois anos.

À Camila, por estar sempre do meu lado me dando apoio em todos os momentos e por ter sido fundamental durante todo este período.

Aos meus familiares e em especial aos meus pais e a minha tia Yêdda por tudo que fazem e que representam para mim. Pela forma com que me criaram e por toda estrutura que me deram permitindo que eu pudesse me concentrar e completar meus estudos.

Aos amigos Leonardo, Isabella, Rodrigo, e Diogo pela amizade, pelos momentos especiais e por saber que posso contar sempre com vocês.

À Deus por tudo.

A Capes pela bolsa concedida.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

"A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida olhando-se para frente."

Soren Kierkegaard.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xv
1 - INTRODUÇÃO.....	17
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	19
CAPÍTULO I	
AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE) ISOLADO HP88, SOBRE A BIOLOGIA DE FÊMEAS INGURGITADAS DE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (ACARI, IXODIDAE)...	28
CAPÍTULO II	
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE) ISOLADO RSC-5, NO CONTROLE DE FÊMEAS INGURGITADAS DE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (ACARI, IXODIDAE).....	48
CAPÍTULO III	
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE) ISOLADO HP88 COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (ACARI, IXODIDAE): EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE EXPOSIÇÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
APÊNDICE.....	94
ANEXOS.....	96

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

- Tabela 1** - Peso médio de fêmeas ingurgitadas (mg) e massa de ovos (mg) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....34
- Tabela 2** – Períodos de pré-postura, postura, sobrevivência de fêmeas ingurgitadas e período médio de incubação de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....36
- Tabela 3** – Percentual de eclosão das larvas e índices de produção de ovos e nutricional de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....38

CAPITULO II

- Tabela 1** - Peso médio de fêmeas ingurgitadas (mg) e da massa de ovos (mg) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....54

- Tabela 2** – Período médio de pré-postura, postura, sobrevivência de fêmeas ingurgitadas e período médio de incubação de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....56
- Tabela 3** – Percentual de eclosão das larvas e índices de produção de ovos e nutricional de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....57

CAPITULO III

- Tabela 1** - Peso inicial (mg), período de pré-postura (dias), peso da massa de ovos (mg) e alteração de peso (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes períodos de exposição (3, 6, 12, 24, 48 e 72) a juvenis infectantes (300/fêmea) do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....72
- Tabela 2** - Período de postura (mg), percentual de eclosão (%), IPO (%) e IN (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes períodos de exposição (3, 6, 12, 24, 48 e 72) a juvenis infectantes (300/fêmea) do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....73

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

- Figura 1 - A:** Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em placas de Petri (6 cm) contendo areia e juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88. **B:** Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* coladas com auxílio de fita adesiva com a parte dorsal voltada para baixo em placas de Petri de 12 cm, para o acompanhamento dos parâmetros biológicos. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....33
- Figura 2 – A:** Fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* realizando postura **B:** Fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* morta devido à ação de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....35
- Figura 3 -** Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR >80%. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....39
- Figura 4 –** Rompimento da cutícula de uma fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, devido a ação de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora*, isolado HP88. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....41

CAPITULO II

- Figura 1 -** A: Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em placas de Petri (6 cm) contendo areia e juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5. B: Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* coladas com auxílio de fita adesiva com a parte dorsal voltada para baixo em placas de Petri de 12 cm, para o acompanhamento dos parâmetros biológicos. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....53
- Figura 2 –** Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5, em condições de laboratório a $27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....59

CAPITULO III

- Figura 1 -** A: Grupo contendo 20 fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* B: Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* divididas em quatro subgrupos, cada um contendo cinco carrapatos identificados individualmente com tinta atóxica e mantidos em placas de Petri de 6 cm. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....70
- Figura 2 -** Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* coladas com auxílio de fita adesiva com a parte dorsal voltada para baixo em placas de Petri de 12 cm, para o acompanhamento dos parâmetros biológicos. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....70
- Figura 3 -** Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes períodos de exposição (3,

6, 12, 24, 48 e 72) a juvenis infectantes (300/fêmea) do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....76

Figura 4 - A: Juvenil infectante de *Heterorhabditis bacteriophora*, isolado HP88 em cima do espiráculo de uma fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. B: Foto aproximada. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.....77

RESUMO

Em vista do atual quadro de resistência do carrapato dos bovinos aos carrapaticidas comerciais, somando-se ainda a necessidade de preservação ambiental e de alimentos livres de resíduos, novas alternativas no controle deste artrópode vem ganhando maior atenção. Entre estas podemos destacar a utilização de nematóides entomopatogênicos como promissores agentes de controle biológico de ixodídeos e, desta forma, a Embrapa Gado de Leite vem desenvolvendo uma linha de pesquisa que investiga interações entre este ixodídeo e estes nematóides. Com objetivo de avaliar a eficiência de duas espécies de nematóides no controle do carrapato dos bovinos, o presente trabalho foi dividido em três experimentos que avaliaram o potencial “in vitro” de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5 como controladores biológicos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais. No primeiro experimento foi avaliada a eficiência de diferentes dosagens de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 no controle do carrapato dos bovinos. A eficácia dos tratamentos foi superior a 90% em todas as concentrações utilizadas, demonstrando que este isolado foi altamente eficaz na redução da prole de *R. (B.) microplus* em condições de laboratório. No segundo experimento, foi feita a mesma avaliação,

entretanto foi empregado o nematóide *H. amazonensis* RSC-5. Os resultados alcançados com *H. amazonensis* RSC-5 foram inferiores aos obtidos com *H. bacteriophora* HP88, sendo que a melhor eficácia foi de 67% no tratamento com 300 NEPs/fêmea. Por ter sido mais eficiente, *H. bacteriophora* HP88 foi à espécie selecionada para o desenvolvimento do terceiro experimento, que buscou avaliar o efeito de diferentes tempos de exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* a juvenis infectantes deste nematóide. Os resultados alcançados mostram que tempos de exposição inferiores a 24h não são suficientes para que o nematóide exerça controle eficiente sobre este ixodídeo. Entretanto, a partir de 24h de exposição o percentual de controle foi de 82%, e com 48 e 72h esta eficácia chegou a 100%. Os resultados alcançados no presente estudo demonstram que “*in vitro*” estes nematóides são eficientes no controle do carrapato dos bovinos, entretanto, ainda é necessária a realização de estudos futuros para investigar o potencial destes agentes de controle biológico em condições de campo e os possíveis impactos que esta utilização possa causar.

Palavras-chave – Carrapato dos bovinos, Heterorhabditidae, controle biológico.

ABSTRACT

Because of the widespread resistance of cattle ticks to commercial carrapaticides and the need to protect the environment and food supply from chemical residues, there is increasing interest in finding new control alternatives. Among these is the use of entomopathogenic nematodes as biological control agents. In this effort, the Embrapa Dairy Cattle Research Center (Embrapa Gado de Leite) has been conducting a line of research investigating the interactions between cattle ticks and these nematodes. The present work examines the efficiency of two nematode species in the control of cattle ticks. We conducted three experiments to evaluate the *in vitro* potential of *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 and *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5 as biological controls of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. The study was conducted in the Parasitology Laboratory of Embrapa Gado de Leite in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. In the first experiment the efficiency was evaluated of different concentrations of infective juveniles of *H. bacteriophora* HP88 to control the ticks. The efficiency of the treatment was greater than 90% at all the concentrations tested, demonstrating this isolate is highly effective in reducing the reproductive capacity of *R. (B.) microplus* in laboratory conditions. In the second experiment, the same evaluation was carried out employing different concentrations of the nematode *H. amazonensis* RSC-5. The results were inferior to those obtained with *H. bacteriophora* HP88. The best efficacy

was 67% in the treatment with 300 EPNs/female. Because it was more efficient, we chose *H. bacteriophora* HP88 for the third experiment, which evaluated the effect of different exposure times of engorged females of *R. (B.) microplus* to infective juveniles of this nematode. The results obtained show that exposure times shorter than 24 hours are not sufficient for the nematode to have a significant control effect on this tick. However, with exposure for longer than 24 h the control percentage rose to 82%, and at 48 and 72h it reached 100%. The results obtained in this study show that *in vitro* these nematodes are efficient in controlling cattle ticks, but further studies are necessary to investigate the of these biological control agents under field conditions and the possible impacts this can cause.

Keywords – Cattle ticks, Heterorhabditidae, biological control.

1 - INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de aproximadamente 170 milhões de cabeças e, a atividade agropecuária representa grande parcela do PIB do país. Em 1984 os danos causados por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI, IXODIDAE) [= *Boophilus microplus*] segundo o Ministério da Agricultura eram de um bilhão de dólares (BRASIL, 1984; *apud.* KESSLER *et al.*, 2004); entretanto, em uma estimativa mais atual, acredita-se que as perdas econômicas geradas por este carrapato sejam superiores a dois bilhões de dólares anuais (GRISI *et al.*, 2002). Em estudo realizado no estado de Minas Gerais, AMARAL (2008) através de entrevistas com produtores, constatou que 60% dos entrevistados citaram o problema com carrapatos como uma das principais dificuldades na criação de gado leiteiro e, destes, 49% citaram este fato como o principal entrave.

Tendo em vista os prejuízos acarretados pelo parasitismo do carrapato dos bovinos e o grave quadro atual de resistência aos carrapaticidas químicos, além das pressões do mercado por produtos isentos/livres de resíduos, a Embrapa Gado de Leite vem desenvolvendo uma linha de pesquisa que investiga interações entre o carrapato dos bovinos e nematóides entomopatogênicos, na busca de viabilizar uma nova alternativa de controle deste artrópode que possa compor

programas manejo integrado de carrapatos e impacto ambiental. Com isso, o presente estudo teve como objetivos verificar o potencial “*in vitro*” de *Heterorhabditis bacteriophora* POINAR, 1975 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE), isolado HP88 e *Heterorhabditis amazonensis* ANDALÓ, NGUYEN & MOINO-JR, 2006 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE), isolado RSC-5, no controle de *R. (B.) microplus*. Dessa forma, serão apresentados os seguintes estudos e capítulos respectivos:

Nos capítulos um e dois foram realizados experimentos buscando investigar o efeito de diferentes dosagens dos nematóides entomopatogênicos *H. bacteriophora* HP88 e *H. amazonensis* RSC-5 no controle do carrapato *R. (B.) microplus*. No terceiro capítulo o objetivo foi avaliar a influência de diferentes tempos de exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* a juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 e avaliar a influência destes tempos na eficácia de controle do nematóide sobre as fêmeas ingurgitadas deste carrapato. Em todos os experimentos a eficiência dos tratamentos foi verificada através da análise de alterações nos parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas devido à ação do nematóide, e avaliações de redução da prole, assim como recomendado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que preconiza avaliação da eficácia de carrapaticidas por meio de fórmulas relativas à redução da prole (MAPA, 1990).

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: controle e resistência.

O uso de carrapaticidas ainda é o método predominante no controle *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI, IXODIDAE) [= *Boophilus microplus*]. A forma de combate mais indicada é a utilização de um programa estratégico, que se baseia no conhecimento da biologia e interações deste carrapato, planejando banhos carrapaticidas em períodos desfavoráveis para a sobrevivência deste ixodídeo na pastagem (FURLONG *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2006; LABRUNA, 2008).

Entretanto, tratamentos curativos são os mais usados no país, onde o fator chave para aplicação de carrapaticidas é o número elevado de fêmeas ingurgitadas no rebanho, e em muitos casos este é o único método de controle empregado (FURLONG *et al.*, 2004; LABRUNA, 2008). Neste caso a maioria dos produtores não conhece aspectos importantes sobre a biologia deste carrapato, suas interações ecológicas (com hospedeiro e meio ambiente) e métodos seguros e adequados no manuseio de equipamentos utilizados no banho carrapaticida (FURLONG *et al.*, 2004;

ROCHA, 1996; AMARAL, 2007). Todos estes fatos contribuem para a ineficiência deste tipo de tratamento, que com o passar dos anos vem sendo cada vez menos eficiente. Desta forma, o produtor insatisfeito com os resultados obtidos, passa a aplicar um maior número de banhos, seguido de troca constante dos acaricidas utilizados. Estes fatores levam a um aumento na pressão de seleção acelerando o surgimento de populações de carrapatos resistentes às formulações comerciais de carrapaticidas presentes no mercado (FURLONG *et al.*, 2007; LABRUNA, 2008).

Com isso, o uso excessivo de carrapaticidas, sem se compreender aspectos sobre a biologia e epidemiologia do carrapato dos bovinos, somado a falhas na detecção da resistência, levou ao desenvolvimento de populações resistentes a quase todas as bases químicas presentes no mercado (FURLONG *et al.*, 2007; KLAFKE, 2008).

Em vista ao atual quadro de resistência de *R. (B.) microplus* aos carrapaticidas, e os prejuízos que este ixodídeo gera à economia de diferentes países, novas alternativas de controle vêm sendo estudadas (JONSSON & PIPER, 2007). Entre estas podemos citar o controle através de vacinas, rotação de pastagens, homeopatia, animais resistentes e carrapaticidas de origem vegetal (MARTINS, 2004; LABRUNA, 2008). Além destes métodos acima citados podemos destacar também o controle biológico com a utilização de agentes microbianos (bactérias, fungos e nematóides entomopatogênicos) (SAMISH & REHACEK, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2004; JONSSON & PIPER, 2007).

2.2 - Nematóides Entomopatogênicos – aspectos relacionados a biologia, ecologia e utilização no controle de pragas.

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) pertencem à ordem Rhabditida (NEMATODA, SECERNETEA), na qual estão classificadas as famílias em Steinernematidae CHITWOOD & CHITWOOD, 1937 e Heterorhabditidae POINAR, 1976. A primeira é composta pelos gêneros

Steinernema TRAVASSOS, 1927 (41 espécies) e *Neosteinernema* Nguyen & SMART, 1994 (uma espécie), e a segunda pelo gênero *Heterorhabditis* POINAR, 1976 (13 espécies) (DOLINSKI, 2006).

NEPs do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* são associados com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* respectivamente (GEORGIS & MANWEILER, 1994; BURNELL & STOCK, 2000). Tais nematóides atuam como veículos para essas bactérias, que são patogênicas, quando introduzidas no corpo dos insetos hospedeiros, onde provocam rápida septicemia, levando-os a morte. (FERRAZ, 1998; GREWAL *et al.*, 2001, HAZIR *et al.*, 2003).

São observadas três fases durante o desenvolvimento desses nematóides, sendo elas: ovo, Juvenil (J1, J2, J3 e J4) e adultos (fêmeas, machos e em determinados casos hermafroditas) (FERRAZ, 1998; DOLINSKI *et al.*, 2005; DOLINSKI & MOINO-JR, 2006). O ciclo no hospedeiro se inicia pelos juvenis infectantes (JIs) de terceiro estágio (J3), os quais carregam bactérias mutualísticas específicas nos seus intestinos. Os juvenis infectantes buscam e localizam seus hospedeiros pelos produtos de excreção, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura, e ao localizarem, penetram através das aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos) e migram para hemocele. No entanto, os juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. podem penetrar também diretamente pelo tegumento por meio de um dente quitinoso presente na parte frontal (KAYA & GAUGLER, 1993; DOLINSKI & MOINO-JR, 2006).

Uma vez dentro do hemocele do hospedeiro os juvenis liberam bactérias que se propagam, multiplicam e por meio de suas toxinas matam o inseto (FERRAZ, 1998; HAZIR *et al.*, 2003) e na seqüência, os JIs ingerem tecidos decompostos no interior do hospedeiro. Os adultos irão reproduzir e dar origem a próxima geração. Estes nematóides podem completar de duas a três gerações dentro do inseto, isto vai depender do tamanho do hospedeiro e da disponibilidade de alimento no interior do cadáver. Quando os nutrientes são exauridos, juvenis infectantes (J3) retêm as bactérias e deixam o cadáver, para no ambiente, buscar um novo hospedeiro (FERRAZ, 1998; GREWAL *et al.*, 2003; DOLINSKI, 2006).

Estes nematóides são importantes agentes no controle biológico, sendo capazes de infectar e matar insetos de diferentes ordens (NEVES, 1999; HAZIR *et al.*, 2003; DOLINSKI, 2006). Algumas características que os fazem controladores potenciais de pragas são: podem ser produzidos com baixo custo em insetos hospedeiros ou em meios artificiais; podem ser armazenados; são facilmente aplicados no campo na água de irrigação ou pulverizados; possuem habilidade de buscar o hospedeiro; são compatíveis com diversos pesticidas; são seguros à maioria dos invertebrados e vertebrados; e em muitas vezes são bem específicos, não causando mortalidade indiscriminada (GREWAL *et al.*, 2001; NEVES, 1999; DOLINSKI & MOINO JR, 2006).

A produção de nematóides em escala industrial já é feita por empresas no EUA, Canadá, Austrália, Suíça, República Tcheca, Itália, Reino Unido, Suécia, Alemanha, Holanda, Cuba, Japão e Israel. Existem inúmeros relatos na literatura que demonstram o potencial destes nematóides no controle de diferentes pragas. Atualmente a utilização de NEPs já faz parte do programa de manejo integrado de pragas na cultura de citros, nozes, cogumelos, flores ornamentais, framboesa e grama em campos de golfe (DOLINSKI, 2006, DOLINSKI & MOINO JR, 2006).

O Brasil tem diferentes histórias de sucesso no controle de pragas com vírus, fungos e parasitóides, entretanto a utilização de NEPs no país ainda é pouco explorada e, além de escassos, a maioria dos estudos envolvendo nematóides entomopatogênicos é recente (GREWAL *et al.*, 2001). LEITE *et al.*, (2003) testaram cinco isolados nativos de NEPs visando o controle de ninfas da cigarrinha das pastagens *Mahanava fimbriolata* (STAL, 1854) (HEMIPTERA, CERCOPIDAE), e relataram que *Steinernema glaseri* (STEINER, 1929) (RHABDITIDA, STEINERNEMATIDAE) e *Heterorhabditis* sp. foram as espécies mais patogênicas causando mortalidade de 84% após cinco dias de infecção.

A patogenicidade de NEPs sobre ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (WESTWOOD, 1863) (COLEOPTERA, VESPERIDAE) foi investigada por MACHADO *et al.*, (2005), e os resultados obtidos demonstram que *Heterorhabditis indica* POINAR *et al.*, 1992 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE)

e *S. glaseri* causaram pequena mortalidade a ovos e alta mortalidade a larvas recém eclodidas e em estágio final de desenvolvimento.

Em casa de vegetação, BÚSSOLA *et al.* (2004) utilizaram duas concentrações (5,7 e 22,6 JIs/cm²) de *Heterorhabditis* sp. em bandejas de 40x60 cm contendo turfas de violetas, buscando o controle de larvas de *Bradysia* sp. (DIPTERA, SCIARIDAE), sendo que a concentração de 22,6 JIs/cm² foi a mais eficiente causando mortalidade de 80% das larvas.

Com o objetivo de observar o desempenho de *Heterorhabditis baujardi* PHAN *et al.*, 2003 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE) sobre larvas *Conotrachelus psidii* MARSHALL, 1922 (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE), DEL VALLE *et al.* (2005) testaram dois isolados desta espécie, e observaram melhor eficiência da linhagem selecionada para tolerância em elevadas temperatura, demonstrando que linhagens com maior tolerância a temperaturas elevadas podem ser mais eficientes.

Em estudo conduzido por ALVES *et al.* (2005), foram testadas duas espécies de NEPs (*S. glaseri* e *S. carpocapsae*) no controle do cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (PANZER, 1797) (COLEÓPTERA, TENEBRIONIDAE) e os resultados obtidos demonstraram que *Steinernema carpocapsae* (WEISER, 1955) (RHABDITIDA, STEINERNEMATIDAE) foi mais patogênica do que *S. glaseri* e que o estágio de larva foi mais susceptível do que adultos desta espécie. Resultado similar foi obtido por COSTA (2006), que observou melhor eficiência de *S. carpocapsae* no controle deste besouro e também relatou que larvas foram mais susceptíveis que pupas e adultos.

Buscando uma nova alternativa no controle de *Cornitermes cumulans* (KOLLAR, 1832) (ISOPTERA, TERMITIDAE), SOUZA (2006) utilizou diferentes espécies de nematóides e observou que para este inseto, espécies do gênero *Steinernema*, em geral, foram mais patogênicas causando mortalidade comparada ao gênero *Heterorhabditis*.

Estudo sobre o controle de *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978 (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE) com a utilização de nematóides entomopatogênicos foi conduzido por TAVARES *et al.*, (2007), e os dados alcançados demonstram que *H. indica* IBCB-n5 e *Steinernema* sp.

IBCB-n6 nas dosagens de 60 JIs/cm² causaram mortalidade em laboratório de 95 e 42% e 85 e 73% em casa de vegetação.

Com o crescente aumento no interesse da utilização de nematóides entomopatogênicos no controle de diferentes pragas, algumas considerações devem ser feitas a respeito do perigo da introdução de espécies (DOLINSKI & MOINO Jr, 2006). Nos EUA *Steinernema feltiae* (FELIPJEV, 1934) (RHABDITIDA, STEINERNEMATIDAE) foi introduzida e multiplicada sem critério, o que resultou na crítica de diferentes pesquisadores e posteriormente na proposição e elaboração de um guia para introdução de NEPs, e que mais tarde resultou em uma legislação sobre introdução de espécies exóticas de nematóides entomopatogênicos (RIVZI *et al.*, 1996; GEORGIS, 2005 *apud*, DOLINSKI & MOINO Jr, 2006). Na Europa foi organizado um comitê onde foi previsto que estes indivíduos são organismos benéficos, inócuos a animais de sangue quente e de poucos riscos ao ambiente, recomendando que estes nematóides não precisariam de registro para introdução, pois representam menos risco do que pesticidas (RICHARDSON, 1996; DOLINSKI & MOINO Jr, 2006). Segundo DOLINSKI & MOINO JR, (2006) existe um grande potencial na utilização de NEPs como agentes de controle, e a utilização de espécies nativas deve ser prioridade por já estarem adaptados às condições climatológicas e a entomofauna local, e a utilização de espécies exóticas deve ser realizada, em último caso, respeitando-se as condições impostas na legislação.

Neste raciocínio estudos têm sido conduzidos no país com intuito de identificar espécies de NEPs nativas para que no futuro estes isolados possam ser utilizados com sucesso no controle de diferentes pragas através do desenvolvimento de produtos comerciais. ANDALÓ *et al.*, (2006) coletaram amostras de solo no estado do Amazonas e descreveram uma nova espécie de nematóide classificada como *Heterorhabditis amazonensis* ANDALÓ, NGUYEN & MOINO-JR, 2006 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE). Por meio de coleta de amostras de solo no estado de Rondônia, DOLINSKI *et al.*, (2008) conseguiram identificar novos isolados de nematóides entomopatogênicos das espécies *H. indica* e *H. baujardi*. Novas linhagens de *Heterorhabditis* sp. e

de *S. glaseri* também foram obtidas por ACEVEDO *et al.* (2005) e MACHADO *et al.* (2005) através de solos coletados no município de Lavras, MG e Araras, SP, respectivamente.

2.3 - Controle biológico de carrapatos com a utilização de nematóides entomopatogênicos

Nematóides entomopatogênicos são importantes agentes no controle de diferentes pragas, (NEVES, 1999; HAZIR *et al.*, 2003; DOLINSKI, 2006). Recentemente a utilização destes nematóides também vem despertando o interesse de acarologistas que visam buscar uma nova alternativa no controle de carrapatos. O primeiro trabalho nesta linha foi publicado por SAMISH & GLAZER (1991) que observaram que ixodídeos são susceptíveis a infecções por NEPs. Em trabalho seguinte, SAMISH & GLAZER (1992) demonstraram que diferentes concentrações de *S. carpocapsae* causaram pequenas reduções na massa de ovos de *Boophilus annulatus* (SAY, 1921) (ACARI, IXODIDAE) [= *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*].

SAMISH (2000) relatou que treze espécies de ixodídeos e duas de argasídeos foram susceptíveis aos NEPs, sendo os adultos o estágio mais vulnerável à infecção. Em estudo conduzido por MAULEON *et al.* (1993) foi observada a patogenicidade de dezessete espécies de nematóides a três espécies de carrapatos, *Amblyomma variegatum* (FABRICIUS, 1794) (ACARI, IXODIDAE) *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI, IXODIDAE) [= *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] e *B. annulatus* (SAY, 1921) e apenas a última apresentou-se suscetível a todas as espécies de nematóides utilizados.

Em estudo realizado por HILL (1998), foram testados diferentes isolados de nematóides entomopatogênicos no combate a imaturos e fêmeas ingurgitadas e não ingurgitadas de *Ixodes scapularis* SAY, 1821 (ACARI, IXODIDAE). Os resultados alcançados mostraram que os estágios imaturos e fêmeas não ingurgitadas não foram suscetíveis a infecções por NEPs, entretanto fêmeas ingurgitadas foram afetadas por diferentes isolados de nematóides utilizados.

Com intuito de avaliar a patogenicidade de NEPs a carrapatos comuns no continente Africano, KAAAYA *et al.* (2000) testaram diferentes isolados de nematóides entomopatogênicos no diferentes estágios dos carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus* (NEUMANN, 1901) (ACARI, IXODIDAE), *Rhipicephalus evertsi* NEUMANN, 1897 (ACARI, IXODIDAE), *Amblyomma variegatum* FABRICIUS, 1794 (ACARI, IXODIDAE) e *Boophilus decoloratus* (KOCH, 1844) (ACARI, IXODIDAE) [= *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*]. Os resultados alcançados demonstram que estágios imaturos e fêmeas ingurgitadas foram pouco susceptíveis à infecção por NEPs, enquanto que fêmeas ingurgitadas foram mais afetadas. Entretanto teleóginas das espécies do gênero *Amblyomma* foram mais resistentes que as demais.

KOCAN *et al.* (1998) avaliaram a eficiência de *S. feltie* e *Steinernema riobravus* (CABANILLAS, POINAR E RAULTON, 1994) (RHABDITIDA, STEINERNEMATIDAE), no controle de diferentes espécies de carrapatos, e concluíram que estes nematóides foram capazes de matar e reduzir a massa de ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (ACARI, IXODIDAE), *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI, IXODIDAE), *Amblyomma maculatum* KOCH, 1844 (ACARI, IXODIDAE) e *Dermacentor variabilis* (SAY, 1821) (ACARI, IXODIDAE).

Além de escassos, a maioria dos trabalhos relacionados com o controle biológico de carrapatos com a utilização de nematóides entomopatogênicos avalia apenas a mortalidade e a quantidade de NEPs utilizados, sendo poucos os estudos que investigam a interferência destes nematóides sobre os parâmetros biológicos da fase não parasitária de carrapatos.

Buscando investigar o potencial de nematóides entomopatogênicos no controle do carrapato dos bovinos, VASCONCELOS *et al.* (2004) realizaram um experimento “*in vitro*” e constataram que a infecção por *H. bacteriophora*, isolado CCA apresentou uma eficácia de 80% nas concentrações de 300 JIs/fêmea e superior a 90% nas concentrações mais elevadas de *S. glaseri*, isolado SANTA ROSA.

Com objetivo de verificar a interferência de nematóides entomopatogênicos nos parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, FREITAS-RIBEIRO *et al.*

(2005) utilizaram dois isolados de *S. carpocapsae* e verificaram que todos os parâmetros de fêmeas ingurgitadas e parcialmente ingurgitadas foram alterados pela ação dos nematóides. Em estudo conduzido por SILVA (2007), foi constatado que *H. indica*, isolado LPP1 também interferiu em quase todos os parâmetros biológicos de fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos, e a eficácia de controle foi superior a 90% em todas as dosagens utilizadas

Em relação à compatibilidade e sinergismo de nematóides entomopatogênicos com carrapaticidas, apenas um estudo foi publicado até o momento. REIS-MENINI *et al.* (2008) mostraram que o nematóide *S. glaseri* foi compatível com a associação entre dois organofosforados (Dielorvós+ Clorfenvinfós) e a utilização dos dois de forma associada apresentou efeito aditivo no controle de *R. (B.) microplus* em condições de laboratório. Buscando aumentar o conhecimento sobre interações entre nematóides e carrapatos para viabilizar uma metodologia a ser utilizada em campo CARVALHO (2008) expôs fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* a juvenis infectantes de *S. glaseri* CCA por diferentes períodos e observou com duas horas de exposição resultou em uma eficácia de controle de 66,01% e com 24 horas a eficácia foi de 99,95.

Com intuito de avaliar o potencial de dois isolados de NEPs nativos no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos, MACHADO (2008), testou diferentes concentrações de *H. indica* LPP4 e *H. baujardi* LPP7, e demonstraram que baixas dosagens destes nematóides são eficientes no controle “in vitro” de *R. (B.) microplus*. Neste estudo foi constatada pela primeira vez na literatura a penetração de um juvenil infectante através do espiráculo de uma fêmea ingurgitada deste carrapato.

CAPITULO I

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE *Heterorhabditis bacteriophora* (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE) ISOLADO HP88, SOBRE A BIOLOGIA DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI, IXODIDAE)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo observar o efeito de diferentes concentrações de *Heterorhabditis bacteriophora* isolado HP88, no controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Para isto, foram formados seis grupos, cada um contendo 20 fêmeas ingurgitadas, que foram expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes deste nematóide (0, 75, 150, 300, 600 e 1.200/fêmea). Foram observados os seguintes parâmetros biológicos: peso inicial, peso final, alteração de pesos, peso da massa de ovos, período de pré-postura, período de postura, período de sobrevivência, período de incubação das larvas, percentual de eclosão, índice de eficiência reprodutiva (IPO), índice de eficiência nutricional (IN) e percentual de controle. Os parâmetros: peso inicial, período de pré-postura e período de incubação não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos. A ação do nematóide causou alteração no peso final, alteração de peso, peso da massa de ovos, período de postura, período de sobrevivência, percentual de eclosão, IPO, IN e percentual de controle, apresentando diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os tratamentos e a testemunha. A eficácia de controle foi superior a 90% em todos os tratamentos, chegando a 99% na dosagem de 1.200 NEPs/fêmeas. Estes resultados demonstram que *H. bacteriophora* HP88, em condições de laboratório foi eficiente no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, tendo ação deletéria na maioria dos parâmetros analisados, o que faz desta espécie, um potencial agente no controle biológico do carrapato dos bovinos.

Palavras chave – Carrapato dos bovinos, nematóides entomopatogênicos, controle biológico.

INTRODUÇÃO

Dentre as várias espécies de carrapatos existentes na região neotropical, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI, IXODIDAE) (= *Boophilus microplus*), conhecido vulgarmente como carrapato dos bovinos, é a espécie que desperta o maior interesse econômico, a ponto de centralizar a atenção de indústrias de carrapaticidas, órgãos governamentais e instituições de pesquisa (MARTINS *et al.*, 2006).

O parasitismo deste carrapato pode causar prejuízos diretos devido à espoliação sanguínea e suas consequências e indiretos como transmissão de agentes patogênicos, gastos com

medicamentos e mão-de-obra especializada (FURLONG *et al.*, 2004). Estima-se que no Brasil as perdas econômicas causadas por este ixodídeo cheguem a dois bilhões de dólares anuais (GRISI *et al.*, 2002).

A utilização de acaricidas sintéticos, apesar de apresentar significativa contribuição no controle de ixodídeos, vem acarretando sérios problemas devido ao uso indiscriminado e sem critérios técnicos (FURLONG *et al.*, 2004; LABRUNA, 2008). Esta prática vem resultando na seleção de populações de carrapatos resistentes, aumentando o risco de poluição do ambiente e alimentos (FURLONG *et al.*, 2007; KLAFKE *et al.*, 2008). Com isso, torna-se necessária a busca de novas tecnologias que possam ser empregadas em programas de manejo integrado para controle destes artrópodes, minimizando impactos ambientais e diminuindo os custos de produção. Além dos benefícios citados, as alternativas não químicas atendem às exigências do mercado consumidor, que busca cada vez mais produtos isentos de resíduos e contaminantes (GUIMARÃES *et al.*, 2001; FLOATE *et al.*, 2005).

Uma alternativa promissora pode ser o controle biológico com a utilização de nematóides entomopatogênicos (SAMISH & GLAZER, 2001; FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2005). Estudos em condições de laboratório, integrantes de linha de pesquisa desenvolvida na Embrapa Gado de Leite, têm demonstrado que diferentes espécies de nematóides entomopatogênicos são eficientes “*in vitro*” no controle do carrapato dos bovinos, (VASCONCELOS *et al.*, 2004; FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2005; SILVA, 2007; REIS-MENINI *et al.*, 2008) e o potencial de *Heterorhabditis bacteriophora* POINAR, 1975, (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE), isolado HP88 no controle de outras espécies de carrapatos já foi evidenciado por SAMISH & GLAZER (1992), HILL (1998) e KAAYA *et al.* (2000). Assim, considerando a eficiência deste isolado para outras espécies de carrapatos e a demanda por um controle alternativo foi delineado o presente trabalho, com objetivo de avaliar a influência de diferentes concentrações de juvenis infectantes (JIs) de *H. bacteriophora* HP88 sobre os parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para realização do trabalho foi utilizada uma estirpe de *R. (B.) microplus*, com diferentes graus de resistência a diferentes carrapaticidas, proveniente do município de Campina Verde, Minas Gerais.

Os nematóides da espécie *Heterorhabditis bacteriophora* utilizados neste estudo foram cedidos pela professora Dra. Cláudia Dolinski, da Universidade Estadual Norte Fluminense, (UENF). Estes nematóides foram multiplicados em lagartas do último instar de *Galleria mellonella* L., 1958 (PYRALIDAE, LEPDOPTERA) de acordo com LINDEGREN *et al.* (1993) e KAYA & STOCK (1997). Os JIs coletados foram estocados em garrafas de cultivo celular de 40 ml e acondicionados em câmara climatizada a $16 \pm 1^\circ\text{C}$.

O procedimento experimental foi baseado na metodologia utilizada por SILVA (2007). As fêmeas ingurgitadas foram divididas em seis grupos com pesos previamente homogeneizados com utilização de balança analítica, cada um correspondendo a um tratamento contendo 20 carrapatos. Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos com cinco fêmeas devidamente identificadas com tinta atóxica para acompanhamento individual (cada fêmea = uma unidade experimental), sendo distribuídas em placas de Petri (6 cm de diâmetro) contendo 15g de areia previamente esterilizada (Figura 1A).

Formados os subgrupos, foi feita a aspersão de 4 ml de solução de nematóides nas concentrações de 375, 750, 1.500, 3.000 e 6.000 JIs por placa. Sendo assim a concentração de NEPs por fêmea em cada tratamento foi de 75, 150, 300, 600 e 1.200. O controle foi constituído de 4 ml de água destilada isenta de nematóides. Os grupos foram mantidos em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR>80%, durante período de 72 horas. A observação das fêmeas para verificar a mortalidade e a realização de postura foi realizada diariamente até a morte do último carrapato, e as massas de ovos coletadas foram acondicionadas individualmente em seringas de 10 ml

devidamente identificadas, com a parte distal cortada, vedadas com algodão hidrófilo e mantidas em câmara climatizada nas mesmas condições de temperatura e umidade citadas anteriormente.

Após o tempo de exposição, com auxílio de fita adesiva, as fêmeas ainda vivas de cada tratamento foram coladas com a parte dorsal voltada para baixo em placas de Petri de 12 cm de diâmetro (Figura 1B) e acondicionadas em estufa climatizada a $27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\%$, para dar continuidade no acompanhamento da biologia da fase não parasitária destes carrapatos, sendo que foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos:

Peso inicial: peso da fêmea ingurgitada (peso da teleógina);

Peso final da fêmea: obtido três dias após o final da postura (peso da quenógina);

Alteração de peso da fêmea: perda de peso da fêmea após a realização de postura - peso inicial – peso final;

Peso da postura: peso total da massa de ovos de cada fêmea;

Período de pré-postura: período que compreende o dia da queda da fêmea ingurgitada até o início da postura;

Período de postura: período que abrange desde a postura do primeiro até a postura do último ovo de cada fêmea;

Período de sobrevivência: período que compreendido entre a data da queda da fêmea ingurgitada até o dia de sua morte;

Período de incubação de ovos: período que abrange o dia do início da postura até o dia da eclosão da primeira larva de cada fêmea;

Percentual de eclosão (%EC): estimativa visual de larvas eclodidas em relação à massa de ovos de cada fêmea;

Índice de produção de ovos (IPO): o índice foi obtido de acordo com a equação proposta por BENNETT (1974). $\text{IPO} = \text{massa de ovos} \times 100 / \text{peso inicial}$. O IPO avalia quanto do sangue ingerido foi convertido em ovos;

Índice nutricional (IN): o índice foi calculado de acordo com a equação proposta por BENNETT (1974). $IN = \text{massa de ovos} \times 100 / (\text{peso inicial} - \text{peso final})$. O IN avalia quanto da perda de peso da fêmea foi destinada à produção de ovos;

Reprodução estimada (RE) – obtida pela fórmula: $(\text{Peso da postura} / \text{Peso inicial}) \times \%EC \times 20.000$ (DRUMMOND *et al.*, 1973);

Percentual de controle (%C): foi obtido segundo a fórmula de Drummond *et al.* (1973): $\%C = (\text{RE grupo controle} - \text{RE grupo tratado}) / \text{RE grupo controle} \times 100$. Este índice avalia a eficácia dos tratamentos.

Análise estatística

Para realização da análise estatística foi utilizado o software Biostat versão 5.0. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$. Os valores referentes às médias dos parâmetros peso inicial, período de pré-postura e peso final foram analisados por ANOVA e Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os parâmetros alteração de peso, peso da massa de ovos, período de postura, período de sobrevivência, período de incubação, percentual de eclosão, IPO e IN apresentaram distribuição não normal, sendo analisados por teste não paramétrico de Kruskal Wallis e Student Newman Keulls ($P < 0,05$). Foi utilizado o teste de Spearman para verificar possível correlação entre a concentração de nematóides e o período de sobrevivência e peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas. Regressão linear simples foi empregada para estabelecer uma equação matemática que descrevesse o relacionamento entre a concentração de nematóides e o percentual de controle e através desta equação foram calculadas as doses inibidoras de 50 e 90% da prole (DIP 50 e DIP 90) de acordo com BEAN (1961) e IKEMOTO & TAKAY (2000).

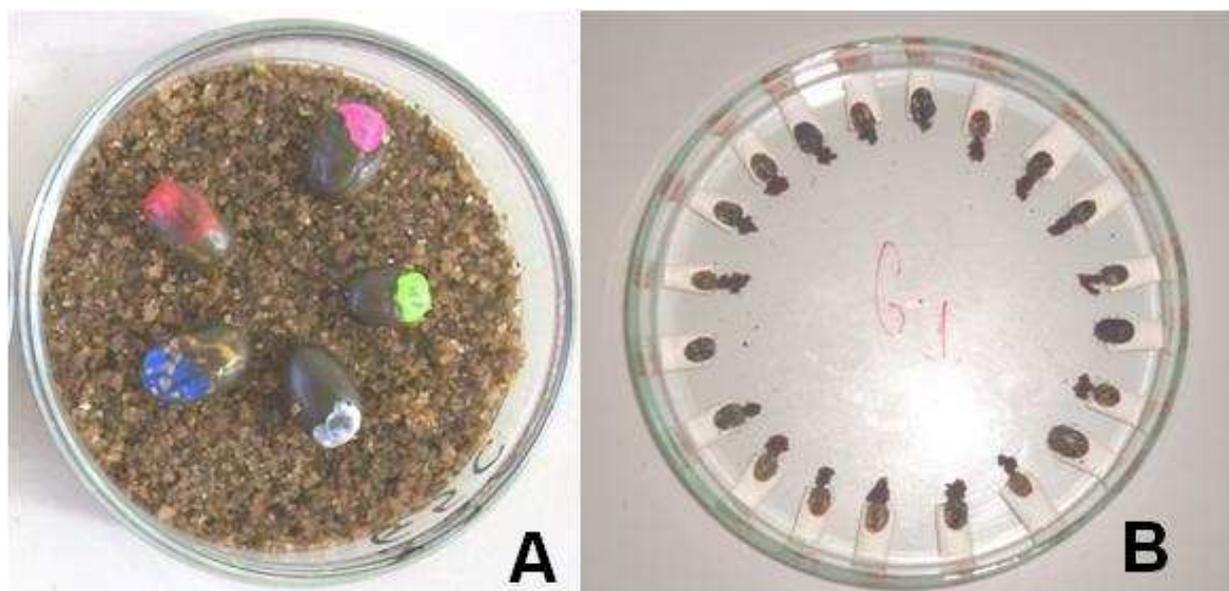


Figura 1 - A: Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em placas de Petri (6 cm) contendo areia e juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88. **B:** Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* coladas com auxílio de fita adesiva com a parte dorsal voltada para baixo em placas de Petri de 12 cm, para o acompanhamento dos parâmetros biológicos. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pesos iniciais das fêmeas dos diferentes grupos não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre si (Tabela 1), sugerindo que as alterações nos demais parâmetros biológicos provavelmente estejam relacionadas à ação dos nematóides entomopatogênicos. Esta análise torna-se importante, uma vez que estudos relatam que os parâmetros podem variar de acordo com o peso inicial das fêmeas, existindo uma correlação entre o peso inicial e o peso da massa de ovos, IPO e IN (BORGES *et al.*, 2001; SANTOS & FURLONG, 2002).

Os valores obtidos para o peso final, alteração de peso e peso da massa de ovos de todos os grupos tratados diferiram significativamente ($p < 0,01$) do grupo controle (Tabela 1). Este fato demonstra a ação do nematóide interferiu nos processos de ovoposição de fêmeas de *R. (B.) microplus*, muitas vezes levando os carrapatos à morte antes de começarem a postura, ou interferindo no processo de conversão do sangue ingerido em ovos (Figura 2). VASCONCELOS *et al.*, (2004) utilizaram diferentes concentrações de *H. bacteriophora* CCA e *Steinernema glaseri*

(STEINER, 1929) (RHABDITIDA, STEINERNEMATIDAE), isolado SANTA ROSA e, verificaram que apenas as concentrações de 1.000 e 5.000 NEPs por fêmea, do segundo nematóide, causaram redução significativa da massa de ovos deste carrapato. Os resultados do presente trabalho são semelhantes aos encontrados por FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005), que relataram que o peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas e parcialmente ingurgitadas do carrapato dos bovinos foi afetado em todos os tratamentos com diferentes dosagens de dois isolados (SANTA ROSA e ALL) de *Steinernema carpocapsae* (WEISER, 1955) (RHABDITIDA, STEINERNEMATIDAE). Da mesma forma SILVA (2007) relatou que todas as dosagens de *Heterorhabditis indica* POINAR, KRANUKAR & DAVID, 1992 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE), causaram alterações significativas nos parâmetros peso final, alteração de peso e peso da massa de ovos, inferindo que a ação do nematóide interferiu no processo metabólico de conversão de nutrientes em ovos.

Tabela 1 - Peso médio de fêmeas ingurgitadas (mg) e massa de ovos (mg) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório (27±1°C e UR>80±10%). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Concentração de NEPs	Peso Inicial (mg)	Peso final (mg)	Alteração de peso (mg)	Peso da massa de ovos (mg)
0*	223.15 ^a ±30.18 (16)	62.93 ^a ±21.28 (16)	160.23 ^a ±19.54 (16)	111.43 ^a ±22.44 (16)
75*	228.82 ^a ±25.14 (17)	190.43 ^b ±40.89 (17)	38.39 ^b ±29.18 (17)	15.41 ^b ±24.55 (17)
150*	228.45 ^a ±34.73 (17)	194.48 ^{bc} ±35.28 (17)	33.47 ^b ±21.62 (17)	9.40 ^b ±14.99 (17)
300*	225.29 ^a ±29.75 (17)	198.75 ^{bc} ±33.94 (17)	28.17 ^b ±20.29 (17)	6.54 ^b ±7.60 (17)
600*	226.12 ^a ±29.83 (17)	205.66 ^{bc} ±36.70 (17)	21.30 ^b ±29.49 (17)	8.73 ^b ±20.79 (17)
1.200*	226.69 ^a ±29.48 (17)	224.36 ^c ±29.82 (17)	2.32 ^c ±3.81 (17)	0.16 ^c ±0.33 (17)
Teste estatístico	Anova	Anova/Tukey	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls

(n) – Tamanho da amostra.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

*Concentração de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* por fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* em cada tratamento.

O período de pré-postura não foi afetado pela ação de *H. bacteriophora* HP88 nas diferentes concentrações (p>0,05) (Tabela 2). Fato similar foi relatado por VASCONCELOS *et al.*

(2004) e SILVA (2007). Entretanto, FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005) observaram que *S. carpocapsae*, isolado SANTA ROSA, aumentou o período de pré-postura de fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos. O fato de não ocorrer alteração no período de pré-postura pode ser devido ao tempo de ação que o nematóide necessita até localizar, penetrar e matar o hospedeiro, o que, segundo a literatura, varia de 24 a 72h. Com isto ou o nematóide mata a fêmea antes do início da postura (24h), ou esta começa a realizar a ovoposição antes da ação do nematóide (72h).

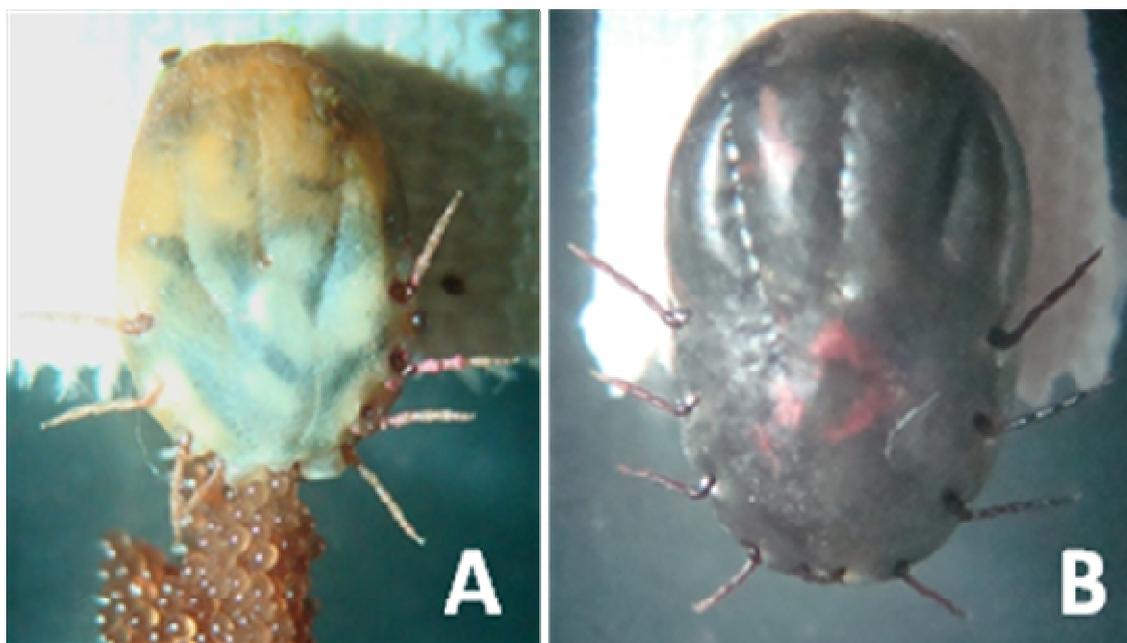


Figura 2 - A: Fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* realizando postura **B:** Fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* morta devido à ação de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Os períodos de postura e sobrevivência dos grupos tratados variaram entre 1 e 2,60 dias e 5,12 e 2,59 dias respectivamente (Tabela 2), demonstrando valores inferiores aos obtidos para o grupo controle, evidenciando diferenças altamente significativas ($p < 0,01$), isto devido à mortalidade precoce das fêmeas em todos os tratamentos. No tratamento com 1.200 NEPs por fêmea, apenas cinco carrapatos realizaram postura e a média foi de 1,0 dia de postura e 2,59 dias de sobrevivência. VASCONCELOS *et al.* (2004) relataram períodos de postura de 10.5 e 13.5 dias nas maiores concentrações de *S. glaseri* SANTA ROSA e *H. bacteriophora* CCA respectivamente,

e em nenhum dos casos foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo controle. Já FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005), demonstraram que dois isolados *S. carpocapsae* interferiram significativamente neste parâmetro. Entretanto, os resultados referentes à interferência do nematóide no período de postura e sobrevivência foram mais acentuados no presente estudo, sendo similares aos resultados obtidos por SILVA (2007).

Os períodos de incubação dos tratamentos não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) quando comparados com o período de incubação do grupo controle (Tabela 2). SILVA (2007) relatou que diferentes concentrações de *H. indica* também não causaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) no período de incubação dos grupos tratados em relação ao grupo controle. A ausência de diferenças significativas entre os grupos pode ser explicada pelo fato de que, como houve postura em todos os tratamentos, a eclosão de apenas uma larva, mesmo que precocemente, para cada fêmea tratada, poderia igualar os parâmetros entre grupos.

Tabela 2 – Períodos de pré-postura, postura, sobrevivência de fêmeas ingurgitadas e período médio de incubação de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Concentração de NEPs	Período de pré-postura (dias)	Período de postura (dias)	Período de sobrevivência (dias)	Período de incubação (dias)
0*	1.38 ^a ±0.51 (16)	13.88 ^a ±2.31 (16)	16.87 ^a ±1.85 (16)	25.53 ^a ±0.52 (16)
75*	1.79 ^a ±0.58 (15)	2.60 ^b ±1.68 (15)	5.12 ^b ±1.65 (17)	26.08 ^a ±1.50 (15)
150*	1.79 ^a ±0.43 (14)	1.93 ^b ±1.07 (14)	3.88 ^{bc} ±0.78 (17)	25.21 ^a ±0.43 (14)
300*	1.67 ^a ±0.49 (13)	1.46 ^b ±0.88 (13)	3.75 ^{bc} ±1.24 (17)	25.92 ^a ±1.51 (13)
600*	1.73 ^a ±0.47 (11)	2.00 ^b ±1.61 (11)	3.63 ^{cd} ±1.41 (17)	25.88 ^a ±1.36 (8)
1.200*	1.80 ^a ±0.45 (5)	1.00 ^b ±0.00 (5)	2.59 ^d ±0.62 (17)	27.00 ^e ±2.83 (2)
Teste estatístico	Anova	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Kruskal-Wallis

(n) – Tamanho da amostra.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

*Concentração de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* por fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* em cada tratamento.

•Análise estatística não realizada devido a tamanho insuficiente da amostra.

Foi observada correlação negativa entre a concentração de nematóides e o período de sobrevivência ($r = -0,6669$) ($p < 0,01$) e entre a concentração de nematóides e o peso da massa de ovos ($r = -0,7466$) ($p < 0,01$) de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Estes resultados mostram que, em relação ao presente estudo, quanto maior foi a concentração de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88, menor foi o período de sobrevivência, levando também a uma menor massa de ovos. VASCONCELOS *et al.* (2004) e FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005) utilizando concentrações de *S. glaseri* SANTA ROSA e *S. carpocapsae*, isolado ALL e SANTA ROSA respectivamente, também observaram que quanto maior foi a concentração de nematóides menor foi o período de sobrevivência e peso da massa de ovos.

O percentual de eclosão dos tratamentos variou de 55 a 66,7%, sendo estatisticamente diferente ($p < 0,01$) do percentual do grupo controle, que foi de 92,60% (Tabela 3), fato também observado por FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005) e SILVA (2007), sobre a ação de *S. carpocapsae* ALL e SANTA ROSA e *H. indica* LPP1 respectivamente, sobre o percentual de eclosão de larvas do carrapatos dos bovinos. Uma forma especulativa de explicar este fato seria a possível ação deletéria dos nematóides nos processos de ovoposição e/ou embrionamento, interferindo nas etapas de oócitos, fertilização, absorção de água pela cutícula e impermeabilização dos ovos pelo órgão de Gené.

Para o IPO dos grupos tratados foram observados valores entre 0,07 e 7%, diferindo estatisticamente ($p < 0,01$) do grupo controle (50,04%) (Tabela 3). O mesmo foi observado em relação ao IN, onde os valores dos grupos expostos a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle (69,42%), chegando a 2,37% no grupo tratado com 1.200 NEPs/fêmea (Tabela 3). Os valores obtidos no presente estudo são similares aos encontrados por FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005) e SILVA (2007) e diferem dos dados obtidos por VASCONCELOS *et al.* (2004), onde o IPO e IN dos grupos tratados não diferiram do grupo controle. Estes resultados revelam que as fêmeas

dos grupos tratados transferiram uma menor taxa de nutrientes para a produção de ovos, os quais podem ter sido utilizados para outros processos metabólicos.

Tabela 3 – Percentual de eclosão das larvas e índices de produção de ovos (IPO) e nutricional (IN) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório (27±1°C e UR>80±10%). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Concentração de NEPs	Percentual de eclosão - %EC	Índice de produção de ovos – IPO (%)	Índice nutricional – IN (%)
0*	92.60 ^a ±6.95 (16)	50.04 ^a ±8.40 (16)	69.42 ^a ±10.38 (16)
75*	66.73 ^b ±31.61 (15)	7.01 ^b ±10.94 (17)	29.15 ^b ±26.44 (17)
150*	63.43 ^b ±32.65 (14)	3.92 ^b ±5.56 (17)	23.79 ^b ±26.37 (17)
300*	61.85 ^b ±37.68 (13)	2.84 ^b ±3.18 (17)	18.30 ^b ±17.26 (17)
600*	58.50 ^b ±32.06 (8)	3.25 ^b ±7.67 (17)	21.42 ^b ±30.03 (17)
1.200*	55.00 [*] ±49.50 (2)	0.07 ^c ±0.16 (17)	2.37 ^c ±4.73 (17)
Teste estatístico	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls

(n) – Tamanho da amostra.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

*Concentração de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* por fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* em cada tratamento.

Os percentuais de controle em todos os tratamentos foram superiores a 90% e o tratamento com 1.200 NEPs/♀ alcançou eficiência de 99,92% (Figura 3). A eficiência de 90,28% no tratamento com a menor dosagem de nematóides (75 NEPs/fêmea) supera os resultados obtidos por VASCONCELOS *et al.* (2004) que observaram eficiência acima 80% para *H. bacteriophora* CCA na concentração de 300 NEPs/♀ e superior a 90% para *S. glaseri* apenas em concentrações de 1.000 e 5.000 NEPs/♀. Os resultados encontrados neste trabalho foram semelhantes aos obtidos por SILVA (2007), que utilizando o nematóide *H. indica* LPP1 observou eficiência superior a 90% a partir de concentrações de 75 NEPs/♀ no controle de *R. (B.) microplus*. De modo geral estudos têm demonstrado que nematóides da família Heterorhabditidae são mais patogênicos para ixodídeos do que nematóides da família Steinernematidae (SAMISH & GLAZER, 2001). Alguns atributos de espécies do gênero *Heterorhabditis*, como a presença de um dente quitinoso na região

anterior que possibilita a penetração ativa do nematóide através da cutícula do hospedeiro e a associação com bactérias simbiotes com alta virulência, pode conferir maior eficiência a estes nematóides (HAZIR *et al.* 2003).

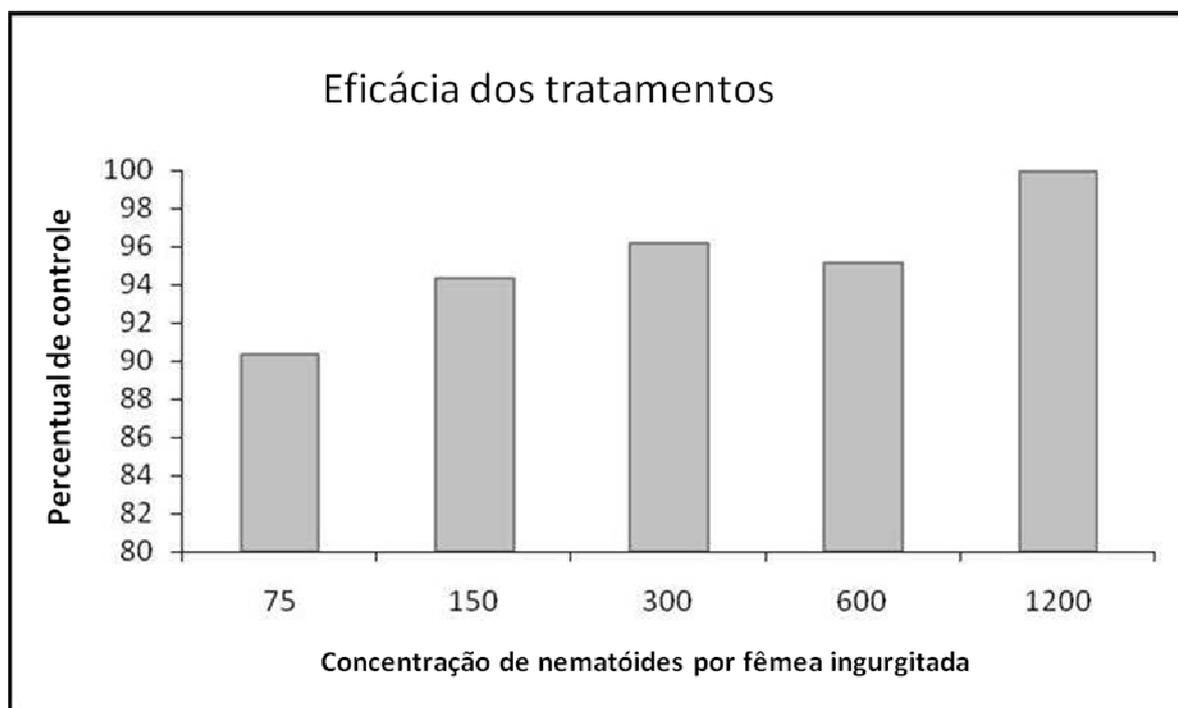


Figura 3 – Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório a $27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Para o cálculo da regressão linear do 1º grau foram utilizados apenas os valores referentes às concentrações de 75, 150 e 300 NEPs/fêmea (porção linear da curva), assim como preconizado por BEAN (1961), de forma a proporcionar a obtenção de valores ainda mais próximos à realidade. A dose de nematóides (D) correspondeu ao eixo das abscissas “x” e o eixo das ordenadas, “y” foi representado pela transformação dose x eficiência (DE) de acordo com IKEMOTO & TAKAI (2000). Com isso foi obtida a equação: $D = -571,50005 + 98,054286 \cdot DE$ ($R^2 = 1,0$). Através da equação foi obtida a dose inibidora de 50 e 90% da prole que foram respectivamente 11,89 e 71,00 NEPs/fêmea. Estes resultados demonstram que baixas concentrações de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 sob condições de laboratório são suficientes para inibir 50 e 90% da prole de fêmeas ingurgitadas. Neste estudo foram seguidas as recomendações do Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (MAPA), que preconiza avaliação da eficácia de carrapaticidas por meio de fórmulas relativas à redução da prole, fator chave para um controle eficiente (MAPA, 1990).

Alguns trabalhos já demonstram a eficiência de *H. bacteriophora* HP88 no controle de diferentes espécies de carrapatos. SAMISH & GLAZER (1992) utilizaram quatro isolados de NEPs no controle de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus annulatus* (SAY, 1821) (ACARI, IXODIDAE) [= *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*] e observaram que *H. bacteriophora* HP88 foi a segunda espécie mais eficiente. Em estudo realizado por HILL (1998) esta mesma espécie de nematóide foi a terceira mais eficiente dentre os 13 isolados testados no controle de *Ixodes scapularis* (SAY, 1821) (ACARI, IXODIDAE). KAAAYA *et al.* (2000) avaliaram a patogenicidade de cinco isolados de nematóides para fêmeas ingurgitadas e não ingurgitadas de cinco espécies de carrapatos, e os resultados obtidos mostram que *H. bacteriophora* HP88 foi a mais patogênica para *Rhipicephalus appendiculatus* (NEUMANN, 1901) (ACARI, IXODIDAE), *Amblyomma variegatum* FABRICIUS, 1794 (ACARI, IXODIDAE) e *Boophilus decoloratus* (KOCH, 1844) (ACARI, IXODIDAE) [= *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*].

Os resultados obtidos no presente estudo são superiores aos resultados alcançados por VASCONCELOS *et al.* (2004), demonstrando que em condições de laboratório *H. bacteriophora* HP88 teve melhor desempenho no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos do que *H. bacteriophora* CCA. HILL (1998) testando dois isolados de *H. bacteriophora* no controle de *I. scapularis*, observou que a estirpe HP88 foi mais patogênica do que o isolado CRUISER. KAAAYA *et al.* (2000) demonstraram que em condições de laboratório, *H. bacteriophora* HP88 foi mais eficiente que *H. bacteriophora* LS5 no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. appendiculatus*. Estes resultados evidenciam a importância na avaliação da patogenicidade de diferentes isolados de nematóides, uma vez que a eficiência pode variar para diferentes cepas da mesma espécie.

Na concentração mais elevada (1.200 NEPs/♀), foi observado o rompimento da cutícula de algumas fêmeas ingurgitadas devido à ação dos nematóides (Figura 4), fato também relatado por HILL (1998) e VASCONCELOS *et al.*, (2004), utilizando *H. bacteriophora*, isolados HP88 e CCA

respectivamente. Segundo estes autores, o rompimento se deve à penetração dos juvenis infectantes de *H. bacteriophora*, uma vez que nematóides do gênero *Heterorhabditis* possuem um dente quitinoso presente na parte frontal que os permite penetrar de forma ativa pelo tegumento do hospedeiro (KAYA & GAUGLER, 1993; DOLINSKI, 2006). No presente estudo, o rompimento da cutícula parece estar relacionado com ao grande número de invasores, uma vez que o rompimento só foi observado na maior concentração de NEPs/fêmea.



Figura 4 – Rompimento da cutícula de uma fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, devido à ação de juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora*, isolado HP88. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que sob condições de laboratório, *H. bacteriophora* isolado HP88 foi mais eficaz no controle de *R. (B.) microplus* apresentando percentuais de controle superiores aos encontrados com a utilização de outros nematóides como *H. bacteriophora* CCA, *S. glaseri* SANTA ROSA e *S. carpocapsae* SANTA ROSA e ALL. Com isso, fica evidenciado o potencial de *H. bacteriophora* HP88 no controle de *R. (B.) microplus*, e

novos estudos devem ser conduzidos para investigar e validar metodologias para uma possível utilização deste nematóide em condições de campo.

CONCLUSÃO

Heterorhabditis bacteriophora HP88 em condições de laboratório demonstrou ser eficiente no controle de *R. (B.) microplus*.

O nematóide utilizado exerceu ação deletéria sobre os parâmetros; peso final, alteração de pesos, peso da massa de ovos, período de postura, período de sobrevivência, percentual de eclosão, IPO, IN, em todas as concentrações utilizadas.

Dosagens de 75 a 1.200 NEPs/fêmea proporcionam eficácia de controle superior a 90%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAN, J.L. 1961. Predicting emergence of second-instar spruce budworm larvae from hibernation under field conditions in Minnesota. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanhan, **54**: 175-177.
- BENNETT, G.F. 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, Paris, **16** (1): 52 - 61.
- BORGES, L.M.F.; J.R. CARNEIRO; A.G. GOMES & P.C. MOREIRA. 2001. Influência do peso inicial e da estação do ano na conversão em ovos de fêmeas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, 2 (2): 127-131.
- DOLINSKI, C. 2006. Uso de nematóides entomopatogênicos para o controle de pragas. p. 261-289. In: MADELAINE VENZON; TRAZILBO JOSÉ DE PAULA JR.; ANGELO PALLINI. (Org.). **Tecnologias Alternativas para o Controle Alternativo de Pragas e Doenças**. Viçosa. 377p.
- DRUMMOND, R.O.; S.E. ERNEST; J.L. TREVINO; W.J. GRADNEY & O.H. GRAHAM, 1973. *Boophilus anulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides, **Journal of Economic Entomology**, Lanham, 66: 30-133.
- FLOATE, K.D.; K.G. WARHHAUGH; A.B.A. BOXALL & T.N. SERRATT. 2005. Fecal residues of veterinary parasiticides: nontarget effects in pasture environment. **Annual Review of Entomology**, **50** (1): 153-179.

- FREITAS-RIBEIRO, G.M.; J. FURLONG; V.O. VASCONCELOS; C. DOLINSKI & A.L. RIBEIRO. 2005. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA AND ALL STRAINS (Steinernema: Rhabditidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, **48** (6): 911-919.
- FURLONG, J.; J.R.S. MARTINS & M.C.A. PRATA. 2004. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, **23** (137), 53-56.
- FURLONG, J.; J.R.S. MARTINS & M.C.A. PRATA. 2007. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, **27** (159): 53-56.
- GRISI, L.; C.L. MASSARD; G.E. MOYA-BORJA & J.B. PEREIRA. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, **21**: 8-10.
- GUIMARÃES, J.H.; E.C. TUCCI & D.M. BARROS-BATESTI. **Ectoparasitos de Importância Médico Veterinária**. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 2001. 213p.
- HAZIR, S.; H.K. KAYA; P. STOCK & N. KESKIN. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, **27**: 181-202.
- HILL, D.E. 1998. Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black legged tick, *Ixodes scapularis*. **Journal of Parasitology**, Winston, **84** (6): 1124-1127.

- IKEMOTO, T. & TAKAI, K. 2000. A new linearized formula for the law of total effective temperature and the evaluation of line-fitting methods with both variables subject to error. **Environmental Entomology**, Lanhan, **29** (4): 671-682.
- KAAYA G.P.; M. SAMISH; & I. GLAZER. 2000. Laboratory evaluation of pathogenicity of entomogenous nematodes to African ticks species. **Annals of the New York Academy Sciences**, New York, **916**: 306–308
- KAYA, H.K. & R. GAUGLER. 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, **38**: 181-206.
- KAYA H.K & P. STOCK. 1997. Techniques in insect nematology. p. 281–324. In: Lacey LA (ed) **Manual of techniques in insect pathology**. Academic, San Diego, CA, p. 281–324.
- KLAFKE. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas. 2008. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. p.65-80. in: PEREIRA, M.C.; M. B. LABRUNA; M.P.J. SZABÓ; G.M. KLAFKE. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo: MEDVET, 169p.
- LABRUNA. 2008. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. P.15-56. in: PEREIRA, M.C.; M.B. LABRUNA; M.P.J. SZABÓ; G.M. KLAFKE. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo: MEDVET, 169p.

LINDEGREN, J.E.; VARELO, K.A.; MACKEY, B.E. 1993. Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juvenile. **Journal of Nematology**, Flórida, **5** (2): 93-197.

MAPA. 1990. **Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura. Diário Oficial de 22.01.90, p. 1506-1509.

MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J.; LEITE, R.C. Controle de carrapatos. p. 145-153. In: BARROSBATTESTI, D.M.B.; M. ARZUA; G. H. BECHARA. (Org.). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan, 2006. 223p.

REIS-MENINI, C.M.R.; M.C.A. PRATA; J. FURLONG & E.R. SILVA. 2008. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Düsseldorf, **2** (103): 1391–1396.

SAMISH M & I. GLAZER. 1992. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Florida, **29**: 614–618.

SAMISH, M. & I. GLAZER. 2001. Entomopathogenic nematodes for the bioncontrol of ticks. **Trends in parasitology**, Londres, **17** (8): 368-371.

- SANTOS, A.P. & J. FURLONG. 2002. Competição intraespecífica em *Boophilus microplus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, **32** (6): 1033-1038.
- SILVA, E. Ação do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LPP1 (POINAR, KRANUKAR & DAVID, 1992) (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE). 2007. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2007.
- VASCONCELOS, V.O.; J. FURLONG; G.M. FREITAS; C. DOLINSKI; & M.M. AGUILLERA; R.C.D. RODRIGUES; & M.C.A. PRATA. 2004. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rabbitida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 94: 201-206.

CAPITULO 2

***Heterorhabditis amazonensis* (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE) ISOLADO RSC-5, NO CONTROLE DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo observar a influência do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC-5 sobre os parâmetros biológicos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fêmeas ingurgitadas devidamente identificadas foram divididas em seis grupos de 20 e expostas às seguintes concentrações de nematóides: 0, 75, 150, 300, 600 e 1.200/fêmea. Foram observados os seguintes parâmetros biológicos: peso inicial, peso final, alteração de pesos, peso da massa de ovos, período de pré-postura, período de postura, período de sobrevivência, período de incubação das larvas, percentual de eclosão, índice de eficiência reprodutiva (IPO), índice de eficiência nutricional (IN) e percentual de controle. Para o peso inicial, período de pré-postura, período de incubação e IN não foram observadas diferenças significativa ($p > 0,05$) entre os grupos, entretanto em relação aos períodos de postura e sobrevivência todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) em relação ao controle. Para o peso final, alteração de peso, peso da massa de ovos e IPO apenas o tratamento com 1.200 nematóides/fêmea não diferiu da testemunha. A melhor eficácia no controle foi de 67,8% obtida no tratamento com 300 NEPs/fêmea e nas dosagens mais elevadas foi observado um decréscimo nesta eficácia. Estes resultados mostram que juvenis infectantes de *H. amazonensis* sob condições de laboratório interferiram na maioria dos parâmetros referentes à biologia da fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas deste ixodídeo, o que faz deste nematóide um promissor agente a ser utilizado no combate ao carrapato dos bovinos.

Palavras chave – Carrapato dos bovinos, nematóide entomopatogênico, controle biológico.

INTRODUÇÃO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (CANESTRINI, 1887) (ACARI, IXODIDAE) é um ectoparasito preferencial de bovinos (PEREIRA & LABRUNA, 2008), sendo responsável por perdas significativas no desempenho produtivo e econômico dos sistemas de produção de carne e leite. Além dos prejuízos diretos causados pela espoliação sanguínea e suas conseqüências, este ixodídeo também é responsável por prejuízos indiretos causados pela transmissão de agentes patogênicos e gasto com a aquisição de medicamentos e mão-de-obra especializada para

tratamento dos animais (GUIMARÃES *et al.*, 2001; FURLONG *et al.*, 2004). Estima-se que no Brasil os prejuízos econômicos gerados por este carrapato chegam a dois bilhões de dólares anuais (GRISI *et al.*, 2002).

O controle de *R. (B.) microplus* é feito na fase parasitária, através da utilização de produtos químicos, entretanto o uso indiscriminado e a má utilização dos carrapaticidas vêm acarretando sérios problemas de resistência, além de resíduos na carne, leite e ambiente (GUIMARÃES *et al.*, 2001; FURLONG *et al.*, 2007; KLAFKE, 2008).

Com o aumento de populações de carrapatos resistentes, novas tecnologias e estratégias têm sido buscadas para um controle mais eficiente e com menor impacto ambiental. Uma alternativa promissora pode ser o controle biológico com a utilização de agentes microbianos como bactérias, fungos e nematóides entomopatogênicos (NEPs) (BRUN & TEIXEIRA, 1992; BITTENCOURT *et al.*, 1997; SAMISH & GLAZER, 2001; FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2005; JONSSON & PIPER, 2007). Estudos em condições de laboratório têm demonstrado que NEPs são eficientes no controle do carrapato dos bovinos, causando interferências significativas nos parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas deste ixodídeo (VASCONCELOS *et al.*, 2004; FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2005; SILVA, 2007; REIS-MENINI *et al.*, 2008).

Estes nematóides são promissores agentes no controle de diferentes pragas agrícolas, entretanto DOLINSKI & MOINO Jr (2006) destacam o perigo na utilização de espécies de NEPs exóticas e defendem a utilização de isolados nativos que estão mais adaptados ao clima e fauna local. Desta forma, estudos têm sido conduzidos com intuito de identificar novas espécies e isolados de nematóides entomopatogênicos nativos para que possam ser estudados e utilizados no manejo integrado de diferentes pragas. Neste aspecto, ANDALÓ *et al.* (2006) através de amostras de solo proveniente do estado do Amazonas, descreveram uma nova espécie de nematóide: *Heterorhabditis amazonensis* ANDALÓ, NGUYEN & MOINO-JR, 2006 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE). Tendo em vista a necessidade de viabilizar novas alternativas para serem utilizadas no controle do carrapato dos bovinos e a importância de priorizar a utilização de NEPs

nativos, o presente estudo teve como objetivo avaliar, sob condições de laboratório, a interferência do nematóide entomopatogênico *H. amazonensis* RSC-5, espécie autóctone, sobre os parâmetros biológicos da fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para realização do trabalho foi utilizada uma estirpe, com diferentes graus de resistência a carrapaticidas, de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* proveniente do município de Bela Vista, Goiás.

Os nematóides da espécie *Heterorhabditis bacteriophora* utilizados neste estudo foram cedidos pelo professor Dr. Alcides Moino-Junior, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Estes nematóides foram multiplicados em lagartas do último instar de *Galleria mellonella* L., 1958 (PYRALIDAE, LEPDOPTERA) de acordo com LINDEGREN *et al.* (1993) e KAYA & STOCK (1997). Os Juvenis infectantes (JIs) coletados foram estocados em garrafas de cultivo celular de 40 ml e acondicionados em câmara climatizada a $16 \pm 1^\circ\text{C}$.

O procedimento experimental foi baseado na metodologia utilizada por SILVA (2007). As fêmeas ingurgitadas foram divididas em seis grupos com pesos previamente homogêneos com utilização de balança analítica, cada um correspondendo a um tratamento contendo 20 carrapatos. Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos com cinco fêmeas devidamente identificadas com tinta atóxica e distribuídas em placas de Petri (6 cm de diâmetro) contendo 15g de areia esterilizada, sendo cada teleógina uma repetição (cada fêmea = uma unidade experimental) (Figura 1A).

Formados os subgrupos, foi feita a aspersão de 4 ml de solução de nematóides nas concentrações de 375, 750, 1.500, 3.000 e 6.000 JIs por placa. Sendo assim a concentração de

NEPs por fêmea em cada tratamento foi de 75, 150, 300, 600 e 1.200. O controle foi constituído de 4 ml de água destilada isenta de nematóides. Os grupos foram mantidos em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e $\text{UR} > 80\%$, durante um período de 72 horas.

A observação das fêmeas para verificar a mortalidade e a oviposição foi realizada diariamente até a morte do último carrapato, e as massas de ovos coletadas foram acondicionadas individualmente em seringas de 10 ml devidamente identificadas, com a parte distal cortada, vedadas com algodão hidrófilo e mantidas em câmara climatizada nas mesmas condições de temperatura citadas anteriormente.

Após o tempo de exposição, com auxílio de fita adesiva, as fêmeas ainda vivas de cada tratamento foram coladas com a parte dorsal voltada para baixo em placas de Petri de 12 cm de diâmetro (Figura 1B) e acondicionadas em estufa climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e $\text{UR} > 80\%$, para dar continuidade no acompanhamento da biologia da fase não parasitária destes carrapatos, sendo que foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos:

Peso inicial: peso da fêmea ingurgitada (peso da teleógina);

Peso final da fêmea: obtido três dias após o final da postura (peso da quenógina);

Alteração de peso da fêmea: perda de peso da fêmea após a realização de postura - peso inicial – peso final;

Peso da postura: peso total da massa de ovos de cada fêmea;

Período de pré-postura: período que compreende o dia da queda da fêmea ingurgitada até o início da postura;

Período de postura: período que abrange desde a postura do primeiro até a postura do último ovo de cada fêmea;

Período de sobrevivência: período compreendido entre a data da queda da fêmea ingurgitada até o dia de sua morte;

Período de incubação de ovos: período que abrange o dia do início da postura até o dia da eclosão da primeira larva de cada fêmea;

Percentual de eclosão (%EC): estimativa visual de larvas eclodidas em relação à massa de ovos de cada fêmea;

Índice de produção de ovos (IPO): o índice foi obtido de acordo com a equação proposta por BENNETT (1974). $IPO = \text{massa de ovos} \times 100 / \text{peso inicial}$. O IPO avalia quanto do sangue ingerido foi convertido em ovos;

Índice nutricional (IN): o índice foi calculado de acordo com a equação proposta por BENNETT (1974). $IN = \text{massa de ovos} \times 100 / (\text{peso inicial} - \text{peso final})$. O IN avalia quanto da perda de peso da fêmea foi destinado à produção de ovos;

Reprodução estimada (RE) – obtida pela fórmula: $(\text{Peso da postura} / \text{Peso inicial}) \times \%EC \times 20.000$ (DRUMMOND *et al.*, 1973);

Percentual de controle (%C): foi calculado segundo a fórmula de Drummond *et al.* (1973): $\%C = (\text{RE grupo controle} - \text{RE grupo tratado}) / \text{RE grupo controle} \times 100$. O %C. Este índice avalia a eficácia dos tratamentos.

Análise estatística

Para realização da análise estatística foi utilizado o software Biostat versão 5.0. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$. Os valores referentes às médias dos parâmetros: peso inicial, período de incubação e percentual de eclosão foram analisados por ANOVA e Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os parâmetros: peso final, alteração de peso, peso da massa de ovos, período de pré-postura, período de postura, período de sobrevivência, IPO e IN apresentaram distribuição não normal, sendo analisados por teste não paramétricos de Kruskal Wallis e Student Newman Keulls ($P < 0,05$).

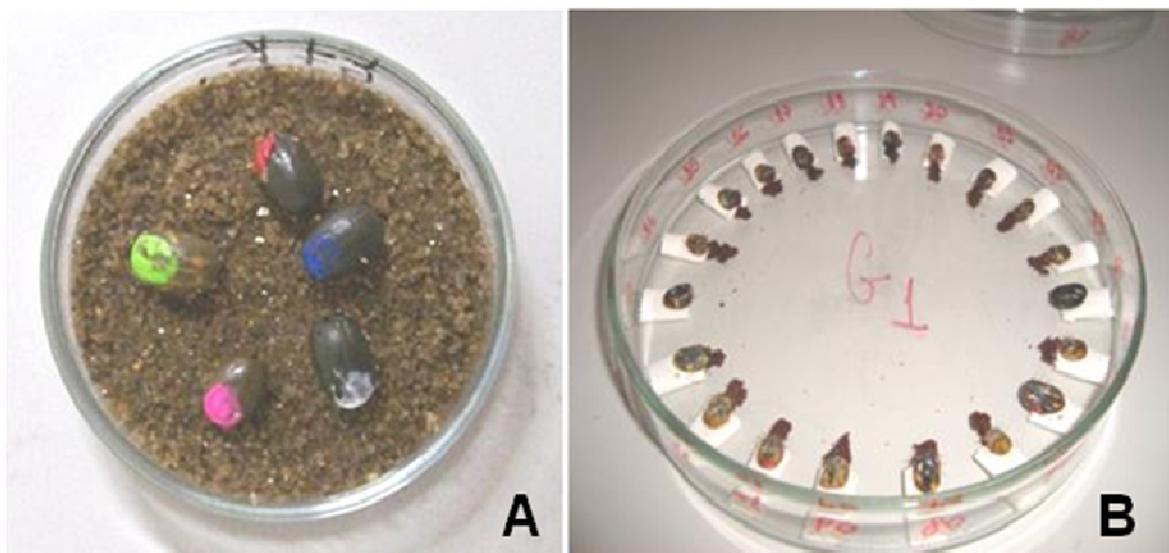


Figura 1 - A: Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em placas de Petri (6 cm) contendo areia e juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5. **B:** Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* coladas com auxílio de fita adesiva com a parte dorsal voltada para baixo em placas de Petri de 12 cm, para o acompanhamento dos parâmetros biológicos. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pesos iniciais das fêmeas dos diferentes grupos não apresentaram diferença significativas ($P > 0,05$) entre si (Tabela 1). Trabalhos como os de BORGES *et al.*, (2001) e SANTOS & FURLONG (2002) mostram que existe uma correlação entre o peso inicial de fêmeas e os parâmetros referentes ao processo de postura, por isso torna-se importante igualar os pesos entre os grupos. O fato de não terem sido encontradas diferenças sugere que as alterações nos demais parâmetros provavelmente estão relacionadas à ação de juvenis infectantes de *H. amazonensis*.

Para os parâmetros peso final, alteração de peso e peso da massa de ovos, com exceção do tratamento com 1.200 NEPs/fêmea, os demais grupos tratados diferiram significativamente ($p < 0,01$) do grupo controle (Tabela 1). Estes resultados mostram que os juvenis infectantes de *H. amazonensis* nas concentrações de 75 a 600 NEPs/fêmea interferiram no processo metabólico de conversão dos nutrientes em ovos. VASCONCELOS *et al.* (2004) buscando avaliar o potencial de *Steinernema glaseri* (STEINER, 1929) (RHABDITIDA, STEINERNEMATIDAE), isolado SANTA ROSA

e *Heterorhabditis bacteriophora* POINAR, 1975 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE), isolado CCA, relataram que apenas as maiores concentrações de *S.glaseri* causaram redução significativa na massa de ovos do carrapato dos bovinos. Entretanto FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005) e SILVA (2007) utilizando duas linhagens de *Steinernema carpocapsae* (WEISER, 1955) (RHABDITIDA, STEINERNEMATIDAE) e uma de *Heterorhabditis indica* POINAR, KRANUKAR & DAVID, 1992 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE), respectivamente, observaram que a ação destes nematóides em todas as concentrações interferiu no processo de postura deste ixodídeo. Outros estudos também relataram que diferentes espécies de nematóides entomopatogênicos reduziram a massa de ovos de outros carrapatos.

Tabela 1 - Peso médio de fêmeas ingurgitadas (mg) e da massa de ovos (mg) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5, em condições de laboratório (27±1° C e UR>80±10%). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Concentração de NEPs	Peso Inicial (mg)	Peso final (mg)	Alteração de peso (mg)	Peso da massa de ovos (mg)
0*	310.76 ^a ±45.88 (20)	59.73 ^a ±18.69 (20)	251.02 ^a ±36.16 (20)	182.41 ^a ±31.86 (20)
75*	308.44 ^a ±34.45 (20)	161.20 ^b ±89.05 (20)	147.24 ^c ±86.63 (20)	101.33 ^b ±70.01 (20)
150*	309.63 ^a ±29.26 (20)	150.25 ^b ±89.12 (20)	159.38 ^{bc} ±101.27 (20)	101.57 ^b ±69.96 (20)
300*	305.91 ^a ±45.73 (20)	197.21 ^b ±78.91 (20)	108.71 ^c ±93.49 (20)	66.37 ^b ±68.75 (20)
600*	308.45 ^a ±46.10 (20)	192.67 ^b ±63.59 (20)	115.78 ^c ±79.23 (20)	84.98 ^b ±64.16 (20)
1.200*	311.18 ^a ±31.70 (20)	96.66 ^a ±65.54 (20)	214.52 ^{ab} ±70.40 (20)	155.31 ^a ±55.07 (20)
Teste estatístico	Anova	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls

(n) – Tamanho da amostra.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

*Concentração de juvenis infectantes de *H. amazonensis* por fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* em cada tratamento.

O período de pré-postura verificado neste trabalho variou de 2,06 a 2,21 dias, não apresentando diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre os tratamentos e o grupo controle (Tabela 2). Este tempo pode não ter sido suficiente para que juvenis infectantes de *H. amazonensis* penetrassem e interferissem de maneira deletéria na maturação e produção de ovos de modo a

retardar este processo, uma vez que é necessário um tempo entre 24 à 72h para que NEPs localizem, penetrem e matem o hospedeiro (DOLINSKI, 2006). VASCONCELOS *et al.* (2004) e SILVA (2007), também não relataram interferências de diferentes espécies de NEPs no período de pré-postura de fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos. Entretanto REIS-MENINI *et al.* (2008), utilizando *S. glaseri* associado a um acaricida relataram aumento dos períodos de pré-postura de *R. (B.) microplus* tratados com nematóides e maiores dosagens do acaricida, entretanto esta alteração deve estar mais relacionada com o efeito do acaricida, do que com a ação do nematóide.

Os valores obtidos para os períodos de postura e sobrevivência variaram entre 4,37 a 14,61 e 5,89 a 18,61 dias respectivamente, sendo que todos os grupos tratados diferiram estatisticamente ($p < 0,01$) do controle (Tabela 2). Em estudo conduzido por VASCONCELOS *et al.* (2004), foram observados períodos de postura de 10,5 e 13,5 dias nas maiores concentrações de *S. glaseri* SANTA ROSA e *H. bacteriophora* CCA respectivamente, e em nenhum dos casos foi observada diferença significativa em relação ao grupo controle. Assim como no presente trabalho FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005), SILVA (2007) e REIS-MENINI *et al.* (2008) empregando os nematóides *S. carpocapsae* (Isolado SANTA ROSA e ALL) e *H. indica* LPP1 e *S. glaseri* associado a um acaricida, respectivamente, observaram diminuições significativas nos valores obtidos neste parâmetro. Estes resultados somados a outros registros na literatura demonstram que diferentes espécies de nematóides entomopatogênicos reduzem o período de sobrevivência de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, resultando em um menor período de postura, diminuição da massa de ovos e redução da prole.

Os períodos de incubação dos grupos tratados variaram entre 24,17 a 24,84 dias, enquanto que o valor obtido para o controle foi de 25,06 dias, não sendo constatada diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 2). Além do presente trabalho, apenas o estudo conduzido por SILVA (2007) avaliou o efeito de diferentes concentrações de NEPs sobre o período de incubação de larvas deste ixodídeo e constatou que juvenis infectantes de *H. indica* LPP1 não exerceram ação deletéria sobre este parâmetro. A ausência de diferenças pode ser explicada pelo

fato de ter ocorrido postura em todos os tratamentos, e a eclosão de apenas uma larva para cada fêmea tratada poderia igualar este as médias referentes aos períodos de incubação entre os grupos.

Tabela 2 – Período médio de pré-postura, postura, sobrevivência de fêmeas ingurgitadas e período médio de incubação de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Concentração de NEPs	Período de pré-postura (dias)	Período de postura (dias)	Período de sobrevivência (dias)	Período de incubação (dias)
0*	2.06 ^a ±0.24 (20)	14.61 ^a ±2.12 (20)	18.61 ^a ±1,14 (20)	25.06 ^a ±0.64 (20)
75*	2.16 ^a ±0.37 (19)	7.37 ^{bc} ±4.79 (19)	9.15 ^{bc} ±4.72 (20)	24.74 ^a ±1.10 (19)
150*	2.15 ^a ±0.37 (20)	7.35 ^{bc} ±4.44 (20)	9.25 ^{bc} ±4.14 (20)	24.53 ^a ±0.90 (20)
300*	2.21 ^a ±0.54 (20)	4.37 ^c ±3.44 (20)	5.89 ^d ±3.45 (20)	24.84 ^a ±1.10 (20)
600*	2.37 ^a ±0.50 (19)	5.21 ^c ±3.87 (19)	7.16 ^{cd} ±4.10 (20)	24.74 ^a ±0.93 (19)
1.200*	2.21 ^a ±0.42 (20)	9.11 ^b ±2.96 (20)	11.53 ^b ±4.03 (20)	24.17 ^a ±0.86 (20)
Teste estatístico	Kruskal-Wallis	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Anova

(n) – Tamanho da amostra.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

*Concentração de juvenis infectantes de *H. amazonensis* por fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* em cada tratamento.

Os percentuais de eclosão dos grupos tratados variaram entre 71,84 e 80,70%, enquanto o valor obtido para o controle que foi de 91,55%, entretanto, não foram constatadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos (Tabela 3). VASCONCELOS *et al.* (2004) relataram que nem as maiores concentrações de *S. glaseri* SANTA ROSA e *H. bacteriophora* CCA afetaram o percentual de eclosão de larvas do carrapato do bovinos, diferindo dos dados obtidos por FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005), SILVA (2007) e REIS-MENINI (2008) que verificaram a redução significativa nos valores referentes a este parâmetro em todos os tratamentos. O contraste entre os resultados anteriormente descritos e os valores obtidos no presente trabalho, provavelmente estão relacionados com a diferença no grau de patogenicidade dos isolados de NEPs utilizados.

Tabela 3 – Percentual de eclosão das larvas e índices de produção de ovos e nutricional de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Grupo	Percentual de eclosão - %EC	Índice de produção de ovos – IPO (%)	Índice nutricional – IN (%)
0*	91.55 ^a ±7.73 (20)	58.91 ^a ±7.06 (20)	73.08 ^a ±8.93 (20)
75*	78.30 ^a ±25.76 (19)	32.93 ^{bc} ±23.25 (20)	61.85 ^a ±24.11 (20)
150*	80.70 ^a ±25.14 (20)	33.94 ^{bc} ±21.90 (20)	59.58 ^a ±24.87 (20)
300*	79.73 ^a ±17.93 (20)	20.52 ^c ±18.12 (20)	57.54 ^a ±28.49 (20)
600*	80.15 ^a ±23.43 (19)	26.32 ^c ±17.35 (20)	65.83 ^a ±21.76 (20)
1.200*	71.84 ^a ±25.61 (20)	46.69 ^{ab} ±18.34 (20)	67.07 ^a ±21.06 (20)
Teste estatístico	Anova	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Kruskal-Wallis

(n) – Tamanho da amostra.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

*Concentração de juvenis infectantes de *H. amazonensis* por fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* em cada tratamento.

A ação do nematóide levou à redução do IPO em todos os tratamentos, e, com exceção do grupo que recebeu a concentração de 1.200 NEPs/fêmea, todos os demais diferiram estatisticamente ($p>0,01$) do grupo controle (Tabela 3). Já em relação ao IN, nenhum grupo tratado apresentou diferença significativa ($p>0,05$) em relação à testemunha (Tabela 3). No estudo conduzido por VASCONCELOS *et al.* (2004) nenhuma das concentrações de *S. glaseri* SANTA ROSA e *H. bacteriophora* CCA causou diminuição significativa no IPO e IN dos grupos tratados. FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005) descreveram que todas as concentrações de *S. carpocapsae* Isolado SANTA ROSA e ALL levaram a diminuições significativas no IPO de fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos, enquanto que SILVA (2007) verificou redução no IPO e IN a partir da concentração de 150 NEPs por fêmea.

Os percentuais de controle obtidos nos tratamentos com 75 e 150 NEPs/fêmea foram de 51 e 50% respectivamente. A dose de 300 NEPs/fêmea foi a que obteve a melhor eficiência no controle, sendo que nas dosagens seguintes (600 e 1.200 NEPs/fêmea) ocorreu um decréscimo linear na eficácia dos tratamentos à medida que as concentrações de NEPs/fêmea foram elevadas

(Figura 2). Os resultados obtidos neste trabalho para a eficiência dos tratamentos foram inferiores aos valores relatados por VASCONCELOS *et al.* (2004) que empregando *S. glaseri* SANTA ROSA e *H. bacteriophora* CCA no controle do carrapato dos bovinos, observaram que em determinadas concentrações de nematóides a eficácia chegou a 100 e 80% respectivamente. SILVA (2007) e REIS-MENINI *et al.* (2008) utilizando *H. indica* LPP1 e *S. glaseri* associado a um acaricida, respectivamente, obtiveram melhores resultados ainda, relatando eficiências acima de 90% em todas os tratamentos.

Em relação ao declínio do percentual de controle nas dosagens mais elevadas, fato similar também foi relatado por VASCONCELOS *et al.* (2004), que utilizando *H. bacteriophora* CCA, observaram que a melhor eficiência de controle foi obtida empregando a concentração de 300 NEPs/fêmea, e a partir das dosagens de 500, 1.000 e 5.000 NEPs/fêmea esta eficácia diminuiu linearmente. Outros estudos empregando nematóides entomopatogênicos no controle de carrapatos e insetos também relatam que em algumas situações, concentrações mais elevadas reduzem a eficiência do tratamento. KAAAYA *et al.* (2000) testando as dosagens de 100 e 1.000 NEPs/fêmea dos nematóides *S. carpocapsae* (isolados MEXICAN e DD) e *H. bacteriophora* HP88, concluíram que as concentrações mais baixas foram as que causaram maior taxa de mortalidade em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus appendiculatus* (NEUMANN, 1901) (ACARI, IXODIDAE) e *Boophilus decoloratus* (KOCH, 1844) (ACARI, IXODIDAE) [= *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*]. MACHADO *et al.* (2005) também constataram que dosagens elevadas tiveram pior desempenho, e que concentrações mais baixas de *H. indica* resultaram em maior mortalidade de larvas do coleóptero *Migdolus fryanus* (WESTWOOD, 1863) (COLEOPTERA, VESPERIDAE). Estes autores atribuem tal fato a competição intra-específica, devido ao aumento do número de JIs por concentração.

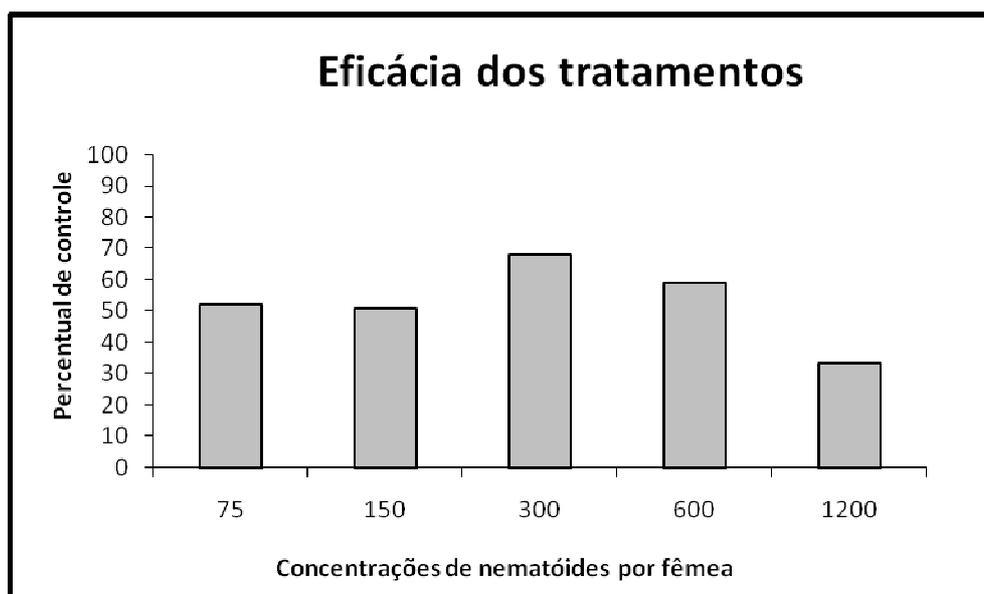


Figura 2 – Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* RSC-5, em condições de laboratório a $27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

O presente estudo demonstrou que diferentes dosagens de juvenis infectantes de *H. amazonensis* RSC-5 foram capazes de exercer ação deletéria sobre a maioria dos parâmetros biológicos referentes à fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, mas a eficácia dos tratamentos obtida neste estudo ficou abaixo dos resultados encontrados por VASCONCELOS *et al.* (2004), SILVA (2007) e REIS-MENINI *et al.* (2008). Entretanto *H. amazonensis* tem a seu favor o fato de ser uma espécie nativa, estando adaptada às condições de clima e ambiente tropical. Esta espécie foi isolada através de amostras de solo provenientes do estado do Amazonas, Brasil, região de clima quente, o que poderia conferir a este isolado um determinado grau de resistência a temperaturas elevadas, um dos principais fatores limitantes na utilização de NEPs em condições de campo.

Diante dos resultados encontrados, verifica-se que a dose de 300 NEPs/fêmea foi a mais eficaz, reduzindo em aproximadamente 70% da prole de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, fato que, uma vez reproduzido sob condições de campo, reduziria significativamente o número de carrapatos na geração seguinte. Cabe ressaltar que grande parte dos acaricidas comerciais não apresenta uma eficácia superior a 70% (FURLONG *et al.* 2007), demonstrando a importância dos

resultados encontrados e da realização de novas pesquisas com o intuito de investigar e validar metodologias que possibilitem a utilização deste nematóide em condições de campo, a fim de compor uma nova alternativa para ser utilizada no manejo integrado de carrapatos.

CONCLUSÃO

Heterorhabditis amazonensis exerce ação deletéria nos processos reprodutivos de ovoposição de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, interferindo nos parâmetros: períodos de postura e sobrevivência, peso final, alteração de peso, peso da massa de ovos e IPO.

A ação do nematóide não afetou significativamente a viabilidade dos ovos *R. (B.) microplus*.

A concentração de 300 NEPs/Fêmea demonstrou melhor eficácia de controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDALÓ, V.; K.N. NGUYEN & A. MOINO JR. 2006. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brasil. **Nematology**, **8** (6): 853-867.
- BENNETT, G.F. 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, Paris, **16** (1): 52 - 61.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; E.J. SOUZA; S.L.E.S. PERALVA; A.G. MASCARENHAS & S.B. ALVES. 1997. Avaliação da eficácia in vitro de dois isolados do fungo entomopatogênico *BEAUVERIA BASSIANA* (Bals) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Seropédica, **6** (1): 49-52.
- BORGES, L.M.F.; J.R. CARNEIRO; A.G. GOMES & P.C. MOREIRA. 2001. Influência do peso inicial e da estação do ano na conversão em ovos de fêmeas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, **2** (2): 127-131.
- BRUM, J.G.W. & M.O. TEIXEIRA. 1992. Doenças em teleóginas de *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) causada por *Cedecea lapagei* e *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, **44** (5): 441-443.
- DOLINSKI, C & A. MOINO JR. 2006. Utilização de nematóides entomopatogênicos Ntivos ou Exóticos: O Perigo das Introduções. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, **30** (2): 139-149.

- DRUMMOND, R.O.; S.E. ERNEST; J.L. TREVINO; W.J. GRADNEY & O.H. GRAHAM, 1973. *Boophilus anulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides, **Journal of Economic Entomology**, Lanham, 66: 30-133.
- FREITAS-RIBEIRO, G.M.; J. FURLONG; V.O. VASCONCELOS; C. DOLINSKI & A.L. RIBEIRO. 2005. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA AND ALL STRAINS (Steinernema: Rhabditidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, **48** (6): 911-919.
- FURLONG, J.; J.R.S. MARTINS & M.C.A. PRATA. 2004. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, **23** (137), 53-56.
- FURLONG, J.; J.R.S. MARTINS & M.C.A. PRATA. 2007. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, 27 (159): 53-56.
- GRISI, L.; C.L. MASSARD; G.E. MOYA-BORJA & J.B. PEREIRA. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, **21**: 8-10.
- GUIMARÃES, J.H.; E.C. TUCCI & D.M. BARROS-BATESTI. **Ectoparasitos de Importância Médico Veterinária**. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 2001. 213p.
- JONSSON, N.N & E.K. PIPER. 2007. **Integrated control programs for ticks on cattle**. Queensland: The University of Queensland. 163p.

- KAAAYA G.P.; M. SAMISH; & I. GLAZER. 2000. Laboratory evaluation of pathogenicity of entomogenous nematodes to African ticks species. **Annals of the New York Academy Sciences**, New York, **916**: 306–308
- KAYA H.K & P. STOCK. 1997. Techniques in insect nematology. p 281–324. In: Lacey LA (ed) **Manual of techniques in insect pathology**. Academic, San Diego, CA, p 281–324.
- KLAFKE. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas. 2008. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. p.65-80. in: PEREIRA, M.C.; M. B. LABRUNA; M.P.J. SZABÓ; G.M. KLAFKE. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo: MEDVET, 169p.
- LINDEGREN, J.E.; VARELO, K.A.; MACKKEY, B.E. 1993. Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juvenile. **Journal of Nematology**, Florida, **5** (2): 93-197.
- MACHADO. L.A.; M. HABIB; L.G. LEITE; L.C.CALEGARI; R.M.GOULART & F.M. TAVARES. 2005. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (WESTWOOD, 1863) (COLEOPTERA: VESPERIDAE). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, **72** (2): 221-226.
- PEREIRA, M.C. & M. B. LABRUNA. 2008. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. P.15-56. in: PEREIRA, M.C.; M. B. LABRUNA; M.P.J. SZABÓ; G.M. KLAFKE. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência**. São Paulo: MEDVET, 169p.

- REIS-MENINI, C.M.R.; M.C.A. PRATA; J. FURLONG & E.R. SILVA. 2008. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Düsseldorf, **2** (103): 1391–1396.
- SAMISH, M. & I. GLAZER. 2001. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. **Trends in parasitology**, Londres, **17** (8): 368-371.
- SANTOS, A.P. & J. FURLONG. 2002. Competição intraespecífica em *Boophilus microplus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, **32** (6): 1033-1038.
- SILVA, E. Ação do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LPP1 (POINAR, KRANUKAR & DAVID, 1992) (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE). 2007. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2007.
- VASCONCELOS, V.O.; J. FURLONG; G.M. FREITAS; C. DOLINSKI; & M.M. AGUILLERA; R.C.D. RODRIGUES; & M.C.A. PRATA. 2004. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Düsseldorf, **94**: 201-206.

CAPITULO 3

***Heterorhabditis bacteriophora* (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE) ISOLADO HP88 COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI, IXODIDAE): EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE EXPOSIÇÃO**

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo observar a influência de diferentes tempos de exposição de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a juvenis infectantes de *Heterorhabditis bacteriophora*, HP88. Para tanto fêmeas ingurgitadas devidamente identificadas foram divididas em sete grupos de 20 carrapatos e expostas a concentrações de 300 nematóides/fêmea nos seguintes períodos: 3, 6, 12, 24, 48 e 72h. Foram observados os seguintes parâmetros biológicos: peso inicial, alteração de peso, peso da massa de ovos, período de pré-postura, período de postura, percentual de eclosão, índice de eficiência reprodutiva (IPO), índice de eficiência nutricional (IN) e percentual de controle. Para o peso inicial, período de pré-postura e período de postura não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos e o controle, entretanto, em relação aos parâmetros alteração de peso, períodos de postura, percentual de eclosão, IPO e IN foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos expostos a nematóides por 24, 48 e 72h e o controle. Estes resultados mostram que juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 sob condições de laboratório interferiram na maioria dos parâmetros referentes à biologia da fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas deste ixodídeo, quando o período de exposição foi igual ou maior que 24h. A eficácia do tratamento chegou a 100% nos períodos de exposição por 48 e 72h.

Palavras chave – Carrapato dos bovinos, nematóide entomopatogênico, controle alternativo.

INTRODUÇÃO

Desde o século passado pesquisadores vêm buscando produtos com a finalidade de combater o carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI, IXODIDAE) [= *Boophilus microplus*], devido ao grande prejuízo econômico que este ixodídeo ocasiona aos sistemas de produção de leite e carne (GRISI *et al.* 2002; LABRUNA, 2008). Entretanto, a utilização sistemática e em muitas vezes de forma inapropriada dos carrapaticidas

vem facilitando o aparecimento de populações de carrapatos resistentes (MARTINS, 2004; FURLONG *et al.*, 2007; LABRUNA, 2008).

Somado ao problema da resistência, existe uma crescente demanda por busca de novas alternativas no controle de pragas, visando a utilização mínima de químicos, com intuito de preservar o ambiente e garantir alimentos livres de resíduos (FLOATE *et al.*, 2005, DOLINSKI, 2006). Entre estas podemos citar o controle através de vacinas, rotação de pastagens, homeopatia, hospedeiros resistentes, carrapaticidas de origem vegetal (MARTINS, 2004; LABRUNA, 2008) e também o controle biológico com a utilização de predadores, parasitóides e agentes microbianos (SAMISH & REHACEK, 1999; JONSSON & PIPER, 2007).

Nematóides entomopatogênicos pertencem à ordem Rhabditida (NEMATODA, SECERNETEA), na qual estão classificadas as famílias Steinernematidae CHITWOOD & CHITWOOD, 1937 e Heterorhabditidae POINAR, 1976, e atuam como veículos de bactérias altamente patogênicas quando introduzidas no corpo de insetos, onde provocam rápida septicemia, levando-os a morte. (GREWAL *et al.*, 2001; HAZIR *et al.*, 2003).

Estudos têm demonstrado que diferentes espécies de ixodídeos são susceptíveis a infecções por NEPs, e em condições de laboratório foi demonstrado que estes nematóides são eficientes no controle do carrapato dos bovinos (VASCONCELOS *et al.* 2004, FREITAS-RIBEIRO *et al.* 2005). GLAZER *et al.* (2001), avaliando diferentes tempos de exposição de fêmeas de *Boophilus annulatus* (SAY, 1821) (ACARI, IXODIDAE) [= *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] a diferentes espécies de nematóides, concluíram que quanto maior o tempo de exposição, maior foi a mortalidade dos carrapatos. Segundo estes autores, doses letais de nematóides em relação a insetos não divergem das doses letais para *B.annulatus*, entretanto, o tempo de exposição em relação a eficiência de NEPs no controle de carrapatos foi maior do que para insetos. Em geral, para insetos, este tempo varia entre 24 a 72h (Dolinski, 2006). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo observar a influência de diferentes intervalos de exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.)*

microplus a juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE) isolado HP88.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Para realização do trabalho foi utilizada uma estirpe de *R. (B.) microplus* com diferentes graus de resistência a carrapaticidas a diferentes acaricidas, proveniente do município de Silveira Carvalho, Minas Gerais.

Os nematóides da espécie *Heterorhabditis bacteriophora* utilizados neste estudo foram cedidos pela professora Dra. Cláudia Dolinski, da Universidade Estadual Norte Fluminense, (UENF). Estes nematóides foram multiplicados em lagartas do último instar de *Galleria mellonella* L., 1958 (PYRALIDAE, LEPDOPTERA) de acordo com LINDEGREN *et al.* (1993) e KAYA & STOCK (1997). Os JIs coletados foram estocados em garrafas de cultivo celular de 40 ml e acondicionados em câmara climatizada a $16 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 80 \pm 10\%$.

O procedimento experimental foi baseado nas metodologias utilizadas por SILVA (2007) e CARVALHO (2008). As fêmeas ingurgitadas foram divididas em sete grupos com pesos previamente homogêneos com utilização de balança analítica, cada um correspondendo a um tratamento contendo 20 carrapatos (Figura 1A). Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos com cinco fêmeas devidamente identificadas com tinta atóxica para acompanhamento individual (cada fêmea = uma unidade experimental) e distribuídas em placas de Petri (6 cm de diâmetro) contendo 15g de areia esterilizada, (Figura 1B).

Formados os subgrupos, foi feita aspersão de 4 ml de solução de nematóides na concentração de 1.500 JIs/4 ml por placa, sendo assim a concentração por fêmea foi de 300 NEPs. Esta concentração foi baseada em resultados obtidos em estudo anterior, onde foi constatado que a dose de 300 NEPs por fêmea resultou em redução de 95% da prole (Dados não publicados).

Após a aspersão, os grupos foram acondicionados em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR>80% e expostos aos nematóides durante os seguintes períodos: 3, 12, 24, 48 e 72h, e. O controle foi exposto a 4 ml de água destilada por 72h. No término do tempo de exposição de cada tratamento, as fêmeas ainda vivas foram: retiradas das placas com areia, limpas em papel toalha e com auxílio de fita adesiva, coladas com a parte dorsal voltada para baixo em placas de Petri de 12 cm de diâmetro (Figura 2) e acondicionadas em estufa climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR>80%.

A observação das fêmeas para verificar a mortalidade e a oviposição foi realizada diariamente até a morte do último carrapato, e as massas de ovos coletadas foram acondicionadas individualmente em seringas de 10 ml devidamente identificadas, com a parte distal cortada, vedadas com algodão hidrófilo e mantidas em câmara climatizada nas mesmas condições de temperatura citadas anteriormente. Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos:

Peso inicial: peso da fêmea ingurgitada (peso da teleógina);

Alteração de peso da fêmea: perda de peso da fêmea após a realização de postura - peso inicial – peso final;

Peso da postura: peso total da massa de ovos de cada fêmea;

Período de pré-postura: período que compreende o dia da queda da fêmea ingurgitada até o início da postura;

Período de postura: período que abrange desde a postura do primeiro até a postura do último ovo de cada fêmea;

Percentual de eclosão (%EC): estimativa visual de larvas eclodidas em relação à massa de ovos de cada fêmea;

Índice de produção de ovos (IPO): o índice foi calculado de acordo com a equação proposta por BENNETT (1974). $\text{IPO} = \text{massa de ovos} \times 100 / \text{peso inicial}$. O IPO avalia quanto do sangue ingerido foi convertido em ovos;

Índice nutricional (IN): o índice foi obtido de acordo com a equação proposta por BENNETT (1974). $IN = \text{massa de ovos} \times 100 / (\text{peso inicial} - \text{peso final})$. O IN avalia quanto da perda de peso da fêmea foi destinado à produção de ovos;

Reprodução estimada (RE) – calculado pela fórmula: $(\text{Peso da postura} / \text{Peso inicial}) \times \%EC \times 20.000$ (DRUMMOND *et al.*, 1973);

Percentual de controle (%C): foi obtido segundo a fórmula de Drummond *et al.* (1973): $\%C = (\text{RE grupo controle} - \text{RE grupo tratado}) / \text{RE grupo controle} \times 100$. Este índice avalia a eficácia dos tratamentos.

Análise estatística

Para realização da análise estatística foi utilizado o software Biostat versão 5.0. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{\text{arco seno } x}$. Os valores referentes às médias dos parâmetros: peso inicial, alteração de peso, período de pré-postura e percentual de eclosão foram analisados por ANOVA e Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os parâmetros: peso da massa de ovos, período de postura, IPO e IN apresentaram distribuição não normal, sendo analisados por testes não paramétricos de Kruskal Wallis e Student Newman Keulls ($P < 0,05$). Foi utilizado o teste de Pearson para verificar possível correlação entre o tempo de exposição e o peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Uma regressão linear simples foi empregada para estabelecer uma equação matemática que descreva o relacionamento entre os tempos de exposição e o percentual de controle e através desta equação foram calculados os tempos de exposição inibidores de 50% e 90% da prole (TEIP 50 e TEIP 90) de acordo com BEAN (1961) e IKEMOTO & TAKAY (2000).

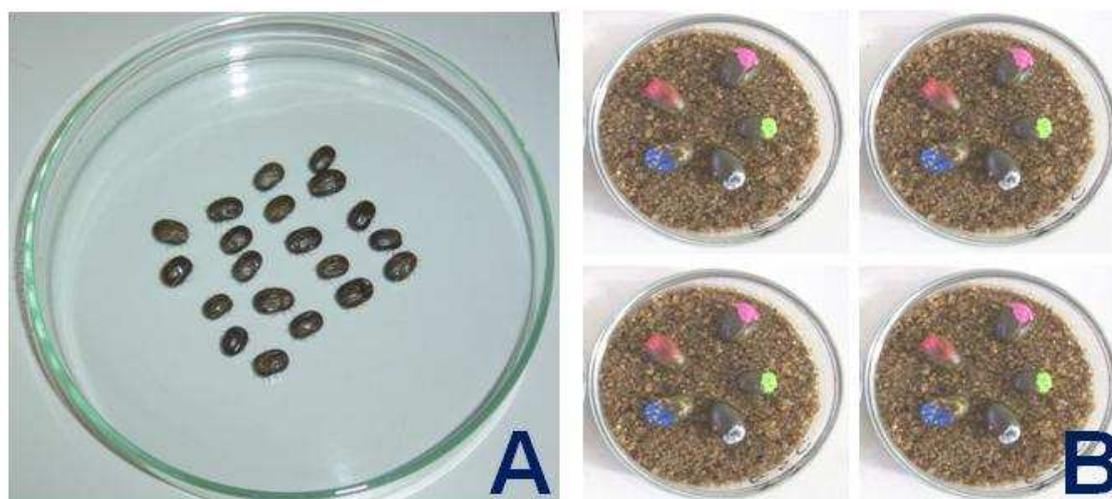


Figura 1 - **A:** Grupo contendo 20 fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* **B:** Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* divididas em quatro subgrupos, cada um contendo cinco carrapatos identificados individualmente com tinta atóxica e mantidos em placas de Petri de 6 cm. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.



Figura 2 - Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* coladas com auxílio de fita adesiva com a parte dorsal voltada para baixo em placas de Petri de 12 cm, para o acompanhamento dos parâmetros biológicos. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pesos iniciais das fêmeas ingurgitadas dos diferentes grupos não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre si (Tabela 1). Esta análise foi feita com o intuito evitar diferenças entre os pesos de modo que pudessem interferir nos resultados dos demais parâmetros analisados, uma vez que existe uma correlação entre o peso inicial e o peso da massa de ovos, IPO e IN (BORGES *et al.*, 2001; SANTOS & FURLONG, 2002).

Apenas os grupos expostos a JIs de *H. bacteriophora* HP88 por 24, 48 e 72h apresentaram diferenças significativas ($p>0,01$) em relação ao controle, nos valores referentes aos parâmetros peso da postura e alteração de peso, fato não observado para os demais tratamentos (Tabela 1). Com isto podemos inferir que maiores tempos de exposição permitiram que um maior número de nematóides localizasse e penetrasse nas fêmeas ingurgitadas, causando alterações mais acentuadas no processo metabólico de conversão do sangue ingerido em ovos. CARVALHO (2008) expôs fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* a juvenis infectantes de *Steinernema glaseri* (STEINER, 1929) (RHABDITIDA, STEINERNEMATIDAE), isolado CCA, por 2, 6, 12, 24, 48 e 72h. Os resultados demonstraram que o peso da massa de ovos de todos os grupos tratados diferiu significativamente do grupo testemunha. VASCONCELOS *et al.* (2004) utilizando diferentes concentrações de *S. glaseri* SANTA ROSA e *H. bacteriophora* CCA, e com 72h de exposição, relataram que apenas as maiores concentrações do segundo nematóide foram capazes de levar à uma redução significativa na massa de ovos deste carrapato.

Os períodos de pré-postura dos grupos tratados não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) em relação ao controle (Tabela 1). Nenhuma fêmea dos grupos expostos a nematóides por 48 e 72h realizou postura, inviabilizando a análise deste parâmetro para estes tratamentos (Tabela 1). O período de pré-postura variou entre 2,64 a 2,86 dias, e este tempo pode não ter sido suficiente para que juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 interferissem de modo a retardar o começo da oviposição das fêmeas. CARVALHO (2008) avaliou diferentes tempos de infecção de

S. glaseri CCA no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, e também não verificou diferenças entre os grupos experimentais para o período de pré-postura. REIS- MENINI *et al.* (2008), utilizando *S. glaseri* associado a um carrapaticida observaram diferenças entre o período de pré-postura dos grupos tratados em relação ao controle, entretanto, esta diferença deve estar relacionada com a ação do carrapaticida.

Tabela 1 - Peso inicial (mg), período de pré-postura (dias), peso da massa de ovos (mg) e alteração de peso (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes períodos de exposição (3, 6, 12, 24, 48 e 72) a juvenis infectantes (300/fêmea) do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório (27±1°C e UR>80±10%). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Tempo de exposição (h)	Peso Inicial (mg)	Peso da massa de ovos (mg)	Alteração de peso (mg)	Período de pré-postura (dias)
72h+Água (controle)	261.52 ^a ±31.17 (19)	144.20 ^a ±23.28 (19)	204.6.38 ^a ±37.33 (19)	2.79 ^a ±0.44 (19)
3h+NEPs	256.51 ^a ±41.28 (20)	142.32 ^a ±26.30 (20)	202.65 ^a ±33.78 (20)	2.74 ^a ±0.45 (20)
6h+NEPs	256.67 ^a ±32.19 (20)	130.73 ^a ±34.26 (19)	184.34 ^a ±56.23 (20)	2.72 ^a ±0.46 (19)
12h+NEPs	256.79 ^a ±32.93 (20)	109.79 ^a ±64.35 (16)	155.01 ^a ±78.70 (20)	2.64 ^a ±0.50 (16)
24h+NEPs	257.26 ^a ±35.88 (20)	36.32 ^b ±58.52 (8)	53.38 ^b ±71.88 (20)	2.86 ^a ±0.38 (8)
48h+ NEPs	256.59 ^a ±42.18 (20)	0.00 ^c ±0.00 (20)	14.02 ^b ±4.94 (20) (0)
72h+NEPs	256.43 ^a ±39.27 (20)	0.00 ^c ±0.00 (200)	12.97 ^b ±6.32 (20) (0)
Teste estatístico	Anova	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Anova	Anova

(n) – Tamanho da amostra.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

*Concentração de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* por fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* em cada tratamento.

.... – Análise estatística não realizada devido ao “n” insuficiente.

Os valores referentes ao período de postura dos grupos tratados com exposição a 300 NEPs/fêmeas por 3, 6 12 e 24h não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) quando comparados com o grupo controle, e em relação ao percentual de eclosão, apenas o grupo exposto a NEPs por 24h apresentou diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao controle (Tabela 2). A ausência de postura nos grupos expostos a NEPs por 48 e 72h, inviabilizou a

análise estatística destes tratamentos para estes parâmetros (Tabela 2). CARVALHO (2008), empregando metodologia semelhante, constatou que todos os tempos de exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* a juvenis infectantes de *S. glaseri* CCA foram suficientes para causar reduções significativas no período de postura e percentual de eclosão dos grupos tratados. Entretanto, VASCONCELOS *et al.* (2004) relataram que diferentes concentrações de *S. glaseri* SANTA ROSA e *H. bacteriophora* CCA com 72 horas de exposição não causaram interferências no período de postura e percentual de eclosão dos grupos tratados.

Tabela 2 – Período de postura (mg), percentual de eclosão (%), IPO (%) e IN (%) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes períodos de exposição (3, 6, 12, 24, 48 e 72) a juvenis infectantes (300/fêmea) do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório (27±1°C e UR>80±10%). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Tempo de exposição (h)	Período de postura (dias)	Percentual de eclosão - %EC	Índice de produção de ovos – IPO (%)	Índice nutricional – IN (%)
72+Água (controle)	13.61 ^a ±2.45 (19)	96.22 ^a ±4.54 (19)	54.59 ^a ±6.07 (19)	70.87 ^a ±4.89 (19)
3+NEPs	13.00 ^a ±2.18 (20)	95.16 ^a ±4.05 (20)	57.04 ^a ±6.63 (20)	70.47 ^a ±5.15 (20)
6+NEPs	13.05 ^a ±2.61 (19)	92.42 ^a ±20.10 (19)	50.94 ^{ab} ±13.18 (20)	67.50 ^a ±17.61 (20)
12+NEPs	12.71 ^a ±3.58 (16)	84.66 ^{ab} ±20.58 (16)	42.60 ^{ab} ±25.19 (20)	58.51 ^a ±30.68 (20)
24+NEPs	10.17 ^a ±5.15 (8)	66.29 ^b ±44.30 (8)	15.90 ^{bc} ±25.42 (20)	23.30 ^b ±34.79 (20)
48+ NEPs (0) (0)	0.00 ^c ±0.00 (20)	0.00 ^c ±0.00 (20)
72+NEPs (0) (0)	0.00 ^c ±0.00 (20)	0.00 ^c ±0.00 (20)
Teste estatístico	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Anova/Tukey	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls	Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls

(n) – Tamanho da amostra.

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

*Concentração de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* por fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* em cada tratamento.

.... – Análise estatística não realizada devido ao “n” insuficiente.

Em relação ao IPO e IN, apenas os grupos tratados com exposições a juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 por 24, 48 e 72h apresentaram diferenças significativas (P>0,01) em relação ao controle (Tabela 2). Estes resultados revelam que períodos superiores a 24h foram suficientes para que JIs de *H. bacteriophora* HP88 interferissem no processo metabólico de

conversão de sangue em ovos. CARVALHO (2008) avaliando diferentes tempos de exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* a JIs de *S. glaseri* CCA observou que em todos os tratamentos os valores obtidos para IPO e IN diferiram significativamente do grupo testemunha. VASCONCELOS *et al.* (2004) não relataram reduções significativas de IPO e IN nem nas maiores concentrações de *S. glaseri* SANTA ROSA e *H. bacteriophora* CCA.

O teste de Pearson mostrou uma correlação negativa entre o tempo de exposição de fêmeas ingurgitadas a NEPs e o peso médio da massa de ovos destas teleóginas ($r = - 0.7830$) ($p < 0,01$). Estes resultados mostram que, em relação ao presente estudo, quanto maior foi o tempo de exposição, menor foi o peso da massa de ovos. Segundo CARVALHO (2008) o aumento no tempo de exposição também levou a um decréscimo no peso da massa de ovos de fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos.

No cálculo da regressão linear simples, apenas os valores referentes aos tempos de 12, 24 e 48h de exposição foram utilizados, priorizando empregar a porção linear da curva, assim como preconizado por BEAN (1961), de forma a proporcionar a obtenção de valores ainda mais próximos à realidade. O tempo de exposição (D) correspondeu ao eixo das abscissas “x” e o eixo das ordenadas, “y” foi representado pela transformação tempo x eficiência (DE) de acordo com IKEMOTO & TAKAI (2000). Com isso foi obtida a equação: $D = -1018.32 + 121.7514 \times DE$ ($R^2 = 0.9982$). Através da equação foi obtido o tempo necessário para inibição de 50 e 90% da prole, que foram de 14,19 e 32,07h, respectivamente. O presente estudo procurou seguir as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que preconiza avaliação da eficácia de carrapaticidas por meio de fórmulas relativas à redução da prole, fator chave para um controle eficiente (MAPA, 1990).

As eficácias de controle nos tratamentos com 3, 6 e 12h de exposição foram baixas, chegando a 1,53, 12,24 e 32,62% respectivamente. Entretanto, períodos de exposição de 24, 48 e 72h resultaram em um percentual de controle de 82,54, 100 e 100% respectivamente (Figura 3). Segundo CARVALHO (2008), 2, 6 e 12h de exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* a

JIs de *S. glaseri* nas concentrações de 1000 NEPs/♀, resultaram em uma eficácia de controle de 66,01, 78,08 e 83,69%, resultados superiores aos encontrados no presente trabalho. Este mesmo autor constatou eficiências de 99, 98 e 97% para os tratamentos com 24, 48 e 72h de exposição, valores similares aos obtidos no presente estudo. Esta diferença pode estar relacionada com a eficiência de buscar o hospedeiro destes nematóides. SHROEDER & BEAVERS (1987) avaliaram a movimentação lateral e horizontal de *S. glaseri*, *Steinernema carpocapsae* (WEISER, 1955) (RHABDITIDA, STEINERNEMATIDAE) e *H. bacteriophora*, e relataram que *S. glaseri* teve maior capacidade de dispersão do que as outras duas espécies. CSONTOS (2002) analisou a capacidade de dispersão de duas espécies de nematóides e concluiu que *S. glaseri* foi mais eficiente que *H. bacteriophora*, em dispersar e localizar o hospedeiro devido a estímulos do mesmo. Estes dados podem contribuir para explicar as diferenças entre o presente trabalho e os resultados obtidos por CARVALHO (2008).

O presente trabalho evidencia que quanto maior foi o tempo de exposição de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* a JIs de *H. bacteriophora* HP88, maior foi a eficácia dos tratamentos, mesmo fato observado por CARVALHO (2008). KOCAN *et al.* (1998) expuseram fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus* a NEPs, e relataram que a mortalidade das teleóginas aumentou linearmente de acordo com o aumento do período de exposição, e que com 32h esta mortalidade foi de 100%. GLAZER *et al.* (2001), avaliando diferentes tempos de exposição de fêmeas de *B.annulatus* a diferentes espécies de nematóides, concluíram que quanto maior o tempo de exposição, maior foi a mortalidade e que nematóides do gênero *Heterorhabditis* foram mais eficientes.



Figura 3 – Percentual de controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tratados com diferentes períodos de exposição (3, 6, 12, 24, 48 e 72) a juvenis infectantes (300/fêmea) do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora* HP88, em condições de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 80\pm 10\%$). Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Com 12h de exposição foi observada a presença de juvenis infectantes de *H. bacteriophora* HP88 penetrando em uma fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* através do espiráculo, sendo o segundo registro na literatura que descreve tal fato (Figura 4). MACHADO (2008) avaliando o potencial de *Heterorhabditis baujardi* PHAN, SUBBOTIN, NGUYEN & MOENS 2003 (RHABDITIDA, HETERORHABDITIDAE), isolado LPP7 e *H. indica* LPP4 no controle de *R. (B.) microplus*, relatou pela primeira vez a penetração de nematóides entomopatogênicos pelo espiráculo deste carrapato. Espiráculos são apontados como uma das principais vias de penetração de NEPs em diferentes insetos. (GEORGIS & HAGUE 1981, NGUYEN & SMART 1991). Outras vias de penetração de nematóides em carrapatos já foram relatadas. SAMISH & GLAZER (1992) concluíram que a abertura do poro genital era a principal forma de acesso de nematóides entomopatogênicos em carrapatos. .

Os resultados alcançados no presente trabalho demonstram que juvenis infectantes de *H. bacteriophora*, isolado HP88, sob condições de laboratório, são altamente patogênicos à fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*. Entretanto, períodos de exposição inferiores a 24h não são suficientes para ação satisfatória deste nematóide no controle do carrapato dos bovinos, sendo

necessários períodos de eposição acima para que este nematóide leve a reduções significativas na prole de fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos.

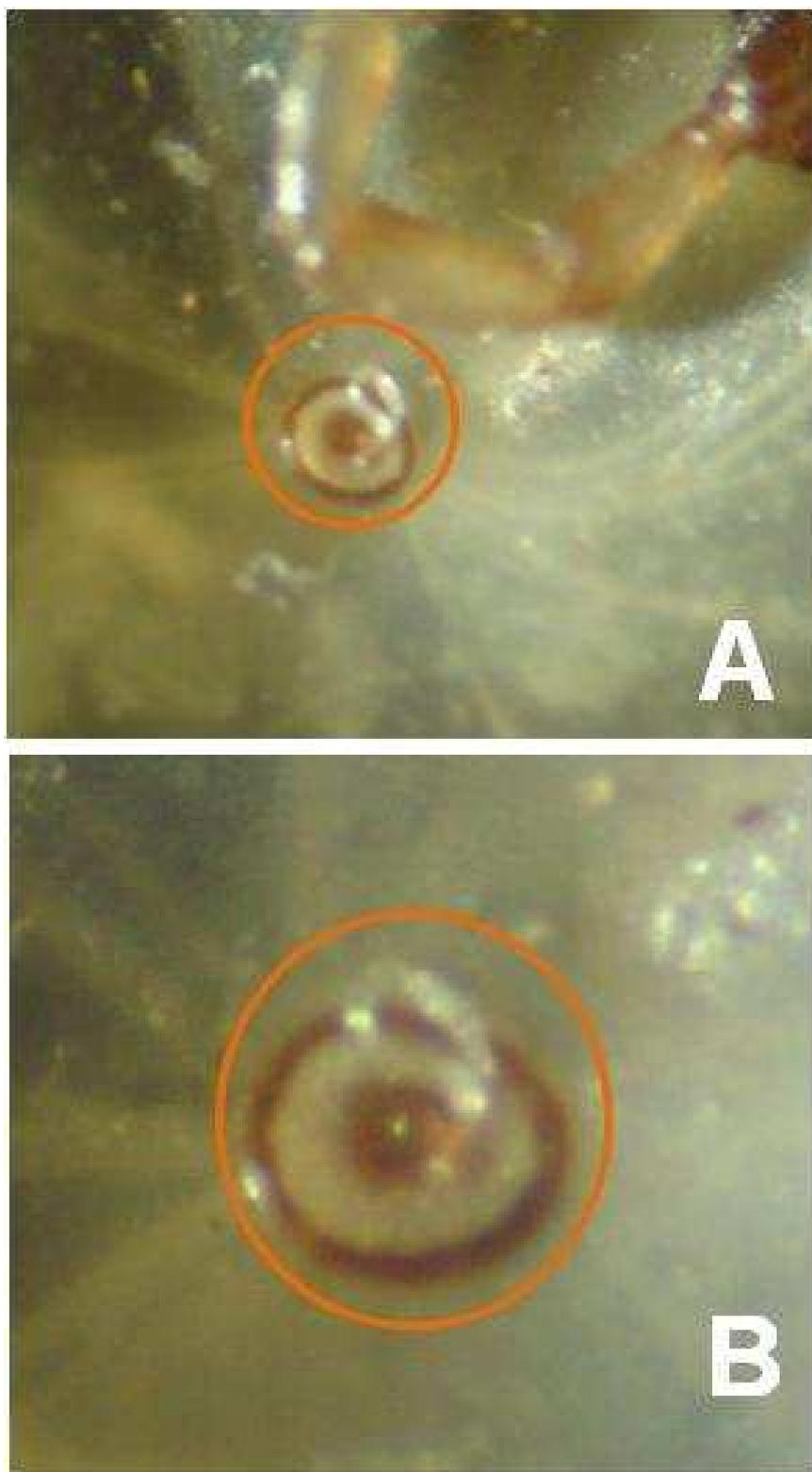


Figura 4 – **A:** Juvenil infectante de *Heterorhabditis bacteriophora*, isolado HP88 em cima do espiráculo de uma fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **B:** Foto aproximada. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

CONCLUSÃO

Os períodos de 3, 6 e 12h não foram suficientes para o nematóide *H. bacteriophora* HP88 conseguisse interferir significativamente nos parâmetros biológicos analisados das fêmeas ingurgitadas do carrapato dos bovinos.

Exposições de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* por 24, 48 e 72h ao nematóide entomopatogênico *H. bacteriophora* HP88 levaram a uma redução na maioria dos parâmetros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAN, J.L. 1961. Predicting emergence of second-instar spruce budworm larvae from hibernation under field conditions in Minnesota. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanhan, **54**: 175-177.
- BENNETT, G.F. 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I. Influencie of tick size on egg production. **Acarologia**, Paris, **16** (1): 52 - 61.
- BORGES, L.M.F.; J.R. CARNEIRO; A.G. GOMES & P.C. MOREIRA. 2001. Influência do peso inicial e da estação do ano na conversão em ovos de fêmeas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, 2 (2): 127-131.
- CARVALHO, L.B. 2008. Efeitos “in vitro” e “in vivo” de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) sobre o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). 2007. 52p. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.
- CSONTOS, A. S. 2002. Lateral Movement of the Entomopathogenic Nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* in Sand at Different Temperatures in response to Host Seeking. **Biocontrol Science and Technology**, **12** (1): 137-139.
- DOLINSKI, C. 2006. Uso de nematóides entomopatogênicos para o controle de pragas. p. 261-289. In: MADELAINE VENZON; TRAZILBO JOSÉ DE PAULA JR.; ANGELO PALLINI. (Org.). **Tecnologias Alternativas para o Controle Alternativo de Pragas e Doenças**. Viçosa. 377p.

DRUMMOND, R.O.; S.E. ERNEST; J.L. TREVINO; W.J. GRADNEY & O.H. GRAHAM, 1973.

Boophilus annulatus and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides, **Journal of Economic Entomology**, Lanham, 66: 30-133.

FLOATE, K.D.; K.G. WARHHAUGH; A.B.A. BOXALL & T.N. SERRATT. 2005. Fecal

residues of veterinary parasiticides: nontarget effects in pasture environment. **Annual Review of Entomology**, 50 (1): 153-179.

FREITAS-RIBEIRO, G.M.; J. FURLONG; V.O. VASCONCELOS; C. DOLINSKI & A.L.

RIBEIRO. 2005. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA AND ALL STRAINS (Steinernema: Rhabditidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, 48 (6): 911-919.

FURLONG, J.; J.R.S. MARTINS & M.C.A. PRATA. 2007. O carrapato dos bovinos e a

resistência: temos o que comemorar? Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, 27 (159): 53-56.

GEORGIS, R. & N.G.M. HAGUE. (1981) A neoplectanid nematode in the larch sawfly

Cephalcia lariciphila (Hymenoptera: Pamphiliidae). **Annals of Applied Biology**, 99, 171-177.

GLAZER, I.; E. ALEKSEEV & M. SAMISH. (2001). Factors affecting the virulence of

entomopathogenic nematodes to engorged females *Boophilus annulatus* ticks. **Journal of Parasitology**, Winston, 87 (4): 808-812.

- GREWAL, P.S.; E.A.B. DE NARDO & M.M. AGUILLERA. 2001. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, Londrina, **30** (2): 191-205.
- GRISI, L.; C.L. MASSARD; G.E. MOYA-BORJA & J.B. PEREIRA. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, **21**: 8-10.
- HAZIR, S.; H.K. KAYA; P. STOCK & N. KESKIN. 2003. Entomopatogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, **27**: 181-202.
- IKEMOTO, T. & TAKAI, K. 2000. A new linearized formula for the law of total effective temperature and the evaluation of line-fitting methods with both variables subject to error. **Environmental Entomology**, Lanhan, **29** (4): 671-682.
- JONSSON, N.N & E.K. PIPER. 2007. **Integrated control programs for ticks on cattle**. Queensland: The University of Queensland. 163p.
- KAAYA G.P.; M. SAMISH; & I. GLAZER. 2000. Laboratory evaluation of pathogenicity of entomogenous nematodes to African ticks species. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, **916**: 306–308.
- KAYA H.K & P. STOCK. 1997. Techniques in insect nematology. p. 281–324. In: Lacey LA (ed) **Manual of techniques in insect pathology**. Academic, San Diego, CA, p. 281–324.

- KOCAN, K.M.; E.F. BLOUIN; M.S. PIDHERNEY; P.L. CLAYPOOL; M. SAMISH & I. GLAZER. 1998. Entomopathogenic nematodes as a potential biological control method of ticks. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, **9**: 355-364.
- LABRUNA. 2008. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. p.15-56. in: PEREIRA, M.C.; M.B. LABRUNA; M.P.J. SZABÓ; G.M. KLAFKE. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistencia***. São Paulo: MEDVET, 169p.
- LINDEGREN, J.E.; VARELO, K.A.; MACKEY, B.E. 1993. Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juvenile. **Journal of Nematology**, Florida, **5** (2): 93-197.
- MACHADO, I.R. 2008. Potencial dos nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *Heterorhabditis indica* LPP4 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) no controle biológico de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE). 2007. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2008.
- MAPA. 1990. **Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura. Diário Oficial de 22.01.90, p. 1506-1509.
- MARTINS, J.R. 2004. Manejo da resistência aos carrapaticidas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Seropédica**, **23**: 114-115. Suplemento 1.

- NGUYEN, K B. & G.C. SMART. (1991). Mode of entry and sites of development of *Steinernema scapterisci* in mole crickets. **Journal of Nematology**, Florida, **23**: 267-68.
- REIS-MENINI, C.M.R.; M.C.A. PRATA; J. FURLONG & E.R. SILVA. 2008. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Düsseldorf, **2** (103): 1391–1396.
- SAMISH M & I. GLAZER. 1992. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Florida, **29**: 614–618.
- SAMISH, M. & J. REHACEK. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Review of Entomology**, **44**: 159–82.
- SAMISH, M., E.; ALEKSEFV, & I. GLAZER. 1999. interaction between ticks and pathogenic nematodes: The susceptibility of various tick species at different developmental stages. **Journal of Medical Entomology** **36**: 733-740.
- SAMISH, M.; E. ALEKSEFV, & I. GLAZER. 2000. Mortality rate of adult ticks due to entomopathogenic nematodes. **Journal of Parasitology** **86**: 679-684.
- SANTOS, A.P. & J. FURLONG. 2002. Competição intraespecífica em *Boophilus microplus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, **32** (6): 1033-1038.

SCHROEDER, W.J. & J.B. BEAVERS. Movement of the entomogenous nematodes of the families Heterorhabditidae e Steinernematidae in soil. **Journal of Nematology**, Flórida, **19**: 257-259.

SILVA, E. Ação do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LPP1 (POINAR, KRANUKAR & DAVID, 1992) (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE). 2007. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2007.

VASCONCELOS, V.O.; J. FURLONG; G.M. FREITAS; C. DOLINSKI; & M.M. AGUILLERA; R.C.D. RODRIGUES; & M.C.A. PRATA. 2004. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rabbitida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Düsseldorf, **94**: 201-206.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, J.P.M.; A. MOINO JR.; R.S. CAVALCANTI; C. DOLINKI & F.A. CARVALHO. 2005. Patogenicidade, Multiplicação e biologia de isolados nativos de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) provenientes de Lavras, MG. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, **29** (1): 25-30.
- ALVES, L.F. A; C. ROHDE; & V.S. ALVEZ. 2005. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabditida) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, **34** (1): 139-141.
- AMARAL, M. A. Z. 2008. Percepção de proprietários rurais sobre o controle estratégico do carrapato dos bovinos. 58p. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- ANDALÓ, V.; K.N. NGUYEN & A. MOINO JR. 2008. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brasil. **Nematology**, New York, **8** (6): 853-867.

- BURNELL, A.N.N.M. & S.P. STOCK. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts- lethal pathogens of insects. **Nematology**, New York, **2**: 31-42.
- BUSSOLA, R.A.; F.M. TAVARES; R.M.GOULART; L.G. LEITE; L.A.MACHADO & C.M.G. AMBROS. 2004. Avaliação do nematóide *Heterorhabditis* sp. em cultura de violetas contra larvas de *Bradysia* sp. (Díptera: Sciaridae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, **71**: 113-114.
- CARVALHO, L.B. 2008. Efeitos “in vitro” e “in vivo” de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) sobre o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). 2007. 52p. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.
- COSTA, J.C.R. Estudo de infecção dos nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocpsae* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE) em *Alphitobius diaperinus* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE). 2006. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2006.
- DEL VALLE, E.E.; C. DOLINKI; R.M. SOUZA & R. I. SAMUELS. Performace de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (28) (NEMATODA: RHABDITIDA), selecionada para tolerância da elevadas temperaturas, no controle de *Conotrachelus psidii* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, **29** (2): 199-205.

- DOLINSKI, C. 2006. Uso de nematóides entomopatogênicos para o controle de pragas. p. 261-289. In: MADELAINE VENZON; TRAZILBO JOSÉ DE PAULA JR.; ANGELO PALLINI. (Org.). **Tecnologias Alternativas para o Controle Alternativo de Pragas e Doenças**. Viçosa. 377p.
- DOLINSKI, C & A. MOINO JR. 2006. Utilização de nematóides entomopatogênicos Ntivos ou Exóticos: O Perigo das Introduções. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, **30** (2): 139-149.
- DOLINSKI, C.; F.L. KAMITAMI; I.R. MACHADO & C.E. WINTER. 2008. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from tropical rainforest in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, **103** (2): 150-159.
- GEORGIS, R. & S.A. MANWEILER. 1994. Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. **Agricultural Zoology Reviews** **6**: 63-94.
- FERRAZ, L.C.C.B. 1998. Nematóides entomopatogênicos. p.541-569. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FAPESP & FEALQ, 1163p.
- FREITAS-RIBEIRO, G.M.; J. FURLONG; V.O. VASCONCELOS; C. DOLINSKI & A.L. RIBEIRO. 2005. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomapatogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA AND ALL STRAINS (*Steinernema*: Rhabditidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, **48** (6): 911-919.

FURLONG, J.; J.R.S. MARTINS & M.C.A. PRATA. 2004. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, **23** (137), 53-56.

FURLONG, J.; J.R.S. MARTINS & M.C.A. PRATA. 2007. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar?, Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, **27** (159): 1-7.

GREWAL, P.S.; E.A.B. DE NARDO & M.M. AGUILLERA. 2001. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomol**, Londrina, **30** (2): 191-205.

GRISI, L.; C.L. MASSARD; G. E. MOYA-BORJA & J.B. PEREIRA. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, **21**: 8-10.

HAZIR, S.; H.K. KAYA; P. STOCK & N. KESKIN. 2003. Entomopatogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, **27**: 181-202.

HILL, D.E. 1998. Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black legged tick, *Ixodes scapularis*. **Journal of Parasitology**, Winston, **84** (6): 1124-1127.

JONSSON, N.N & E.K. PIPER. 2007. **Integrated control programs for ticks on cattle**. Queensland: The University of Queensland. 163p.

- KAAYA G.P.; M. SAMISH; & I. GLAZER. 2000. Laboratory evaluation of pathogenicity of entomogenous nematodes to African ticks species. **Annals of the New York Academy Sciences**, New York, **916**: 306–308
- KAYA, H.K. & R. GAUGLER. 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, **38**: 181-206.
- KESSLER, R.H.; C.O. SOARES; C.R. MADRUGA & F.R. ARÁUJO. 2004. Tristeza parasitária dos bovinos: quando vacinar é preciso. **À Hora Veterinária**, Porto Alegre, **23** (137): 26-30.
- KLAFKE. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas. 2008. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. p.65-80. in: PEREIRA, M.C.; M. B. LABRUNA; M.P.J. SZABÓ; G.M. KLAFKE. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência***. São Paulo: MEDVET, 169p.
- KOCAN, K.M.; E.F. BLOUIN; M.S. PIDHERNEY; P.L. CLAYPOOL; M. SAMISH & I. GLAZER. 1998a. Interaction of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) with selected species of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Florida, **35** (4):514-520.
- LABRUNA. 2008. Combate contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. P.15-56. in: PEREIRA, M.C.; M. B. LABRUNA; M.P.J. SZABÓ; G.M. KLAFKE. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência***. São Paulo: MEDVET, 169p.
- LEITE, L.G.; L.A. MACHADO; M.M. AGUILHERA; R.C.D. RODRIGUES & A.S. NEGRISOLI JR. 2003. Patogenicidade de *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* sp. (NEMATODA:

RHABDITIDA) à ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar (*Mahanava fimbriolata*).

Revista de Agricultura, Piracicaba, **78** (1):139-148.

MACHADO. L.A.; M. HABIB; L.G. LEITE; L.C.CALEGARI; R.M.GOULART & F.M. TAVARES. 2005. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (WESTWOOD, 1863) (COLEOPTERA: VESPERIDAE). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, **72** (2): 221-226.

MACHADO, I.R. 2008. Potencial dos nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *Heterorhabditis indica* LPP4 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) no controle biológico de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE). 2007. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2008.

MAPA. 1990. **Normas para produção, controle e utilização de produtos antiparasitários**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura. Diário Oficial de 22.01.90, p. 1506-1509.

MARTINS, J.R. 2004. Manejo da resistência aos carrapaticidas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Seropédica, **23**: 114-115. Suplemento 1.

MARTINS, J.R.S.; J. FURLONG & R.C. LEITE. 2006. Controle de carrapatos. p. 145-153. In: BARROS-BATTESTI, D.M.B.; M. ARZUA; G. H. BECHARA. (Org.). **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. Um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan, 223p.

- MAULÉON, H.; N. BARRÉ & S. PANOMA. 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**, Amsterdam, **17** (11): 831-838.
- NEVES, J.M.; N. SIMÕES & M. MOTA. 1999. Nematóides Entomopatogênicos: Uso e novas perspectivas. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, **64**: p.23-29.
- REIS-MENINI, C.M.R.; M.C.A. PRATA; J. FURLONG & E.R. SILVA. 2008. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Düsseldorf, **2** (103): 1391–1396.
- RICHARDISON, P.N. 1996. British and European legislation regulating rhabditid nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, **6**: 449-463.
- RIZVI, S.A.; R. HENNESEY & D. KNOTT. 1996. Legislation on the introduction of exotics nematodes in the US. **Biocontrol Science and Technology**, **6**: 477-480.
- ROCHA, C. M. B. M.; R. C. LEITE; J. FURLONG; P. R. OLIVEIRA. 2006. Percepção dos produtores de leite do Município de Passos, MG sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural, Santa Maria**, Porto Alegre, **36** (4), p. 1235-1242.
- SAMISH M & I. GLAZER. 1991. Killing ticks with parasitic nematodes insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, Oxford, **58**: 281–282.

- SAMISH M & I. GLAZER. 1992. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, Florida, **29**: 614–618.
- SAMISH, M. & J. REHACEK. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potencial in biological control. **Annual Review of Entomology**, **44**: 159–82.
- SAMISH, M. 2000. Biocontrol of ticks. **Annals of New York Academy of Sciences**, New York, **916**: 172-178.
- SILVA, E. Ação do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LPP1 (POINAR, KRANUKAR & DAVID, 1992) (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE). 2007. 45p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2007.
- SOUZA, G.C. Seleção de isolados de nematóides entomopatogênicos para o controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae). 2006. 41p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.
- TAVARES, F.M.; A. BATISTA FILHO; L.G. LEITE; L.C. ALMEIDA; A.C.S. SILVA & C.M.G. AMBRÓS. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do Bicudo da Cana-deAçúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em Laboratório e Casa-de-Vegetação. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, **31** (1): 12-19.

VASCONCELOS, V.O.; J. FURLONG; G.M. FREITAS; C. DOLINSKI; & M.M. AGUILLERA; R.C.D. RODRIGUES; & M.C.A. PRATA. 2004. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rabbitida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Düsseldorf, **94**: 201-206.

APÊNDICE

Manutenção e multiplicação de nematóides entomopatogênicos

Lagartas de *Galleria mellonella* LINNAEUS, 1758 (LEPIDOPTERA, PYRALIDAE) foram criadas em laboratório e utilizadas na multiplicação dos nematóides de acordo com LINDEGREN *et al.* (1993). A produção foi feita a partir de adultos recém eclodidos de *G. mellonella* os quais foram colocados em recipientes plásticos (24x25cm de diâmetro) com tampas aeradas e dentro do recipiente foram colocados papéis dobrados em forma de sanfona para que os adultos realizassem a postura (Anexo F1). Após esta etapa os ovos coletados (Anexo F2) foram transferidos para formas de metálicas (25 cm de diâmetro), contendo dieta artificial para nutrir as lagartas (Anexo F3). As fôrmas ficaram acondicionadas em estufa BOD nas condições de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ UR>80%.

As lagartas do 7º *instar* (*G. mellonella*), pesando aproximadamente 0,26g foram utilizadas na multiplicação e manutenção das colônias de nematóides. Para isso, dois ml de suspensão aquosa contendo juvenis infectantes foi espalhada sobre placas de *Petri* de 6 cm de diâmetro, contendo previamente duas folhas esterilizadas de papel de filtro do mesmo tamanho, e 5 lagartas de *G.*

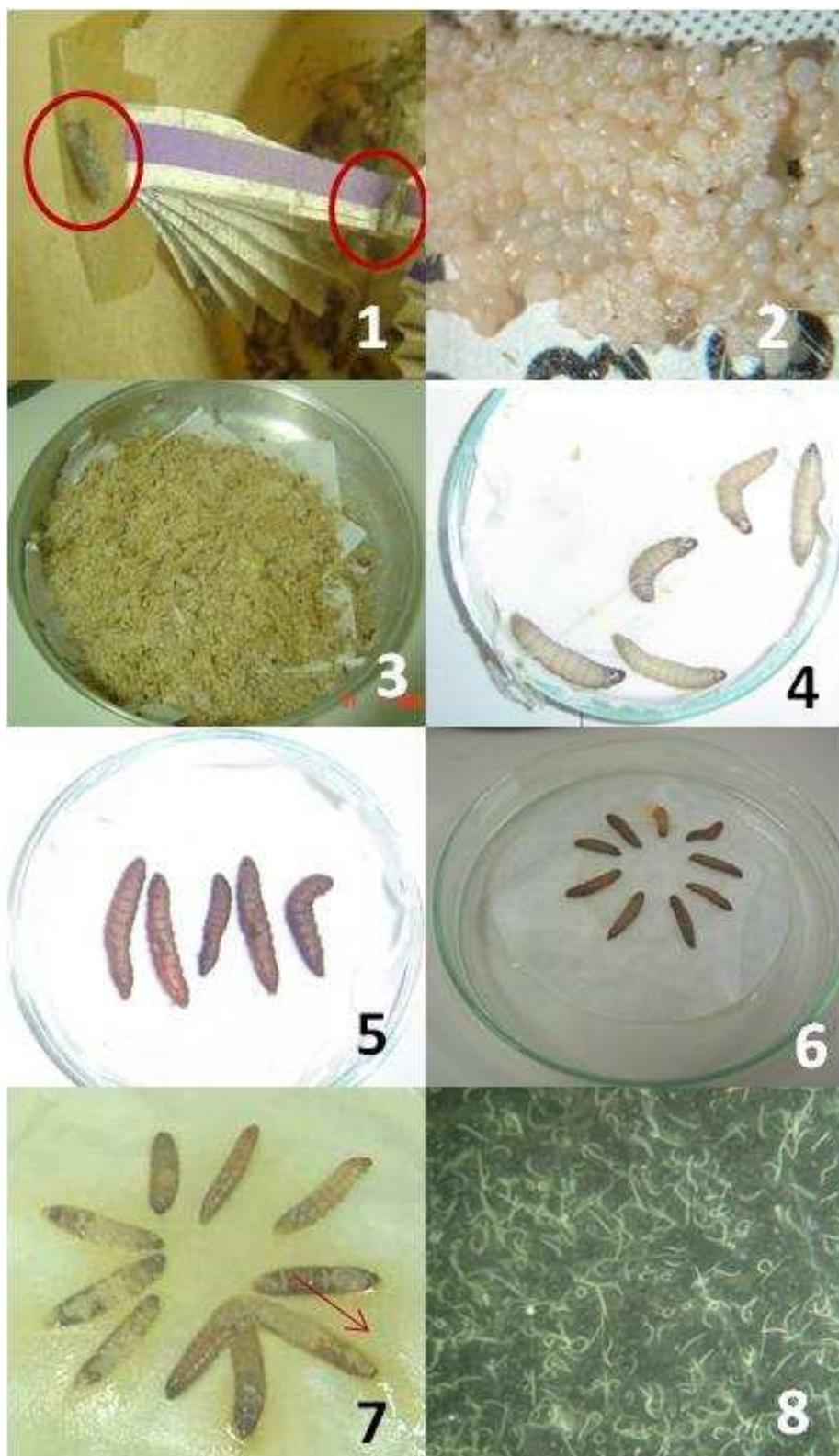
mellonella (Anexo F4). As placas foram envolvidas em filme plástico, a fim de se evitar evaporação e entrada de outros microorganismos e por 48h acondicionadas em estufa a $27\pm 1^\circ\text{C}$ UR>80%. Posteriormente, as lagartas mortas e com sinais de infecção (Anexo F5) foram transferidas para as “armadilhas de White” (KAYA & STOCK, 1997) para coleta dos JIs (Anexo F6). Dentro de 8 a 10 dias após a exposição, os juvenis infectantes começaram a emergir e migrarem para a água das armadilhas (Anexo F7 e F8), sendo coletados diariamente por aproximadamente duas semanas e estocados em garrafas de cultivo celular de 40 ml e armazenadas em câmara climatizada a $16 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR>80 \pm 10%. Duas vezes por semana as garrafas contendo nematóides serão colocadas em um agitador mecânico, para oxigenação.

Obtenção dos carrapatos

Diante do quadro de resistência dos carrapatos aos químicos, em 1997 a Embrapa Gado de Leite implementou o teste de eficácia de carrapaticidas, serviço gratuito que permite determinar o produto adequado para ser aplicado em cada propriedade. Este teste é feito a partir de amostras de carrapatos enviadas por produtores de diferentes lugares do país.

As populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizadas neste estudo são provenientes de amostras de carrapatos enviadas por produtores, onde parte da população foi utilizada para a realização do teste de eficácia de carrapaticidas e parte foi empregada no desenvolvimento dos experimentos. Os ixodídeos utilizados nos experimentos referentes aos capítulos um, dois e três foram obtidos através de amostras enviadas por produtores dos Municípios de Campina Verde, Minas Gerais, Silveira Carvalho, Minas Gerais e Bela Vista, Goiás, respectivamente.

ANEXOS



Anexo A – 1: Fêmeas de *Galleria mellonella* realizando postura em papéis dobrados em forma de sanfona dentro de recipientes plásticos (24x25cm de diâmetro); **2:** Ovos de *G. mellonella*; **3:** Formas de pizza (25 cm de diâmetro), contendo lagartas de *G. mellonella* e dieta artificial.; **4:** Lagartas de *G. mellonella* em placas de petri de 6cm contendo duas folhas papel de filtro e solução com nematóides.; **5:** Lagartas de *G. mellonella* mortas apresentando coloração avermelhada, sinal de infecção por nematóides do gênero *Heterorhabditis*; **6:** Lagartas de *G. mellonella* transferidas para armadilha de “White”; **7:** Nematóides emergindo de lagartas mortas de *G. mellonella*; **8:** Nematóides na lâmina de água presente na armadilha de “White”. Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.