

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)

INÊS RIBEIRO MACHADO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 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)

INÊS RIBEIRO MACHADO

“Dissertação apresentada
ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias
(CCTA) no Programa de Pós-
Graduação em Produção
Vegetal, para obtenção do título
de Mestre em Produção
Vegetal”

Orientadora: Prof^a Cláudia de Melo Dolinski

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 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)

INÊS RIBEIRO MACHADO

Dissertação apresentada
ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias
(CCTA) no Programa de
Pós-Graduação em
Produção Vegetal, para
obtenção do título de
Mestre em Produção
Vegetal.

Aprovado em 07 de março de 2008.

Comissão Examinadora:

Dr. Rômulo da Silva Carvalho (Entomologia) - Embrapa Mandioca e Fruticultura
Tropical

Dr. Ricardo Moreira de Souza (Fitopatologia) -UENF

Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira (Parasitologia) – UENF

Dr. Claudia Dolinski (Fitopatologia) -UENF

Os que confiam no Senhor são como os montes de Sião, que não se abalam, firmes para sempre. Como em redor de Jerusalém estão os montes, assim é o Senhor, em derredor de seu povo, desde agora e para sempre. Amém

Salmos 125:1-2

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por ter me ajudado em todos os momentos de minha vida e que me deu força para que cada dia eu pudesse vencer novos desafios com o mesmo ânimo de sempre e também pelos livramentos diários;

Aos meus pais Nédia América Ribeiro Esteves e seu Ignácio Cardoso Machado que sempre me apoiaram e me entenderam em todos os momentos, principalmente na minha ausência por causa dos estudos;

Aos meus padrinhos Léa e Geraldo pela compreensão da minha ausência de anos e por me apoiarem e torcerem por mim mesmo de longe;

Aos meus irmãos Felipe, Ignácio Júnior, Cristiane e Delanilson (*in memorian*) pela amizade e convívio diário; Aos meus sobrinhos Nataly e Victor Hugo pelos quais amo de paixão e deposito muitas esperanças em suas formações;

Aos meus professores orientadores Cláudia de Melo Dolinski e Ricardo Moreira de Souza que são meus “pais” na pesquisa, pois me ensinaram tudo na

pesquisa, desde os meus primeiros passos na iniciação científica até hoje e ainda espero aprender muito mais com eles;

À minha amiga Liliana Parente Ribeiro pelos sete inseparáveis anos de amizade e por tudo que compartilhamos juntas neste tempo;

A Carla Cristina da Silva Pinto que sempre me ajudou e a quem admiro. Pela amizade dedicada que sempre dá a sensação de anos de convívio;

A Renata Robaina e Leandro Gonçalves pelo apoio, amizade que surgiu em meio a necessidades de auxílio na estatística deste trabalho;

A Gil de Sena Fernandes pelo amor e companheirismo dedicados. Sem seu apoio seria muito mais difícil;

Aos meus amigos do laboratório, que já se tornaram irmãos pra mim: Thiago, Paulo Victor, Rogério, Fernandinho, Juan Pablo, Eleodoro, Vicente, Dimmy, Eduardo, Luciano, Carol, Shênia, Alessandra e Lílian (estagiárias de passagem no lab);

A Ramon Santos de Minas pela amizade construída durante o mestrado, por ser meu “irmão” em todas as horas, pelo auxílio mútuo que caracterizou nossa amizade e que tornou nossa caminhada menos “dura” nesse mestrado;

A Marcela Campanharo, Alessandra Dardengo, Tatiana Barbé, pela amizade e apoio durante o mestrado;

A Edilena (Didi) e à sua família pela amizade e pelo apoio em me hospedar nos dias em que precisei ir a Juiz de Fora –MG;

Ao John Furlong e a Márcia Prata pela disposição em sempre me mandar carrapatos, pela amizade e ensinamentos na estatística;

A CAPES pelo apoio financeiro na execução deste trabalho e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	4
2.1.1. Ciclo de vida.....	8
2.2. Métodos de controle.....	10
2.2.2. Controle Químico: Carrapaticidas.....	11
2.2.1. Controle Imunológico: Vacinas.....	13
2.2.3. Animais resistentes.....	14
2.2.4. Controle fitoterápico do carrapato bovino.....	16
2.2.5. Rotação de Pastagem.....	17
2.2.6. Controle biológico do carrapato dos bovinos.....	18
2.3. Nematóides Entomopatogênicos.....	19
2.3.1. Comportamento ecológico de NEP's.....	21
2.3.2. Controle Biológico de insetos-praga com a utilização de NEP's.....	25
2.3.3. Controle biológico do carrapato bovino com NEP's	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Local de realização e obtenção do material vivo.....	31
3.2. Procedimento experimental.....	32

3.3. Parâmetros biológicos analisados.....	35
3.4. Análise estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
9. ANEXO.....	95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema demonstrativo do gênero *Rhipicephalus* sendo parafilético em relação ao gênero *Boophilus*.....5
- Figura 2.** Micrografia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando microscopia eletrônica de varredura mostrando o idiosoma, a ausência de festões e o capítulo.....6
- Figura 3. A.** Micrografia de *R. (B.) microplus* utilizando microscopia eletrônica de varredura mostrando o podosoma, o opistoma, o espiráculo e as quatro placas adanais.....6
- Figura 4.** Esquema do ciclo de vida do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.....10
- Figura 5.** Procedimento para multiplicação dos nematóides *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *H. indica* LPP4.....32
- Figura 6.** Placa de cultura de células com 24 orifícios utilizada no experimento e placa com areia e carrapatos demonstrando um dos tratamentos.....33
- Figura 7.** Placa de Petri (5 cm) usada para separar individualmente as fêmeas ingurgitadas após as 72 horas de exposição ao nematóide34

Figura 8. Seringas plásticas adaptadas utilizadas para armazenagem das posturas.....34

Figura 9. Penetração de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4 e *Heterorhabditis baujardi* LPP7 pelo espiráculo de uma fêmea ingurgitada do carrapato bovino.....37

Figura 10. Gradação da coloração das fêmeas de *Rhipicephalus Boophilus microplus* infectadas com *Heterorhabditis baujardi* LPP7 com diferentes concentrações de JIs.....38

Figura 11. Intensa coloração vermelha da fêmea do carrapato *R. (B.) microplus* observada no tratamento de maior concentração (960 JIs/ ♀). Foto em microscópio estereoscópico com 58X de aumento.....38

Figura 12. Massa de ovos de uma das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* observado no tratamento de maior concentração de JIs de *Heterorhabditis baujardi* (960 JIs/ ♀) e do controle.....39

Figura 13. Peso inicial de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H.indica* LPP4.....40

Figura 14. Peso inicial de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H. baujardi* LPP7.....40

Figura 15. Peso da postura de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H.indica* LPP4.....41

Figura 16. Peso da postura de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H. baujardi* LPP7.....42

- Figura 17.** Alteração do peso de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H.indica* LPP4.....43
- Figura 18.** Alteração do peso de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H. baujardi* LPP7.....43
- Figura 19.** Período de pré-postura (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. indica* LPP4 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.....44
- Figura 20.** Período de pré-postura (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.....45
- Figura 21.** Período de postura (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. indica* LPP4 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.....46
- Figura 22.** Período de postura (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.....47
- Figura 23.** Período de sobrevivência (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. indica* LPP4 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.....48
- Figura 24.** Período de sobrevivência (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.....49

- Figura 25.** Porcentagem de controle de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpes sensível e resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80%.....50
- Figura 26.** Porcentagem de controle de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpes sensível e resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80%.....51
- Figura 27.** Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4.....52
- Figura 28.** Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe resistente expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4.....53
- Figura 29.** Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7.....54
- Figura 30.** Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe resistente expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7..... 54

ANEXO

Tabela 1- Pesos médios (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.....96

Tabela 2- Pesos médios (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.....97

Tabela 3- Pesos médios (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%..98

Tabela 4- Pesos médios (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%..99

Tabela 5 - Períodos (dias) referentes à fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.....100

Tabela 6 - Períodos (dias) referentes à fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.....101

Tabela 7 - Períodos referentes à fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.....102

Tabela 8 - Períodos referentes à fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estipe resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.....103

RESUMO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) é um ectoparasito comum em bovinos, que ocorre em quase todo o território nacional e está relacionado a inúmeras doenças que promovem diminuição na produção ou causam a morte dos animais. O uso incorreto dos produtos químicos traz

conseqüências como seleção de carrapatos resistentes, contaminação do ambiente, animais e alimentos. Existe boa perspectiva quanto ao uso dos nematóides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernematidae Chitwood & Chitwood, 1937 e Heterorhabditidae Poinar, 1976 (Nematoda: Rhabditida) no controle destes ectoparasitas, pois estudos em laboratório vêm demonstrando a eficácia no uso destes nematóides no controle do carrapato bovino. Baseados nestes dados favoráveis, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos de dois isolados de NEPs, sendo eles *Heterorhabditis baujardi* LPP7 Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003 e *H. indica* LPP4 Poinar, Karunakar & David, 1992 sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpes sensível e resistente a carrapaticidas; e observar o processo de infecção destes nematóides nas fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpes sensível e resistente. Foram testadas as concentrações com 15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 de juvenis infectantes (JIs) dispersos em 4 mL de água destilada, por fêmea em areia. As fêmeas foram separadas em oito placas com 24 orifícios cada e pesadas individualmente. Cada placa representou um tratamento ou concentração de JI, os nematóides foram adicionados à areia antes dos carrapatos e para o controle foi utilizada a mesma placa com areia e 1 mL de água destilada isenta de nematóides. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ a UR > 80%, durante 72 horas. Durante a exposição aos nematóides foi observado e fotografado o processo de infecção em cada um dos tratamentos. Após o período de exposição, as fêmeas foram individualmente acondicionadas em placas de Petri com separador para isolar diariamente a massa de ovos de cada fêmea. As fêmeas de *R. (B.) microplus* foram observadas diariamente até a última morte, anotando-se as datas de início e fim de postura para fêmeas que ovipositaram, data da morte, aspecto pós-infecção e aspecto pós-morte para todas as fêmeas. Durante o período de exposição de 72 horas das fêmeas ingurgitadas com ambos os NEPs, foi observado a entrada desses nematóides pelos espiráculos. O peso da postura tanto de fêmeas resistentes quanto de fêmeas sensíveis foi reduzido utilizando as duas espécies de NEPs. Quanto ao peso das fêmeas sensíveis e resistentes houve diferenças entre o controle e os tratamentos. A alteração do peso diminuiu na medida em que se aumentava a concentração de JIs de *H. indica* LPP4 em fêmeas sensíveis. No período de pré-

postura foram registradas diferenças entre o controle e o tratamento de 240 JIs/ ♀, no entanto para fêmeas resistentes não foram observadas diferenças. Utilizando JIs de *H. baujardi* LPP7 também não foram observadas diferenças neste parâmetro. Para período de postura e período de sobrevivência foi evidenciada uma redução nos dias em fêmeas sensíveis e resistentes para ambos os nematóides. O percentual de controle foi acima de 90% para a concentração acima de 480 JIs/ ♀ para ambos os nematóides e ambas sensíveis e resistentes. Em relação à mortalidade, 100% das fêmeas sensíveis e resistentes morreram a partir do quinto dia utilizando JIs de *H. indica* LPP4. Utilizando JIs de *H. baujardi* LPP7, os mesmos 100% de mortalidade foram alcançados a partir do sétimo dia. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 foi tão eficiente afetando a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes de *R. (B.) microplus* quanto *H. indica* LPP4, isto se deve provavelmente a ótima temperatura tanto dos isolados de nematóides quanto das fêmeas. Contudo, aparentemente *Heterorhabditis indica* LPP4 mostrou ser mais eficaz no controle destas fêmeas causando uma maior mortalidade em menos dias, principalmente em fêmeas resistentes, já que estas é que serão controladas no campo.

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

ABSTRACT

Rhipicephalus (Boophilus) microplus Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) is a common ectoparasite in bovines, that occur almost all in the domestic territory and are related the innumerable illnesses that promote reduction in the production or cause the death of the animals. The incorrect use of the chemical products brings consequences as election of resistant ticks, contamination of the environment, animals and foods. Good

perspective how much to the use of the entomopathogenic nematodes (NEP's) of the families Steinernematidae Chitwood exists & Chitwood, 1937 and Heterorhabditidae Poinar, 1976 (Nematoda: Rhabditida) in the control of these ectoparasites, therefore studies in laboratory see demonstrating the effectiveness in the use of these nematodes in the control of the bovine's tick. Based on these favorable data, the objectives of this work had been to evaluate the isolated effect of two NEPs been they *Heterorhabditis baujardi* LPP7 Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003 and *H. indica* LPP4 Poinar, Karunakar & David, 1992 on the reproductive biology of ingurgitates females of *R. (B.) microplus* lineages sensible and resistant the acaricides; and to observe the process of infection of these nematodes in the engorged females of *R. (B.) microplus* lineages sensible and resistant. The concentrations with 15, 30, 60, 120, 240, 480 and 960 of infective juveniles (JIs) dispersed in 4 had been tested mL of distilled water, for female in sand. The females had been separate in eight plates with 24 orifices each and weighed individually. Each plate represented a treatment or concentration of JI, the nematodes had been added to the sand before the ticks and for the control it was used the same plate with sand and 1 mL distilled water exempt of nematodes. The plates had been conditioned in acclimatized chamber of $27 \pm 1^\circ \text{C}$ the UR > 80%, during 72 hours. During the exposition to the nematodes it was observed and photographed the process of infection in each one of the treatments. After the period of exposition, the females individually had been conditioned in plates of Petri with separator to daily isolate the egg mass of each female. The females of *R. (B.) microplus* had been observed daily until the last death, writing down itself the dates of beginning and end of position for females that oviposited, date of the death, aspect after infection and postmortem aspect for all the females. During the period of exposition of 72 hours of the engorged females with both the NEP's, was observed the entrance of these nematodes for the spiracles. The weight of the position in such a way of resistant females as much for sensible female was reduced using the two species of NEP's. As much for the weight of the sensible and resistant females had differences between the control and the treatments. The alteration of the weight diminished the measure where if it increased the concentration of JIs de *H. indica* LPP4 in sensible females. In the period of daily pay-ovoposition had been registered differences between the

control and the 240 treatment of JIs/ ♀, however for resistant females differences had not been observed. Using JIs de *H. baujardi* LPP7 had also not been observed differences in this parameter. For period of position and period of survival they had been evidenced a reduction in the days in sensible and resistant females for both the nematodes. The perceptual of control was above 90% for the concentration above 480 JIs/ ♀ for both the sensible nematodes and both and resistant ones. In relation to mortality, 100% of the sensible and resistant females had died from the fifth day using JIs de *H. indica* LPP4. Using JIs de *H. baujardi* LPP7, same the 100% of mortality had been reached from the seventh day. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 was so efficient affecting the reproductive biology of sensible and resistant ingurgitates females of *R. (B.) microplus* as much for *H. indica* LPP4, this if in such a way must probably the excellent temperature of the isolated ones of nematodes as much for the females. However, apparently *Heterorhabditis indica* LPP4 mainly showed to be more efficient in the control of these females causing a bigger mortality in little days, in resistant females, since these are the ones that will be controlled in the field.

Key words: *Heterorhabditis indica* LPP4, *Heterorhabditis baujardi* LPP7 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, biological control, entomopathogenics nematodes.

1-INTRODUÇÃO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus Canestrini (Acari: Ixodidae) é um ectoparasito comum em bovinos, que ocorre em quase todo o território nacional e está relacionado a inúmeras doenças que promovem diminuição na produção ou causam a morte dos animais. Os carrapatos dos bovinos estão entre os paralelos de 32° N e 32° S (Gonzalez, 2003) e são um dos mais importantes ectoparasitos das regiões tropicais e subtropicais (Castro e Newson, 1993) atingindo mais de 75% da população mundial de bovinos (Cordovés, 1997).

Além da transmissão de agentes patogênicos, o elevado custo dos produtos para o controle deste carrapato faz elevar o custo de produção e a ação dos carrapatos acarreta em perdas significativas na produção de leite e carne. Estudos na Austrália mostram uma perda anual de 4 bilhões de dólares na criação de gado, 49% desta perda devido aos custos do controle dos carrapatos e 51% devido a perdas na produção de leite, carne e couro (Jonsson et al. 2000).

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores de carne bovina do mundo, possui um rebanho bovino de aproximadamente 200 milhões de cabeças, produzindo aproximadamente 8,5 milhões de toneladas de carne e 23 bilhões de litros de leite por ano (Conselho Nacional da Pecuária de Corte, 2005; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2004). No Brasil, as perdas econômicas devidas a este parasito estão estimadas em 2 bilhões de dólares ao ano (Grisi et al. 2002). O

principal meio de controle deste ectoparasito também se baseia no uso de carrapaticidas, mas seu uso indiscriminado pode induzir resistência nas populações de carrapatos. Além disso, ocorrem reações tóxicas em animais e homens devido a resíduos químicos deixados no ambiente, por isso têm-se buscado alternativas de controle não químico que diminuam os prejuízos causados pelos carrapaticidas.

Os carrapatos possuem inimigos naturais que atacam em especial as fêmeas ingurgitadas (Dela Vega, 1981; Soneshine, 1993; Veríssimo, 1995; Souza, 1999) por serem um estágio bastante vulnerável, de grande valor nutricional e por estarem no solo (Brovini et al., 2003). A queda de uma fêmea ingurgitada ao chão permitirá a sua multiplicação e resultará em no mínimo 2.500 outros carrapatos. Dessa maneira, entende-se facilmente que a qualquer momento, em uma propriedade, a maior parte da população dos carrapatos esteja na pastagem (95%), e não nos animais aos quais esta se aplicando o carrapaticida. Estima-se que nos bovinos estejam presentes apenas em torno de 5% do total de carrapatos da população (Furlong & Martins, 2000).

Samish et al. (2004) mostraram que predadores, parasitóides, fungos, nematóides e bactérias podem diminuir a população de carrapatos. Contudo, poucos desses agentes foram utilizados com sucesso no controle biológico do carrapato até o momento. Existe boa perspectiva quanto ao uso dos nematóides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernematidae Chitwood & Chitwood, 1937 e Heterorhabditidae Poinar, 1976 (Nematoda: Rhabditida) no controle destes ectoparasitas. Estes nematóides vêm sendo usados com sucesso no controle biológico de pragas de solo (Grewal et al. 2005).

Estudos vêm demonstrando que espécies da família Heterorhabditidae são mais virulentas do que as da família Steinernematidae por alguns atributos que podem explicar este fato, como: a presença de um dente quitinoso na região anterior do nematóide que ajuda na penetração ativa deste através da cutícula dos hospedeiros; e a presença de uma bactéria simbiote com alta virulência. Estes nematóides apresentam um estágio de vida livre no solo, que corresponde ao estágio de juvenil 3 (J3), também chamado de juvenil infectante (JI), sendo os outros

estádios obrigatoriamente encontrados dentro dos hospedeiros (Burnell & Stock, 2000).

Glazer et al. (2001) demonstraram que injetando apenas um juvenil de *Heterorhabditis* sp. foi possível matar um carrapato da espécie *Boophilus anulatus* Say, 1891. Assim sendo, é possível que espécies desta família possam ser promissores agentes de controle biológico para o carrapato bovino.

No Brasil, estudos em laboratório utilizando NEPs vêm demonstrando a eficácia no uso destes nematóides no controle do carrapato bovino (Vasconcelos et al, 2004; Freitas-Ribeiro et al., 2005; Reis, 2005; Silva, 2006).

Com base na problemática relacionada à bovinocultura em relação aos danos diretos e indiretos dos carrapatos sobre as cadeias produtivas (carne, leite e couro), resistência a carrapaticidas e exigências dos mercados em relação à segurança alimentar e ambiental, os objetivos desse estudo foram avaliar a ação e a factibilidade de uso de nematóides entomopatogênicos como agente de controle biológico do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) com base na observação, em laboratório, do processo de infecção dos nematóides *Heterorhabditis baujardi* LPP7 Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003 e *H. indica* LPP4 Poinar, Karunakar, & David, 1992, ambos nativos do Brasil, em estirpes sensíveis e resistentes a carrapaticidas, visando conhecer os efeitos da ação patogênica desses nematóides sobre a biologia reprodutiva, longevidade e mortalidade do carrapato.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Registros de carrapato em animais são antigos. Uma figura em uma tumba egípcia, datada de 1500 a.C., representando um animal semelhante à hiena com três protuberâncias no pavilhão auricular interno, é o registro mais antigo da presença do carrapato (Arthur, 1965). Sua primeira denominação foi *Cynorhaestea*, citada por Homero por volta de 800 a.C. Em 355 a.C., Aristóteles, em sua *Historia Animalium*, referiu-se aos carrapatos, acreditando que sua origem fosse o capim (Arthur, 1961). Na Antiga Grécia era chamado de *Croton*, que quer dizer “semelhante à mamona”, e, pela mesma razão, foi denominado *Ricinus* na Antiga Roma. No ano 77, o carrapato foi citado como hematófago por Plínio em sua *Historia Naturalis*.

Atualmente existe registro de 800 espécies de carrapatos no mundo, das quais, pelo menos 700 possuem especificidade de hospedeiro (Cordovés, 1997). A designação genérica *Boophilus*, do grego “amigo do boi”, foi introduzida em 1891 por Curtice, sendo chamado de *Boophilus microplus* até 2002. Houve um grande progresso no estudo da filogenia e evolução dos carrapatos nesses últimos cinco anos, o que gerou um melhor conhecimento do relacionamento entre os táxons (Murrel et al., 2001; Barker & Murrel, 2002). Segundo Barker & Murrel (2002), na subfamília Rhipicephalinae, o gênero *Rhipicephalus* é quase certamente parafilético

em relação ao gênero *Boophilus*. Portanto, o gênero *Boophilus* se tornou subgênero de *Rhipicephalus* (Figura 1).

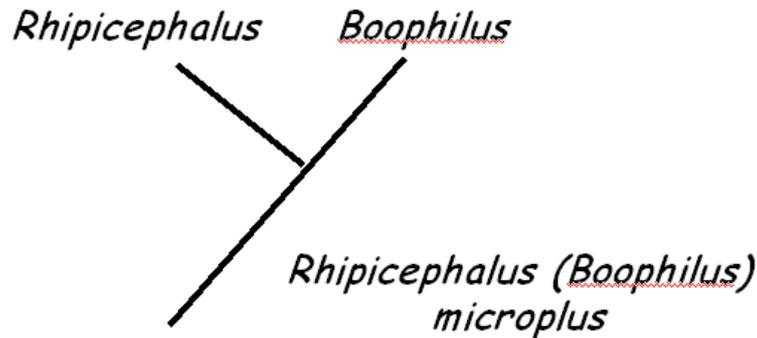


Figura 1. Esquema demonstrativo do gênero *Rhipicephalus* sendo parafilético em relação ao gênero *Boophilus*.

Rhipicephalus (B.) microplus é a única espécie presente no Brasil das 5 reconhecidas (Arthur, 1960). No Brasil, sua introdução parece ter se dado pela vinda de animais comprados do Chile, no início do século XVIII, via Rio Grande do Sul estando atualmente distribuídos por todo o país. Contudo, a intensidade de sua população varia de acordo com as condições climáticas e os tipos raciais de bovinos explorados em cada região (Gonzales, 1995).

De acordo com Sonenshine (1991), o corpo dos carrapatos, em geral, consiste de capítulo (gnatossoma) e idiosoma (Figura 1). O capítulo dá suporte às partes bucais, incluindo as quelíceras, palpos e hipostômio. O idiosoma é subdividido em podosoma, onde estão as patas e o poro genital, e em opistoma, uma região posterior na qual carrega os espiráculos e a abertura anal (Figura 2). Em *R. (B.) microplus*, os espiráculos ou placa estigmal é uma estrutura larga, alongada, suboval ou oval que contém a mácula junto ao pequeno óstio, que é uma abertura para o sistema respiratório onde ocorrem as trocas gasosas e também está relacionado com a regulação do excesso de perda de água.

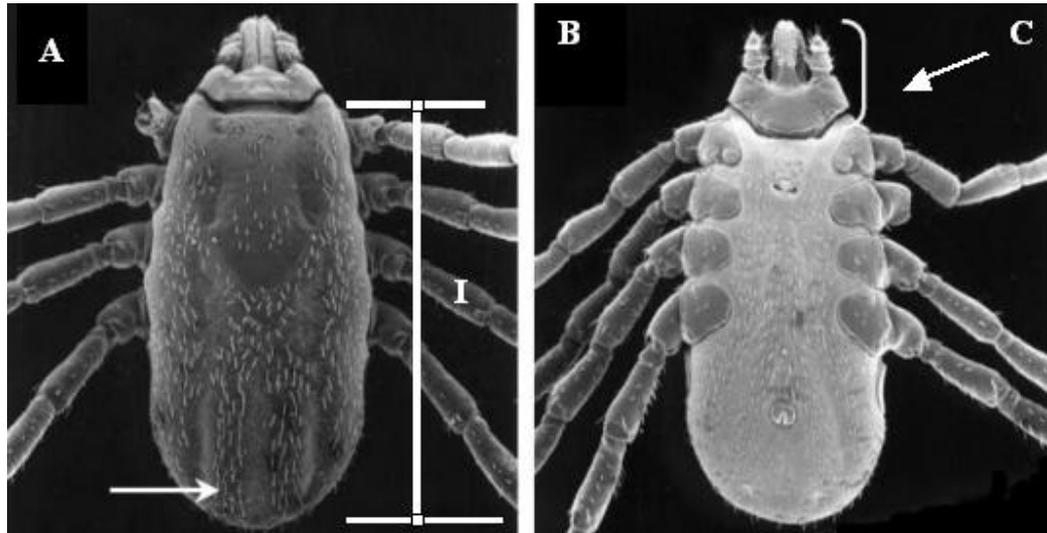


Figura 2. A. Micrografia da parte dorsal do corpo de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando microscopia eletrônica de varredura mostrando o idiosoma (I). Seta mostra ausência de festões. **B.** Micrografia da parte ventral do corpo de *R. (B.) microplus* utilizando microscopia eletrônica de varredura mostrando o capitulo (C). Disponível em: <<http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Boophilus+microplus&flags=col5:&res=80>>. National Tick Collection, 2004. Acesso em 27 dez. 2007.

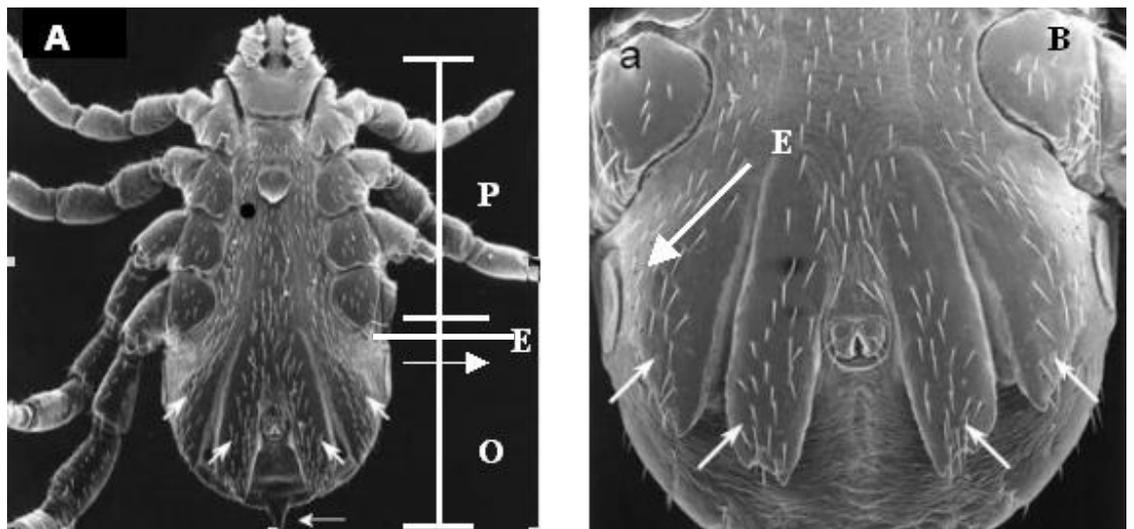


Figura 3. A. Micrografia da parte ventral do corpo de machos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando microscopia eletrônica de varredura mostrando o

podosoma (P) e o opistoma (O) e o espiráculo (E) B. Micrografia de *R. (B.) microplus* utilizando microscopia eletrônica de varredura mostrando o espiráculo (E) abaixo de uma das patas (a). Setas mostram as 4 placas adanais. Disponível em: <<http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Boophilus+microplus&flags=col5:&res=80>>. Nacional Tick Collection, 2004. Acesso em 27 dez. 2007.

O gênero *Rhipicephalus*, de origem africana, tem mais de 70 espécies reconhecidas no mundo. Todas as espécies apresentam coloração castanha ou castanha avermelhada escudo não ornamentado, olhos, rostro curto e base do capítulo hexagonal. Machos possuem duas a quatro placas adanais e alguns apresentam apêndice caudal (Onofrio et al. 2006) (Figura 2B). Segundo este mesmo autor, o que caracteriza a espécie *R. (B.) microplus* são quatro placas adanais, ausência de festões e capítulo curto (Figura 1 e 2).

A fixação deste carrapato provoca lesões cutâneas que além de prejudicarem a indústria do couro favorecem a entrada de bactérias e larvas de moscas (Sonenshine, 1991). Considerando que cada fêmea ingere de 0,5 a 3,0 mL de sangue em toda sua vida é comum a perda de peso do animal, conseqüente depreciação, redução na produção de leite, devido ao estresse do animal, e enfraquecimento generalizado levando-o a predisposição a diversas doenças (Gonzales, 1975; Seifer, 1971).

Entre os danos diretos causados pelo carrapato cita-se a espoliação sanguínea, com reflexos negativos diretos no ganho de peso e produção leiteira, que variam de acordo com o grau de parasitismo. Em pesquisa realizada na Argentina, observou-se uma queda na produção de leite variando de 18,6 a 42,4% em relação às vacas não parasitadas (Corrêa, 1976). Podem ocorrer também danos indiretos com a inoculação de toxinas na corrente circulatória do hospedeiro, que interferem na síntese protéica, resultando em uma desproporção proteína-gordura, com prevalência desta última, o que se percebe por ocasião do abate. Pode transmitir, ainda, agentes infecciosos como a rikétsia (*Anaplasma* spp.) e o protozoário *Babesia* spp., responsáveis pela doença comumente chamada de Tristeza Parasitária Bovina (TPB). Essa doença se manifesta clinicamente por febre, anemia, hemoglobinúria, icterícia, anorexia, emagrecimento, e, nos casos de bovinos

sensíveis, alta mortalidade (Kessler, 1998). Sendo assim, as perdas econômicas causadas por essa doença são elevadas, pois há uma queda acentuada na produção de leite, aumento do período de engorda dos animais, gastos com medicamentos, descarte do leite, e finalmente morte do animal. No Brasil, a TPB é endêmica na maior parte do território, sendo os bovinos de raça européia mais sensíveis que os zebuínos (Kessler & Schenk, 1998).

R. (B.) microplus tem uma fase de vida parasitando o bovino (parasitária) e outra de vida livre, sendo esta última influenciada por fatores climáticos (temperatura, umidade, radiação solar, evaporação, chuvas, etc.) e seu sucesso com relação à sobrevivência e o alcance do hospedeiro pelas larvas dependerá de outros fatores também, como condições da pastagem, presença e densidade do hospedeiro, comportamento do mesmo no pasto e presença de predadores (Bittencourt, 2000).

Trabalhos avaliando a biologia de *R. (B.) microplus* sob condições de laboratório, foram realizados. Alvarado & Gonzáles (1979) analisaram a sua fase não parasitária à temperatura de 26° C e avaliaram o período de pré-postura e a porcentagem de eclosão das larvas, sendo que o período de pré-postura ocorreu em torno de três dias e a eclosão entre 22 e 24 dias. Gloria et al. (1993) realizaram um estudo avaliando os parâmetros biológicos de duas estirpes de *R. (B.) microplus* nas temperaturas de 27° C e 32° C, mas estas estirpes diferiam no fato de serem resistentes e sensíveis a acaricidas. Os parâmetros analisados foram período de pré-postura, peso da massa de ovos, porcentual de eclosão, período de sobrevivência das fêmeas, índice de eficiência reprodutiva (IER) e índice de eficiência nutricional (IEN).

2.1.1 Ciclo de vida

Segundo Gonzales, 1995 citado por Leal (2006), o ciclo biológico de *R. (B.) microplus* se divide em duas fases:

a) Fase de vida livre. Esta fase ocorre no meio ambiente e pode variar de aproximadamente 30 dias, quando há boas condições climáticas, até vários meses em condições adversas de temperatura e umidade. As teleóginas (fêmeas

completamente ingurgitadas) ao se desprenderem do hospedeiro caem ao solo, dando início a fase de vida livre. As teleóginas possuem geotropismo e buscam abrigo no solo e vegetação para iniciar o processo de postura, logo após o período de pré-postura. Este período corresponde ao tempo necessário para formação dos ovos e dura de 2 a 3 dias na temperatura ideal, podendo se estender por muitos dias na época de frio. As condições ideais para o desenvolvimento de *R. (B.) microplus* são: temperatura de 27 °C e umidade superior a 70% (Gonzales, 1995). Nestas condições ideais de temperatura e umidade ocorre a fase seguinte chamada de período de postura que dura aproximadamente 15 dias quando ocorre ovoposição de aproximadamente 3.000 ovos feita por cada teleógina. Os ovos férteis apresentam cor âmbar, são ovalados e pequenos de casca translúcida. O “órgão de Gené” secreta uma substância sobre os ovos conferindo-lhe determinada resistência à desidratação e ainda os mantém unidos (Cordovés, 1997). Após aproximadamente sete dias depois do final da postura inicia-se a eclosão das larvas, que dura em torno de cinco dias. Depois de um período aproximado de sete dias as neolarvas transformam-se em larvas infestantes, em condições de iniciar a fase de vida parasitária. Em temperaturas baixas as larvas podem sobreviver por vários meses, mas elas só estão infestantes nos primeiros 90 dias (Gonzales, 1995).

b) Fase de vida parasitária. Esta fase inicia-se quando a larva infestante instala-se no hospedeiro, e dura em média 21 dias. As larvas então irão migrar para determinadas regiões corpóreas do bovino como região posterior das coxas e as regiões perianal e perivulvar; locais mais propícios para o desenvolvimento devido à espessura, à vascularização e à temperatura da pele, bem como dificuldade de autolimpeza do hospedeiro (Wagland, 1978; Cordovés, 1996). Na fase parasitária o carrapato passa por vários instares até chegarem à fase adulta. Os instares e seus respectivos períodos de duração são: larva à metalarva (4 dias em média); metalarva à ninfa (4 dias) e ninfa à metaninfa (3 dias). A partir desta etapa ocorre a diferenciação sexual; metaninfa à neandro (3 dias) e gonandro (1-2 dias) – macho adulto; metaninfa à neógina (4 dias); neógina à paternógina (3 dias) e paternógina à teleógina (3-4 dias)- fêmea adulta (González, 1995) (Figura 3).

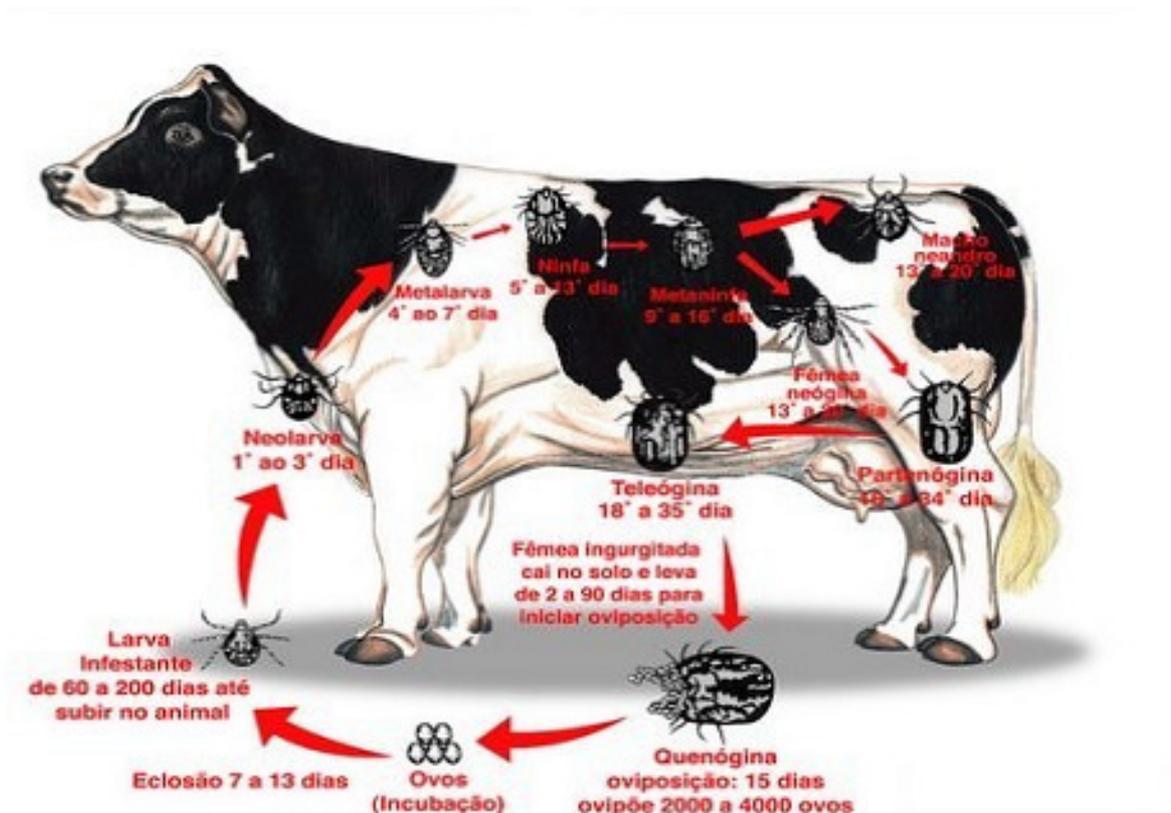


Figura 4. Esquema do ciclo do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
 Fonte: <http://www.ufrgs.br/depbiot/201/carrapat.htm>. (Acessado em 14 de março de 2006).

2.2- Métodos de controle

O controle eficiente do carrapato em uma propriedade depende de vários fatores relacionados com o rebanho (tamanho, raças e cruzamentos), assim como as pastagens (variedades e lotação), parasitos (número de gerações, eficácia dos parasiticidas), sistema de produção, clima, época do ano dentre outros fatores (Almeida, 2005). Contudo, os principais meios de controle contra *R. (B.) microplus* têm sido os carrapaticidas ou acaricidas, as vacinas e a utilização de animais resistentes. O controle biológico tem sido testado em laboratório e apresenta um bom índice de controle.

2.2.1- Controle Químico: Carrapaticidas

No fim do século XIX e início do século XX, ocorreu uma grande perda de animais, devido às doenças transmitidas pelo carrapato, como foi descoberto mais tarde. Em parte a causa destes problemas foi a introdução e a dispersão de carrapatos e de agentes patogênicos trazidos por colonizadores e exploradores (George, 2000). Em fins de 1893, vários agentes químicos foram testados como possíveis “carrapaticidas” através da imersão dos animais infestados, incluindo óleo de semente de algodão, óleo de peixe, petróleo cru, querosene, creosoto, extrato de tabaco, sabão e uma combinação de enxofre e querosene (George, 2000).

Em 1946 começou-se a utilizar, como alternativa para o arsênico, produtos organoclorados como DDT e BHC, que foram substituídos por uma série de novos produtos como os organofosforados e em seguida os piretróides (George, 2000). Apesar da alta toxidez destes pesticidas, como os organoclorados e organofosforados, um dos principais motivos da troca dos princípios ativos tem sido o surgimento de populações de carrapatos resistentes (George et al. 2004).

Além desse método de controle não ser efetivo isoladamente, é o mais oneroso para o agricultor, tendo ainda um fator agravante de usar produtos com grande toxicidade, que têm deixado resíduos nos alimentos e no ambiente. Infelizmente, essa forma de controle foi usada por muitas décadas, acreditando-se no arsenal da indústria química, com a criação de novos produtos quando apareciam problemas de resistência ou com a potencialização e associação dos já existentes, como têm ocorrido nos últimos anos (Vivan, 2005).

A porcentagem de eficácia exigida para um carrapaticida ser lançado no mercado é de 95%. O problema é que essa eficácia vai atuar sobre apenas 5% da população de carrapatos (a que está sobre os animais). Esse quadro bastante sintético mostra que é imprescindível o conhecimento do ecossistema desse parasito, para se estabelecer as melhores estratégias de controle, que tendem a ser diferenciadas de acordo com o clima, a localização geográfica entre outros fatores.

Segundo Bordin (1998), a capacidade dos carrapatos em se adaptar e sobreviver a condições adversas se deve provavelmente à mutabilidade potencial do parasito (pressão seletiva dos indivíduos resistentes), ao grau variável de desafio relacionado com a variabilidade epidemiológica entre períodos favoráveis e adversos, habilidade bioquímica da espécie, inadequação de algumas práticas terapêuticas, dosagens errôneas, e outros fatores. Por vezes, a resistência está instalada em uma população de carrapatos até mesmo antes de entrarem em contato com determinado produto. Isso ocorre porque já existiam na população alguns indivíduos naturalmente resistentes.

Os principais mecanismos utilizados pelos carrapatos resistentes para sobreviver aos acaricidas são: a redução da taxa de penetração do produto, alterando o tegumento externo; as mudanças no metabolismo, armazenamento e excreção do produto químico; e mudanças no local de ação do produto (Furlong, 2000).

As principais características da resistência apresentadas pelos carrapatos são genéticas e de caráter irreversível, ou seja, filhos de pais resistentes também serão resistentes e, se houver estabelecimento da resistência a um produto, a suspensão do uso do mesmo por um determinado período de tempo não o habilitará a um novo uso eficaz (Gonzáles, 1975).

Na década de 30 do último século foram identificados os primeiros casos de resistência ao carrapato *R. (B.) microplus*. Desde então, diversos princípios ativos carrapaticidas têm sido testados e utilizados comercialmente, tendo sido observado um aumento da resistência a esses produtos (Oliveira, 2002).

Nos últimos anos, muitos trabalhos no Brasil têm demonstrado que a eficácia dos carrapaticidas, disponíveis no mercado, está bastante comprometida. A Embrapa Gado de Leite realizou, durante os anos de 1997 a 1999, aproximadamente 200 testes para avaliar a sensibilidade/resistência de populações de carrapatos a carrapaticidas em Minas Gerais. Os produtos utilizados nos testes (coumafós, amitraz, cipermetrina + clorpirifós, deltametrina e alfametrina) representaram os principais grupos de carrapaticidas disponíveis no mercado. O resultado desse trabalho mostrou o estado crítico de resistência generalizada dos carrapatos aos

poucos grupos de carrapaticidas de contato existentes no mercado. Dentre os baixos índices de eficiência encontrados, o melhor desempenho comparativo apresentado foi de 61%, pelo grupo das diamidinas como, por exemplo, o amitraz (Furlong, 2002).

Atualmente, os controles biológico e imunológico já constituem parte dos programas de controle integrado de ectoparasitos que ainda exigem a utilização de produtos químicos (Pruett, 1999).

2.2.2- Controle Imunológico: Vacinas

Vacinas contra carrapatos baseadas em antígenos têm provado ser um método alternativo de controle de carrapatos bastante efetivo (Willadsen et al. 1995; Rodrigues et al. 1995). Essas vacinas, baseadas no antígeno Bm 86, atuam na ativação do sistema imunológico dos bovinos com posterior formação dos anticorpos específicos contra substância protéica, de natureza antigênica. Os anticorpos ingeridos pelos carrapatos durante a alimentação (hematofagismo) produzem lesões intestinais nos carrapatos, levando-os à morte ou causando-lhes danos que irão interferir em sua reprodução (Kemp et al. 1989). O efeito da vacinação ao longo do tempo pode reduzir entre 70 e 90% o número de carrapatos sobreviventes entre uma geração e a seguinte. A redução do número de fêmeas de carrapatos que ficam ingurgitadas pode ser insignificante ou, então, atingir níveis de 20 a 30% de eficiência (Willadsen et al. 1995).

Dessa forma, a vacinação tem pouco ou nenhum efeito imediato sobre o tamanho da população de carrapatos. A efetividade em manter a infestação abaixo de um determinado número de carrapatos que não provoquem perdas econômicas significativas é dependente do uso da vacina como parte integrante de um Programa de Controle Integrado do Carrapato (PCIC). Segundo Utech et al. (1978), para raças com resistência média acima de 95%, o uso correto da vacina pode manter a população de carrapatos abaixo de níveis economicamente significativos, sem a necessidade de se utilizar acaricidas. Em muitas raças bovinas, cerca de 20% dos animais carregam 50% dos carrapatos, sugerindo que a eliminação desses animais pode melhorar o desempenho da vacinação. Todavia, quando os animais de baixa

resistência (<85%) são desafiados com alta infestação, somente o uso de vacinas não controla satisfatoriamente os carrapatos. Esse problema tem sido resolvido por meio do uso combinado da vacina com a aplicação estratégica de acaricidas. Recomenda-se usar os acaricidas para reduzir a população de carrapatos a níveis muito baixos e as vacinas para diminuir a taxa de aumento do número de carrapatos.

A teoria dos “antígenos ocultos”, aqueles não expostos ao sistema imune do hospedeiro durante uma infestação natural, e o achado de uma proteína do intestino (Bm 86) com essa característica, significaram um grande avanço no desenvolvimento de vacinas contra *R. (B.) microplus*. A Bm 86 induz resposta imunológica em bovinos imunizados e é a base de duas vacinas comerciais presentes no mercado: a TickGard[®], desenvolvida na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a Gavac[®], desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba. As duas vacinas são produzidas em sistema heterólogo, porém, a proteína da TickGard[®] é obtida na bactéria *Escherichia coli* e a da Gavac[®] em *Pichia pastoris*. Embora essas vacinas estejam comercialmente disponíveis, muitas vezes elas não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas (Jonsson, 2000; Willadsen, 1996). O grupo australiano descreveu e avaliou um segundo antígeno oculto, denominado Bm 91, que foi associado a Bm 86 e aumentou a eficácia parcial da vacinação (Riding et al., 1994; Willadsen, 1996).

2.2.3- Animais resistentes

A resistência dos animais, entre e dentro das raças influencia o custo do controle dos carrapatos positivamente, por ser de baixo custo, permanente e não requerer gasto adicional para se produzir determinada quantidade de produto. Com a globalização, a capacidade dos produtores de se manterem economicamente competitivos está associada à disponibilização aos consumidores, de produtos saudáveis e mais baratos. O controle químico dos carrapatos combinado ou não com vacinas anticarrapatos, aumenta o custo de produção e os riscos de contaminação dos produtos.

Assim, a utilização de animais de alta resistência aos carrapatos é de grande importância em qualquer programa onde se deseja a erradicação destes. Em geral,

Bos indicus (gado zebuino) é mais resistente a doenças parasitárias do que *Bos taurus* (gado bovino) (Villares, 1941; Utech et al., 1978). Esses animais possuem um eficiente sistema de defesa contra os parasitos, que os impede de se fixarem e causarem danos; eles são extremamente sensíveis às larvas do carrapato; quando estas tentam se fixar em sua pele, ficam incomodados, sentem muita coceira, e, coçam-se com a língua, retirando dessa forma, grande quantidade de larvas, que são ingeridas. Esse processo ocorre também nas outras fases do carrapato: ninfas e adultos, sendo que pouquíssimos carrapatos nos bovinos resistentes conseguem chegar até a fase de fêmea ingurgitada.

Os animais resistentes também possuem defesas imunológicas que interferem na ingestão de sangue pelas fêmeas do carrapato, de modo que elas não alcançam o mesmo tamanho que alcançariam se estivessem se alimentando em um hospedeiro suscetível.

O importante é identificar os animais que têm muitos carrapatos e os que têm pouco ou nenhum, sendo que a aparência externa pode ajudar na seleção dos animais resistentes. Em testes de suscetibilidade dos bovinos aos carrapatos, verificou-se que entre as raças leiteiras, holandês e pardo-suíço apenas 20% apresentaram resistência ao carrapato, enquanto que na raça Jersey esse percentual alcançou 70%. No caso dos zebuínos, nas raças gir e nelore 90% apresentaram resistência ao carrapato, enquanto que nas raças mestiças o percentual caiu para 40% (Vivan, 2005).

Pesquisas revelam que nos animais mestiços existe uma relação entre o comprimento do pêlo e a infestação por carrapatos. Animais com pêlos bem curtos, semelhante aos pêlos dos zebuínos apresentam menor infestação (Veríssimo, 2004). Gonzáles (1975) já alertava, que a medida simplista de importar raças puras mais produtoras de leite, em substituição às nativas, poderia contribuir para situações de desequilíbrio de difícil solução. Assim, o cruzamento de raças leiteiras européias com raças leiteiras zebuínas parece ser uma boa solução para algumas regiões, constituindo-se em uma arma natural para antagonizar o crescimento populacional do carrapato.

2.2.4- Controle fitoterápico do carrapato bovino

O controle de endo e ectoparasitos através da homeopatia vêm sendo utilizado por alguns produtores no Brasil, com bons resultados (Real, 2003). Chungsamarnyart et al. (1991) ao estudar o efeito do extrato etanólico das folhas do nim indiano, *Azadirachta indica*, sobre larvas do carrapato do boi não obtiveram efeito significativo em 24 e 48 horas de contato das larvas com a solução. Furlong et al. (2002) realizaram um estudo sobre os extratos alcoólico e aquoso do nim em larvas de *R. (B.) microplus*. O extrato aquoso com 48 horas de exposição obteve os melhores resultados, mas a concentração CL90 foi muito alta para sua utilização rotineira a campo. Silva et al. (2002a) avaliaram duas formulações comerciais do óleo de nim contra *R. (B.) microplus* e observaram elevada eficiência dos produtos somente em altas concentrações.

Williams (1993) avaliou o efeito dos extratos de *Artocarpus altilis* e *Azadirachta indica* na fisiologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* com os quais ocorreu 50% de inibição da postura na dose de 0,54 e 0,46 mg do extrato etanólico, e 65 e 80% de falha na eclodibilidade, respectivamente para cada espécie vegetal.

Silva et al. (2002b) concluíram em seus estudos sobre o efeito de *Melia azedarach* sobre larvas de *R. (B.) microplus*, que esta planta possui um efeito acaricida superior à *Azadirachta indica* e que seus extratos poderiam auxiliar no controle deste ixodídeo, fornecendo condições de minimizar problemas com a resistência em várias propriedades rurais.

Mendes et al. (2002) avaliaram os efeitos dos extratos de *Sesbania virgata*, *Tabebuia ochraceae* e *Tecoma stans* em larvas de *R. (B.) microplus* e concluíram que o extrato de *T. stans* demonstrou certa eficiência (CL50 73,82 mg/mL) havendo diferença estatística na concentração letal de 50% com relação ao amitraz (CL50 26 mg/mL).

Segundo Prates et al. (1998), o monoterpeneo 1,8-cineol está presente no óleo essencial do capim-gordura, *Melinis minutiflora*, a uma concentração de 10,6% e esse monoterpeneo matou 100% das larvas do carrapato *R. (B.) microplus* em 5

minutos. O 1,8-cineol ou eucaliptol é um produto natural constituinte também do óleo essencial das folhas de várias espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae).

Pesquisadores continuaram procurando fontes alternativas ao óleo essencial de capim-gordura em espécies de eucalipto cultivadas no Brasil ricas em eucaliptol e desenvolveram concentrados emulsionáveis que se diluem facilmente em água, possibilitando sua aplicação no gado. Os concentrados apresentaram eficiência elevada nos testes desenvolvidos na Embrapa Gado de Leite, sob orientação do pesquisador John Furlong. Estes possuem também potencial para combater pragas de grãos armazenados, a mosca-do-chifre, o berne e endoparasitas de caprinos, ovinos e bovinos.

2.2.5- Rotação de Pastagem

A rotação de pastagem auxilia no controle do carrapato, já que desfavorece o fechamento do seu ciclo. No sistema extensivo, em que os animais permanecem sempre na mesma pastagem, eles são constantemente reinfestados por parasitas, principalmente vermes gastrintestinais e carrapatos, já que o hospedeiro está sempre presente. Quando o bovino fica ausente em um piquete por um determinado período, as larvas de *R. (B.) microplus* não encontram o hospedeiro e têm sua população diminuída pela ação dos inimigos naturais e pela ação do próprio ambiente. Períodos secos, chuvosos, ou muito frios interferem negativamente na longevidade das larvas, que sucumbem na ausência do hospedeiro (Abreu Jr., 1998).

Em sistemas de pastoreio rotativo como o Voisin, pesquisadores relatam que ocorre uma redução na ocorrência de carrapatos (Machado, 2004; Eli, 2005). Embora nesse sistema haja uma alta concentração de animais, a permanente mudança de piquetes e o pastoreamento a fundo dos mesmos, dificultam o ciclo evolutivo deste parasito (Machado, 2004). Outra forma de manter as pastagens limpas de carrapatos é alternar o pastoreio dos bovinos com ovinos, caprinos ou eqüinos, que fazem um pastejo diferente, obtendo o alimento bem junto ao solo (González, 1975).

2.2.6- Controle biológico do carrapato dos bovinos

Existem várias alternativas para controle de *R. (B.) microplus*, que associadas podem reduzir a população do mesmo a um limite aceitável e compatível com a produção. Os predadores naturais desempenham um papel importante. Vários predadores vertebrados (aves, ratos, camundongos e sapos) e invertebrados (formigas e aranhas) foram apontados como predadores potenciais de fêmeas, parcial ou totalmente ingurgitadas e de ovos de *R. (B.) microplus*. Entre esses inimigos naturais destacam-se aves como a garça-vaqueira (*Egretta ibis*) e a galinha doméstica (*Gallus domesticus*) (Veríssimo, 2004). Outras aves relatadas como predadoras de carrapatos são: *Quiscalus crassirostris*, *Crotophagaani* sp, *Buphagus africanus*, *B. erythrorhynchus*, *Cyanopica cyana* e *Dives atrovioleaceus* (Arenales, 2003). É importante lembrar que a atuação desses inimigos naturais depende da existência de um ambiente favorável a eles, o que exclui a utilização de agrotóxicos. O uso intensivo e contínuo de carrapaticidas e outros agrotóxicos promovem a eliminação de diversos seres vivos presentes no solo, que são predadores das larvas de carrapato. Desta forma, os ovos viáveis depositados pela fêmea do carrapato não encontram nenhum predador e têm ambiente propício para continuidade de seu ciclo. Em um solo saudável, no entanto, estão presentes diversos predadores como: cochonilhas (Hemiptera); aranhas (*Toutona triangulosa*, *Tegenaria domestica* e *Lycosa* sp); insetos hemípteros (família Reduviidae); coleópteros (família Carabidae, Histeridae e Dermestidae); mariposas (*Tinoola bisolliola*); formigas carnívoras (*Pheidole megacephala*); e vespas (família Encyrtidae) (Arenales, 2003).

Samish et al. (2004) mostraram que os carrapatos têm numerosos inimigos naturais e patógenos. Alguns resultados em laboratório sugerem que várias bactérias são patogênicas a carrapatos, mas o seu modo de ação e seu valor potencial precisam ser ainda determinados para uso no controle biológico.

Os fungos entomopatogênicos englobam cerca de 90 gêneros e 700 espécies, estando entre os bioagentes mais utilizados no controle biológico de pragas. Esses fungos não são prejudiciais ao homem e outros animais homeotermos, pois dificilmente conseguem se desenvolver na faixa de temperatura

dos diferentes mamíferos (Alves, 1988). Os fungos entomopatogênicos mais promissores apontados, *Metarhizium anisopliae* (Metchnikof) e *Beauveria bassiana* (Balsamo), estão comercialmente disponíveis para o controle de alguns insetos-praga, no entanto, o desenvolvimento de formulações efetivas destes fungos para administração no carrapato faz-se necessário. Frazzon et al. (2000) estudando o efeito de vários isolados de *M. anisopliae* sobre fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* obtiveram 100% de mortalidade quando utilizaram 10^7 esporos/mL do isolado E6S1.

Existe também boa perspectiva quanto ao uso dos nematóides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae no controle desses ectoparasitas.

2.3- Nematóides Entomopatogênicos (NEPs)

Há estudos demonstrando que as interações entre nematóides e insetos já ocorrem desde, provavelmente, 300 milhões de anos, período Carbonífero (Ferraz, 1998). A primeira publicação foi feita por Aldrovandus (1623), quando o autor relatou vermes alongados, emergindo dos corpos de gafanhotos mortos. Existem mais de 30 famílias de nematóides associadas com insetos incluindo parasitas de animais e plantas que utilizam insetos como vetores, sendo que nove destas possuem potencial como agente de controle biológico (Kaya & Stock, 1988). Dentre estas, mais atenção tem sido dada a duas famílias: Steinernematidae, que compreende os gêneros, *Steinernema* Travassos e *Neosteinerema* Nguyen & Smart, e Heterorhabditidae, com apenas o gênero *Heterorhabditis* Poinar. Estas famílias possuem associação patogênica com artrópodes e seus membros são chamados de nematóides entomopatogênicos, causando morte de diferentes hospedeiros com rapidez (24 a 72 horas) (Dowds & Peters, 2002). Atualmente existem descritas e reconhecidas 43 espécies do gênero *Steinernema*, uma do gênero *Neosteinerema* e 14 espécies do gênero *Heterorhabditis* (Adams et al., 2006).

Segundo Aguillera et al. (2003), nematóides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* continuam a despertar interesse de empresas em todo mundo que estão produzindo e comercializando produtos à base de NEPs para uso em culturas

de alto valor comercial ou naquelas em que o uso de inseticidas químicos não é adequado.

Os NEPs dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são associados mutualisticamente com enterobactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente. Os juvenis infectantes (JIs) transportam estas células bacterianas em seus intestinos (Burnell & Stock, 2000).

Em ambos os gêneros, o ciclo no hospedeiro se inicia pelos juvenis de terceiro estágio no solo, também chamados de juvenis infectantes (JIs). Esses nematóides de vida-livre não se alimentam e possuem uma série de atributos, como: receptores que são móveis, são altamente virulentos, podem ser facilmente cultivados *in vitro*, têm alto potencial reprodutivo, possuem um amplo espectro de hospedeiros (Gaugler, 1981; 1988), no entanto, são bastante específicos não causando, portanto mortalidade indiscriminada (Peters, 1996); são seguros para vertebrados, plantas e outros organismos não alvo (Poinar, 1989; Akhurst, 1990), são isentos de registro nos Estados Unidos (Gorsuch, 1982), são facilmente aplicados usando equipamento de irrigação (Georgis, 1990) e são compatíveis com muitos pesticidas (Forschler, 1990; Hara, 1983; Rovesti, 1988; 1990; Zimmerman, 1990).

Os JIs penetram em seus insetos hospedeiros através das aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos) e migram até a hemocele. No entanto, os JIs de *Heterorhabditis* podem penetrar também diretamente pelo tegumento, devido à presença de um dente quitinoso na sua extremidade anterior (Kaya & Gaugler, 1993). Uma vez dentro da hemocele do hospedeiro os JIs liberam células da bactéria simbiote. As bactérias então se multiplicam e produzem toxinas e compostos antimicrobianos (Burman, 1982). Após seu crescimento exponencial, os nematóides se alimentam delas e dos tecidos do inseto em decomposição e se transformam em juvenis de quarto estágio (J4). No gênero *Heterorhabditis* a primeira geração é formada por hermafroditas. Essas hermafroditas se autofecundam, produzem ovos que darão origem a juvenis (J1, J2, J3 e J4), que se desenvolvem em adultos anfimíticos de segunda geração, machos e fêmeas. Dados sobre a determinação do sexo neste gênero sugerem que o fenótipo sexual é determinado principalmente pelo ambiente (Burnell & Stock, 2000). Após o acasalamento destes, surgem novamente os juvenis que depois de se alimentarem do que restou do cadáver do inseto, vão

para o solo em busca de novos hospedeiros completando o ciclo (Adams & Nguyen, 2002). Os juvenis infectantes no solo podem permanecer por vários meses até encontrar um novo hospedeiro (Kaya, 1990).

O ciclo de vida das espécies de *Steinernema* é semelhante ao descrito anteriormente, contudo os JIs penetram no hospedeiro somente pelas aberturas naturais. Neste gênero a reprodução é sempre anfimítica e o J4 da primeira geração se desenvolve em machos ou fêmeas.

2.3.1- Comportamento ecológico de NEPs

O comportamento e ecologia dos NEPs têm sido estudados na tentativa de torná-los cada vez melhores como agentes de controle biológico. A maioria dos trabalhos tem focado em interações comportamentais destes nematóides com seus hospedeiros (Lewis et al., 2006).

Muitos artigos publicados nesta área têm ressaltado que os nematóides entomopatogênicos possuem grande potencial como agentes de controle biológico, no entanto por causa das "brechas" no conhecimento de seu comportamento de busca (ou estratégia de infecção, associação com o hospedeiro, etc.), esse potencial não tem sido aproveitado de maneira satisfatória (Lewis et al., 2006). Apenas recentemente os NEPs têm sido utilizados em estudos básicos, onde são vistos como organismos modelo, respondendo a questões sobre biologia parasitária em geral. Não se pode conhecer todos os aspectos biológicos de todas as espécies de NEPs, entretanto, pode-se coletar e entender as informações de um determinado organismo com que se trabalha. É importante entender tais questões para que se possa incrementar o sucesso destes organismos como agentes de controle biológico.

O comportamento específico usado pelos JIs para procurar e achar o hospedeiro pode variar dependendo da espécie de nematóide (Ramos-Rodriguez et al., 2007). De acordo com Lewis et al. (1992) e Lewis et al. (1995), os nematóides entomopatogênicos podem ser divididos em duas categorias segundo suas estratégias de busca pelo hospedeiro: (1) "cruiser", que busca ativamente seu hospedeiro movimentando-se no ambiente e com curtas pausas para procura; (2) "ambusher", que se locomove pouco no ambiente exibindo ainda o comportamento

de nictação (“senta-e-espera”) onde o nematóide ergue o corpo ficando apoiado em sua cauda, movendo apenas a região anterior, e na presença do hospedeiro “salta” em sua direção. Existem autores que consideram também a estratégia intermediária, onde os nematóides buscam o hospedeiro e param para nictar (Grewal et al., 1994).

Observações feitas por Grewal et al. (1994) em laboratório, mostraram que nematóides “cruiser” percebem melhor seu hospedeiro através de quimiorrecepção (sem contato prévio com hospedeiro) e seu comportamento é mais eficiente em substratos arenosos, quando comparado ao papel filtro como substrato. Já os “ambusher” são mais eficientes em papel filtro como substrato e mostraram-se menos sensíveis à quimiorrecepção.

A habilidade de *S. glaseri* Steiner em localizar efetivamente e parasitar hospedeiros relativamente sedentários como, por exemplo, larvas de *Popillia japonica* Newman (Georgis & Gaugler, 1991), e sua forte resposta a compostos químicos provenientes do hospedeiro (Lewis et al. 1992, Grewal et al. 1993) sugerem que estes nematóides utilizam a estratégia “cruiser” para localizar seus hospedeiros. Seguindo esta mesma abordagem, Campbell & Gaugler (1993) agruparam *S. feltiae* Filipjev, e *H. bacteriophora* Poinar como “cruisers”. No entanto, a baixa resposta a sugestões do hospedeiro por *S. carpocapsae* (Weiser) e *S. scapterisci* Nguyen e Smart e sua habilidade para nictar em um substrato áspero sugerem que estas espécies utilizam uma abordagem “ambusher” para encontrar seus hospedeiros (Lewis et al., 1992; 1993; Grewal et al., 1993 Campbell e Gaugler, 1993).

Em *Steinernema*, o comportamento “ambusher” ocorre provavelmente em pelo menos oito espécies, ocorrendo com observações comprovadas somente em *S. carpocapsae*, *S. scapterisci* e *S. siamkayai* Stock, Somsook e Reid (Campbell e Kaya, 2002). O “salto” ocorre quando um J1 está na espera e o hospedeiro passa por ele (Campbell e Kaya, 1999 a; b; 2000). A frequência de “saltos”, assim como o comportamento de espera, varia entre espécies de *Steinernema*, contudo nunca foi relatado em *Heterorhabditis* (Campbell & Kaya, 2002), mas não existe um motivo *a priori* para suspeitar que não pudesse ocorrer em espécies desse gênero (Lewis et al., 2006).

A eficácia dos NEPs a campo pode ser melhorada simplesmente pela combinação de espécies e linhagens de nematóides contra aqueles insetos que eles

estejam melhor adaptados. Esta abordagem requer entendimento de como os NEPs localizam, identificam e avaliam o hospedeiro. O que se chama de processo de infecção, deveria ser entendido como seleção e busca específica pelo hospedeiro, comportamento de reconhecimento e ligação do hospedeiro (Kaya e Gaugler, 1993).

A seleção do hospedeiro pelo nematóide segue uma seqüência de fases que incluem procura pelo habitat, aceitação e susceptibilidade do hospedeiro (Christen et al. 2007). Este modelo tem sido adotado amplamente e tem se mostrado útil para se entender o comportamento de busca de parasitóides (Godfray, 1994), trematódeos (Combes et al., 2002) e nematóides entomopatogênicos (Campbell e Lewis, 2002).

A primeira fase do comportamento é a procura do hospedeiro, a qual começa com a seleção do habitat, presumivelmente a mais importante fase que restringe os nematóides de alcançar o hospedeiro (Kaya & Gaugler, 1993). Algumas espécies parecem preferir procurar seus hospedeiros na superfície do solo ou perto deste como *S. carpocapsae*, por exemplo (Moyle & Kaya, 1981), ao passo que outras estão adaptadas a realizar esta procura de forma mais profunda no perfil do solo, como por exemplo, *H. bacteriophora* (Choo et al., 1989).

A segunda fase na seleção do hospedeiro é a ligação do nematóide ao inseto-hospedeiro alvo, ou seja, o contato do nematóide com a cutícula deste. Apesar do contato do nematóide ao inseto ser um pré-requisito para infecção, esta importante fase permanece sem estudo (Kaya e Gaugler, 1993).

A terceira fase ainda na seleção do hospedeiro é o reconhecimento. Superfícies de carboidratos atraem a atenção e produzem uma especificidade essencial nos NEPs em reconhecer espécies de hospedeiros. No entanto, o papel dos órgãos sensoriais e do(s) mecanismo(s) de reconhecimento do hospedeiro durante a procura e ligação dos NEPs ainda permanece pouco conhecido (Kaya e Gaugler, 1993). Com relação a atrativos, alguns fatores têm mostrado influenciar o comportamento dos JIs, e estes fatores incluem CO₂, gradientes de temperatura e fezes do hospedeiro (Gaugler et al., 1980; Byers e Poinar, 1982; Grewal et al., 1993; Lewis., 1993).

Dando seqüência à seleção do hospedeiro, tem-se a penetração; NEPs utilizam as aberturas oral ou anal e devem atravessar a parede do intestino. A penetração pode potencialmente ser fatal para o nematóide devido à defesa

específica de cada inseto (uma composição letal do fluido do intestino ou uma forte resposta imune contra o nematóide) ou algumas outras condições que poderiam interromper a infecção do nematóide (Lewis et al., 2006). Para os NEPs o processo de busca pelo habitat do hospedeiro (Kaya, 1990; Rasmann et al., 2005) e busca pelo hospedeiro (Campbell & Lewis, 2002) são melhor entendidos do que o processo de aceitação do hospedeiro. No entanto, o nível de aceitação do hospedeiro é de extrema importância no processo de infecção dos NEPs. Depois de encontrar o hospedeiro, os JIs precisam fazer uma decisão irreversível sobre se infectam ou não aquele hospedeiro (Christen et al., 2007).

Existem muitos outros fatores que afetam a penetração, como o nível fisiológico do inseto ou o impacto da espessura da cutícula do inseto (Glazer, 1997). Dependendo da espécie de nematóide e hospedeiro, diferentes rotas de penetração são tomadas. Duas rotas de entrada conhecidas são a da boca e a do ânus. A largura das aberturas pode excluir JIs (Eidt & Thurston, 1995) e as mandíbulas podem esmagar os nematóides e matá-los (Gaugler & Molloy, 1981). Usando o ânus como porta de entrada se evita os problemas anteriores, sendo esta a principal rota em larvas voadoras e minadoras de folhas (Renn, 1998). Mesmo assim, a freqüente defecação pode expelir os nematóides evitando sua entrada pelo ânus. Portanto, a invasão em geral é mais bem-sucedida via abertura oral do que via ânus (Cui et al., 1993; Georgis & Hague, 1981). Alternativamente, NEPs podem entrar no sistema traqueal via espiráculos (Lewis et al., 2006).

Outro local de penetração utilizado pelos NEPs é o integumento ou membranas intersegmentadas do inseto. A penetração através do integumento foi demonstrada ser a principal rota de entrada de *S. feltiae* em *Tipula paludosa* (Lewis et al., 2006).

2.3.2- Controle Biológico de insetos-praga com a utilização de NEPs

O uso de NEPs para o controle de pragas agrícolas já vêm sendo feito há algum tempo (Kaya & Gaugler, 1993). Nos últimos dez anos os estudos vêm sendo realizados não só em laboratório, como também em aplicações a campo (McCoy et al., 2000).

Em termos de segurança, estes nematóides são considerados ambientalmente seguros e não tóxicos para vertebrados, estando assim isentos de registro e regulamentações na maioria dos países, simplificando assim sua utilização e o desenvolvimento de novas formulações (Dolinski & Moino Jr., 2006).

Cerca de 90 empresas sediadas nos Estados Unidos, Canadá, Austrália, Suíça, República Tcheca, Itália, Reino Unido, Suécia, Dinamarca, Alemanha, Holanda, Cuba, Israel e Japão produzem nematóides em nível comercial para o controle de diversas pragas agrícolas e alguns parasitas de importância veterinária e saúde pública (Georgis, 1992; Georgis & Manweiler, 1994; Glazer & Lewis, 2000; Stock, 2001).

Nos Estados Unidos, Shapiro-ilan et al. (2003) testaram em laboratório 15 isolados de quatro espécies de nematóides entomopatogênicos contra larvas de besouros curculionídeos em plantações de pêsego (*Prunus persica*). A mortalidade das larvas foi de 30% para todos os isolados. Anteriormente foram testadas a eficiência e persistência de três espécies de NEPs, *S. riobrave* (Cabanillas, Poinar & Raulston), *H. bacteriophora* e *H. indica*, produzidos comercialmente na América do Norte e aplicados a campo em *Citrus* sp. Os nematóides foram aspergidos no solo, em concentrações variando de 11 a 216 juvenis/cm² abaixo das copas das árvores. O número de nematóides no solo diminuiu com o passar dos dias e até o 14^o dia foram observados nematóides vivos no campo. Em concentrações acima de 54 JI/cm², foi observada eficiência dos nematóides (McCoy et al., 2000).

Fallon et al. (2006) utilizaram quatro espécies de *Steinernema* sp. e duas espécies de *Heterorhabditis* sp., para o controle da praga do algodão *Plectrodera scallator* (Fabricius) (Coleoptera: Cerambycidae). A mortalidade nos tratamentos variou de 0-58%.

A virulência de *S. scarabei* Stock & Koppenhöfer, *H. zelandica* Poinar e *H. bacteriophora* foi verificada em laboratório e em casa de vegetação por Koppenhöfer et al. (2006) contra cinco espécies de besouros escarabeídeos. Os nematóides *H. bacteriophora* e *H. zelandica* foram virulentos para quatro das cinco espécies de besouro; *S. scarabei* apresentou baixa virulência para uma espécie de besouro e alta para as outras.

Na América Latina vários nematóides entomopatogênicos têm sido encontrados atacando insetos e isolados a partir dos hospedeiros ou do solo. Ressaltando-se o trabalho realizado por Travassos no Brasil, transferindo a espécie *Aplectana krausse* para um novo gênero por ele denominado *Steinernema*. Um provável *Heterorhabditis* sp. foi encontrado atacando a broca do algodoeiro, *Eutinobothrus brasiliensis* (Hambleton) (Coleoptera: Curculionidae), mas foi descrito erroneamente por Pereira (1937) como *Rhabditis hambletoni*.

A espécie *S. scapterisci* Nguyen & Smart foi primeiramente encontrada no Brasil e no Uruguai atacando a paquinha *Neocurtilla hexadactyla* (Perty) (Orthoptera: Grylotalpidae) (Fowler & Garcia, 1988), e em seguida na Argentina parasitando o mesmo hospedeiro (Stock, 1992). Esse nematóide mostrou ser um parasita bem adaptado ao inseto, sendo patenteado para exploração comercial visando o controle dessa praga. Atualmente, *S. scapterisci* é utilizado em larga escala nos Estados Unidos para o controle de paquinhos em campos de golfe e pastagem.

Na região dos Pampas na Argentina foi feito um levantamento de nematóides entomopatogênicos coletando-se 310 amostras de solo de 14 localidades, além de 264 insetos encontrados ao longo dos percursos, para serem checados quanto à presença desses patógenos. Nematóides entomopatogênicos foram encontrados em 41 amostras, sendo 65,9 % steinernematídeos (*S. feltiae*, *S. carpocapsae* e *S. scapterisci*) e 34,1 % heterorhabditídeos (*H. bacteriophora* e *H. argentinensis* Stock). Solos pesados apresentaram nematóides em 19 ocasiões, enquanto que em solos arenosos, 22 ocasiões. Nenhum nematóide foi encontrado em solo argiloso. Nematóides da família Steinernematidae e Heterorhabditidae foram encontrados em 27 dos 264 insetos coletados no levantamento. Esses nematóides foram isolados de larvas de curculionídeos em alfafa, larvas de escarabeídeos e ninfas da paquinha *N. hexadactyla* (Stock, 1995).

Doucet et al. (1996) encontraram uma nova população de *H. bacteriophora* na região de Rio Negro, Argentina que apresentou algumas diferenças morfológicas comparadas à população de Córdoba, incluindo o fato de os insetos parasitados pela primeira população não apresentarem luminescência e não mudarem de cor.

No Brasil, Schmitt et al. (1992) conseguiram bons níveis de controle de *Cosmopolites sordidus* (moleque da bananeira) com a aplicação de *S. carpocapsae*

em iscas. Passos Jr. et al., (1995) estudaram o efeito da aplicação de *S. carpocapsae* sobre a saúva-limão (*Atta sexdens rubropilosa*), sem muito êxito. A utilização de nematóides nativos deve ter prioridade sobre os exóticos que devem ser aplicados em último caso. Nematóides nativos já estão adaptados às condições climáticas e à entomofauna local (Dolinski, 2006). No Brasil, o isolamento de NEPs foi feito em Rondônia (Machado & Dolinski, 2005), Minas Gerais (Acevedo et al., 2005), Rio de Janeiro e São Paulo, tratando-se em sua maioria de heterorhabditídeos.

Dolinski et al. (2006) testaram a virulência de nove espécies de NEPs contra uma praga da goiaba (Coleoptera: Curculionidae) em laboratório e em casa de vegetação. Em laboratório as maiores mortalidades alcançadas foram observadas para *Heterorhabditis baujardi* LPP7 Phan et al. 2003, *H. indica* Hom1 e *H. indica* LPP1. Em casa de vegetação foi testado apenas *H. baujardi* LPP7, nas concentrações de 500, 1000 e 2000 JI/ 50 mL, sendo que as concentrações de 1000 e 2000 JI/ 50 mL por vaso alcançaram uma mortalidade de 60% das larvas do besouro.

2.3.3- Controle biológico do carrapato bovino com NEPs

A maioria dos trabalhos relacionados com o controle biológico de carrapatos por nematóides entomopatogênicos apresenta poucos dados sobre a interferência dos nematóides na biologia reprodutiva das fêmeas dos carrapatos. Os dados de literatura são geralmente sobre a taxa de mortalidade, quantidade de nematóides utilizados, tempo de exposição e quais espécies e isolados utilizados.

Os NEPs foram testados em várias fases e estágios de vida do carrapato e a fêmea ingurgitada demonstrou ser a fase mais susceptível aos nematóides. Durante a fase parasitária os carrapatos foram extremamente resistentes e seus ovos também não foram afetados (Samish et al., 2004).

Samish et al., (2000a) avaliaram a virulência de *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* e *Heterorhabditis* sp. S3 e IS5 a quatro espécies de carrapatos *B. annulatus* Say, *Hyalomma excavatum* Koch, *Rhipicephalus bursa* Canestrini & Fanzago e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille. Para todos os carrapatos foram

utilizadas as concentrações de 200, 1000 e 5000 JIs. A mortalidade dos carrapatos aconteceu em média após sete dias de exposição. *B. annulatus* obteve 90% de mortalidade na concentração de 200 JIs para todos os nematóides testados. Para os demais carrapatos apenas a concentração de 5000 JIs apresentou mortalidade de 90%. Em outro trabalho foi comprovada a susceptibilidade de treze espécies de ixodídeos e duas espécies de argasídeos aos nematóides entomopatogênicos (Samish & Glazer, 2001).

A virulência de isolados de NEPs (três heterorhabditídeos e seis steinernematídeos) a fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus* referentes a três parâmetros do processo de infecção foram relatados por Glazer et al., (2001): o efeito do tempo de exposição sobre a mortalidade dos carrapatos, com melhor resultado para os isolados de heterorhabditídeos; a quantidade de nematóides que penetram nos carrapatos, que variou de 16 a 141; e a taxa de mortalidade depois da injeção de 1, 2 ou 3 nematóides, onde um juvenil de *Heterorhabditis* sp. causou a morte do carrapato. O mesmo não foi observado para as espécies de *Steinernema*.

Dois isolados de *S. carpocapsae* Santa Rosa e ALL foram testados por Freitas-Ribeiro et al., (2005) em *R. (B.) microplus*, analisando os efeitos dos nematóides sobre parâmetros biológicos do carrapato. Foram utilizadas as concentrações de 600, 3000 e 30.000 JIs dispersos em 2 mL de água destilada por placa de Petri com areia. Todos os parâmetros analisados (peso da massa de ovos, índice eficiência reprodutiva e tempo de sobrevivência) tiveram valores reduzidos, em ambos os isolados quando comparados ao controle.

Pesquisa realizada por Vasconcelos et al. (2004) com duas espécies de nematóides entomopatogênicos, *S. glaseri* e *H. bacteriophora* avaliou a mortalidade das fêmeas, peso da massa de ovos, período de pré-postura, porcentagem de eclosão e índices de eficiência reprodutiva e nutricional de *R. (B.) microplus*. Neste trabalho foram utilizadas sete concentrações de nematóides (375, 500, 750, 1500, 2500, 5000 e 25.000) colocados em areia umedecida com água destilada em placa de Petri. O estudo mostrou que os nematóides foram eficientes no controle do carrapato, causando alta mortalidade e baixo peso da massa de ovos.

A associação de um nematóide entomopatogênico com um carrapaticida foi testada por Reis (2005) para o controle de *R. (B.) microplus* e foram avaliados os

parâmetros mortalidade das fêmeas, peso da massa de ovos, período de pré-postura, porcentagem de eclosão e índices de eficiência reprodutiva e nutricional. Neste estudo foi utilizado *S. glaseri* nas concentrações de 10.000 JIs dispersos em 3 mL de água destilada, juntamente com um carrapaticida organofosforado em cinco diluições (dose comercial, metade, quarta, oitava e décima sexta parte da dose comercial). Os carrapatos foram submersos nessa solução por cinco minutos, depois transferidos para placas de Petri com papel filtro e incubados em câmaras climatizadas. Os tratamentos apresentaram mortalidade de 99,8-100% e redução em todos os valores dos parâmetros analisados. O acaricida não afetou a viabilidade do nematóide e aumentou sua eficiência nos tratamentos com doses mais baixas de carrapaticida. Neste trabalho também foi relatado pela primeira vez na literatura que um nematóide entomopatogênico conseguiu completar seu ciclo biológico, com juvenis emergindo em um hospedeiro que não um inseto. Este fato ocorreu para associação com as concentrações de 1/8 e 1/16 da dose comercial com 10.000 JIs de *S. glaseri*.

Alekseev et al. (2006) mostraram que vários experimentos em laboratório utilizando nematóides entomopatogênicos no controle de carrapatos apresentaram resultados satisfatórios, mas quando repetidos a campo os resultados não foram os mesmos. Segundo os autores, isto aconteceu porque em laboratório são oferecidas condições ideais para o estudo, não levando em consideração fatores adversos que ocorrem no solo. Foram conduzidos experimentos em casa de vegetação, a fim de avaliar o efeito da textura e umidade do solo na atividade de diferentes nematóides em controlar fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus*, sendo testadas três espécies de heterorhabditídeos, e três de steinernematídeos. Todas as espécies de nematóides não penetraram mais que 6 cm no solo, e a maior taxa de mortalidade foi para os dois isolados nativos de *Heterorhabditis* (maior que 85%), enquanto que para as outras espécies não passou de 50%.

Silva (2006) verificou a ação do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LPP1 sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino testando diferentes concentrações (375, 750, 1.500, 3.000, 6.000, 12.000 e 24.000) de JIs. Todas as concentrações apresentaram eficácia de controle acima de 95%. Os pesos finais mostraram diferença entre o grupo controle e os

grupos tratados, o que não ocorreu entre os tratamentos. No peso da fêmea e no índice nutricional houve diferença entre o grupo controle e os grupos tratados, aumentando com a maior quantidade de nematóides. Tanto para período de postura quanto para período de sobrevivência foi evidenciada uma redução. A massa de ovos e a porcentagem de eclosão larval foram reduzidas. O índice de produção de ovos do grupo controle mostrou-se semelhante à menor concentração e diferente entre os demais tratamentos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

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

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

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

Foram utilizados os nematóides *H. baujardi* LPP7 e *H. indica* LPP4, provenientes da Floresta Amazônica (Monte Negro-RO) e foram identificados com base na morfologia e biologia molecular (Dolinski et al. 2008). Os nematóides foram multiplicados em larvas no 7º instar de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) provenientes da criação mantida no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia/Nematologia da UENF, utilizando-se 100 JIs diluídos em 0,5 mL de água destilada para cada 5 larvas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com papel filtro no fundo (Whatman nº1) e acondicionadas em câmara climatizada a

$27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%, durante 48 horas (Figura 5). Após a morte das larvas, estas foram transferidas para armadilhas modificadas de White (White, 1927) e acondicionadas nas mesmas condições supracitadas. Após 11 a 12 dias, quando os primeiros juvenis infectantes começaram a emergir dos cadáveres de *G. mellonella*, foram realizadas coletas destes, em dias alternados, utilizando-se pipetas Pasteur. Os JIs foram acondicionados em garrafas de cultura de células (40 mL) e armazenados em câmara climatizada a $16 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80% por até uma semana antes dos testes (Figura 5).

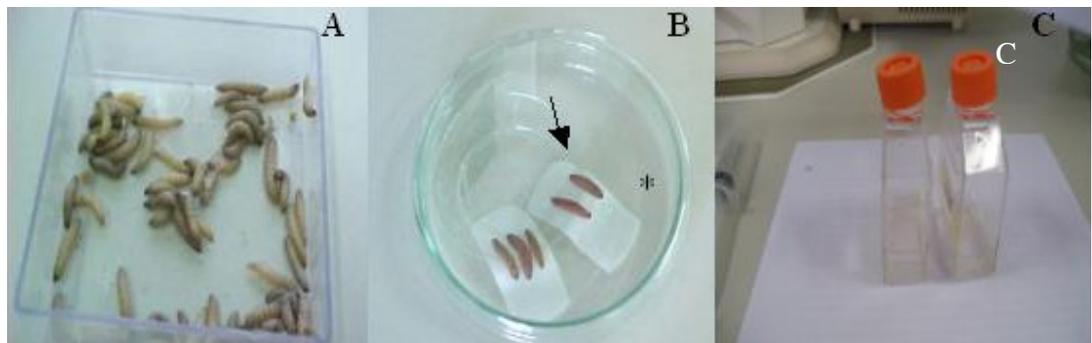


Figura 5. Procedimento para multiplicação dos nematóides *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *H. indica* LPP4. A. Larvas de *Galleria mellonella* no 7^o instar utilizadas na multiplicação dos nematóides; B. Armadilha de White modificada, sendo evidenciada no asterisco (*) o local onde os juvenis infectantes são coletados e na seta (→) as larvas de *Galleria mellonella* mortas; C. Detalhe do armazenamento dos juvenis em garrafas de culturas de células (40 mL).

3.2- Procedimento experimental

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

se a solução a cada coleta. Para a obtenção das concentrações mais baixas (15, 30 e 60 JIs), os juvenis foram coletados manualmente com o auxílio de bambu.

Foram utilizadas oito placas com 24 orifícios cada, aos quais foram adicionados 4 g de areia peneirada e autoclavada. Cada placa representou um tratamento ou concentração de JI. Para o controle foi utilizada a mesma placa com areia e 1 mL água destilada isenta de nematóides. Os nematóides foram adicionados à areia antes dos carrapatos (Figura 6).

Cada tratamento teve 24 repetições, sendo cada fêmea uma unidade experimental. Foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* desprendidas naturalmente do hospedeiro no dia anterior. As fêmeas foram separadas, pesadas e distribuídas de forma homogênea nas placas.

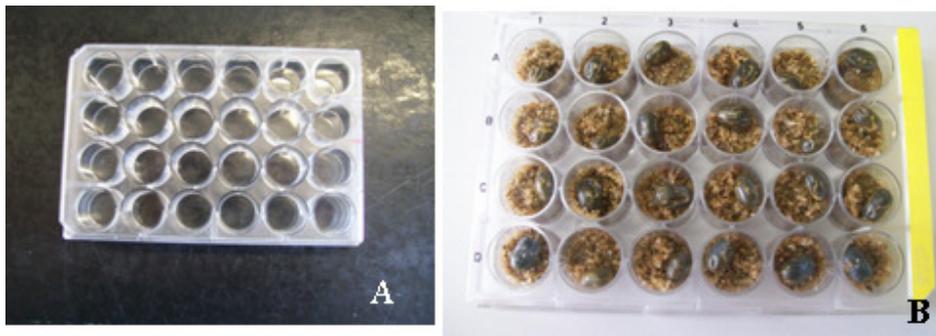


Figura 6. A. Detalhe do procedimento experimental utilizando placa de cultura de células com 24 orifícios utilizada nos experimentos; B. Placa com areia e carrapatos demonstrando um dos tratamentos.

As placas foram acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ a UR > 80%, durante um período de 72 horas. O processo de infecção foi observado durante as 72 horas de exposição aos nematóides em cada um dos tratamentos. Todas as observações feitas durante e após o processo de infecção foram fotografadas com a câmara digital Kodak® EasyShare C743 com Zoom óptico de 3X, com 7.1 Megapixels.

Após o período de exposição, as fêmeas foram individualmente acondicionadas em placas de Petri (5 cm de diâmetro) e dentro de cada placa foi colocado um separador feito de tiras de papel alumínio para isolar diariamente a

massa de ovos de cada fêmea (Figura 7). As fêmeas de *R. (B.) microplus* foram observadas diariamente até a última morte, anotando-se as datas de início e fim de postura para fêmeas que ovipositaram, data da morte e aspecto pós-morte, para todas as fêmeas. Foi observado também e fotografado o aspecto delas após infecção pelo nematóide.

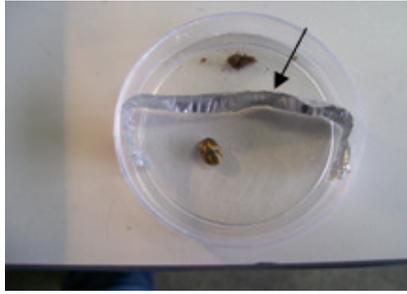


Figura 7. Detalhe da placa de Petri de 5 cm de diâmetro e do separador da massa de ovos confeccionado de tiras de papel alumínio (seta) utilizados para separar individualmente as fêmeas ingurgitadas do carrapato após as 72 horas de exposição ao nematóide.

As posturas foram separadas todos os dias, para se observar o último dia de postura de cada fêmea, e três dias após o final da postura a quenógina (fêmea do carrapato após ter feito a postura dos ovos) foi pesada. A postura total de cada fêmea foi pesada, identificada, acondicionada em seringa plástica adaptada e incubada em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80% (Figura 8).



Figura 8. Detalhe das seringas plásticas de 5 mL adaptadas e utilizadas para armazenamento de todos os ovos depositados durante o período reprodutivo das fêmeas de carrapatos.

Depois de 15 dias de incubação, as posturas foram revisadas diariamente, para observar e datar a eclosão da primeira larva e o período de incubação dos ovos de cada fêmea. Após o final da eclosão de todas as larvas foi feita a estimativa visual da eclosão das larvas para se obter o percentual de eclosão.

3.3- Parâmetros biológicos analisados das fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes

- **Peso inicial:** peso inicial de cada fêmea ingurgitada;
- **Peso da postura:** peso da massa de ovos total da fêmea;
- **Alteração do peso da fêmea:** alteração do peso da fêmea após final de postura (Peso inicial - Peso final);
- **Período de pré-postura:** período que compreende o dia da queda da fêmea ingurgitada até o dia do início da postura;
- **Período postura:** período que abrange o dia do início da postura até o dia da última ovoposição;
- **Período de sobrevivência:** período que compreende a data da queda da fêmea ingurgitada até o dia de sua morte;
- **Porcentual de controle (%C):** foi calculado segundo fórmula de Drummond et al., (1973):

$$\%C = \frac{ER^* \text{ Grupo controle} - ER^* \text{ Grupo tratado}}{ER^* \text{ grupo controle}}$$

$$ER = \frac{\text{Peso da massa de ovos} \times \% \text{ de eclosão} \times 20.000^*}{\text{Peso inicial das fêmeas}}$$

ER*= Reprodução estimada

* Constante que indica o número de ovos presentes em 1g de postura.

- **Mortalidade cumulativa:** Porcentual da mortalidade acumulada ao longo dos dias de todos os tratamentos e controle. A mortalidade foi registrada diariamente e constatada por meio da averiguação da ocorrência de reflexos nas patas e pela coloração geral do corpo das fêmeas.

Os valores finais correspondem às médias obtidas de cada unidade experimental de todos os tratamentos de cada parâmetro.

3.4- Análise estatística

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

4- RESULTADOS

Processo de Infecção

Durante o período entre 48 e 72 horas de exposição de fêmeas ingurgitadas susceptíveis e resistentes a carrapaticidas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos nematóides foram observadas, pela primeira vez, sendo penetradas, via espiráculo, por nematóides juvenis infectantes de *H. indica* LPP4 e *H. baujardi* LPP7. Sendo que essa observação e registros foram possíveis apenas na maior concentração de 960 JIs/ ♀ (Figura 9).

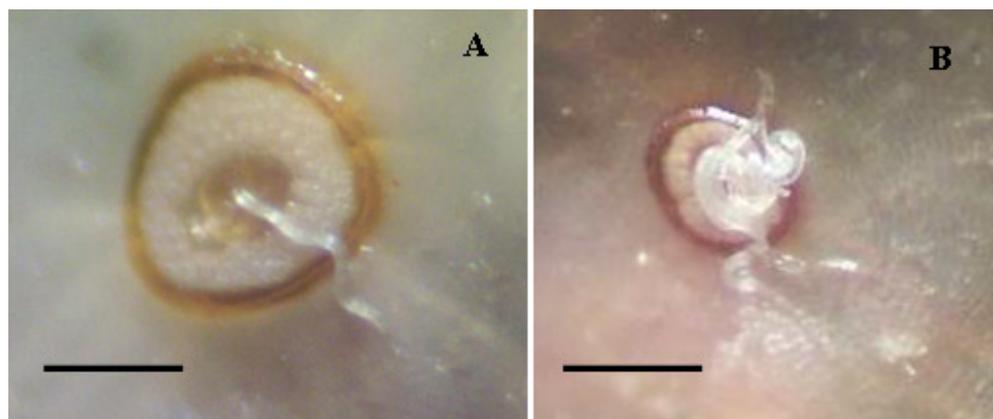


Figura 9. A. Foto do primeiro registro e detalhe da penetração, via espiráculo, do nematóide juvenil infectante em fêmea ingurgitada do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* susceptíveis e resistentes a carrapaticidas. (A)

Penetração de um único juvenil infectante de *Heterorhabditis indica* LPP4 pelo espiráculo e (B) Grupo de juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 penetrando no corpo da fêmea pelo espiráculo durante 72 horas de exposição ao nematóide. Barra = 1mm.

Uma semana após a infecção com ambas as linhagens de nematóides, foram observadas uma graduação na coloração de acordo com o aumento da concentração de JIs nas fêmeas de *R. (B.) microplus* e uma intensa coloração vermelha na maior concentração (960 JIs/ ♀) (Figura 10 e 11).



Figura 10. Gradação da coloração das fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infectadas com *Heterorhabditis baujardi* LPP7 de acordo com a concentração de juvenis infectantes (JIs) utilizados. Da esquerda para direita, controle, 15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 JIs/ ♀. Barra = 1mm.



Figura 11. Intensa coloração vermelha da fêmea do carrapato *R. (B.) microplus* observada no tratamento de maior concentração (960 JIs/ ♀). Foto em microscópio estereoscópico. Barra = 1mm.

Durante o período de postura das fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* observou-se que a massa de ovos das fêmeas do tratamento de maior concentração (960 JIs/ ♀) aparentava um estado alterado enquanto que a massa de ovos do grupo controle apresentava um aspecto normal (Figura 12).

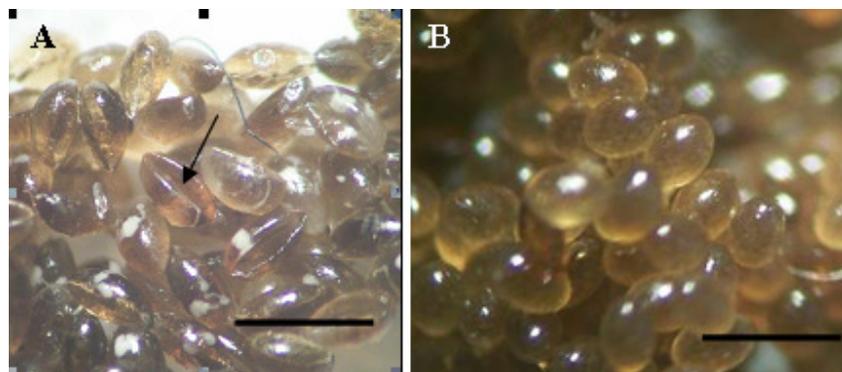


Figura 12. A. Aspecto alterado da massa de ovos de uma fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* observado no tratamento de maior concentração de juvenis infectantes (JIs) de *H. baujardi* LPP7 (960 JIs/ ♀) . Seta mostra ovo com sua casca afetada. **B.** Massa de ovos com aspecto normal de fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* do grupo controle. Foto em microscópio estereoscópico. Barra = 1mm.

Pesos iniciais

Não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos, nem entre os tratamentos nos testes com fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes ($P > 0,05$). Assim sendo, pôde-se continuar o experimento com as diferentes concentrações de NEPs e avaliar os parâmetros reprodutivos das fêmeas ingurgitadas (Figura 13 e 14).

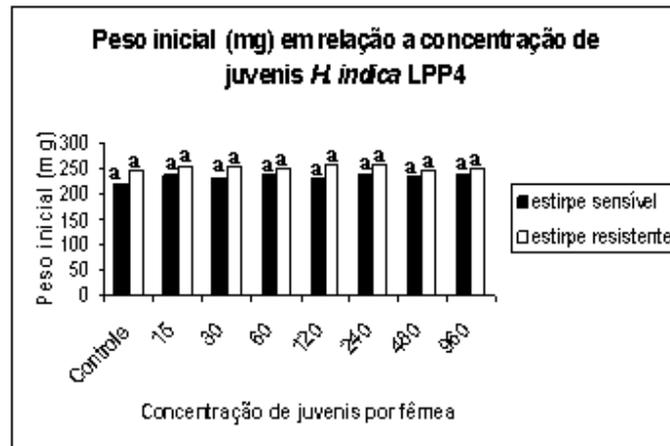


Figura 13. Peso inicial de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H. indica* LPP4.

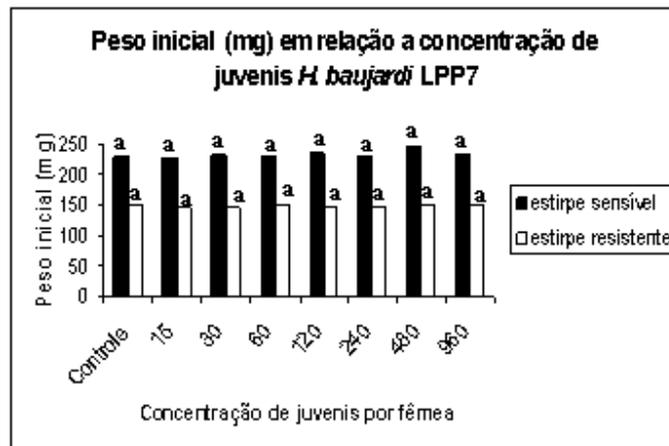


Figura 14. Peso inicial de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H. baujardi* LPP7.

Peso da Postura

- *Heterorhabditis indica* LPP4

Os tratamentos foram diferentes do controle a partir da concentração de 120 Jls/ ♀. A concentração que mais reduziu a massa de ovos foi a de 960 Jls/ ♀ (3,33 mg em média) (Figura 15).

Em fêmeas resistentes o peso da massa de ovos do controle diferiu estatisticamente da maioria dos tratamentos e a partir da concentração de 120 Jls/ ♀ os tratamentos foram diferentes do controle. A concentração de 960 Jls/ ♀ foi a mais eficaz reduzindo drasticamente a massa de ovos (6,83 mg em média) em comparação ao controle (Figura 15).

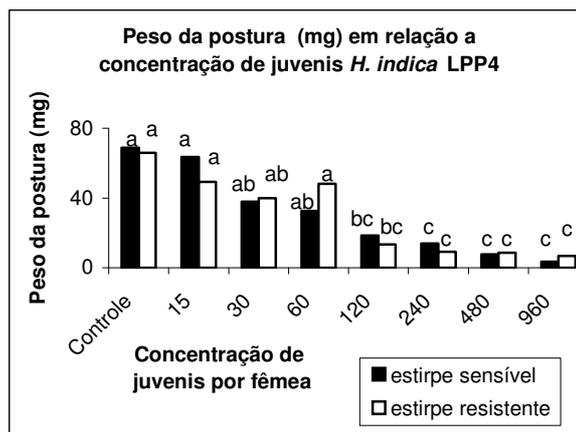


Figura 15. Peso da postura de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H.indica* LPP4.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

A partir da concentração de 15 Jls/ ♀ os tratamentos foram diferentes do controle. A concentração de 480 Jls/ ♀ foi a que mais reduziu a massa de ovos dessas fêmeas (12,58 mg em média), comparada ao controle (96,00 mg em média) (Figura 16).

O controle diferiu dos tratamentos acima de 15 Jls/ ♀ em fêmeas resistentes de *R. (B.) microplus*. A concentração que notavelmente reduziu a massa de ovos foi a de 960 Jls/ ♀ (Figura 16).

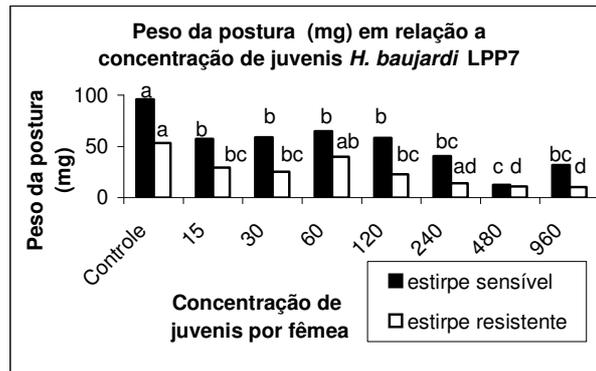


Figura 16. Peso da postura de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H. baujardi* LPP7.

Alteração do Peso

- *Heterorhabditis indica* LPP4

Na estirpe sensível foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos acima de 60 Jls/ ♀ e o controle, assim como entre a maioria dos tratamentos. A concentração que reduziu significativamente a alteração do peso foi a de 960 Jls/ ♀. Nesse tratamento, a fêmea não perdeu peso ovopositando e morreu precocemente com uma alteração de 23,16 mg em média em comparação com o controle, que teve uma alteração de peso em média de 164,71 mg (Figura 17).

Em fêmeas resistentes existiram diferenças entre o controle e os tratamentos a partir da concentração de 15 Jls/ ♀, assim como entre tratamentos. A concentração que mais alterou o peso foi a de 960 Jls/ ♀ com 37,04 mg em média, comparado ao controle com alteração de 97,08 mg em média (Figura 17).

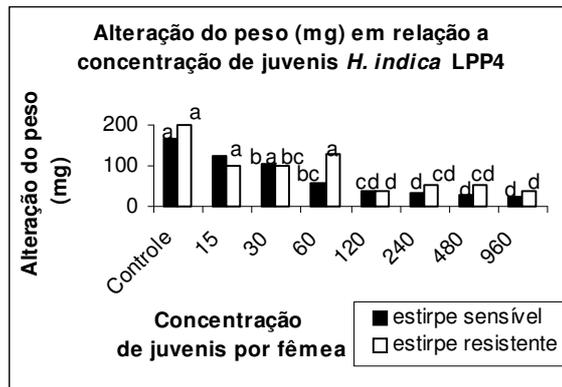


Figura 17. Alteração do peso de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H.indica* LPP4.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Foram notadas diferenças significativas em fêmeas sensíveis, o controle diferiu dos tratamentos acima de 240 JIs/ ♀ e a concentração de 480 JIs/ ♀ foi a que mais afetou a alteração de peso (76,33 mg em média) em comparação com o controle, com alteração média de 178, 50 mg (Figura 18).

Nas fêmeas resistentes o controle também diferiu dos tratamentos acima da concentração de 240 JIs/ ♀, e os tratamentos diferiram entre si. A concentração que mais diminuiu a alteração do peso foi a de 480 JIs/ ♀ (26,58 mg em média) em relação ao controle com 97,08 mg em média (Figura 18).

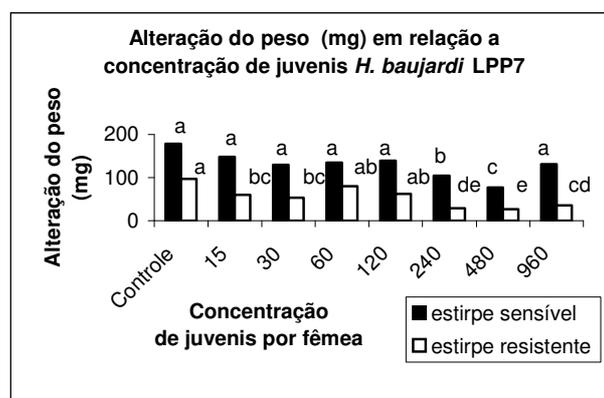


Figura 18. Alteração do peso de fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente em relação à concentração de juvenis de *H. baujardi* LPP7.

Período de Pré-Postura

- *Heterorhabditis indica* LPP4

O período de pré-postura em dias referentes à fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível e resistente tratadas com as concentrações de 15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 JIs/ ♀ de *Heterorhabditis indica* LPP4 e *Heterorhabditis baujardi* LPP7 não apresentou diferença significativa em relação ao controle (3,74 e 6,47, respectivamente), exceto para a concentração de 240 JIs/ ♀ utilizando *Heterorhabditis indica* LPP4 em fêmeas sensíveis (Figura 19).

Em fêmeas sensíveis a concentração de 240 JIs/ ♀ foi diferente do controle. As fêmeas tratadas com esta concentração tiveram seus períodos de pré-postura prolongados em média 5,12 dias (Figura 19).

Não houve diferenças significativas entre o controle e os tratamentos e nem entre os tratamentos em fêmeas resistentes do carrapato bovino (Figura 19).

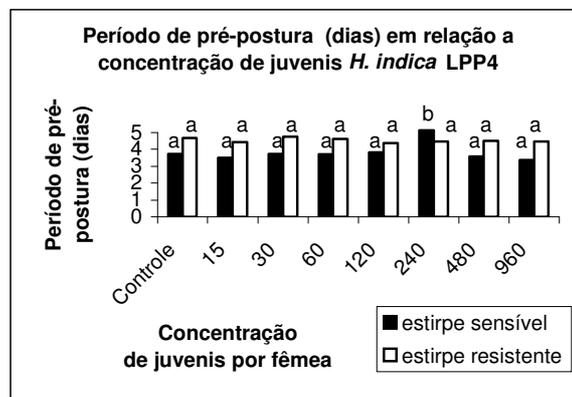


Figura 19. Período de pré-postura (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. indica* LPP4 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Em fêmeas sensíveis tratadas com *H. baujardi* LPP7 não foram observadas diferenças entre o controle e os tratamentos e nem entre os tratamentos (Figura 20).

Em fêmeas resistentes também não foram observadas diferenças entre o controle e os tratamentos e nem entre os tratamentos (Figura 20).

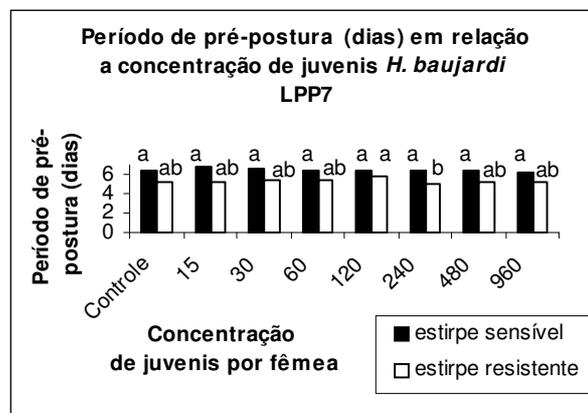


Figura 20. Período de pré-postura (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.

Período de Postura

- *Heterorhabditis indica* LPP4

Em fêmeas ingurgitadas estirpe sensível foram observadas diferenças entre controle e os demais tratamentos a partir da concentração de 15 JIs/ ♀, com exceção da concentração de 30 JIs/ ♀ que não diferiu do controle. A concentração que reduziu mais notavelmente o período de ovoposição foi a de 960 JIs/ ♀ com 2,25 dias em média, comparando com o controle (17,56 dias em média) (Figura 21).

Ocorreram diferenças significativas entre o controle e os tratamentos acima de 15 JIs/ ♀ em fêmeas resistentes. A concentração que reduziu de maneira eficaz o

período de postura foi a de 960 JIs/ ♀ com 2,46 dias em média, em contraposição com o controle (12,42 dias em média) (Figura 21).

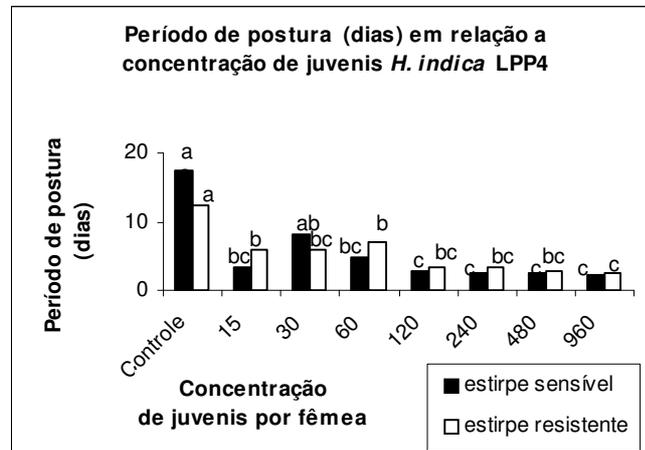


Figura 21. Período de postura (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. indica* LPP4 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Em fêmeas sensíveis, o controle diferiu dos tratamentos a partir da concentração de 240 JIs/ ♀. Sendo que a concentração de 480 JIs/ ♀ foi a que mais diminuiu o período de ovoposição (3,37 dias em média), enquanto que o controle teve em média 11,78 dias (Figura 22).

Acima de 120 JIs/ ♀ foram observadas diferenças entre o controle e os tratamentos em fêmeas resistentes do carrapato bovino. A concentração que se destacou causando uma queda no período de postura foi a de 480 JIs/ ♀ (2,90 dias em média) em comparação com o controle (11,28 dias em média) (Figura 22).

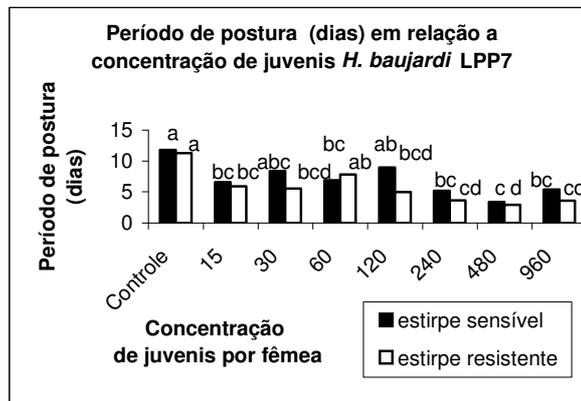


Figura 22. Período de postura (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.

Período de sobrevivência

- *Heterorhabditis indica* LPP4

Em fêmeas ingurgitadas estirpe sensível foram verificadas diferenças significativas entre o controle e os tratamentos a partir da concentração de 30 JIs/ ♀. A concentração de 480 JIs/ ♀ foi que se destacou na redução do período de sobrevivência das fêmeas (3,56 dias em média) diferentemente das fêmeas do controle (24,71 dias em média) (Figura 23).

Ocorreram diferenças significativas entre o controle e os tratamentos em fêmeas resistentes do carrapato bovino a partir da concentração de 15 JIs/ ♀, com exceção da concentração de 60 JIs/ ♀, que foi estatisticamente igual ao controle. Por fim, a concentração que se destacou em reduzir a sobrevivência das fêmeas foi a de 960 JIs/ ♀ com 5,54 dias em média, enquanto que as fêmeas do controle sobreviveram 20,04 dias em média (Figura 23).

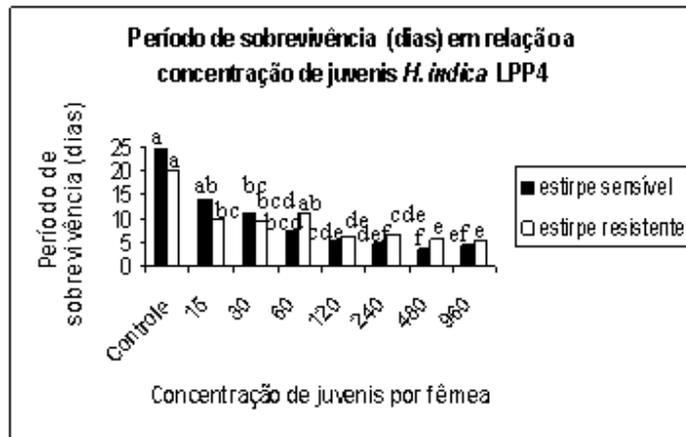


Figura 23. Período de sobrevivência (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. indica* LPP4 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Em fêmeas sensíveis ocorreram diferenças entre o controle e os tratamentos a partir da concentração de 15 JIs/ ♀, exceto a concentração de 120 JIs/ ♀ que foi estatisticamente igual ao controle. A concentração que mais reduziu o tempo de sobrevivência dessas fêmeas foi a de 480 JIs/ ♀ com um período de sobrevivência de 8,56 dias em média (Figura 24).

Acima de 15 JIs/ ♀ foram notadas diferenças entre o controle e os tratamentos em fêmeas resistentes, com exceção da concentração de 60 JIs/ ♀. A concentração de 480 JIs/ ♀ foi a que mais diminuiu a sobrevivência destas fêmeas para em média 7,00 dias e comparação ao controle, que sobreviveu 17,79 dias em média (Figura 24).

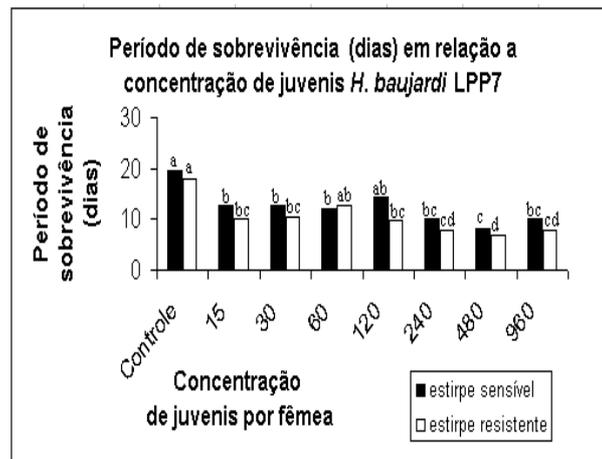


Figura 24. Período de sobrevivência (dias) em relação à concentração de juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 em fêmeas ingurgitadas de *R.(B.) microplus* estirpe sensível e resistente.

Porcentual de controle

- *Heterorhabditis indica* LPP4

Em fêmeas sensíveis, as concentrações de 240, 480 e 960 JIs/ ♀ atingiram em média 100% de controle. A concentração de 120 JIs/ ♀ atingiu em média 99% de controle. Já nas menores concentrações (30 e 60 JIs/ ♀) houve um controle médio acima de 80%, em condições de laboratório (Figura 25).

Em estirpes resistentes, as concentrações de 15, 30 e 60 JIs/ ♀ causaram controle em média de 45, 50 e 21%, respectivamente. As concentrações de 120 e 240 JIs/ ♀ tiveram uma eficácia de controle de 93 e 91% em média, respectivamente. Os tratamentos que mais se destacaram no controle foram as concentrações de 480 e 960 JIs/ ♀ onde ambas atingiram um porcentual de 96% de controle em média (Figura 25).

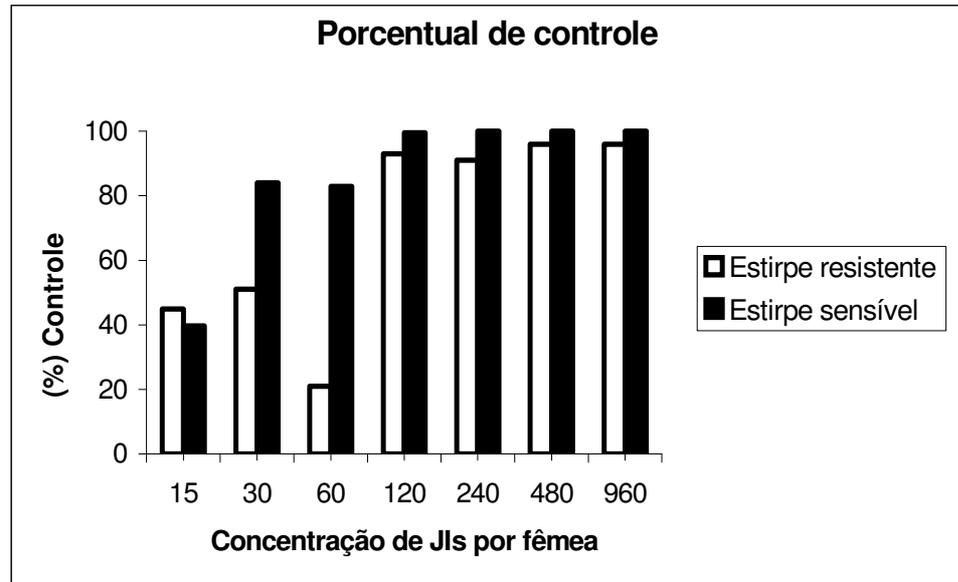


Figura 25. Porcentagem de controle de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpes sensível e resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80%.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Em fêmeas ingurgitadas estirpe sensível, as concentrações de 15, 30 e 60 JIs/ ♀ houve uma eficácia no controle de 73, 70 e 72 % em média, respectivamente. Nas concentrações de 120 e 240 JIs/ ♀ houve 76 e 77% de controle em média, respectivamente. As concentrações que mais se sobressairam foram de 480 e 960 JIs/ ♀ com em média 96 e 94% de controle, respectivamente (Figura 26).

À concentração de 15 JIs/ ♀ obteve-se em média 48% de controle na estirpe resistente das fêmeas de *R. (B.) microplus*. Às concentrações de 30, 60, 120, 240,

480 e 960 JIs/ ♀ foram obtidos os percentuais médios de controle 75, 69, 80, 88, 95 e 96%, respectivamente (Figura 26).

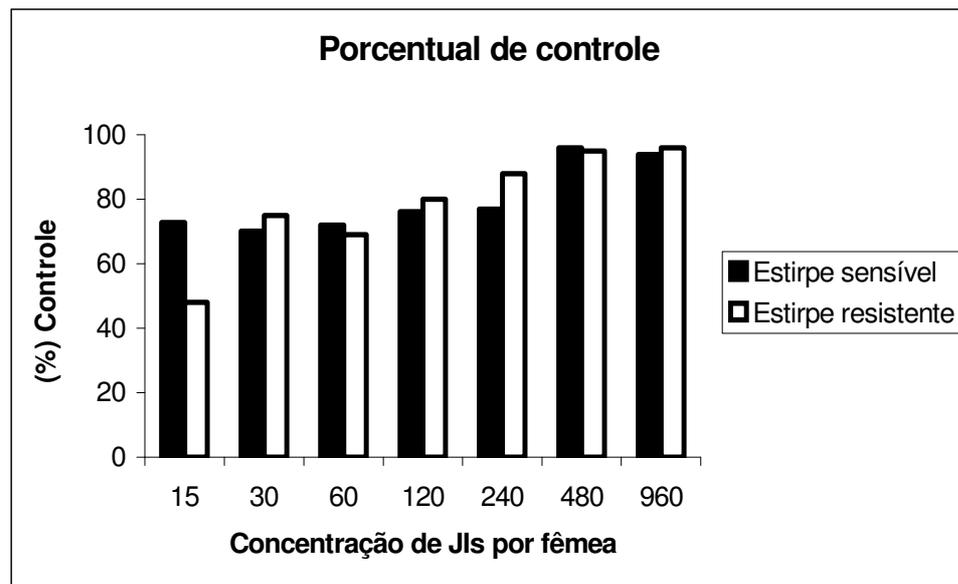


Figura 26. Porcentagem de controle de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpes sensível e resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80%.

Mortalidade cumulativa

- *Heterorhabditis indica* LPP4

A avaliação da mortalidade em fêmeas ingurgitadas estirpe sensível durou trinta e dois dias, sendo que durante os três primeiros dias (72 horas) as fêmeas ficaram expostas aos juvenis de *Heterorhabditis indica* LPP4 (Figura 27).

No quinto dia, nas concentrações de 240, 480 e 960 JIs/ ♀ ocorreu 100% de mortalidade. Também no quinto dia, as concentrações de 60 e 120 JIs/ ♀ causaram 75 e 92% de mortalidade, respectivamente, enquanto que no sexto dia nessas mesmas concentrações, houve 87 e 96% de mortalidade, respectivamente. As menores concentrações (15 e 30 JIs/ ♀) causaram a mortalidade de 29 e 46% das fêmeas do carrapato bovino, respectivamente no quinto dia. Já no sexto dia, houve um aumento da mortalidade de 42 e 67%, respectivamente para essas mesmas concentrações (Figura 27).

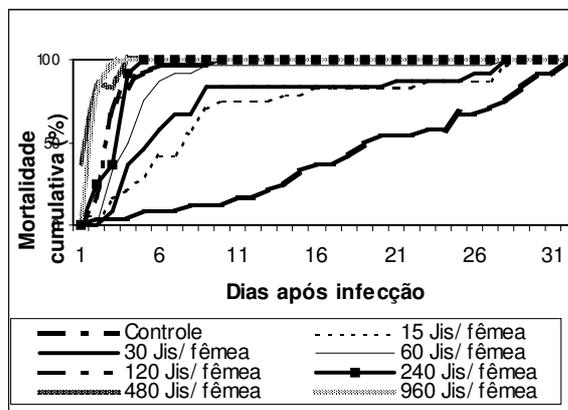


Figura 27. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4.

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

No quinto dia, os JIs de *H. indica* LPP4 causaram 100% de mortalidade nas fêmeas do carrapato bovino na concentração de 960 JIs/ ♀. Tanto no quinto como no sexto dia, uma mortalidade de 96% das fêmeas foi obtida utilizando-se a concentração de 480 JIs/ ♀. No quinto dia também se observou 87% de mortalidade das fêmeas em ambas as concentrações de 120 e 240 JIs/ ♀, sendo que no sexto

dia o percentual de mortalidade aumentou para 100 e 96%, respectivamente. Uma mortalidade de 37% ocorreu nas concentrações de 15 e 60% JIs/ ♀ no quinto dia, enquanto que a concentração de 30 JIs/ ♀ atingiu 50% de mortalidade no mesmo dia (Figura 28).

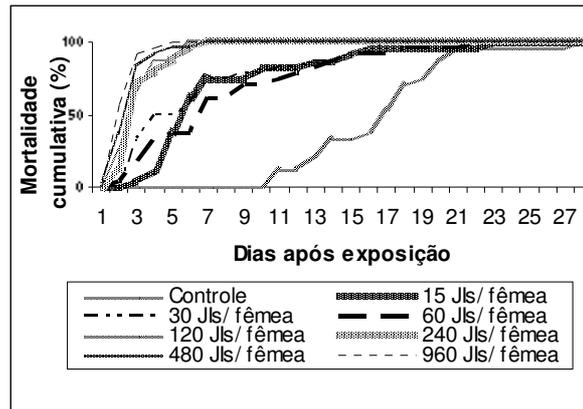


Figura 28. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe resistente expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

A avaliação do percentual de mortalidade em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível durou 32 dias, e durante os três primeiros dias (72 horas) as fêmeas foram expostas aos juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 (Figura 29).

No sétimo dia foi registrada uma mortalidade de 100% na concentração de 480 JIs/ ♀, enquanto que com 240 JIs/ ♀ houve 75% de mortalidade. O mesmo não ocorreu para a maior concentração (960 JIs/ ♀) que gerou uma mortalidade de 67%, enquanto que no sexto, este percentual foi de 71%. Além disso, tanto as concentrações de 30 quanto as de 60 JIs/ ♀ apresentaram 54% de mortalidade. Por fim, a mortalidade das fêmeas do carrapato bovino nas concentrações de 15 e 120 JIs/ ♀ foram de 42 e 33%, respectivamente (Figura 29).

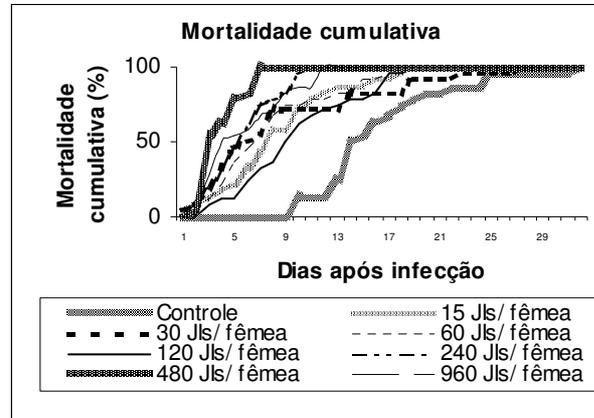


Figura 29. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

A avaliação do percentual de mortalidade em fêmeas ingurgitadas estirpe resistente durou 27 dias, e durante os três primeiros dias (72 horas) as fêmeas foram expostas aos juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 (Figura 18).

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

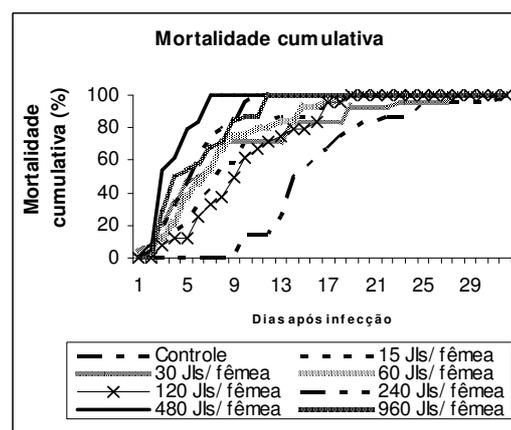


Figura 30. Mortalidade cumulativa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe resistente expostas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

6 - DISCUSSÃO

Processo de infecção

Reconhecidamente, JIs do gênero *Heterorhabditis* penetram na hemocele dos hospedeiros através da cutícula, via ânus/boca ou através dos espiráculos. Dependendo do hospedeiro e da espécie de nematóide, diferentes rotas de penetração são tomadas (Lewis et al., 2006). Neste trabalho, foi demonstrado que a penetração dos JIs das espécies *H. baujardi* LPP7 e *H. indica* LPP4 em fêmeas do carrapato bovino, *R. (B.) microplus*, se dá especialmente pelos espiráculos. Espiráculos, boca e ânus de fêmeas suscetíveis e resistentes foram observados constantemente nas 72 horas de contato, e às 48 horas JIs foram encontrados nos espiráculos na concentração de 960 JIs/ ♀. Nas outras concentrações não foram encontrados provavelmente por que os nematóides são de tamanho diminuto, sendo só observados quando formam uma massa de nematóides que provavelmente só ocorreu na maior concentração empregada.

Este é o primeiro relato de observação da penetração de nematóides entomopatogênicos pelos espiráculos em *R. (B.) microplus* e o primeiro relato de observação de penetração de *H. indica* LPP4 e *H. baujardi* LPP7 em algum hospedeiro (Figura 9 A e B).

Espiráculos vêm sendo citados como rota de entrada para vários insetos. Em larvas de *Cephalcia lariciphila* (Himenoptera: Pamphiliidae), os espiráculos foram a via de entrada mais importante para *S. carpocapsae* (Georgis & Hague, 1981).

Nguyen & Smart (1991) fotografaram a invasão de *S. scapterisci* através dos espiráculos para hemocele. Eles observaram que JIs destes nematóides entram no espiráculo com um vigoroso movimento pelo tubo, rompendo-o.

Samish & Glazer (1992) afirmaram que a principal porta de entrada dos nematóides em carrapatos são as aberturas gonodais. No entanto, Samish & Glazer et al. (2001) observaram JIs tentando penetrar entre as partes bucais de *B. annulatus*. Samish et al. (2004) concluíram que os nematóides penetram em fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus* quase que unicamente via ânus e poro genital. Kocan et al. (1998) encontraram nematóides atraídos em torno das aberturas naturais de fêmeas ingurgitadas de *Ambliyoma americanum*.

Aparentemente, a rota de entrada tanto para insetos como para carrapatos é resultante de um processo específico entre hospedeiro e nematóide. Mauléon et al. (1993) compararam duas espécies de *Boophilus* e não observaram relação evidente entre o tamanho dos espiráculos, tamanho das aberturas genitais ou espessura da cutícula na sua relativa susceptibilidade contra duas linhagens de nematóides por eles testadas.

No presente trabalho, estes fatores também não pareceram influenciar na penetração tanto de *H. indica* LPP4 quanto de *H. baujardi* LPP7 pelos espiráculos destas fêmeas, já que as cepas sensíveis e resistentes testadas eram da mesma espécie.

Estudos prévios têm demonstrado que JIs respondem a uma variedade de compostos incluindo CO₂ (dióxido de carbono) (Gaugler et al., 1980; Thurston et al., 1994), produtos excretados pelo hospedeiro (Schmidt & All, 1979; Gaugler et al., 1980; Byers & Poinar, 1982), gradiente de temperatura (Byers & Poinar, 1982; Choo et al., 1989), presença ou ausência de bactérias simbiotes e pH (Pye & Burman, 1981).

Hinton (1967) sugeriu que trocas gasosas entre o carrapato e o ambiente ocorrem via aerófilos através dos espiráculos. A demanda de oxigênio e liberação de CO₂ deve ser balanceada pela necessidade de proteger o animal contra o excesso de perda d'água por dissecação (Sonshine, 1991). Quando a fêmea ingurgitada cai ao solo, durante o período de pré-ovoposição o volume do seu corpo diminui devido

à perda de água (Diehl et al., 1982). O CO₂ é um importante composto usado na atração do hospedeiro (Ramos-Rodríguez et al., 2007). Portanto, é possível inferir que o CO₂ liberado pelas fêmeas do carrapato *R. (B.) microplus* tenha sido o composto que atraiu os nematóides *H. indica* LPP4 e *H. baujardi* LPP7 a entrarem pelos espiráculos destes carrapatos.

Além disso, a resposta positiva dos JIs de *H. indica* LPP4 e *H. baujardi* LPP7 em buscar o carrapato bovino já era esperada, já que esses nematóides possuem um comportamento do tipo “cruiser”. Esses nematóides são, portanto altamente móveis e procuram seus hospedeiros através das respostas de compostos voláteis como CO₂, sendo ideais para hospedeiros sedentários como fêmeas ingurgitadas.

Lewis et al. (1993) acharam *S. glaseri* (Steiner), um nematóide “cruiser”, respondendo positivamente a compostos voláteis de um inseto-hospedeiro. Esta resposta era eliminada quando o CO₂ era removido. Grewal et al., (1994) encontraram níveis similares de respostas a compostos voláteis para outras espécies de NEPs com comportamento ecológico do tipo “cruiser”. Diferentemente, nematóides do tipo “ambusher” como *S. carpocapsae* não respondem a compostos voláteis, a não ser depois do contato com o hospedeiro, no qual sugere que eles poderiam usar os compostos voláteis para localização da rota de entrada no hospedeiro (Lewis et al., 1995).

A intensa coloração vermelha observada nesse trabalho no tratamento de maior concentração (960 JIs/ ♀) tanto de *H. baujardi* LPP7 quanto *H. indica* LPP4, foi também encontrada por Vasconcelos et al. (2004) (Figura 11). Além disso, foi observada uma gradação na coloração das fêmeas infectadas com *H. baujardi* LPP7 de acordo com o aumento da concentração de JIs utilizados (Figura 10). Esta mudança na coloração é típica de infecções por heterorhabditídeos e é causada pela presença e multiplicação da bactéria simbiote *Photorhabdus* (Samish & Glazer 1992; Glazer & Samish, 1993; Zhioua, 1995). Vasconcelos et al., (2004) relataram que alguns carrapatos de *R. (B.) microplus* inoculados com o nematóide *H. bacteriophora* na concentração de 25.000 JIs por placa de Petri apresentaram ruptura de cutícula e extravasamento da hemolinfa, a qual poderia ter sido causada pela alta população de juvenis no hospedeiro. Hill (1998) observou rupturas similares

na cutícula de aproximadamente 60% das fêmeas ingurgitadas de *I. scapularis* atribuídas a perfurações de membrana durante a penetração de *H. bacteriophora*.

Em relação à massa de ovos no carrapato bovino, o órgão de Gené produz uma camada superficial no ovo que protege o oócito. Essa secreção, semelhante a uma cera, confere impermeabilidade ao ovo e ainda possui propriedades fungicidas (Lees & Beament, 1948). Nesse trabalho foi observado que a massa de ovos das fêmeas do tratamento com 960 JIs/ ♀ possuía um aspecto alterado (Figura 12 A) quando comparada à massa de ovos do grupo controle, com aspecto normal e aparência brilhosa (Figura 12 B). Isso se deve, provavelmente, a alguma alteração feita pelos JIs de *H. baujardi* LPP7 no órgão de Gene durante sua busca para chegar à hemocele. Vale ressaltar que as larvas desses ovos não eclodiram. Diehl (1982) confirma esse fato dizendo que o oócito sem a secreção do órgão de Gené morrerá dentro de minutos após a ovoposição e não haverá eclosão da larva.

Zhioua et al. (1995) também observaram alterações na qualidade das posturas dos ovos de fêmeas ingurgitadas de *I. scapularis* tratadas com *S. glaseri* e *S. carpocapsae*. Esse trabalho foi o primeiro a relatar alterações físicas nas posturas de fêmeas do carrapato *R. (B.) microplus* causadas pela infecção de *H. baujardi* LPP7.

Parâmetros biológicos das fêmeas sensíveis e resistentes de *R. (B.) microplus*

Uma grande parcela dos autores concorda que o período de exposição das fêmeas de *R. (B.) microplus* aos nematóides influencia na maioria dos parâmetros relacionados à biologia reprodutiva dessas fêmeas. Assim como nos trabalhos de Vasconcelos et al. (2004) e Freitas-Ribeiro et al. (2005) que relataram a diferença entre o controle e os tratamentos, o tempo de exposição dos JIs nesse trabalho foi de 72 horas. Porém, Silva (2006) expôs fêmeas sensíveis do carrapato bovino a JIs de *H. indica* LPP1 durante 48 horas.

Peso da Postura

De acordo com Kaaya et al. (2000), a redução da massa de ovos das fêmeas ingurgitadas do carrapato provocada pelos nematóides é relevante pelo fato de afetar o número de carrapatos da próxima geração.

- *Heterorhabditis indica* LPP4

O peso da massa de ovos em estirpes sensível e resistente dos grupos tratados com *H. indica* LPP4 diferiram do controle a partir da concentração de 120 JIs/ ♀ (Tabelas 1 e 2). Esses resultados corroboram com os de Freitas-Ribeiro et al. (2005) que relataram a diferença entre o controle e os tratamentos a partir de 600 JIs/ placa com cinco fêmeas, utilizando *S. carpocapsae* linhagens All e Santa Rosa. Similar efeito foi encontrado por Vasconcelos et al. (2004) ao mostrar que o tratamento com 1.000 JIs / ♀ de *S. glaseri* Santa Rosa foi o que mais diminuiu a massa de ovos de fêmeas sensíveis do carrapato bovino (Figura15).

Zhioua et al. (1995) verificaram que o peso da massa de ovos das fêmeas ingurgitadas de *I. iscapularis* expostas a *S. carpocapsae* All diferiu do controle em concentrações acima de 50, 500 e 3.000 JIs/ placa.

A correlação entre diminuição do peso da massa de ovos e concentração de JIs, só foi observada em fêmeas suscetíveis. Freitas-Ribeiro et al. (2005) relataram o mesmo em seus estudos com fêmeas da mesma espécie suscetíveis utilizando JIs de *S. carpocapsae* linhagens All e Santa Rosa. Vasconcelos et al. (2004) observaram que apenas dois tratamentos com *S. glaseri* diminuíram a massa de ovos em relação ao controle.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Nesse trabalho utilizando *H. baujardi* LPP7 em fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes, observou-se diferenças significativas no controle em relação aos

tratamentos acima de 15 JIs/ ♀. O tratamento que mais diferiu do controle reduzindo a massa de ovos foi o de 480 JIs/ ♀ para suscetíveis e 960 para resistentes (Figura 16).

Kocan et al. (1998) demonstraram que a infecção com JIs de *S. glaseri* não interferiram na fecundidade de fêmeas ingurgitadas de *A. americanum*, mas que as diferentes concentrações reduziram o peso da massa de ovos destas fêmeas.

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

Samish & Glazer (1992) mostraram que a infecção de JIs de *S. carpocapsae* DT não interferiu no peso da massa de ovos das fêmeas de *B. annulatus*. Eles sugeriram que o curto período de exposição aos JIs destas fêmeas (24 horas) poderia ter sido a explicação para este fato.

O peso de ovos nas fêmeas resistentes e suscetíveis foi afetado por esse nematóide a partir de baixas concentrações. Aparentemente, diferentes linhagens ou espécies de nematóides podem influenciar diferentemente na fecundidade de fêmeas ingurgitadas de diferentes espécies de carrapatos.

Alteração do Peso

A alteração do peso é a subtração do peso inicial (quando a fêmea está cheia de ovos) pelo peso final (peso depois que a fêmea oviposita). A alteração do peso é um dos parâmetros mais relevantes para se verificar a ação do tratamento, pois quando a alteração do peso é pequena, se conclui que as fêmeas tiveram um intervalo de tempo insuficiente para liberação dos ovos, pois morreram precocemente devido justamente à ação do tratamento. Porém, quando a alteração do peso é grande conclui-se que o tratamento não foi tão eficaz, pois a fêmea ficou viva e ovopositando.

- *Heterorhabditis indica* LPP4

Assim como em Silva (2006), nesse trabalho fêmeas sensíveis apresentaram diferenças significativas entre o controle e os tratamentos acima de 60 JIs/ ♀, e a alteração do peso médio foi diminuída na medida em que se elevou a concentração de JIs. Portanto, fêmeas dos tratamentos de maiores concentrações (120, 240, 480 e 960) não chegaram a perder peso com a ovoposição, por morrerem precocemente devido à ação dos JIs de *H. indica* LPP4 nos referidos tratamentos (Figura 17).

O mesmo não foi observado em fêmeas resistentes em que a alteração do peso não seguiu uma tendência de diminuição. Foram observadas diferenças entre o controle e os tratamentos a partir de 15 JIs/ ♀ (Figura 17).

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Em fêmeas sensíveis do carrapato bovino registraram-se diferenças entre o controle e os tratamentos acima de 240 JIs/ ♀. Além disso, também ocorreram diferenças entre os tratamentos, sendo a concentração de 480 JIs/ ♀ a que mais se diferenciou do controle reduzindo a alteração de peso devido à morte precoce da fêmea. Diferentemente dos resultados de Freitas-Ribeiro et al. (2005) não houve tendência de diminuição na alteração do peso quando se elevou a concentração de JIs de *H. baujardi* LPP7 (Figura 18).

Nesse trabalho em fêmeas resistentes notaram diferenças significativas nos tratamentos em relação ao controle acima de 15 JIs/ ♀, similar ao nematóide *H. indica* LPP4, quando também aplicado a fêmeas resistentes (Figura 18). Aparentemente fêmeas resistentes tiveram menor alteração de peso do que as suscetíveis, independentemente da aplicação dos nematóides.

Período de Pré- Postura

O período de pré-postura é uma fase em que ocorre a conversão metabólica para produção de nutrientes necessários para formação do ovo. Este período dura

de 2 a 3 dias na temperatura ideal, podendo se estender por muitos dias na época de frio (Gonzáles, 1995).

- *Heterorhabditis indica* LPP4

Em fêmeas sensíveis não foram observadas diferenças significativas entre o controle e a maioria dos tratamentos. Contudo, o tratamento de 240 JIs/ ♀ diferiu estatisticamente do controle, apresentando um período de pré - ovoposição maior (Tabela 5). Não há explicação para tal fato e o experimento precisaria ser repetido para averiguação. Em fêmeas resistentes não se registrou diferenças entre o controle e os tratamentos (Figura 19).

Silva (2006) não encontrou diferença entre o controle e os tratamentos neste parâmetro, mostrando que os JIs de *H. indica* LPP1 não influenciaram nesta fase reprodutiva. Reis (2005) também relatou este fato para fêmeas sensíveis tratadas com *S. glaseri*.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Utilizando JIs de *H. baujardi* LPP7 tanto em fêmeas sensíveis quanto em resistentes não foram observadas diferenças entre o controle e os tratamentos (Figura 20). Freitas-Ribeiro et al. (2005) avaliando diferentes concentrações de JIs de *S. carpocapsae* All e Santa Rosa também não encontraram diferenças entre o grupo controle e grupo tratado, concluindo que os JIs destes nematóides também não intervieram neste parâmetro biológico.

Período de Postura

Este período dura aproximadamente 15 dias quando ocorre oviposição de aproximadamente 3.000 ovos feita por cada teleógina (Gonzáles, 1995). É a fase em que a fêmea perde peso devido à ovoposição e também é a fase mais vulnerável da fêmea. Samish et al. (2000a) utilizando fêmeas ingurgitadas e não ingurgitadas de *B. annulatus* expondo esta fêmeas a JIs de *S. carpocapsae* (DT e Mexican) e *H.*

bacteriophora (HP88, IS-5 e IS-3) encontraram uma morte mais rápida em fêmeas não ingurgitadas.

- *Heterorhabditis indica* LPP4

Fêmeas sensíveis e resistentes de *R. (B.) microplus* foram afetadas pelos JIs a partir da concentração de 15 JIs/ ♀, sendo. Assim como Silva (2006), concentração de 960 JIs/ ♀ foi a que mais reduziu o número de dias de postura das fêmeas (Figura 21). O período de postura do controle durou em média 12 dias, similar em Silva (2006).

Em contraposição as observações supracitadas, Vasconcelos et al. (2004) não encontraram diferenças no período de postura entre o controle e os tratamentos e nem ao menos entre os tratamentos utilizando diferentes concentrações de JIs de *S. glaseri* Santa Rosa e *H. bacteriophora* CCA contra fêmeas sensíveis do carrapato bovino.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Diferentemente de Freitas-Ribeiro et al. (2005) que obtiveram diferenças entre o controle e os tratamentos a partir de 600 JIs/ placa de *S. carpocapsae* All, nesse trabalho, em fêmeas sensíveis somente acima de 240 JIs/ ♀ ocorreram diferenças com relação ao controle.

Em contraste, em fêmeas resistentes observaram-se diferenças entre o controle e os tratamentos acima de 120 JIs/ ♀. O tratamento de 480 JIs/ ♀ foi o que reduziu notavelmente o período de ovoposição dos carrapatos sensíveis e resistentes demonstrando a virulência do nematóide (Figura 22).

Período de Sobrevivência

A questão da sobrevivência das fêmeas é um parâmetro de grande importância para se verificar atuação dos tratamentos em comparação ao controle. O

tempo médio de sobrevivência de uma fêmea ingurgitada desde quando cai ao solo até sua morte dura em média 17 dias (González, 1995).

- *Heterorhabditis indica* LPP4

Assim como Silva (2006), foram encontradas diferenças significativas entre o controle e os tratamentos a partir de 30 JIs/ ♀ em fêmeas. O tratamento de 480 JIs/ ♀ foi o que reduziu de forma mais eficiente a sobrevivência destas fêmeas (3,56 dias em média). Silva (2006) observou que em uma concentração de *H. indica* LPP1 próxima a essa testada (375 JIs/ placa) houve uma redução na sobrevivência de 4,03 dias em média.

Em fêmeas resistentes observou-se uma redução no período de sobrevivência com o aumento da concentração de JIs de *H. indica* LPP4 (Figura 23). Estes resultados corroboram com os de Reis (2005), e demonstram a interferência dos nematóides na sobrevivência dos carrapatos.

- *Heterorhabditis baujardi* LPP7

Em fêmeas sensíveis notou-se que acima da concentração de 15 JIs/ ♀ foram observadas diferenças entre o controle e os tratamentos. Todavia, a concentração que reduziu o período de sobrevivência foi de 480 JIs/ ♀ (8,56 dias em média) (Tabela 7). Silva (2006) em sua menor concentração (375 JIs/ placa) reduziu para 4,03 dias em média o período de sobrevivência de suas fêmeas utilizando JIs de *H. indica* LPP1 em um tempo de exposição menor (48 horas).

Diferentemente de Reis (2005) e Silva (2006), em fêmeas resistentes não ocorreu diminuição no período de sobrevivência com o aumento da concentração de JIs de *H. baujardi* LPP7 (Figura 24).

Porcentual de controle

- *H. indica* LPP4 X fêmeas ingurgitadas estirpe sensível

Os resultados obtidos mostram que a eficiência de *H. indica* LPP4 em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível é comparável a outros agentes de controle biológico, como por exemplo, o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. De acordo com Onofre et al. (2001), o fungo foi altamente eficiente controlando aproximadamente 80% das fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* com 10^4 conídios/ mL. A eficiência também foi comparada a do controle químico, pois Leite et al. (1995) testaram um grupo de acaricidas de organofosfatos e obtiveram uma eficiência de aproximadamente 90% contra *R. (B.) microplus*.

Silva (2006) obteve dois tratamentos (600 e 24.000 JIs/ ♀) com 100% de controle de fêmeas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível utilizando *H. indica* LPP1 com 48 horas de exposição aos nematóides. Nesse trabalho os mesmos 100% foram obtidos nas concentrações de 240, 480 e 960 JIs de *H. indica* LPP4 por estirpes sensíveis de fêmeas de *R. (B.) microplus*, mas em tempo de exposição maior (72 horas) (Figura 25).

- *H. indica* LPP4 X fêmeas ingurgitadas estirpe resistente

A concentração de 120 JIs de *H. indica* LPP4 no controle de fêmeas de *R. (B.) microplus* estirpe resistente mostrou maior eficácia (91%) do que o resultado obtido por Vasconcelos et al. (2004) com a utilização de variadas concentrações de nematóides entomopatogênicos para controle de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível, onde utilizando juvenis de *H. bacteriophora* obtiveram a eficácia de controle de 80% com a concentração de 1.500 JIs/ ♀. Os resultados do presente trabalho se tornam ainda mais expressivos pelo fato de terem sido utilizadas no experimento fêmeas ingurgitadas resistentes de *R. (B.) microplus*, o que tornam os resultados mais próximos da realidade do controle a campo (Figura 25).

Os resultados também se mostraram mais eficientes do que os obtidos por Glazer et al. (2001) usando concentração de 5.000 JIs de *S. glaseri*, em experimento para controle de *B. annulatus* de apenas 20%, enquanto no presente trabalho a concentração de 15 JIs/ ♀ controlou 45%. Em contraposição às observações supracitadas, os resultados obtidos por Mauléon et al. (1993) mostraram que o

carrapato *R. (B.) microplus* foi resistente a 17 cepas de nematóides entomopatogênicos (oito de *Steinernema* e nove de *Heterorhabditis*). Curiosamente, a concentração de 30 JIs/ ♀ obteve uma eficácia de controle maior (50%) do que a de 60 JIs/ ♀ com apenas 21%. Uma situação similar foi relatada por Lewis et al. (1996), onde altas concentrações de JIs não foram capazes de reconhecer o hospedeiro. Segundo este mesmo autor, a interação parasita-hospedeiro poderia ter sofrido interferência da competição intra-específica.

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

Os tratamentos com maiores concentrações de juvenis de *H. baujardi* LPP7 obtiveram uma maior eficácia de controle de fêmeas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível (Figura 26). Samish et al. (1999a) também encontraram uma mortalidade aumentada em *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma excavatum* e *Rhipicephalus bursa* quando ocorreu um aumento na concentração de nematóides. Por outro lado, a mesma correlação positiva não ocorreu nas pesquisas feitas por Zhioua et al. (1995), Kaaya et al. (2000) e Samish et al. (1999b).

Neste trabalho a concentração de 480 JIs/ ♀ alcançou controle maior (96%) do que os resultados obtidos por Vasconcelos et al. (2004) que utilizaram a concentração de 25.000 JIs/ ♀ e alcançaram somente 45% de controle utilizando *H. bacteriophora* também no controle de fêmeas *R. (B.) microplus* estirpe sensível. No entanto, a mesma concentração de 25.000 utilizada por Vasconcelos et al. (2004) utilizando JIs de *S. glaseri* controlou 90% das fêmeas ingurgitadas sensíveis de *R. (B.) microplus*.

Máuleon et al. (1993) mostraram que todas as fêmeas de *R. (B.) microplus* sobreviveram quando expostas à suspensão de 1000 JIs de *S. carpocapsae* de nove diferentes linhagens.

A concentração de 480 JIs/ ♀ de *H. baujardi* LPP7 obteve uma eficácia de controle maior (96%) do que a concentração de 960 JIs de *H. baujardi* LPP7 por fêmea que controlou 94% das fêmeas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível (Figura 26). Segundo Máuleon et al. (1993), a explicação para isto se deve ao sistema imunológico das fêmeas de *R. (B.) microplus* que deve ter repelido ou matado os JIs.

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

A concentração de 15 nematóides por fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* estirpe resistente apresentou um resultado similar (48%) aos de Alekseev et al. (2006) que obtiveram um controle de 50% na concentração de 20 juvenis por fêmea sensível (JIs/ ♀) de *Heterorhabditis* spp. Possivelmente, a mesma competição intra-específica relatada por Lewis et al., (2006) ocorreu neste experimento com duas concentrações utilizando juvenis de *H. indica* LPP4 no controle de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe resistente. Foi observado que na concentração de 60 JIs/ ♀ houve 69% de controle em comparação à concentração de 30 JIs/ ♀ que controlou 75% e esta competição interferiu na interação parasito-hospedeiro (Figura 26).

Glazer et al. (2001) observaram taxa de mortalidade de 90% para *B. annulatus* na concentração com 1000 JI/ ♀ de *Heterorhabditis* spp. em apenas 24 horas de exposição. No presente trabalho a concentração 960 JIs/ ♀ obteve 100% de controle em um tempo de exposição maior (72 horas) (Figura 26). Os resultados foram ainda mais expressivos porque foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe resistente, o que torna os resultados mais próximos da realidade de campo. Tal resistência causa redução da taxa de penetração alterando o tegumento externo no carrapato, mudanças no metabolismo, armazenamento e excreção e mudanças no local de ação de qualquer agente controlador (Nolan, 1985) dificultando ainda mais o controle a campo.

Mortalidade cumulativa

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

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

- *H. indica* LPP4 X fêmeas ingurgitadas estirpe sensível

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

No presente trabalho esta correlação positiva em relação à mortalidade também foi observada. Quando se aumentou a concentração de JIs de *H. indica* LPP4 ocorreu maior taxa de mortalidade em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível (Figura 27).

Vasconcelos et al. (2004) observaram uma mortalidade de 90% das vinte fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível utilizando 5.000 juvenis por placa (JIs/ placa) de *S. glaseri* no terceiro dia. Entretanto, neste estudo 96% das fêmeas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível foram mortas no terceiro dia utilizando uma concentração menor (960 JIs/ ♀) (Figura 27).

Freitas-Ribeiro et al. (2005) avaliando a mortalidade obtiveram 100% de mortalidade em fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino estirpe sensível no décimo terceiro dia utilizando 30.000 JIs/ placa tanto de *S. carpocapsae* linhagem Santa Rosa quanto de *S. carpocapsae* linhagem All. Os resultados do presente trabalho mostram que 100% das fêmeas ingurgitadas estirpe sensível foram mortas no sexto dia utilizando-se 240 JIs/ ♀ de *H. indica* LPP4 (Figura 27).

No entanto, Glazer et al. (2001) testando JIs de *Heterorhabditis* sp. HIS-3 contra fêmeas de *B. annulatus* obtiveram 78% de mortalidade no décimo primeiro dia injetando apenas um JI/ ♀.

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

- *H. indica* LPP4 X fêmeas ingurgitadas estirpe resistente

Vasconcelos et al. (2004) observaram um aumento linear na mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível com o aumento da concentração de JIs de *S. glaseri*. No entanto, nos testes com *H. bacteriophora* esta mesma correlação linear não foi observada. Assim como observado por Vasconcelos et al. (2004), nesse trabalho não houve uma correlação positiva na mortalidade em fêmeas de *R. (B.) microplus* estirpe resistente com o aumento da concentração de JIs de *H. indica* LPP4 (Figura 28). Isto provavelmente pode estar relacionado a algum fator intrínseco que algumas fêmeas do carrapato bovino estirpe resistente tenham desenvolvido após exposição a carrapaticidas, já que estas, segundo Nolan (1985) apresentam alterações como cutícula mais espessa e também alterações metabólicas que dificultam a ação da maioria dos agentes controladores.

Freitas-Ribeiro et al. (2005) obtiveram 22% de mortalidade em fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível com a utilização de 600 JIs de *S. carpocapsae* linhagem All no quinto dia. Porém, neste estudo, em uma concentração próxima (480 JIs/ ♀) ocorreu 96% de mortalidade em fêmeas ingurgitadas estirpe resistente no quinto dia de exposição aos JIs de *H. indica* LPP4.

Glazer et al. (2001) relataram que 80% das fêmeas foram mortas injetando-se um único juvenil de *Heterorhabditis* sp. HIS-5 no oitavo dia. Contudo, neste experimento, as quatro maiores concentrações (120, 240, 480 e 960 JIs/ ♀) atingiram 100% de mortalidade no oitavo dia (Figura 28).

Hill (1998) testando 5.000 JIs de *S. riobrave* registrou 100% de mortalidade no sexto dia. Em contraposição às observações supracitadas, neste estudo notou-se

100% de mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* no sexto dia em uma menor concentração (120 JIs/ ♀) (Figura 28).

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

Samish et al. (1999a) verificaram um aumento de mortalidade de *R. sanguineus*, *Hyalomma excavatum* e *Rhipicephalus bursa* com a elevação da concentração de nematóides. Todavia, neste trabalho o mesmo não foi observado em relação à mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe sensível quando se aumentou a concentração de JIs de *H. baujardi* LPP7 (Figura 29).

Segundo Samish et al. (2001), 80% das fêmeas de *Rhipicephalus bursa* foram mortas com a concentração de 5.000 JIs de *Heterorhabditis sp.* IS-3 no sexto dia. Nesse estudo, na concentração de 480 JIs/ ♀ de *H. baujardi* LPP7 ocorreu 83% de mortalidade em fêmeas no sexto dia (Figura 29).

Freitas- Ribeiro et al. (2005) registraram 60% de mortalidade em fêmeas sensíveis do carrapato bovino utilizando 600 JIs de *S. carpocapsae* linhagem All no sétimo dia. Porém, no presente trabalho observou-se no sétimo dia 100% de mortalidade em fêmeas sensíveis do carrapato bovino utilizando JIs de *H. baujardi* LPP7 em uma concentração menor (480 JIs/ ♀) (Figura 29). De acordo com Glazer et al. (2001), 90% das fêmeas de *B. annulatus* morreram injetando-se apenas um juvenil no sétimo dia.

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

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

Zihoua et al. (1995); Kaaya et al. (2000) e Samish et al. (1999b) não verificaram uma correlação positiva em relação à mortalidade com o aumento da concentração de nematóides. Esta observação também foi verificada neste estudo, em que foram utilizadas crescentes concentrações de JIs de *H. baujardi* LPP7 para avaliar a mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estirpe resistente (Figura 30).

Glazer et al. (2001) relataram 90% de mortalidade em fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus* no sexto dia injetando somente um juvenil de *Heterorhabditis* sp. IS-3.

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

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

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

Os nematóides aqui testados demonstraram ser mais eficientes na mortalidade do carrapato bovino do que outros nematóides testados, independente se os carrapatos são sensíveis ou resistentes.

7-CONCLUSÕES

Este trabalho demonstra que os nematóides *H. baujardi* LPP7 e *H. indica* LPP4 testados neste trabalho, ambos nativos da Floresta Amazônica em Monte Negro-RO são promissores agentes de controle biológico e sua aplicação junto ao Manejo Integrado de Pragas (MIP) poderia diminuir os impactos ambientais, econômicos e sociais causados pelo uso indiscriminado de carrapaticidas. E, além disso, garantiria a segurança da qualidade tanto do leite quanto da carne bovina a ser produzida livre de possíveis resíduos deixados pelo uso de acaricidas.

No processo de infecção, JIs de *H. baujardi* LPP7 e *H. indica* LPP4 provavelmente dão preferência aos espiráculos como rota de entrada. Sugere-se que a escolha da rota esteja ligada ao tipo do hospedeiro e à espécie/ linhagem do nematóide. Observou-se que a graduação da coloração das fêmeas após infecção é diretamente proporcional à concentração dos JIs aplicados. As alterações observadas na massa de ovos provavelmente se devem ao comprometimento físico do órgão de Gené.

Heterorhabditis baujardi LPP7 foi tão eficiente afetando a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas sensíveis e resistentes de *R. (B.) microplus* quanto *Heterorhabditis indica* LPP4, isto se deve provavelmente ao mesmo ótimo de temperatura de em média 27°C tanto dos isolados de nematóides quanto das fêmeas. Contudo, aparentemente *Heterorhabditis indica* LPP4 mostrou ser mais eficaz no controle destas fêmeas causando uma maior mortalidade em menos dias, principalmente em fêmeas resistentes, já que estas é que serão controladas no campo. São necessários estudos a campo para verificar a ação destes isolados no controle de fêmeas resistentes de *R. (B.) microplus*.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldrovandus, U. (1623) De animalibus insectis libri septum. Fol. Franeofurti. 71, 197–201.

Alekseev, E.; I. Glazer & M. Samish. (2006) Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against females *Boophilus annulatus* ticks. *BioControl* 51: 507-518.

Almeida, M.A.O. (2005) Controle de carrapatos: resistência e vacinas. www.simentalbrasil.com.br.

Alvarado, R.U. & J.C. Gonzales. (1979) A postura e a viabilidade de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina, Ixodidae) em condições de laboratório. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 21: 31-36.

Alves, S.B.; Moino Jr., A.; Almeida, J.E.M. (1998) Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: Controle Microbiano de Insetos, Piracicaba, ALVES S.B. (ed.): FEALQ, p. 1143-1163.

Arenales, M. C. (2003) Principais patologias parasitárias em bovinos e os medicamentos homeopáticos. *Agroecologia Hoje*, n. 19, p19. Meliaceae) in cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 22 (1): p. 19-24, jan./mar.

Arthur D.R. Ticks. (1960) A monograph of the Ixodoidea. On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus* and *Margaropus*. Detection, evaluation and control. In: Training in the control of *Sirex noctilio* by the use of natural enemies. Colombo, Brazil, Proceedings, *USDA Forest Service*, p. 45-52.

Arthur D.R. Tick and disease. (1961) London: Pergamom Press;.

Arthur D.R. (1965) Feeding in ectoparasitic acari with special reference to tick. *Adv Parasitol*; 3: 249-98.

Barker, S.C., Murrel, A. (2002) Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Experimental and Applied Acarology*. v. 28, p. 55-68.

Bittencourt, V. R. E. P. (2000) Controle biológico de carrapato: p. 145-171. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (Eds.). Controle biológico. Jaguariúna, SP: EMBRAPA Meio Ambiente, 388.

Bohan, D. A. and Hominick, W.M. (1996) Investigations on the presence of an infectious proportion amongst populations of *Steinernema feltiae* (Site 76 strain) infective stages. *Parasitology* 112, 113-118.

Bordin, E. L. (1998) Carrapatos – Uma abordagem diferenciada. *A Hora Veterinária* – Ano 18, nº 103, maio/junho p. 23-28.

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

Burman, M. (1982) *Neoaplectana carpocapsae*. Toxin production by axenic insect parasitic nematodes. *Nematologica*. v. 28, p. 62-70.

Burnell, A.M. & P. Stock. (2000) *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts – lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2 (1): 31-42.

Byers, J.A e Poinar, G.O. Jr. (1982) Location of insect hosts by the nematode, *Neoaplectana carpocapsae*, in response to temperature. *Behaviour* v. 79, 1-10.

Campbell, J. F. And Gaugler, R. (1993) Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour* n. 26, p. 156-169.

Campbell, J. F. and Lewis, E. E. (2002) Entomopathogenic nematode host-search strategies. In *The Behavioural Ecology of Parasites* (ed. Lewis, E. E., Campbell, J. F. and Sukhdeo, M. V. K.), pp. 13-38. CAB International, New York.

Campbell, J.F., Kaya, H.K., (2002) Variation in entomopathogenic nematode (Steinernematidae and Heterorhabditidae) infective stage jumping behavior. *Nematology* 4, 471-482.

Castro, J. J.; Newson, R. M. (1993) Host resistance in cattle tick control. *Parasitology Today*, Limerick, v. 9, p. 13-7.

Choo, H. Y., Kaya, H. K., Budando, T., Gaugier, R. (1989) Influence of plant roots on nematode host-finding ability. *Environ. Entomol.* 18: 1136-40.

Christen, J.M., Campbell, J.F., Lewis, E.E., Shapiro-Ilan, D.I. (2007) Responses of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* to its insect hosts, *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. *Parasitology*, 134, 889-898.

CNPC, Conselho Nacional da Pecuária de Corte. Balanço da Pecuária Bovídea de Corte – 1994 a 2005 [online]. Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.abiec.com.br/estatísticas/14.pdf>. Arquivo capturado em 3 de fevereiro de 2006.

Combes, C., Bartoli, P. and Théron, A. (2002) Trematode transmission strategies. In *The Behavioural Ecology of Parasites* (ed. Lewis, E. E., Campbell, J. F. and Sukhdeo, M. V. K.), pp. 1-12. *CAB International*, New York.

Cordovés, C.O. (1996) Carrapato: Controle e erradicação. Alegrete: Gralha. 110p.

Cordovés, C.O. (1997) Carrapato: controle ou erradicação. 2.ed. Guaíba: Agropecuária.

Corrêa, O. (1976) Doenças parasitárias dos animais domésticos. Porto Alegre/RS: Editora Sulina, p. 242-250.

Costa-Júnior, L.M.; Chagas, A.C.S.; Furlong, J.; Reis, E.S.; Mascaro, U.C.P. (2002) Eficiência in vitro de rotenóides extraídos do Timbó (*Derris urucu*) em teleóginas do carrapato *Boophilus microplus*. *Anais do Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária*, 12, Rio de Janeiro. *Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 12, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002. CD ROM.

Cui, L., Gaugler, R., Wang, Y., (1993) Penetration of steinernematid nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Invertebr. Pathol.* 62, 73–78.

Dela Vega, R. (1981) New method for determination of viability of *Boophilus microplus* (Ixodoidea, Ixodidae) larvae. *Folia Parasitologica*, v. 28, n. 4, 371-375.

Diehl, P.A., Aeschlimann, A., Obenchain, F.D. (1982) Physiology of ticks. In: Tick reproduction: Oogenesis and ovoposition. 277-350. 599 pp.

Dolinski, C. (2006) Uso de nematóides entomopatogênicos no controle de pragas agrícolas. In: Venzon, M., Paula Júnior, T.J., Pallini, A. *Tecnologias alternativas para o controle de pragas de doenças*. 1. ed. Viçosa: EPAMIG, 261-289.

Dolinski, C.; E. Del Valle & R.J. Stuart. (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control* 38: 422-427.

Dolinski, C. M.; Moino Jr., A. (2006) Utilização de nematóides entomopatogênicos nativos ou exóticos: o perigo das introduções. *Nematol. Bras.*, Brasília, , Vol. 30 (2): 139-149

Dolinski, C., Kamitani, F., Machado, I.R., Winter C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 103 (2): 150-159.

Doucet, M.M.A.; Bertolotti, M.A.; De Doucet, M.M.A. (1996) A new population of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar 1975 (Heterorhabditidae) from Rio Negro,

Argentina: Characterization and effects on host. *Nematol. Mediterranea*, v. 24, n. 2, p. 169-174.

Dowds, B.C.A; Peters, A. (2002) Virulence mechanisms. In: Gaugler R. (Ed.). *Entomopathogenic Nematology*. New York: CABI Publishing,. p. 79-98.

Eidt, D.C., Thurston, G.S., (1995) Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworm (Coleoptera: Elateridae) and other soil pests. *Can. Entomol.* 127, 423-429.

Fallon, D. J.; L.F. Solter; L.S. Bauer; D.L. Miller; J.R. Cate & M.L. McManus. (2006) Short communication: Effect of entomopathogenic nematodes on *Plectrodera scalator* (Fabricius) (Coleoptera:Cerambycidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 55-57.

Faustino, M.A.G. et al. (1997) Avaliação *in vitro* da sensibilidade de cepas de *Boophilus microplus* de estado de Pernambuco a produtos carrapaticidas através de testes de imersão de fêmeas ingurgitadas. Anais do Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 10, Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, 1. Anais. Itapema/SC, p. 116.

Fowler, H.G.; Garcia, C.R. (1988) Nematodes (Rhabditida: *Steinernema feltiae*) as natural control agents of mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae): field and laboratory studies. *Rev. Bras. Biol.*, v. 48, n. 4, p. 789-795.

Frazzon, A.P.; Da Silva V. J., I.; Massuda, A.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 94, n. 1-2, p. 117-125.

Freitas-Ribeiro, G. M.; J. Furlong; V.O. Vasconcelos; C. Dolinski & A. Loures-Ribeiro. (2005). Analysis of Biological Parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 Exposed to Entomopathogenic Nematodes *Steinernema*

carpocapsae Santa Rosa and All Strains (Steinernema: Rhabditida). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48 (6): 911-919.

Furlong, J.; Martins, J.R.S. (2000) Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, p. 7-17, 25p.

Gaugler, R., LeBeck, L., Nakagaki, B. and Boush, G. M. (1980) Orientation of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* to carbon dioxide. *Environmental Entomology* 9, 649-652.

Gaugler, R., Molloy, D. (1981) Instar susceptibility of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae*. *J. Nematol.* 13, 1-5.

Gaugler, R. (1988) Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insect pests with entomopathogenic nematodes. *Agric. Ecosyst. Environ.* 24: 351-60.

George, J. E. (2000) Present and future technologies for ticks control. *Ann. NY Acad. Sci.* 916: 583-588.

Georgis, R., Hague, N.G.M. (1981) A neoaplectanid nematode in the larch sawfly *Cephalcia lariciphila* (Hymenoptera: Pamphiliidae). *Ann. Appl. Biol.* 99, 171-177.

Georgis, R. (1990) Commercialization of steinernematid and heterorhabditid entomopathogenic nematodes. *Brighton Crop Prot. Conf. Insectic. Fungic.* 1: 275-80.

Georgis, R. & Gaugler, R. (1991) Entomopathogenic nematodes in *Biological Control*. Boca Raton, Flórida: CRC Press.

Georgis, R.; Hom, A. (1992) Introduction of entomopathogenic nematode products into Latin America and the Caribbean. *Nematropica*, v. 22, n. 1, p. 81-98.

Georgis, R. & Manweiler, S. A. (1994) Entomopathogenic nematodes: a developing nematodes (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. *J, Econ. Entomol.* 83: 97-100.

Glazer I, Samish M. (1993) Suitability of *Boophilus annulatus* replete female ticks as hosts of the nematode *Steinernema carpocapsae*. *J Invert Pathol* 61: 220-222.

Glazer, I., (1997) Effects of infected insects on secondary invasion of steinernematid entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 114, 597-604.

Glazer, I. & Lewis, E.E. (2000) Bioassays for Entomopathogenic Nematodes. *In: Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes* (Navon, A. & Ascher, K.R.S., Eds.), Wallingford, UK, CAB. International, p. 229-247.

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

Gloria, M. A.; Faccini, J.L.H.; Daemon, E.; & Grisi, L. (1993) Biologia comparativa da fase não parasitária de estirpes de *Boophilus microplus* (Can., 1887) resistente e sensível à carrapaticidas em condições de laboratório. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2 (2): 77-84.

Godfray, H. C. J. (1994) Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology. *In: Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.*

Gonzales, J. C. (1975). O controle do carrapato bovino. Porto Alegre: Editora Sulina, p. 13-46/57-65, 103p.

Gonzales J.C. (1995) O controle do carrapato do boi. 2a ed. Porto Alegre: Edição do Autor.

Gonzalez, J. C. (2003) O Controle do carrapato do boi. Passo Fundo, RS: UPF. 129.

Gorsuch, A. M. (1982) Regulations for the enforcement of the Federal Insecticide,

Gothe R, Kunze K, Hoogstraal H. The mechanisms of pathogenicity in the tick paralysis. *J Med Entomol* 1979, 16: 357-369.

Grewal, P. S., Selvan, S., Lewis, E. E. and Gaugler, R. (1993) Male insect-parasitic nematodes: a colonizing sex. *Experientia* 49, 605-608.

Grewal, P.S., Gaugler, R. & Selvan, S. (1993) Host recognition by entomopathogenic nematodes: Behavioral response to contact with host feces. *Journal of Chemical Ecology* 17, 1217-1229.

Grewal, P.S., Lewis, E.E., Gaugler, R., Campbell, J.F. (1994) Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 108, 207-215.

Grewal P.S.; Ehlers R-U; Shapiro-Ilan D.I. (2005) Nematodes as biocontrol agents. *CABI Publishing*, Wallingford, Oxfordshire. 505 pp.

Grisi L, Massard C.L, Borja G.E.M, Pereira J.B. (2002) Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet* 21: 8-10.

Hara, A. H., Kaya, H. K. (1983) Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environ. Entomol.* 12: 496-501.

Hay, D.B., Fenlon, J.S. (1995) A modified binomial model that describes the infection dynamics of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Steinernematidae: Nematoda). *Parasitology.* 111, 627-633.

Hill D.E. (1998) Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black legged tick, *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 84: 1124-1127.

Hinton, H. E. (1967) The structure of the spiracles of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). *Aust. J. Zool.* 3, 295-311.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2004) Produção Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v.32 p. 1-35, [on line]. Disponível na Internet Via WWW. URL: <http://www.ibge.gov.br>. Arquivo capturado em 3 de fevereiro de 2006.

Jonsson N.N., Mayer D.G. & Green P.E. (2000) Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology.* 88: 79-92.

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

Kaya, H.K. & Stock, P.S. (1988) Techniques in insect nematology. *In: Manual of techniques in insect pathology.* Series Biological Techniques (Lacey L.A Ed.). San Diego, *Academic Press*, p. 281-324.

Kaya, H.K. (1990) Soil ecology. *In*: Gaugler, R & Kaya, H.K. (ed), Entomopathogenic nematodes in Biological Control. *CRC Press. Boca Raton. Florida.* 93-115.

Kaya, H. K. & R. Gaugler. (1993) Entomopathogenic nematodes. *Annu. Ver. Entomol.* 38: 181-206.

Kemp, D.H.; Pearson, R.D.; Gough, J.M.; Willadsen, P. (1989) Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of anti-gens on tick gut cells and their interactions with the host immune system. *Exp. Appl. Acarol.*, v. 7, p. 43-58.

Kessler, R. H.; Schenk, M. A. M. (1998) Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC, p. 9-33/74-61, 157p.

Kocan, KM, Pidherney MS, Blouin EF, Claypool PL, Samish M, Glazer I. (1998) Entomopathogenic nematodes as a potential biological control method of ticks. *Ann N Y Acad Sci* 914: 355-364.

Koppenhöfer, A.M.; P.S. Grewal & E. M. Fuzy. (2006) Virulence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Steinernema scarabaei* against five white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae) of economic importance in turfgrass in North America. *Biological Control* 38: 397-404.

Labarta, V., Rodriguez, M.; Penichet, M. (1996) Simulation of control strategies for the cattle tick *Boophilus microplus* employing vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet.Parasitol.*, v. 63, p. 131-160.

Leal, A.T. (2006) Obtenção e avaliação da proteína BYC (*Boophilus* *Yolk pro-Cathepsin*) recombinante em uma vacina contra o carrapato *Boophilus microplus*. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)-Porto Alegre-RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS,105p.

Lees, A.D. e Beament, J.W.L. (1948) An egg-waxing organ in ticks. *Ql.J. Microsc. Sci.* 89: 291-332.

Leite R.C, Labruna, M.B., Oliveira, P.R., Monteiro, A.M.F. (1995) In vitro susceptibility of engorged female from different populations of *B. microplus* to commercial acaricides. *Rev Bras. Parasitol Vet* 4: 283-294.

Lewis, E.E.; R. Gaugler, & R. Harrison. (1992) Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology.* 105: 309-315.

Lewis, E.E., Gaugler, R. e Harrison, R. (1993) Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) in host volatile cues. *Canadian Journal of Zoology* 71, 765-769.

Lewis, E.E.; S. Selvan; J.F. Campbell & R. Gaugler. (1995) Changes in foraging behaviour during the infective juvenile stage of entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 110: 583-590. London: Cambridge University Press. 1960.

Lewis, E.E.; Ricci, M. E Gaugler, R. (1996) Host recognition behaviour reflects host suitability for the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*. *Parasitology*, 113, 573-579.

Lewis, E.E.; J. Campbell; C. Griffin; H. Kaya & A. Peters. (2006) Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 38: 66-79.

Machado, L. C. P. (2004) Pastoreio Racional Voisin: tecnologia agroecológica para o terceiro milênio. Porto Alegre: Cinco Continentes. p. 39, 314p.

Machado, L.A. (2006) Estudos biológicos e comportamentais de *Mgdolus frynus* (Westwood, 1863) (Coleóptera: Vesperidae) e sua interação com nematóides entomopatogênicos e outros agentes de mortalidade. Tese (Doutorado em Parasitologia)- Campinas-SP, Universidade Estadual de Campinas - UEC, 101p.

Machado I.R., Dolinski, C.M. (2005) Identificação de um isolado de nematóide entomopatogênico proveniente da Floresta Amazônica em Monte Negro, RO: Parte II. Anais do Encontro de Iniciação Científica, 10, Campos dos Goytacazes, Anais... UENF, p. 213.

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

McCoy, C.W.; D.I. Shapiro; L.W. Duncan & K. Nguyen. (2000) Entomopathogenic Nematodes and Other Natural Enemies as Mortality Factors for Larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control* 19: 182-190.

Mendes, M.C.; Braggio, M.M.; Haraguchi, M. (2002) Efeitos dos extratos de *Sesbania virgata*, *Tabebuia ochraceae* e *Tecoma stans* em larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini). Anais do Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, 12, Rio de Janeiro. Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 12. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002. CD ROM.

Moyle, P. L., Kaya, H. K. (1981) Dispersal and infectivity of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae), in sand. *J. Nematol.* 13: 295-300.

Murrel, A.; Campbell, N.J.H.; Barker, S.C. (2001) A total evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of the life cycles and biogeography. *Mol. Phylogenet.* v. 2, p. 244-258.

Nguyen, K. B., Smart, G. C. (1991) Mode of entry and sites of development of *Steinernema scapterisci* in mole crickets. *J. Nematol.* 23: 267-68.

Oliveira, A. A. (2002) Resistência do carrapato *Boophilus microplus* a carrapaticidas em bovinos de leite na região dos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. *Ver. Cient. Rural*, v. 7, n. 2 p. 64-71.

Onofrio, V.C., Venzal, J.M., Pinter, A., Szabó, M.P.J. (2006) Família ixodidae: características gerais, comentários e chaves para gêneros. *In*: Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H.(Ed.), carrapatos de importância médico-veterinária da região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo. p. 29-39.

Onofre, S.B., Miniuk, C.M., Barros, N.M., Azevedo, J.L. (2001) Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *American Journal of Veterinary Research* September 2001, v. 62, n. 9, Pages 1478-1480.

Passos Jr. N.C., Alves, S.B., Silveira Neto, S. (1995) Patogenicidade de *Steinernema carpocapsae*, formulação Exhibit, sobre diferentes castas de saúvalimão, *Atta sexdens rubropilosa*. Anais do Congresso Brasileiro de Entomologia, 15, Caxambu.

Pereira, C. (1937) *Rhabditis hambletoni* n.sp. nema aparentemente semiparasito da "broca do algodoeiro" (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Arch. Inst. Biol.* v.8, p. 215-230.

Peters, A. (1996) The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 389-402.

Poinar, G.O. Jr. (1989) Non-insect hosts for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Rev. Nematol.* 12: 423-28.

Prates, H.T.; Leite, R.C.; Craveiro, A.A.; Oliveira, A.B. (1998) Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 9, n. 2, p. 193-197.

Pruett, J.H. (1999) Immunological control of arthropods ectoparasites- a review. *International Journal of Parasitology*, 29: 25-32.

Pye, A. E. and Burman, M. (1981) *Neoaplectana carpocapsae*: Nematode accumulations on chemical and bacterial gradients. *Experimental Parasitology* 15, 13-20.

Ramos, C. I. (2001) Parasitoses dos bovinos e ovinos: epidemiologia e controle em Santa Catarina. Florianópolis: Epagri, 55p. (Epagri. Boletim Técnico, 121).

Ramos-Rodríguez, O., Christen, J.M., Ramaswamy, S.B., Campbell, J.F., Shapiro-Ilan, D.I., Lewis, E.E. (2007) Attraction behaviour of three

entomopathogenic nematode species towards infected and uninfected hosts. *Parasitology*, 134, 729-738.

Rasmann, S., Koßlner, T. G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J. and Turlings, T.C.J. (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature, London* 434, 732-737.

Real, C.M. (2003) Homeopatia Populacional. *Agroecologia Hoje*, n. 19, junho/julho, p12.

Reis, C. M. R. (2005) Associação entre o nematóide entomopatogênico *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) (Rhabditida: Steinernematidae) e um acaricida no controle de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Tese (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal)- Juiz de Fora-MG, Universidade Federal de Juiz de Fora- UFJF, 61p.

Renn, N. (1998) Routes of penetration of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* attacking larval and adult houseflies (*Musca domestica*). *Journal of Invertebrate Pathology* 72, 281-287.

Riding G.A., Jarmey J., Makenna R.V., Pearson R., Cobon G.S. & Willadsen P. (1994) A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *Journal of Immunology*. 153: 5158-5166.

Rodriguez, M.; Penichet, M.L.; Mouris, A. E. (1995) Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with recombinant Bm 75 antigen preparation. *Vet. Parasitol.*, v. 57, p. 339-349.

Rovesti, L., Heinzpeter, E. W., Tagliente, F., Deseo, K. V. (1988) Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis*

bacteriophora Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica* 34: 462-760, 148.

Rovesti, L., Deseo, K. V. (1990) Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica* 36: 237-45, 147.

Samish, M & Glazer, I. (1992) Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae). *Entomol. Soc. Am.* 29: 614-618.

Samish, M.; Aleseev, E. and Glazer, I. (1999a) Interaction between ticks (Acari: Ixodidae) and pathogenic nematodes (Nematoda): susceptibility of tick species at various developmental stages. *Journal of Medical*, 36: (6), 733-740.

Samish, M.; Alekseev, E. and Glazer, I. (1999b) Efficacy of entomopathogenic nematode strains against engorged *Boophilus annulatus* females (Acari: Ixodidae) under simulated field conditions. *Journal of Medical Entomology*, 36: (6), 727-732.

Samish, M.; E. Alekseev & I. Glazer. (2000) Mortality rate of adult ticks due to infection by entomopathogenic nematodes. *Journal of Parasitology*, 4 (86): 679-684.

Samish, M. & I. Glazer. (2001) Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends in Parasitology*, 8 (17): 368-371.

Samish, M.; H. Ginsberg & I. Glazer. (2004) Biological control of ticks. *Parasitology*, 129: 389-403.

Schmidt, J. and All, J. N. (1979) Attraction of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to common excretory products of insects. *Environmental Entomology* 8, 55-61.

Schmitt, A.T.; Gowen, S.R.; Hague, N.G.M. (1992) Baiting technique for the control of *Cosmopolites sordidus* Germar by *Steinernema carpocapsae*. *Nematropica* 22: 159-163.

Seifer, G.W. (1971) Ecto and endoparasitic effects on the growth rates of Zebu crossbred and british in the field. *Aut. Res.*, Melbourne, v. 22, p. 839-850.

Silva, W.J.; Silva, W.C.; Borges, L.M.F. (2002a) Avaliação de duas formulações comerciais de *Azadirachta indica* (Meliaceae) sobre fêmeas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Anais do Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, 12, Rio de Janeiro. Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 12, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002a. CD ROM.

Silva, W.J.; Silva, W.C.; Borges, L.M.F. (2002b) Eficácia de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre larvas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). In: Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, 12, 2002, Rio de Janeiro. Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 12, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, CD ROM.

Silva, E.R. (2006) Ação do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* isolado LPP1 sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Tese (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal) - Juiz de Fora – MG, Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF, 49 pp.

Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG). (1997). Versão 9.0. Viçosa, MG: UFV. 150p.

Sonenshine, D.E. (1991) Biology of ticks. In: The respiratory system. (12): 212-218. New York Oxford. v. 1, 446 pp.

Souza, A. C. (1999) Comportamento e ecologia de larvas e fêmeas ingurgitadas do carrapato *B. microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI:IXODIDAE) em pastagens de *Brachiaria decumbens*. Tese (Mestrado em Biologia)- Juiz de Fora-MG, Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF. 42p.

Souza, A. P. et al. (2003) Eficácia de carrapaticidas em rebanhos de bovinos leiteiros de municípios da região Centro Sul do Paraná. *Rev. de Ciências Agroveterinárias*, v. 2, n. 2, p 131-135. Lages.

Souza, C. A. et al. (1997) Características do controle químico do na Região sul do Rio Grande do Sul e relação com a resistência a carrapaticidas. In: X Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, I Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul. Itapema/SC, p. 129.

Stock, S.P. (1992) Presence of *Steinernema scapterisce* Nguyen et Smart parasitizing the mole cricket *Scapteriscus borellii* in Argentina. *Nematol. Mediterranea*, v. 20, n. 2, p. 163-165.

Stock, S.P. (1993) Description of an Argentinian strain of *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) (Nematoda: Steinernematidae). *Nematol. Mediterranea*, v. 21, n. 2, p. 279-283.

Stock, S.P. (1995) Natural populations of entomopathogenic nematodes in the Pampean region of Argentina. *Nematropica*, v. 25, n. 2, p. 143-148.

Stock, S.P. (2001) Systematics and Biology of Nematodes Parasites and Associates of Insects. Course on Systematics and biology of entomopathogenic nematodes, Brazil, September, 43p.

Thurston, G. S., Yule, W. N. and Dunphy, G. B. (1994) Explanations for the low susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* to *Steinernema carpocapsae*. *Biological Control*, 4, 53-58.

Utech, K.B.W.; Wharton, R.W.; Kerr, J.D. (1978) Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 29, p. 885-895.

Vasconcelos, V.O.; J. Furlong ; G.M. Freitas; C. Dolinski; M.M. Aguilera.; R.C.D. Rodrigues & M. Prata. (2004) *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 94: 201-206.

Veríssimo, C. J. (1995) Natural enemies of the cattle parasitic tick. *Agropecuaria Catarinense* 8, 35-37.

Veríssimo, C. J. (2004) Controle biológico e alternativo do carrapato do boi. APTA/SAA-SP, mimo. 3p.

Vieira, M. I., Tuerlinck, S. (1997) Avaliação da resistência do carrapato *Boophilus microplus* a carrapaticidas em rebanhos de corte e leite no município de Bagé, RS. Anais do X Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, I Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul. Itapema/SC, p. 132,

Villares, J.B. (1941) Climatologia zootécnica. III. Contribuição ao estudo da resistência e susceptibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. *Bol. Ind. Anim.*, v. 4, n. 1, p. 60-86.

Vivan, M. P. (2005) Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativa aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). 72p. Tese (Mestrado em Agroecossistemas)- Florianópolis-SC, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, 72p.

Wagland, B.M. (1978) Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 401-409.

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

Willadsen P., Cobon G. & McKenna R.V. (1996) Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*. 18: 241-246.

Willadsen, P.; Bird, P.; Cobon, G.S.; Hungerford, J. (1995) Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, v. 110, p. 43-50.

Williams, L.A.D. (1993) Adverse effects of extracts of *Artocarpus altilis* Park. and *Azadirachta indica* (A. Juss) on the reproductive physiology of the adult female tick, *Boophilus microplus* (Canest.) *Invertebrate Reproduction and Development*, v. 23, n. 2-3, p. 159-164.

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

Zimmerman, R. J., Cranshaw, W. S. (1990) Compatibility of three entomogenous nematodes (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. *J, Econ. Entomol.* 83: 97-100.

9- ANEXO

Tabela 1- Pesos médios (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.

Parâmetros analisados	Medidas determinadas	Quantidade de Juvenis infectantes por fêmea							
		Controle	15	30	60	120	240	480	960
Peso Inicial ¹	X ± DP	220,66 ^a ±42,55	237,79 ^a ±36,71	230,37 ^a ±35,60	238,46 ^a ±32,68	231,25 ^a ±37,14	238,21 ^a ±37,91	232,96 ^a ±47,78	236,66 ^a ±38,05
	IC*	(202,70-238,64)*	(222,29-253,30)*	(215,34-245,41)*	(224,66-252,26)*	(215,57-246,93)*	(222,20-254,22)*	(212,78-253,14)*	(222,59-254,74)*
	(n)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)
Peso da Postura ²		68,74 ^a ±26,63	63,37 ^a ±32,44	37,81 ^{ab} ±28,29	32,66 ^{ab} ±23,78	18,54 ^{bc} ±23,90	13,83 ^{bc} ±14,74	7,66 ^c ±9,29	3,33 ^c ±4,80
		(57,22-80,26)*	(49,67-77,08)*	(25,86-49,76)*	(22,62-42,71)*	(8,45-28,63)*	(7,60-20,06)*	(3,74-11,59)*	(1,31-5,36)*
		(23)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)
Alteração do Peso ²		164,71 ^a ±55,97	123,00 ^{ab} ±70,48	102,92 ^{abc} ±76,13	56,42 ^{bcd} ±43,70	36,12 ^{cd} ±53,76	34,21 ^d ±36,46	28,25 ^d ±14,22	23,16 ^d ±11,86
		(141,07-188,35)*	(93,23-152,77)*	(70,76-135,07)*	(37,96-74,87)*	(13,42-58,83)*	(18,81-49,61)*	(22,24-34,26)*	(18,16-28,17)*
		(23)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)

LPP4 – linhagem isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

X ± DP – média ± desvio padrão

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico - Kruskal-Wallis e Dunn

IC* - Intervalo de confiança

Tabela 2- Pesos médios (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.

Parâmetros analisados	Quantidade de Juvenis infectantes por fêmea								
	Medidas determinadas	Controle	15	30	60	120	240	480	960
Peso Inicial ¹	X ± DP	248,83 ^a ±33,28	253,54 ^a ±40,67	252,96 ^a ±34,85	250,91 ^a ±29,95	258,12 ^a ±25,65	256,37 ^a ±40,87	246,25 ^a ±33,75	250,42 ^a ±31,92
	IC*	(234,77-262,89)*	(236,37-270,72)*	(238,24-267,67)*	(238,27-263,57)*	(247,29-268,96)*	(239,11-273,64)*	(232,00-260,50)*	(236,94-263,90)*
	(n)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)
Peso da Postura ²		65,90 ^a ±31,73	49,14 ^a ±36,44	39,90 ^{ab} ±30,76	48,04 ^a ±43,00	13,29 ^{bc} ±13,78	9,00 ^{bc} ±8,83	8,50 ^c ±8,77	6,83 ^c ±6,75
		(51,46-80,35)*	(32,97-65,30)*	(26,27-53,55)*	(28,97-67,12)*	(6,21-20,38)*	(3,07-14,93)*	(3,83-13,17)*	(2,54-11,62)*
		(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)
Alteração do Peso ²		198,12 ^a ±30,13	101,12 ^{bc} ±66,85	98,21 ^{bcd} ±78,69	127,25 ^{ab} ±67,06	36,29 ^d ±18,84	54,00 ^{cd} ±44,76	53,62 ^{cd} ±42,77	37,04 ^d ±25,24
		(185,40-210,85)*	(72,89-129,36)*	(64,98-131,44)*	(98,93-155,57)*	(27,91-44,67)*	(18,81-49,61)*	(35,56-71,69)*	(26,38-47,70)*
		(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)

LPP4 – linhagem isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

X ± DP – média ± desvio padrão

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico – Kruskal-Wallis e Dunn

IC* - Intervalo de confiança

Tabela 3- Pesos médios (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe sensível tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.

Parâmetros analisados	Quantidade de Juvenis infectantes por fêmea								
	Medidas determinadas	Controle	15	30	60	120	240	480	960
Peso Inicial ¹	X ± DP	231,62 ^a ±49,64	227,29 ^a ±46,85	232,75 ^a ±46,86	230,62 ^a ±54,75	235,96 ^a ±51,90	230,62 ^a ±55,15	246,25 ^a ±47,26	233,83 ^a ±49,02
	IC*	(210,66-52,59)*	(207,50-247,08)*	(212,96-252,54)*	(207,50-253,75)*	(214,04-57,88)*	(207,33-253,92)*	(226,29-66,21)*	(213,13-254,53)*
	(n)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)
Peso da Postura ²		96,00 ^a ±33,35	57,12 ^b ±31,43	59,08 ^b ±32,33	64,60 ^b ±41,72	58,41 ^b ±29,81	40,54 ^{bc} ±38,84	12,58 ^c ±19,46	31,54 ^{bc} ±30,07
		(81,58-110,42)*	(43,85-70,40)*	(45,43-72,74)*	(37,34-72,58)*	(45,83-71,00)*	(24,14-56,94)*	(4,29-20,87)*	(11,84-44,24)*
		(23)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)
Alteração do Peso ²		178,50 ^a ±50,90	147,70 ^{ab} ±53,61	129,29 ^{abc} ±64,99	134,75 ^{abc} ±75,53	139,45 ^{abc} ±64,99	104,83 ^{bc} ±75,41	76,33 ^c ±62,08	131,25 ^{abc} ±71,65
		(157-200)*	(125,07-170,35)*	(101,84-156,54)*	(102,85-166,65)*	(113,28-165,64)*	(72,99-136,68)*	(50,12-102,55)*	(100,99-161,51)*
		(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)

LPP7 – linhagem isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

X ± DP – média ± desvio padrão

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico – Kruskal-Wallis e Dunn

IC* - Intervalo de confiança

Tabela 4- Pesos médios (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estirpe resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.

Parâmetros analisados	Quantidade de Juvenis infectantes por fêmea								
	Medidas determinadas	Controle	15	30	60	120	240	480	960
Peso Inicial ¹	X ± DP	150,00 ^a ±21,48	145,75 ^a ±18,18	146,92 ^a ±20,29	150,20 ^a ±22,56	144,33 ^a ±18,55	146,62 ^a ±22,71	150,58 ^a ±19,85	150,58 ^a ±19,85
	IC*	(140,93-159,07)*	(137,07-152,43)*	(138,35-155,49)*	(142,68-161,74)*	(136,50-152,17)*	(137,03-156,22)*	(142,20-158,97)*	(142,20-158,97)*
	(n)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)
Peso da Postura ²		53,05 ^a ±16,48	29,33 ^{bc} ±18,87	25,08 ^{bcd} ±22,37	39,75 ^{ab} ±20,57	22,46 ^{bcd} ±15,43	13,85 ^{cd} ±15,30	10,50 ^d ±8,64	10,00 ^d ±14,02
		(45,55-60,55)*	(21,36-37,30)*	(15,63-34,53)*	(31,06-48,44)*	(15,94-28,97)*	(7,39-20,31)*	(6,85-14,15)*	(4,08-15,92)*
		(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)
Alteração do Peso ²		97,08 ^a ±32,67	59,79 ^{bcd} ±39,07	53,46 ^{bcd} ±44,74	80,12 ^{ab} ±34,38	61,75 ^{abc} ±31,80	29,16 ^{de} ±37,63	26,58 ^e ±29,74	35,45 ^{ode} ±27,32
		(83,28-110,88)*	(43,29-76,29)*	(34,56-72,35)*	(65,60-94,64)*	(48,32-75,18)*	(13,27-45,06)*	(14,02-39,15)*	(23,92-46,70)*
		(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)

LPP7 – linhagem isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

X ± DP – média ± desvio padrão

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico – Kruskal-Wallis e Dunn

IC* - Intervalo de confiança

Tabela 5 - Períodos (dias) referentes a fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estipe sensível tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a 27 ± 1 °C e UR >80%.

Parâmetros analisados	Medidas determinadas	Quantidade de Juvenis infectantes por fêmea							
		Controle	15	30	60	120	240	480	960
Período de Pré Postura ²	X ± DP IC* (n)	3,74 ^a ±0,44 (3,54-3,93)* (23)	3,50 ^a ±0,51 (3,28-3,71)* (24)	3,74 ^a ±0,45 (3,54-3,93)* (23)	3,71 ^a ±0,46 (3,51-3,90)* (24)	3,83 ^a ±0,38 (3,67-3,99)* (24)	5,12 ^b ±0,90 (4,74-5,50)* (18)	3,56 ^a ±0,51 (3,29-3,83)* (16)	3,37 ^a ±0,52 (2,94-3,80)* (8)
Período da postura ²		17,56 ^a ±5,79 (15,06-20,07) (23)	3,50 ^{bc} ±2,75 (2,33-4,66) (24)	8,17 ^{ab} ±7,29 (5,02-11-33) (23)	4,87 ^{bc} ±5,28 (2,64-7,11) (24)	2,74 ^c ±1,86 (1,93-3,54) (24)	2,55 ^c ±1,20 (1,96-3,15) (18)	2,43 ^c ±0,51 (2,16-2,71) (16)	2,25 ^c ±0,71 (1,66-2,84) (8)
Período de sobrevivência ²		24,71 ^a ±7,79 (21,42-28,00) (24)	13,75 ^{ab} ±10,09 (9,49-18,01) (24)	11,08 ^{bc} ±7,29 (7,63-14,54) (24)	7,58 ^{bcd} ±5,26 (5,36-9,80) (24)	5,54 ^{cde} ±1,69 (4,83-6,26) (24)	5,12 ^{def} ±0,51 (3,29-3,81) (24)	3,56 ^f ±0,51 (3,29-3,83) (16)	4,25 ^{ef} ±0,53 (4,02-4,47) (24)

LPP4 – linhagem isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

X ± DP – média ± desvio padrão

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico – Kruskal-Wallis e Dunn

IC*

-

Intervalo

de

confiança

Tabela 6 - Períodos (dias) referentes a fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estipe resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP4, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.

Parâmetros analisados	Medidas determinadas	Quantidade de Juvenis infectantes por fêmea							
		Controle	15	30	60	120	240	480	960
Período de Pré Postura ²	X ± DP IC* (n)	4,66 ^a ±0,48 (4,46-4,87)* (24)	4,43 ^a ±0,51 (4,22-4,65)* (23)	4,74 ^a ±0,45 (4,54-4,93)* (23)	4,61 ^a ±0,50 (4,39-4,82)* (23)	4,37 ^a ±0,50 (4,11-4,64)* (16)	4,47 ^a ±0,51 (4,21-4,73)* (17)	4,50 ^a ±0,52 (4,20-4,80)* (14)	4,46 ^a ±0,52 (4,15-4,77)* (13)
Período da postura ²		12,42 ^a ±3,32 (11,04-13,82) (24)	5,96 ^b ±3,88 (4,28-7,63) (23)	5,87 ^{bc} ±4,25 (4,03-7,71) (23)	7,09 ^b ±4,38 (5,19-8,98) (23)	3,44 ^{bc} ±1,46 (2,66-4,21) (16)	3,41 ^{bc} ±1,37 (2,71-4,12) (17)	2,93 ^{bc} ±0,83 (2,45-3,41) (14)	2,46 ^c ±0,78 (1,99-2,93) (13)
Período de sobrevivência ²		20,04 ^a ±4,15 (18,29-21,80) (24)	9,71 ^{bc} ±4,70 (7,73-11,69) (24)	9,54 ^{bcd} ±4,14 (7,80-11,29) (24)	11,29 ^{ab} ±3,36 (9,09-13,56) (24)	6,33 ^{de} ±1,24 (5,81-6,86) (24)	6,54 ^{cde} ±1,32 (5,98-7,10) (24)	5,92 ^e ±1,06 (5,47-6,36) (24)	5,54 ^e ±0,78 (5,21-5,87) (24)

LPP4 – linhagem isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

X ± DP – média ± desvio padrão

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico – Kruskal-Wallis e Dunn

IC* - Intervalo de confiança

Tabela 7 - Períodos referentes a fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estipe sensível tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.

Parâmetros analisados	Quantidade de Juvenis infectantes por fêmea									
	Medidas determinadas	Controle	15	30	60	120	240	480	960	
Período de Pré Postura ²	X ± DP	6,47 ^a ±0,59	6,74 ^a ±0,75	6,54 ^a ±0,59	6,45 ^a ±0,67	6,37 ^a ±0,57	6,50 ^a ±0,60	6,43 ^a ±0,81	6,26 ^a ±0,65	
	IC*	(6,22-6,73)*	(6,41-7,06)*	(6,29-6,81)*	(6,16-6,75)*	(6,13-6,62)*	(6,22-6,78)*	(6,00-6,87)*	(5,95-6,58)*	
	(n)	(23)	(23)	(22)	(22)	(24)	(20)	(16)	(19)	
Período da postura ²	X ± DP	11,78 ^a ±3,03	6,56 ^{bc} ±4,85	8,36 ^{abc} ±6,65	6,86 ^{bc} ±4,62	8,95 ^{ab} ±5,15	5,15 ^{bc} ±2,52	3,37 ^c ±1,20	5,36 ^{bc} ±3,23	
	IC*	(10,47-13,09)	(4,47-8,66)	(5,41-11,31)	(4,81-8,91)	(7,50-6,78)	(3,97-6,33)	(2,73-4,02)	(3,81-6,93)	
	(n)	(23)	(23)	(22)	(22)	(24)	(20)	(16)	(19)	
Período de sobrevivência ²	X ± DP	19,65 ^a ±4,91	12,76 ^b ±4,63	12,75 ^b ±7,53	12,08 ^b ±4,66	14,37 ^{ab} ±5,28	10,04 ^{bc} ±2,82	8,17 ^c ±1,61	10,12 ^{bc} ±3,23	
	IC*	(13,53-21,78)	(10,75-14,66)	(9,57-15,93)	(10,11-14,05)	(12,14-16,61)	(8,85-11,23)	(7,49-8,84)	(8,76-11,49)	
	(n)	(23)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	(24)	

LPP7 – linhagem isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

X ± DP – média ± desvio padrão

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico – Kruskal-Wallis e Dunn

IC* - Intervalo de confiança

Tabela 8 - Períodos referentes a fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* estipe resistente tratadas com diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em condições de laboratório a 27 ± 1 °C e UR >80%.

Parâmetros analisados	Medidas determinadas	Quantidade de Juvenis infectantes por fêmea							
		Controle	15	30	60	120	240	480	960
Período de Pré Postura ²	X ± DP IC* (n)	5,25 ^{ab} ±0,55 (4,99-5,51)* (20)	5,21 ^{ab} ±0,60 (4,96-5,48)* (23)	5,36 ^{ab} ±0,66 (5,07-5,65)* (22)	5,50 ^{ab} ±0,66 (5,22-5,78)* (24)	5,72 ^a ±0,77 (5,39-6,07)* (22)	5,09 ^b ±0,42 (4,91-5,27)* (23)	5,25 ^{ab} ±0,55 (4,99-5,51)* (20)	5,25 ^{ab} ±0,55 (4,99-5,51)* (20)
Período da postura ²	X ± DP IC* (n)	11,28 ^a ±3,80 (9,56-13,01) (20)	5,91 ^{bc} ±3,78 (4,28-7,55) (23)	5,59 ^{bcd} ±4,45 (3,62-7,56) (22)	7,83 ^{ab} ±4,72 (5,84-9,83) (24)	4,95 ^{bcd} ±3,56 (3,37-6,53) (22)	3,60 ^{cd} ±2,67 (2,45-4,77) (23)	2,90 ^d ±0,85 (2,50-3,30) (20)	3,57 ^{cd} ±1,46 (2,87-4,28) (20)
Período de sobrevivência ²	X ± DP IC* (n)	17,79 ^a ±7,41 (14,66-20,92) (24)	9,95 ^{bc} ±3,57 (8,45-11,47) (24)	10,54 ^{bc} ±5,56 (8,19-12,89) (24)	12,70 ^{ab} ±5,61 (10,34-15,08) (24)	9,87 ^{bc} ±4,19 (8,10-11,65) (24)	7,79 ^{cd} ±3,41 (6,35-9,23) (24)	7,00 ^d ±0,88 (6,63-7,37) (24)	7,75 ^{cd} ±1,87 (6,96-8,54) (24)

LPP7 – linhagem isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

X ± DP – média ± desvio padrão

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico – Kruskal-Wallis e Dunn

IC* - Intervalo de confiança