

Leandro Barbiéri de Carvalho

**EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
(RHABDITIDA) SOBRE O CARRAPATO DOS BOVINOS *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* (ACARI: IXODIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção de grau de doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2008

C331e Carvalho, Leandro Barbiéri de, 1979-

Efeitos in vitro e in vivo de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) sobre o carrapato dos bovinos Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) / Leandro Barbiéri de Carvalho. – 2008. 37 p. : il.

**Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia**

**1. Carrapato – Controle – Teses. 2. Boophilus microplus – Controle – Teses. 3. Nematóides – Teses. 4. Carrapato de bovino – Controle biológico – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.**

CDD – 636.089 696 8

Assinaturas

DEDICATÓRIA

Àquela que com seu amor me apoiou diariamente, iluminando toda essa caminhada, abdicando-se de minha presença e abrindo mão de seus interesses primários em prol de meu crescimento profissional: minha doce Juliana.

Ao pequeno Augusto, que com seu amor puro e carinho sincero, me apoiou e me ensinou valiosas lições de vida.

Aqueles que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me incondicionalmente: meu pai Helio, minha mãe Marilene, vovó Maria e meu querido irmão Clayton.

À minha querida Elaine, que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite, um grande profissional e amigo, por seu exemplo, por todos os ensinamentos e oportunidades e por sempre ter acreditado em meu trabalho.

Ao Dr. John Furlong, pela preciosa orientação, ajuda, amizade e exemplo de cidadania.

Ao grande amigo “irmão” e funcionário da Embrapa Gado de Leite, Éder Sebastião dos Reis, pela ajuda fundamental, incondicional (dia, noite, finais de semana e feriados) e, acima de tudo, pela amizade.

À Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata, por sua valiosa contribuição no desenvolvimento e execução do experimento de tese.

Aos Professores Romário Cerqueira Leite e Paulo Roberto Oliveira pelas orientações ao longo dessa jornada.

Aos Drs. Alexander Machado Auad e Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto, pela ajuda e transmissão de suas experiências.

Aos amigos da Embrapa e de Belo Horizonte: Marão, Aline, Eldin, Gama, Cida, Joselito, Caio, Ericota, Wanessa, Abia, Lílian, Alessandra, Dani, Carla, Sílvia, Lata, Flávio e Camila pelos ótimos momentos de convivência.

Ao grande amigo Pedro Augusto Carvalho Pereira, pelo apoio e amizade.

À Dona Suely, Mariluz, Sr. Rômulo e Bete, Isabela, Tônico, Lílian, Mirian e Daniel, Seu Sebastião e Dona Cici, Del, Rosélia e Tiurico, pelo apoio, amizade, ajuda e inúmeras refeições.

Seu Murilo, Tia Maria, Lud, Tio Manoel, Tia Mônica, Tatá, Luísa e Vó Lourdes, pelo apoio e ótimos momentos de convivência.

A todos os funcionários da Embrapa Gado de Leite e da UFMG, em especial à Nilda, pela paciência e por seu trabalho

À Embrapa Gado de Leite, pela parceria.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de estudar e crescer profissionalmente e à Universidade Federal Fluminense, por minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo apoio ao projeto.

A todos os demais que direta ou indiretamente participaram dessa caminhada.

“Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas.”

Luis Fernando Veríssimo.

SUMÁRIO

		Pág.
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
	RESUMO	13
	ABSTRACT	13
1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.	NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	14
2.2.	CICLO BIOLÓGICO DOS NEPS	15
2.2.1.	Juvenis Infectantes (JIs).....	16
2.2.2.	Bactérias simbioses	17
2.3.	USO DOS NEPS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO	17
2.4.	OBSTÁCULOS NA UTILIZAÇÃO DOS NEPS COMO CONTROLADORES BIOLÓGICOS	19
3.	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1.	CRIAÇÃO DE <i>Galleria mellonella</i>	20
3.2.	MULTIPLICAÇÃO DOS NEPS.....	20
3.3.	CARRAPATOS.....	20
3.4.	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DE TEMPOS DE INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> DE FÊMEAS INGURGITADAS DE <i>Rhipicephalus microplus</i> POR <i>Steinernema glaseri</i> ESTIRPE CCA.....	22
3.5.	EXPERIMENTO 2: EFEITOS DA INFECÇÃO <i>IN VIVO</i> DE FÊMEAS INGURGITADAS DE <i>Rhipicephalus microplus</i> PELOS NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS <i>Steinernema glaseri</i> ESTIRPE CCA e <i>Heterorhabditis baujardi</i> ESTIRPE LPP7.....	23
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1.	EXPERIMENTO 1	25
4.2.	EXPERIMENTO 2	27
5.	CONCLUSÕES	30
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
LISTA DE TABELAS		
Tabela 1.	Peso inicial médio das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e os períodos médios de sobrevivência, pré-postura e postura do grupo controle e dos grupos expostos por diferentes tempos à ação do nematóide entomopatogênico <i>Steinernema glaseri</i> estirpe CCA, Juiz de Fora, 2006	25
Tabela 2.	Massa de ovos (g), taxa de eclosão larval (%), índices médios de postura de ovos e nutricional das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> do grupo controle e dos grupos expostos por diferentes tempos à ação do nematóide entomopatogênico <i>Steinernema glaseri</i> estirpe CCA, Juiz de Fora, 2006	26

Tabela 3.	Peso inicial médio das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e os períodos médios de sobrevivência, pré-postura e postura do grupo controle (Grupo 1) e dos grupos expostos à ação dos nematóides entomopatogênicos <i>Steinernema glaseri</i> estirpe CCA (Grupo 2) e <i>Heterorhabditis baujardi</i> estirpe LPP7 (Grupo 3), Juiz de Fora, 2007....	28
Tabela 4.	Massa de ovos (g), taxa de eclosão larval (%), índices médios de postura de ovos e nutricional das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> do grupo controle (Grupo 1) e dos grupos expostos à ação dos nematóides entomopatogênicos <i>Steinernema glaseri</i> estirpe CCA (Grupo 2) e <i>Heterorhabditis baujardi</i> estirpe LPP7 (Grupo 3), Juiz de Fora, 2007	28
Tabela 5.	Médias da temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar no Campo Experimental de Coronel Pacheco – MG, no período de janeiro a julho de 2007	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Papéis dobrados “em leque” para a reprodução de <i>Galleria mellonella</i> . Estádio adulto (mariposas).....	21
Figura 2.	Fôrmas de alumínio para criação das lagartas de <i>Galleria mellonella</i> , forradas com papel toalha e contendo ração de crescimento.....	21
Figura 3.	Armadilha de White contendo dez cadáveres de lagartas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos.....	21
Figura 4.	Garrafas para cultivo celular, adaptadas para estocagem de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos.....	21
Figura 5.	A) Fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> expostas ao nematóide entomopatogênico (NEP) <i>Steinernema glaseri</i> estirpe CCA em placas de <i>Petri</i> de cinco centímetros de diâmetro contendo 15g de areia peneirada e esterilizada, subdivididas em cinco partes por aparato de madeira; B) Fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i> pós-exposição ao NEP <i>S. glasei</i> estirpe CCA em placas de <i>Petri</i> de cinco centímetros de diâmetro sem areia, subdivididas em cinco partes por aparato de madeira; C) Aspecto edemaciado e enegrecido de fêmea ingurgitada de <i>R. microplus</i> infectada e morta pela ação do NEP <i>S. glaseri</i> estirpe CCA.....	22
Figura 6.	Eficácia dos tratamentos <i>in vitro</i> de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> submetidas a diferentes tempos de exposição ao nematóide entomopatogênico (NEP) <i>Steinernema glaseri</i> estirpe CCA, com a concentração de 1000NEPs/teleógina.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CECP	Campo Experimental de Coronel Pacheco
JIs	Juvenis Infectantes
NEPs	Nematóides Entomopatogênicos
UE	Unidade Experimental

RESUMO

Os carrapatos são susceptíveis à infecção por nematóides entomopatogênicos (NEPs). E esta susceptibilidade diverge quanto às espécies de carrapato estudadas, sua fase evolutiva, às espécies e estirpes de NEPs e o tempo ao qual os carrapatos ficam expostos aos NEPs. O presente trabalho teve como objetivo adicionar para a possibilidade do uso de NEPs no controle biológico do carrapato dos bovinos por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, avaliando tempos de infecção *in vitro* em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pelo NEP *Steinernema glaseri* estirpe CCA e avaliando a infecção *in vivo* de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pelos NEPs *S. glaseri* estirpe CCA e *Heterorhabditis baujardi* estirpe LPP7 por meio da análise dos parâmetros biológicos do carrapato. Os resultados obtidos demonstraram que um período de duas horas de exposição foi suficiente para que fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* fossem infectadas pelo NEP *S. glaseri* CCA e que, um período de exposição mínimo de 24h foi necessário para que houvesse infecção de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* por *S. glaseri* estirpe CCA, capaz de gerar eficácia no tratamento superior a 90%, *in vitro*. Bovinos infestados por fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram banhados por aspersão com solução contendo os NEPs *S. glaseri* estirpe CCA e *H. baujardi* estirpe LPP7, contudo não foi observada eficácia na infecção *in vivo* desses carrapatos pelos referidos NEPs.

Palavras-chave: nematóide entomopatogênico, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, carrapato.

ABSTRACT

Ticks are susceptible to infection by entomopathogenic nematodes (EPNs) and several works have presented ticks' susceptibility results to infection by EPNs. However, those studies are not standardized concerning ticks' species, their evolutive stage, EPNs' species and strains and period of time of ticks' exposure to EPNs. The goal of this work was to increase the knowledge necessary to enable the use of EPNs in the biological control of cattle tick by *in vitro* and *in vivo*, evaluating different times of *in vitro* infection by the EPN *Steinernema glaseri* strain CCA in engorged *Rhipicephalus microplus* females and evaluating *in vitro* infection of engorged *R. microplus* females by the EPNs *S. glaseri* strain CCA and *Heterorhabditis baujardi* strain LPP7 using the tick's biological parameter analysis. The results showed that a 2-hour-period of exposure was enough to have engorged *R. microplus* females infected by the EPN *S. glaseri* CCA and a minimum of 24 hours of exposure was necessary in order to have an infection of engorged *R. microplus* females by *S. glaseri* CCA able to promote more than 90% of treatment effectiveness. Bovines infected by engorged *R. microplus* females were sprinkled using a solution of *S. glaseri* strain CCA and *H. baujardi* strain LPP7, but no effectiveness of *in vivo* infection of these ticks by EPNs was observed.

Key-words: entomopathogenic nematodes, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tick.

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são parasitas hematófagos encontrados em praticamente todos os vertebrados terrestres. Possuem grande importância em saúde animal e humana e estão associados a prejuízos econômicos consideráveis na pecuária mundial.

O controle dos carrapatos é feito predominantemente com o uso de acaricidas, de variadas bases químicas. No entanto, ao longo das últimas décadas, o uso incorreto dessas substâncias levou à seleção de populações de carrapatos resistentes aos diversos grupos químicos existentes. Torna-se, por isso, fundamental a busca por alternativas eficientes que, simultaneamente, sejam menos poluentes ou agressivas para o meio ambiente e para a saúde humana e animal.

Várias alternativas não-químicas para o controle de carrapatos vêm sendo estudadas. Citam-se, como exemplos, o uso de fitoterápicos, vírus, bactérias, fungos e nematóides entomopatogênicos (NEPs). A utilização de NEPs como controladores biológicos torna-se interessante devido à adaptabilidade da técnica de seu uso aos processos já existentes de controle químico e biológico dos carrapatos.

Estudar interações entre NEPs e carrapatos, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, avaliando uma redução no período de tempo necessário para que uma fêmea ingurgitada de carrapato fosse infectada por um NEP, em contraste com o descrito na literatura, bem como aspergir solução contendo NEPs em bovinos infestados por carrapatos foram o foco deste trabalho e contribuíram para a linha de pesquisa que vem sendo conduzida na Embrapa Gado de Leite, segundo a qual o uso de NEPs no controle biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) (Murrel e Barker, 2003) pode ser viável no futuro.

Os objetivos específicos do presente estudo foram: 1) buscar o menor tempo de eficiência *in vitro* no processo de infecção

em teleóginas de *R. microplus* por *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) estirpe CCA através da análise sobre os parâmetros biológicos do artrópode tratado e; 2) testar a viabilidade da utilização de *S. glaseri* estirpe CCA e *Heterorhabdits baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae) estirpe LPP7 no controle de teleóginas de *R. microplus* fixadas em bovinos estabulados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Aproximadamente 20 espécies de carrapatos estão associadas às doenças bacterianas, virais ou parasitárias como anaplasmoses e babesioses, as quais podem induzir a morte do animal ou causar a diminuição na produção (Mauléon et al., 1993). O carrapato *R. microplus* é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino (Leal et al., 2003). Segundo Sutherst et al. (1983) e Furlong et al. (2004), a parasitose causada por *R. microplus* pode resultar em anemia, predispor à ocorrência de miíases, elevar custos com o controle envolvendo carrapaticidas, instalação e mão-de-obra, além daqueles detectados durante o processo de industrialização das peles, cuja qualidade é prejudicada pela ação do carrapato.

Há décadas os carrapatos vêm causando danos à pecuária. Em Cuba, Cordovés et al. (1980) citaram que as perdas estimadas devido à ação patógena dos carrapatos alcançaram cerca de oito milhões de dólares. No Brasil, Horn (1983) e Grisi (2002) estimaram que os prejuízos causados pelo carrapato *R. microplus* chegavam, respectivamente, a 968 milhões de dólares e 2 bilhões de dólares anualmente.

Os carrapaticidas químicos têm sido o principal meio de controle de *R. microplus*, mas a dependência de poucas bases químicas disponíveis no mercado, aliada à sua má utilização, levou à dispersão generalizada da resistência das populações de carrapatos em todo o mundo (Kunz e Kemp, 1994; Furlong, 1999).

A resistência de *R. microplus* aos carrapaticidas, após seu uso contínuo, ocorre como resultado de mudanças no sítio de ação desses produtos e do desenvolvimento de mecanismos adaptativos oriundos de uma série de mutações. Tais mecanismos incluem redução na taxa de penetração do produto, alteração do tegumento externo, mudanças no metabolismo, no armazenamento e excreção do produto químico (Leite et al., 1995; Furlong et al., 2004; Freitas et al., 2005).

A resistência de carrapatos aos grupos químicos já foi descrita em vários estados brasileiros: no Rio Grande do Sul, aos organofosforados, ao amitraz e às lactonas macrocíclicas, respectivamente, por Martins et al. (1995), Vargas et al. (2003) e por Martins e Furlong (2001). Em São Paulo e Rio de Janeiro, aos piretróides sintéticos, por Pereira e Lucas (1987), Leite (1988) e Laranja et al. (1989), respectivamente. De acordo com Furlong (1999), a maioria dos produtos comerciais no Brasil não apresenta eficiência superior a 75%.

Além do problema da resistência, existe crescente demanda mundial por alimentos sem resíduos químicos para consumo humano e a preocupação com a preservação dos recursos naturais. Esses fatos mostram a grande necessidade da busca de novas alternativas viáveis no controle do carrapato. O controle biológico poderá ser uma alternativa promissora, pois minimiza o acúmulo de resíduos químicos no leite, na carne e no ambiente, além de diminuir o problema da resistência aos acaricidas (Gomes, 1998; Samish e Rehacek, 1999; Samish, 2000).

Além da seleção de raças bovinas mais resistentes aos carrapatos, da utilização de técnicas de manejo que dificultam sua proliferação, como o rodízio das pastagens, e as pesquisas com imunobiológicos, existem estudos sobre o controle biológico de *R. microplus*. Citam-se como exemplos, a utilização de predadores invertebrados como formigas e predadores vertebrados como roedores, aves e anfíbios (Dreyer et

al., 1997; Samish e Rehacek, 1999; Samish, 2000; Sutherst et al., 2000; Leal et al., 2003). Na mesma linha encontram-se, freqüentemente, trabalhos utilizando, vírus, bactérias, fungos e nematóides entomopatogênicos para o controle de insetos e pragas (Cordovés, 1980; Brum e Teixeira, 1992a; Brum e Teixeira, 1992b; Bittencourt, 1997; Bittencourt, 1999; Dolinski, 2006c). Um trabalho experimental *in vitro* associando o NEP *H. bacteriophora* JPM4 ao fungo *Metarhizium anisopliae* para controlar uma praga dos canaviais (*Diatraea saccharalis*) foi recentemente apresentado (Acevedo et al., 2007).

2.1. NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Nematóides ou vermes cilíndricos não segmentados pertencem ao Filo Nematoda e estão entre os organismos mais numerosos do planeta (Dolinski, 2006a). A ordem Rhabditida compreende famílias de NEPs utilizados no controle biológico de várias espécies de insetos e ácaros (Georgis e Manweiler, 1994; Smart JR, 1995; Doucet et al., 1998; Taylor et al., 1998). Dentro da ordem Rhabditida as duas maiores famílias de nematóides entomopatogênicos são Steinernematidae e Heterorhabditidae. Atualmente são conhecidos três gêneros de nematóides entomopatogênicos: *Steinernema* spp., *Heterorhabditis* spp. e *Neosteinerinema* sp. Várias espécies já foram isoladas, caracterizadas filogeneticamente, portanto, catalogadas, encontrando-se em bancos genéticos e laboratórios espalhados pelo mundo (Hominick et al., 1996; Adams e Nguyen, 2002).

2.2. CICLO BIOLÓGICO DOS NEPS

O ciclo de vida dos NEPs inclui três fases de desenvolvimento: ovo, juvenil e adulto (machos e fêmeas), sendo a fase juvenil composta de quatro estádios - J1, J2, J3 ou Juvenil Infectante (JI) e J4 (Dolinski, 2006a).

O JI, único ínstar de vida livre dos nematóides entomopatogênicos, habita o solo, onde consegue encontrar o hospedeiro, penetrando pelas suas aberturas corporais naturais (boca,

espiráculos respiratórios e poros anal e genital), ou pela sua cutícula (principalmente *Heterorhabditis* spp.), alcançando a hemocele. A habilidade dos *Heterorhabditis* spp. em penetrar a cutícula do hospedeiro vem da presença de um dente quitinoso localizado frontalmente em sua extremidade anterior (Kaya e Gaugler, 1993; Dolinski, 2006a).

Os NEPs das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae carregam bactérias simbióticas dos gêneros *Xenorhabdus* spp. ou *Photorhabdus* spp., respectivamente, em seus intestinos, as quais são liberadas dentro do hospedeiro, causando sepse e ocasionando sua morte dentro de 24 a 72h pós-infecção (Dowds e Peters, 2002). Dentro do hospedeiro, os nematóides alimentam-se, desenvolvem-se em adultos maduros sexualmente, acasalam-se e se reproduzem freqüentemente por múltiplas gerações, antes que uma nova geração de juvenis infectantes rompa o cadáver do hospedeiro e vá para o ambiente (Kaya e Gaugler, 1993; Kaya et al., 1993). Duas ou três gerações de nematóides adultos podem ocorrer em insetos hospedeiros (O'Leary et al., 1998). O aumento na densidade populacional de nematóides no cadáver somado às condições limitantes de nutrientes levam ao desenvolvimento das formas resistentes, os JIs. Estes emergem do cadáver e penetram no solo carregando a bactéria em seu intestino, prontos para infectar um novo hospedeiro (Poinar, 1990; Stuart et al., 1996). Os JIs (L3) retêm a cutícula de L2 como forma de resistência no ambiente. Nessa fase os JIs não se alimentam e sobrevivem com sua reserva energética corporal (Woodring e Kaya, 1988).

O ciclo de vida de *Heterorhabditis* spp. é similar ao de *Steinernema* spp., porém os adultos da primeira geração são hermafroditas e a progênie destes hermafroditas é composta de machos e fêmeas (Adams e Nguyen, 2002). O ciclo de *Neosteinerema* também se assemelha ao de *Steinernema*, com as diferenças de haver somente uma geração no hospedeiro (Nguyen e Smart, 1994).

De acordo com Nguyen e Smart (1990) e Martin (1997), a duração do ciclo dos NEPs depende da temperatura ambiental e da espécie de hospedeiro, que em geral, poderá durar de seis a 18 dias, com temperaturas entre 18 e 28 °C em *Galleria mellonella* LINNAEUS, 1758 (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE).

2.2.1. Juvenis Infectantes (JIs)

Lewis (2002) classificou os juvenis infectantes de acordo com o comportamento de procura em três categorias: emboscadores, cruzadores e intermediários. As espécies emboscadoras nictam, ou seja, levantam quase a totalidade do corpo da superfície, apoiando-se sobre a cauda. Um exemplo de espécie emboscadora é *S. carpocapsae*, que além de levantar-se, salta e circula a procura do hospedeiro. Esta espécie está adaptada para infectar hospedeiros que se movimentam sob a superfície do solo (Kondo e Ishibashi, 1986). Ao contrário, *S. glaseri* e *H. baujardi* não nictam, porém arrastam-se à procura do hospedeiro sendo, portanto, classificadas como cruzadoras. Esses se movem ativamente à procura do hospedeiro, localizando-os pelos produtos de excreção, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura (Dolinski, 2006a). Dessa forma, de acordo com a estratégia adotada, aumenta-se a probabilidade de encontro e reconhecimento do hospedeiro susceptível (Schroeder e Beavers, 1987; Campbell e Kaya, 2002). Os JIs de comportamento intermediário apresentam características de cruzadores e emboscadores, de acordo com a proximidade do hospedeiro (Dolinski, 2006a).

Steinernematidae e Heterorhabditidae são capazes de se dispersar por curtas e longas distâncias (Lewis, 2002). Segundo Downes e Griffin (1996), os JIs se dispersam ativamente à procura de microambiente adequado e hospedeiro susceptível, que por sua vez atrai os nematóides através de seus materiais fecais e gradientes térmicos.

2.2.2. Bactérias simbiotes

As bactérias simbiotes *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. pertencem à família Enterobacteriaceae, são anaeróbicas facultativas, gram-negativas e estão presentes na parte anterior do intestino dos NEPs da família Heterorhabditidae ou contidas em uma vesícula no intestino dos NEPs da família Steinernematidae (Akhurst, 1980; Chiche e Ensign, 2003).

A relação entre a bactéria e o nematóide é simbiótica porque a bactéria faz a bioconversão do tecido do hospedeiro como fonte de alimento para o nematóide, além da própria biomassa bacteriana lhe servir de alimento. Essas bactérias produzem toxinas que causam a morte dos insetos e produzem antibióticos que impedem o crescimento de outros microrganismos oportunistas (Dolinski, 2006a). Por outro lado, o nematóide fornece abrigo à bactéria, uma vez que ela não é encontrada sozinha na natureza (Woodring e Kaya, 1988). Apesar do processo patogênico ser o resultado da interação inseto-nematóide-bactéria, Han e Ehlers (2000) demonstraram que *Steinernema* sp. pode matar *G. mellonella* quando aplicado axenicamente, sem o simbiote. Porém, o tempo necessário para a morte foi mais lento, sugerindo que o nematóide passou a sintetizar entomotoxinas. Igualmente, quando somente a bactéria é inoculada no inseto, também ocorre a morte do mesmo, contudo sendo constatada a necessidade de grande número desses microrganismos. De acordo com Wouts (1991), um único nematóide, liberando de uma a três bactérias na hemocele de *G. mellonella* é capaz de matá-la dentro de 48 horas.

Segundo Grewal e Conserve (1997), a interação entre as bactérias simbióticas e os nematóides não é tão específica como se pensava. Em seus estudos, esses autores observaram que juvenis de *S. scapterisci* contendo bactérias de outro nematóide foram mais patogênicos à *G. mellonella* do que carregando seu simbiote natural.

2.3. USO DOS NEPS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Os NEPs vêm sendo utilizados no controle de insetos-praga, desde a década de 30 (Dolinski, 2006b). Os mesmos possuem uma ampla lista de atributos para controlar biologicamente insetos residentes no solo (Friedman, 1990). Apresentam uma ampla ordem de hospedeiros e podem ser produzidos e estocados em massa, tanto em substratos sólidos, como esponja de poliéster-poliuretano ou vermiculite, como também em meios gelatinosos, como gel de poliácridamida e gel de alginato, em anidrobiose, na forma de pó-molhável ou grânulos e em meio líquido, como água destilada (Friedman, 1990; Grewal, 2002). Apresentam fácil manipulação, baixo custo de produção, compatibilidade com produtos químicos, resistência às variações ambientais e podem apresentar longo tempo de estocagem, dependendo da técnica aplicada. Os NEPs podem ser aspergidos pelos sistemas convencionais de aplicação de pesticidas, como irrigação e bombas elétricas, mecânicas ou costais. Estes fatores, quando somados, têm estimulado o intenso interesse no seu desenvolvimento como inseticidas biológicos (Gaugler e Han, 2002; Grewal, 2002; Shapiro-Ilan et al., 2006).

Outra característica observada é que os JIs podem ser liberados juntamente com pesticidas químicos através de equipamentos usuais de pulverização, podendo resistir à pressão da pulverização. Outros métodos incluem irrigação por liberação inundativa, jatos que liberam uma névoa de nematóides e, até mesmo, aspersão com o uso de aviões ou helicópteros (Georgis, 1990; Shapiro-Ilan et al., 2006).

Os NEPs são usados em todo o mundo no controle biológico de insetos-praga. No entanto, o seu uso no controle biológico de carrapatos encontra-se no campo experimental. Samish e Glaser (1991) foram os pioneiros nas pesquisas envolvendo exposições de carrapatos a nematóides entomopatogênicos. A susceptibilidade dos carrapatos aos nematóides rhabditídeos

difere entre as espécies e linhagens de nematóides, de carrapatos e entre os estádios de desenvolvimento dos últimos. Pelo menos 16 espécies de ixodídeos e três de argasídeos já foram expostas a nematóides entomopatogênicos ocasionando suas mortes (Samish e Glaser, 2001). Testes em laboratório revelaram que as fêmeas ingurgitadas são mais susceptíveis do que as não ingurgitadas, sendo os estádios imaturos e os ovos os mais resistentes de todos (Samish et al., 1999). Treze espécies de carrapatos ixodídeos e duas espécies de argasídeos são comprovadamente susceptíveis aos nematóides, sendo os adultos aparentemente mais susceptíveis (Samish, 2000). Fêmeas ingurgitadas de *Boophilus annulatus* foram susceptíveis as infecções por nematóides entomopatogênicos (Samish e Glaser, 1992). *Steinernema glaseri* e *Steinernema carpocapsae* foram patogênicos para fêmeas ingurgitadas de *Ixodes scapularis* (Zhioua et al., 1995). Kocan et al. (1998a) observaram que *Dermacentor variabilis*, *R. sanguineus*, *Amblyomma maculatum* e *A. cajennense* foram susceptíveis à infecção por *S. feltiae* e *S. riobravus*. A exposição dessa espécie de carrapato aos NEPs citados por apenas uma hora resultou em mortalidade, e essa mortalidade cresceu linearmente até 100% quando o tempo de exposição atingiu 32 horas. Em outra pesquisa, Kocan et al. (1998b) expuseram fêmeas parcialmente ingurgitadas de *A. americanum* e *D. variabilis* ao NEP *S. riobravus* por 8, 24, 48 e 96 horas, encontrando, via auxílio de microscopia óptica, NEPs na hemocele daquelas fêmeas expostas por 24 horas ou mais.

Pesquisa desenvolvida no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite por Vasconcelos et al. (2004) demonstrou que nematóides entomopatogênicos são eficientes controladores biológicos de *R. microplus*, *in vitro*. A susceptibilidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* às infecções por juvenis infectantes de *S. glaseri* estirpe Santa Rosa é indicada pela sua rápida mortalidade e pela redução da postura e massa de ovos. Tais constatações demonstraram o potencial dessa espécie de

NEP como agentes controladores da espécie do carrapato acima citada. Em outro estudo, Freitas-Ribeiro et al. (2005) observaram que todos os parâmetros biológicos de fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas e parcialmente ingurgitadas foram alterados quando expostos aos juvenis infectantes dos NEPs *S. carpocapsae*, estirpes Santa Rosa e ALL. Esses estudos apontaram a necessidade de se pesquisar o uso dos NEPs como agentes biológicos controladores de *R. microplus* em condições de campo. Reis-Menini et al. (2008) avaliaram a associação entre o NEP *S. glaseri* estirpe Santa Rosa e um acaricida organofosforado, em diferentes diluições, para o controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. microplus*. Os resultados obtidos apontaram para uma maior eficácia dos tratamentos com as concentrações mais baixas do acaricida em associação com *S. glaseri*.

O desenvolvimento de novas ferramentas como o uso de técnicas moleculares aplicadas às comunidades de nematóides poderão conferir maior precisão e agilidade aos estudos (Cares, 2006). O melhoramento genético pode ser ferramenta útil para tornar os NEPs mais adaptados para os diversos ambientes (Dolinski, 2006a). Estudos com seleção de pressão a *H. baujardi* LPP7 levou à seleção de linhagem mais tolerante a temperaturas mais elevadas sem perda da infectividade (Del Valle et al., 2005). Na mesma linha de pesquisa, Somvanshi et al. (2008) investigaram a expressão gênica em nematóides que foram tolerantes ou sensíveis à dessecação. Nessa pesquisa foram encontrados quatro genes relacionados (aldeído desidrogenase, proteína 1 dos nucleosomas, glutation-peroxidase e proteína de choque térmico 40) em cinco espécies de nematóides entomopatogênicos (*S. feltiae* estirpe IS-6, *S. feltiae* estirpe Carmiel, *S. carpocapsae* estirpe Mexicano, *S. riobrave*, e *H. bacteriophora* estirpe TTO1) com divergentes graus de tolerância: *H. bacteriophora* TTO1 foi o mais suscetível à dessecação, mas mostrou a mais alta expressão de todos os genes estudados sob dessecação. *S. carpocapsae* estirpe Mexicano e *S. riobrave* mostraram a menor

expressão dos genes, mas estes foram mais tolerantes à dessecação. Esses genes podem ser utilizados como marcadores de tolerância à dessecação dos nematóides entomopatogênicos. Recentemente, Dolinski et al. (2008) realizaram caracterização molecular de NEPs obtidos de amostras de solo da floresta amazônica (Monte Negro/RO), identificando duas espécies e nove estirpes (*H. indica* estirpes LPP1, LPP2, LPP3, LPP4 e LPP9 e *H. baujardi* estirpes LPP5, LPP7, LPP8 e LPP10).

2.4. OBSTÁCULOS NA UTILIZAÇÃO DOS NEPS COMO CONTROLADORES BIOLÓGICOS

O limitado tempo de estocagem dos juvenis infectantes é um dos obstáculos para a utilização dos NEPs no controle biológico. Estudo realizado por Selvan et al. (1993) avaliou o tempo de sobrevivência *in vitro* de três espécies de nematóides entomopatogênicos (*S. glaseri*, *Steinernema carpocapsae* e *H. bacteriophora*), no qual verificou-se a sobrevivência de 36, 16 e 7 semanas, respectivamente para as espécies citadas. A estabilidade de armazenamento dos JIs é dependente da temperatura, das espécies e da densidade de nematóides estocados (Fan e Hominik, 1991). Segundo Dolinski (2006a), para cada estirpe trabalhada, é necessária uma diferente temperatura de estocagem, e essa temperatura pode variar de 4 a 16 °C, por um a três meses.

Durante a estocagem *in vitro*, por exemplo, os JIs de *H. bacteriophora* movem-se ativamente na água (Gaugler e Campbell, 1991), enquanto que os JIs de *S. carpocapsae* assumem, em sua maioria, um aspecto estacionário em "J" (Hara e Kaya, 1983). O comportamento assumido pelas diferentes espécies, estacionário ou não, contribui para o tempo de estocagem, bem como as reservas lipídicas dos JIs (Woodring e Kaya, 1988).

Outros fatores que limitam a sobrevivência dos NEPs são a temperatura, irradiação ultravioleta, dessecação e oxigenação

(Grewal et al., 2002). Cada estirpe de NEP possui uma faixa de temperatura ideal para a sua sobrevivência, infectividade e reprodução; temperatura essa relacionada às suas condições climáticas de origem (Molyneux, 1986).

A produção massal dos NEPs deve ser escolhida de acordo com a necessidade e a disponibilidade de espaço e investimento. O método de produção *in vivo* demanda mais espaço e mão-de-obra, enquanto que os métodos de multiplicação *in vitro* necessitam de fatores de crescimento e da presença da bactéria simbiótica (Dolinski, 2006b). De acordo com Gaugler e Han (2002), 95% dos nematóides hoje comercializados são produzidos em sistemas de cultura líquida por cerca de 30 companhias estrangeiras como MicroBio, E-Nema e SDS Biotech.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, situado na cidade de Juiz de Fora - MG e no Campo Experimental de Coronel Pacheco (CECP), localizado no município de Coronel Pacheco - MG, no período de dezembro de 2005 a julho de 2007.

Para o teste *in vitro* foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* provenientes de uma propriedade rural localizada no município de Barbacena - MG. Para o teste *in vivo* foram utilizadas fêmeas ingurgitadas sensíveis de *R. microplus* cepa Porto Alegre provenientes da colônia mantida no CECP. Esta colônia era renovada periodicamente e apresentava produção quinzenal de fêmeas ingurgitadas, as quais eram mantidas em estufa climatizada B.O.D (27±1°C e UR > 80%), produzindo massas de ovos e conseqüentemente, larvas.

Neste estudo foram utilizados os JIs do NEP *S. glaseri* estirpe CCA e o NEP *H. baujardi* estirpe LPP7. Para multiplicá-los, foram utilizadas lagartas de *G. mellonella*.

3.1. CRIAÇÃO DE *Galleria mellonella*

Para haver um contínuo estoque de nematóides entomopatogênicos, foi necessário propagá-los em lagartas da mariposa *G. mellonella*, conhecidas por causarem danos em colméias de abelhas por se alimentarem de favos, cera, mel e pólen. Exemplos dessa espécie são freqüentemente usados em vários países como multiplicadores de nematóides, pois são bons hospedeiros para a reprodução destes, além de serem facilmente encontrados e criados (Lindegren et al., 1993).

Os adultos foram mantidos em câmaras de acasalamento que consistiam de recipientes plásticos de 24 x 25 cm de diâmetro com tampas aeradas (baldes plásticos com tampas adaptadas). Papéis dobrados em forma de sanfona foram depositados dentro das câmaras para que os adultos pudessem fazer a postura sobre os mesmos (Figura 1). Após a postura, esses papéis foram transferidos para fôrmas de alumínio (5 x 25cm) com tampa telada de ferro galvanizado (Figura 2) com o objetivo de facilitar a ventilação (fôrmas de pizza com tampas adaptadas). Nas fôrmas colocava-se um substrato para que as larvas eclodidas se alimentassem. A eclosão ocorria após oito a 10 dias e em aproximadamente 30 dias as lagartas atingiam o último ínstar (7^o), ideal para a multiplicação dos NEPs. A dieta artificial continha 120g de mel, 120g de açúcar mascavo, 130g de glicerol, 400g de leite, 120g de levedo de cerveja, 200g de germen de trigo, 200g de farinha de trigo e 200g de farelo de trigo. O material foi mantido em estufa à temperatura de 27±1°C e UR > 80% segundo as recomendações de Cardoso (2004). Outra parte das lagartas foi mantida até a fase adulta para que completassem seu ciclo biológico, mantendo a criação.

3.2. MULTIPLICAÇÃO DOS NEPS

As lagartas do 7^o ínstar (*G. mellonella*), pesando aproximadamente 0,26g foram retiradas das fôrmas e usadas para a

produção de nematóides. Dois ml de suspensão aquosa contendo juvenis infectantes foram espalhados sobre placas de *Petri* de nove cm de diâmetro, forradas previamente com duas folhas esterilizadas de papel de filtro do mesmo tamanho. Sobre essas placas, 10 lagartas de *G. mellonella* foram liberadas. As placas foram então envolvidas em filme plástico, a fim de se evitarem a evaporação e a entrada de outros organismos. O material foi mantido em estufa a 28°C por 48 horas.

Após esse período, as lagartas mortas e infectadas foram transferidas para as "armadilhas de White" (Kaya, 1990) para posterior coleta dos nematóides. Tais armadilhas consistiam em uma placa de *Petri* de 12cm de diâmetro com um vidro de relógio de menor tamanho em seu interior, uma folha de papel filtro sobre o mesmo, sobre o qual ficavam as lagartas mortas, e água destilada ao redor (Figura 3). Dentro de oito a 10 dias após a exposição, os juvenis infectantes migravam das armadilhas para a água. Os nematóides foram coletados diariamente por até duas semanas consecutivas, ou enquanto foi possível observar sua presença. Após cada coleta, foi repostada a água destilada no interior da armadilha. A água contendo as formas infectantes dos NEPs foi vertida diariamente em peneira de aço inox de malha 500 (própria para análises de solos) e a suspensão armazenada em garrafas para cultivo celular (Figura 4) e acondicionada em estufa B.O.D à 10 ± 1°C, no caso de *S. glaseri* CCA e à 25°C ±1°C para *H. baujardi* LPP7.

3.3. CARRAPATOS

As teleóginas utilizadas para os testes *in vitro* foram coletadas em uma propriedade rural do município de Barbacena e enviadas via correio (Sedex®) em caixa de papelão para realização do biocarrapaticidograma, serviço prestado gratuitamente pela Embrapa Gado de Leite. As mesmas foram contadas, pesadas e selecionadas para ambos os testes.

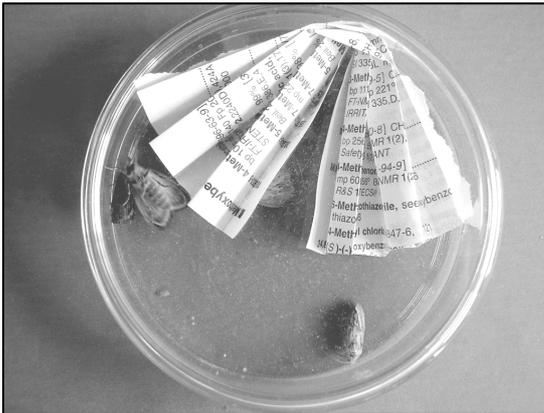


Figura 1: Papéis dobrados “em leque” para a reprodução de *Galleria mellonella*. Estádio adulto (mariposas).

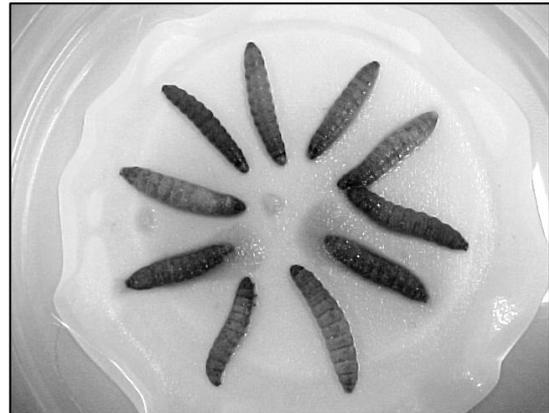


Figura 3: Armadilha de White contendo dez cadáveres de lagartas de *Galleria mellonella* infectadas com juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos.



Figura 2: Fôrmas de alumínio para criação das lagartas de *Galleria mellonella*, forradas com papel toalha e contendo ração de crescimento.



Figura 4: Garrafas para cultivo celular, adaptadas para estocagem de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos.

As fêmeas do carrapato *R. microplus* (cepa sensível Porto Alegre) utilizadas no Experimento 2 foram provenientes da colônia mantida na Estação Experimental de Coronel Pacheco. Três bezerros da raça girolando, grau de sangue $\frac{3}{4}$, foram estabulados e tratados com dois banhos carrapaticidas intervalados de 21 dias. Após 40 dias, observada ausência de carrapatos nos animais, os mesmos foram infestados com larvas de *R. microplus*. No 18º dia pós-infestação, esses bezerros foram estabulados em baias suspensas e ripadas, próprias para recuperação das teleóginas que se desprendiam naturalmente. Em seguida, as teleóginas foram conduzidas ao Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, acondicionadas em placas de *Petri* e colocadas em estufa B.O.D à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80% para a realização da postura e recuperação das larvas provenientes de seus ovos. Essa colônia era renovada periodicamente e apresentava produção quinzenal de fêmeas ingurgitadas. No período em que os bezerros ficaram estabulados, os mesmos foram alimentados com capim picado, cana-de-açúcar picada e concentrado, duas vezes ao dia, e sal mineral e água à vontade. As baias possuíam área coberta e solário, para proporcionar maior conforto aos animais. Todos os dias foi realizada a limpeza das instalações.

3.4. EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DE TEMPOS DE INFECÇÃO *IN VITRO* DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus microplus* POR *Steinernema glaseri* ESTIRPE CCA.

Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram pesadas individualmente em balança analítica, para que houvesse separação homogênea (estatisticamente semelhante) dos grupos tratados e controle. As fêmeas ingurgitadas foram separadas em 48 placas de *Petri* de cinco centímetros de diâmetro, contendo 15g de areia previamente peneirada e esterilizada, subdivididas em cinco partes iguais por um aparato de madeira (Figura 5A). Cada placa continha cinco teleóginas.

Cada teleógina foi considerada uma unidade experimental (UE). Foram montados sete grupos, seis tratamentos mais um grupo controle, cada um contendo 30 UE.

Para a estimativa do número de JIs, foi feito um *pool* das soluções-estoque, previamente armazenadas a $15^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ em garrafas para cultivo celular de 25cm^2 . Após homogeneização, foram coletadas 20 alíquotas de 10 μl da solução com os JIs, depositadas sobre 10 lâminas de vidro cobertas com lamínula, para contagem em microscópio estereoscópio. Realizada a contagem, ajustou-se as respectivas concentrações para quatro ml de suspensão.

Com o auxílio de uma pipeta de vidro graduada, os grupos tratamento foram expostos por gotejamento a quatro ml de uma suspensão na concentração de 5000 JIs do NEP *S. glaseri* estirpe CCA por placa de *Petri*, ou 1000 JIs por fêmea, concentração essa capaz de matar 90% das fêmeas ingurgitadas e de reduzir 90% da massa de ovos oviposta, após 72 horas de exposição, segundo Vasconcellos et al. (2004). Os seis grupos tratados foram expostos aos nematóides respectivamente, durante os seguintes períodos: duas horas (G1), seis horas (G2), 12 horas (G3), 24 horas (G4), 48 horas (G5) e 72 horas (G6). O grupo G7 foi o grupo controle, exposto a quatro ml de água destilada por 72 horas.

As placas de *Petri* devidamente identificadas foram acondicionadas em câmara climatizada sob condições ideais para os carrapatos e para os nematóides ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80%).

Decorrido o tempo de exposição de cada tratamento descrito acima, as fêmeas ingurgitadas foram retiradas das placas com areia e transferidas para placas de *Petri* sem areia, de igual tamanho, subdivididas e identificadas (Figura 5B), sendo acondicionadas novamente em câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR > 80%).

Detectado o fim da postura, os ovos foram recolhidos, pesados e transferidos para seringas plásticas descartáveis previamente preparadas, identificadas e tampadas com algodão hidrofílico, igualmente mantidas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%. Três dias após o fim da postura, as fêmeas foram novamente pesadas para a obtenção do peso residual. As fêmeas que morreram antes da realização da postura ou durante o período de postura tiveram seus pesos tomados três dias após sua morte.

A mortalidade das teleóginas foi registrada diariamente através de observações como ausência de reflexo das patas, mudança de coloração e aspecto edemaciado (Figura 5C).

Os parâmetros biológicos analisados foram período de pré-postura (período que compreendeu a data da coleta da fêmea ingurgitada até o início da postura), período de postura (período compreendido entre o início e o fim da postura), tempo de sobrevivência (tempo transcorrido desde a exposição até a morte da fêmea), peso da massa de ovos ao final da postura ou até a morte da fêmea, índice de produção de ovos, índice nutricional, percentual de eclosão de larvas, índice de fertilidade e eficácia dos tratamentos (Drummond et al. 1973).

Foram empregadas análise de variância e teste de Tukey-Kramer aos níveis de 5% em cada parâmetro avaliado, para verificação da existência de diferenças significativas determinadas pelo tratamento experimental. Para análise de parâmetros em que a diferença entre desvios padrões foi considerada, pelo teste de Bartlett, significativa, caracterizando uma amostragem de distribuição não normal, os testes citados foram substituídos pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn, respectivamente. Os dados adquiridos em porcentagem foram transformados em $2\sqrt{\text{arco seno } x}$.

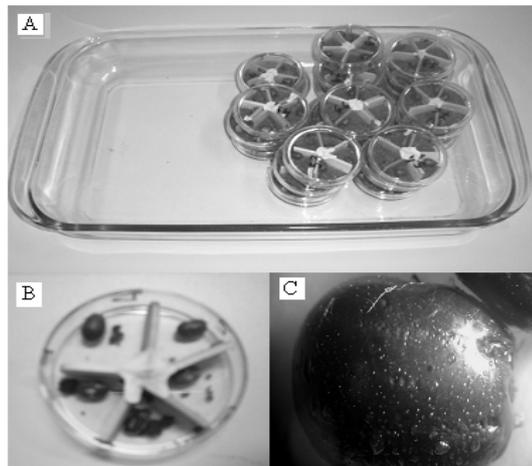


Figura 5 A) Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expostas ao nematóide entomopatogênico (NEP) *Steinernema glaseri* estirpe CCA em placas de Petri de cinco centímetros de diâmetro contendo 15g de areia peneirada e esterilizada, subdivididas em cinco partes por aparato de madeira; B) Fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* pós-exposição ao NEP *S. glasei* estirpe CCA em placas de Petri de cinco centímetros de diâmetro sem areia, subdivididas em cinco partes por aparato de madeira; C) Aspecto edemaciado e enegrecido de fêmea ingurgitada de *R. microplus* infectada e morta pela ação do NEP *S. glaseri* estirpe CCA.

3.5. EXPERIMENTO 2: EFEITOS DA INFECÇÃO *IN VIVO* DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Rhipicephalus microplus* PELOS NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS *Steinernema glaseri* ESTIRPE CCA e *Heterorhabditis baujardi* ESTIRPE LPP7.

Para o teste de estábulo, foram selecionados do rebanho da Embrapa Gado de Leite 12 bovinos da raça girolando (grau de sangue 7/8), sendo 3 bezerros machos e 9 novilhas. Esses animais foram separados aleatoriamente em três grupos: Grupo 1 (controle), Grupo 2 (tratamento com *S.*

glaseri CCA) e Grupo 3 (tratamento com *H. baujardi* LPP7).

Cada bovino foi infestado uma única vez (por mês estudado – março, maio, junho e julho) no dorso, da nuca até a cauda, com 0,1g de larvas infestantes de *R. microplus*, com 10 a 20 dias de idade, o que corresponde a aproximadamente 2.000 larvas. Estima-se que aproximadamente 10% dessas larvas se tornem fêmeas adultas, ou seja, aproximadamente 200 teleóginas (Sutherst et al., 1978). Após 18 dias, constatada a presença de fêmeas ingurgitadas, foi realizada a contagem das mesmas para estimativa de teleóginas por animal. Assim, foi possível determinar a concentração de NEPs nas soluções, com base nos trabalhos *in vitro* desenvolvidos por Vasconcellos et al. (2004).

Os animais do Grupo 1 foram banhados com cinco litros de água para cada animal, com bomba de aspersão tipo costal. Os animais do Grupo 2 foram banhados com cinco litros de solução para cada animal, contendo o NEP *S. glaseri* estirpe CCA e os do Grupo 3 foram banhados com cinco litros de solução para cada animal, contendo o NEP *H. baujardi* estirpe LPP7. Esse procedimento foi realizado uma vez, em cada um dos seguintes meses: março, maio, junho e julho de 2007. Nessas datas, foram coletadas a temperatura média, a precipitação total e a umidade relativa do ar do serviço de meteorologia do CECP.

Para as soluções contendo *S. glaseri* CCA (Grupo 2) foi utilizada a concentração de 1.000 JIs por teleógina enquanto para as soluções de *H. baujardi* LPP7 (Grupo 3) foi utilizada a concentração de 75 JIs por teleógina. A estimativa do número de JIs foi feita conforme descrito no experimento 1 da presente tese.

Para garantir que os NEPs estavam com sua capacidade infectante plena, sempre era retirada uma alíquota da solução preparada e infectavam-se lagartas de *G. mellonella in vitro*, concomitantemente.

Observou-se mortalidade dessas lagartas, mudança na sua coloração e emersão dos JIs.

No 18º dias pós-infestação, os bovinos foram banhados ao final da tarde e em área sombreada, com a finalidade de se evitar a exposição dos NEPs aos raios solares e diminuir a dessecação. Após o banho, os animais foram imediatamente recolhidos às suas baias individuais, devidamente cobertas.

Após esse procedimento, os animais foram observados diariamente, e as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* desprendidas foram coletadas no chão das baias por cinco dias consecutivos e pesadas individualmente em balança analítica. As teleóginas expostas aos NEPs e as do grupo controle foram fixadas individualmente com o auxílio de esparadrapo em uma placa de *Petri* de 11cm de diâmetro e identificadas com um número, o qual foi grafado na parede lateral da referida placa.

As placas de *Petri* devidamente identificadas foram acondicionadas em câmara climatizada sob condições ideais para os carrapatos e para os nematóides ($27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%).

Detectado o fim da postura, os ovos foram recolhidos, pesados e transferidos para seringas plásticas descartáveis previamente preparadas, identificadas e tampadas com algodão hidrofílico, igualmente mantidas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%. Três dias após o fim da postura, as fêmeas foram novamente pesadas para a obtenção do peso residual.

Os parâmetros biológicos analisados foram período de pré-postura (período que compreendeu a data da coleta da fêmea ingurgitada até o início da postura), período de postura (período compreendido entre o início e o fim da postura), tempo de

sobrevivência (tempo transcorrido desde a exposição até a morte da fêmea), peso da massa de ovos ao final da postura ou até a morte da fêmea, índice de produção de ovos, índice nutricional, percentual de eclosão de larvas, índice de fertilidade e eficácia dos tratamentos (Drummond et al. 1973). Cada teleógina foi considerada uma unidade experimental (UE).

Foram empregadas análise de variância e teste de Tukey-Kramer aos níveis de 5% em cada parâmetro avaliado, para verificação da existência de diferenças significativas determinadas pelo tratamento experimental. Para análise de parâmetros em que a diferença entre desvios padrões foi considerada, pelo teste de Bartlett, significativa, caracterizando uma amostragem de distribuição não normal, os testes citados foram substituídos pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn, respectivamente. Os dados

adquiridos em porcentagem foram transformados em $\sqrt{2} \arcsin x$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTO 1

A Tabela 1 revela o peso inicial das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e os períodos de sobrevivência, pré-postura e postura dos grupos tratados, expostos por diferentes tempos à ação do NEP *S. glaseri* estirpe CCA e do grupo controle.

As fêmeas dos grupos tratados e as do grupo controle apresentaram peso médio inicial estatisticamente semelhante ($p < 0,05$), demonstrando homogeneidade entre os pesos das fêmeas ingurgitadas dentre os grupos e garantindo que as diferenças encontradas entre os parâmetros analisados desses grupos resultaram da ação dos tratamentos.

Tabela 1: Peso inicial médio das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e os períodos médios de sobrevivência, pré-postura e postura do grupo controle e dos grupos expostos por diferentes tempos à ação do nematóide entomopatogênico *Steinernema glaseri* estirpe CCA, Juiz de Fora, 2006.

Grupo	Peso Inicial (g)	Período de Sobrevivência (dias)	Período de Pré Postura (dias)	Período de Postura (dias)
1(2h)	0,2042 ^a (30) ±0,0068	7,5 ^a (30) ±0,8980	2,3 ^a (20) ±0,1051	7,4 ^a (20) ±1,0010
2(6h)	0,2009 ^a (30) ±0,0054	7,8 ^a (30) ±0,7909	2,3 ^a (22) ±0,1050	7,8 ^a (22) ±0,6643
3(12h)	0,2053 ^a (30) ±0,0061	4,8 ^{ab} (30) ±0,5775	2,3 ^a (16) ±0,1250	4,2 ^a (16) ±0,8342
4(24h)	0,2005 ^a (30) ±0,0052	3,3 ^b (30) ±0,1986	2,4 ^a (7) ±0,2020	2,6 ^a (7) ±0,3689
5(48h)	0,2013 ^a (30) ±0,0069	3,6 ^b (30) ±0,2820	2,4 ^a (10) ±0,1633	3,1 ^a (10) ±0,4333
6(72h)	0,2023 ^a (30) ±0,0042	3,2 ^b (30) ±0,2095	2,2 ^{**} (4) ±0,2500	3,5 ^{**} (4) ±0,5000
7(c*)	0,2044 ^a (30) ±0,0064	14,7 ^c (30) ±0,1815	2,6 ^a (30) ±0,1148	12,1 ^b (30) ±0,1871

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao nível de 5% de significância
* grupo controle; ** n insuficiente

Observou-se que o período de sobrevivência variou de dois a 15 dias nos grupos tratados e de 13 a 17 dias no grupo controle. Entre os grupos 1, 2 e 3 não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$), ao passo que entre os grupos 1 e 2,

comparados aos grupos 4, 5 e 6 houve diferença estatística ($p < 0,05$), sendo menor nos grupos expostos por mais de 24 horas, o que está de acordo com Hill (1998) o qual relata que uma exposição por curto período de tempo diminui o número de JIs que

penetram com sucesso em fêmeas ingurgitadas, reduzindo a letalidade da infecção. Entre os grupos 3, 4, 5 e 6 não foi observada diferença estatística ($p < 0,05$). Entre todos os tratamentos e o controle observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao período de sobrevivência.

Não foram observadas diferenças significativas entre o período de pré-postura do grupo controle e dos grupos tratados, variando de dois a quatro dias, fato semelhante observado por Vasconcelos et al. (2004) em relação ao *S. glaseri* estirpe Santa Rosa, sugerindo que possa não ter havido interferência no metabolismo da oviposição nesse período. O período de pré-postura observado foi semelhante ao relatado por Gloria et al. (1993) em estudo da biologia da fase não parasitária de *B. microplus* em condições de laboratório, que foi de um a quatro dias para uma estirpe resistente, a 27°C.

Em relação ao período de postura, não houve diferença significativa entre os grupos tratados, variando de um a 12 dias, embora tenha sido possível observar menores períodos de postura para os grupos expostos à ação dos NEPs por mais tempo. No entanto, todos os grupos tratados, comparados ao grupo controle, apresentaram período de postura estatisticamente menor ($p < 0,05$). Tal fato é explicado pela mortalidade provocada pelos NEPs, não havendo postura de algumas teleóginas. O Grupo 6 foi excluído da análise desses parâmetros devido ao número reduzido de sua amostra, fato provocado pela alta mortalidade das teleóginas expostas à ação dos NEPs por 72 horas.

Na Tabela 2 são apresentadas as médias das massas de ovos pesadas, as taxa de eclosão larval, os índices de postura de ovos, bem como os índices nutricionais dos grupos tratados e controle.

Tabela 2: Massa de ovos (g), taxa de eclosão larval (%), índices médios de postura de ovos e nutricional das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* do grupo controle e dos grupos expostos por diferentes tempos à ação do nematóide entomopatogênico *Steinernema glaseri* estirpe CCA, Juiz de Fora, 2006.

Grupo	Massa de Ovos (g)	Taxa Eclosão* (%)	Índice de Postura de Ovos	Índice Nutricional
1(2h)	0,0422 ^a (30) ±0,0078	48,0 ^a (20) ±8,806	19,1551 ^a (30) ±3,4064	35,4961 ^a (30) ±5,1771
2(6h)	0,0317 ^a (30) ±0,0061	27,7 ^a (22) ±8,646	16,1110 ^a (30) ±3,0753	39,8052 ^a (30) ±5,1170
3(12h)	0,0200 ^{ab} (30) ±0,0059	17,5 ^a (16) ±7,665	10,0101 ^{ab} (30) ±2,9862	25,4214 ^{ab} (30) ±5,0880
4(24h)	0,0012 ^b (30) ±0,0005	1,4 ^a (7) ±1,429	0,6792 ^b (30) ±0,2911	6,9891 ^b (30) ±2,8221
5(48h)	0,0061 ^b (30) ±0,0028	1,5 ^a (10) ±1,500	3,1862 ^b (30) ±1,2731	7,9760 ^b (30) ±2,8820
6(72h)	0,0032 ^b (30) ±0,0018	5,0 ^{***} (4) ±5,000	1,5801 ^b (30) ±0,8620	9,9360 ^b (30) ±2,2932
7(c ^{**})	0,1061 ^c (30) ±0,0036	94,3 ^a (30) ±1,350	51,9133 ^c (30) ±0,5181	74,0122 ^c (30) ±0,5554

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao nível de 5% de significância

* dados analisados como $\sqrt[2]{\text{arco seno } x}$; **grupo controle; *** n insuficiente

De acordo com as médias das massas de ovos obtidas, observaram-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre alguns grupos tratados e entre os grupos tratados e o controle. Entre os Grupos 1 e 2, 1 e 3, e 2 e 3, não houve diferença. A partir do Grupo 3, observou-se que não houve diferença entre

a massa oviposta dos demais tratamentos. Conseqüentemente, o fato se repetiu para os Índices de Postura de Ovos e Nutricional. Os parâmetros do grupo controle se assemelharam aos obtidos por estudo de biologia de *B. microplus* realizado por Glória et al. (1993), no qual encontrou-se peso da

massa de ovos variando de 86,6 a 177,7 para uma estirpe resistente, a 27°C. Analisando todos os grupos tratados, observou-se que a quantidade de ovos foi menor quanto maior o tempo de exposição ao NEP. Samish e Glazer (1992) relataram que após 24 horas de exposição, a postura de ovos de fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus* não foi diferentemente afetada. No entanto, Hill (1998) relatou que o índice de postura e a taxa de eclosão larval foram reduzidas de acordo com o período pelo qual fêmeas ingurgitadas ficaram expostas, relacionando essa diminuição à morte das teleóginas, mas sem excluir a possibilidade de que órgãos reprodutivos tenham sido afetados.

No presente estudo, embora não se tenha observado diferença significativa ($p < 0,05$) na taxa de eclosão entre os tratamentos e o controle, observou-se menor taxa de eclosão nos grupos tratados. Dessa forma, quando foi analisado o Índice de Fertilidade, observou-se nitidamente queda dos valores nos grupos tratados e na eficiência do tratamento, demonstrados na Figura 6.

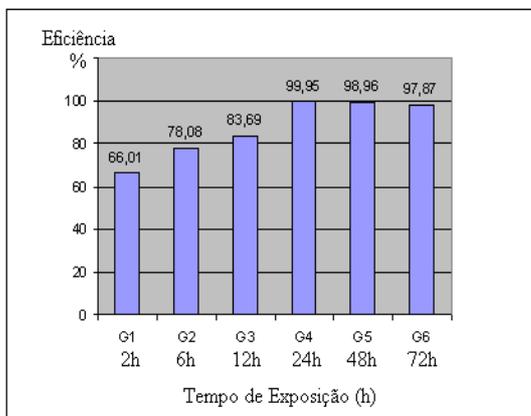


Figura 6: Eficácia dos tratamentos *in vitro* de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* submetidas a diferentes tempos de exposição ao nematóide entomopatogênico (NEP) *Steinernema glaseri* estirpe CCA, com a concentração de 1000NEPs/teleóquina.

Os tratamentos dos Grupos 1 (2h), 2 (6h) e 3 (12h) apresentaram eficiência inferior a 90%, embora a eficiência tenha sido acima de 60% (respectivamente 66,01%, 78,08% e

83,69%). Os demais tratamentos, G4 (24h), G5 (48h) e G6 (72h), apresentaram resultados *in vitro* satisfatórios, ou seja, acima de 90% de eficácia (respectivamente 99,95%, 98,96% e 97,87%). Vasconcelos et al. (2004) descreveram eficiência do tratamento superior a 90% em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* tratadas com 1000NEPs/fêmea, expostas por 72 horas. No entanto, Kocan et al. (1998a) observaram que a exposição de carrapatos da espécie *B. annulatus* a NEPs por apenas uma hora resultou em mortalidade, e essa mortalidade cresceu linearmente até 100% quando o tempo de exposição atingiu 32 horas. Em outra pesquisa, Kocan et al. (1998b) expuseram fêmeas parcialmente ingurgitadas de *A. americanum* e *D. variabilis* ao NEP *S. riobravus* por 8, 24, 48 e 96 horas, encontrando, via auxílio de microscopia óptica, NEPs na hemocele daquelas fêmeas expostas por 24 horas ou mais.

4.2. EXPERIMENTO 2

Os resultados dos testes realizados em bovinos estabulados são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

De acordo com o que pode se observar nessas Tabelas, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratamento e controle em nenhum dos parâmetros avaliados, os quais incluem períodos de sobrevivência, pré-postura e postura, massa de ovos oviposta, taxa de eclosão e os índices de postura de ovos e nutricional.

Os parâmetros fisiológicos dos carrapatos observados por Gloria et al. (1993) foram: período de pré-postura variando de dois a quatro dias para uma estirpe sensível, período de postura em torno de 12 dias, peso médio da massa de ovos de 0,1821g, taxa de eclosão de 100%, período de sobrevivência variando de 11 a 36 dias, índice de postura de ovos médio de 58,18% e índice de eficiência nutricional médio de 78,70%, todos esses parâmetros avaliados a 27 °C. Os resultados obtidos por esses pesquisadores são semelhantes aos encontrados na presente tese,

demonstrando que os tratamentos não afetaram os parâmetros biológicos das teleóginas.

Nos grupos tratados foi observada a morte de quatro e cinco teleóginas, respectivamente, dos grupos 2 e 3. As teleóginas mortas apresentavam, aparentemente, alterações características da ação dos JIs, com edema e enegrecimento, como observado em testes *in vitro* e descritos por Vasconcelos et al.

(2004), Freitas-Ribeiro et al. (2005) e Reis-Menini (2008). Essas fêmeas foram novamente pesadas para obtenção do peso residual e então dissecadas e observadas em microscópio óptico, na tentativa de visualização de JIs ou de formas adultas dos NEPs testados. No entanto, não foi constatada a presença dos NEPs, não sendo possível, portanto, associar estas mortes à ação dos mesmos.

Tabela 3: Peso inicial médio das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e os períodos médios de sobrevivência, pré-postura e postura do grupo controle (Grupo 1) e dos grupos expostos à ação dos nematóides entomopatogênicos *Steinernema glaseri* estirpe CCA (Grupo 2) e *Heterorhabditis baujardi* estirpe LPP7 (Grupo 3), Juiz de Fora, 2007.

Grupo	Peso Inicial em g	Período de Sobrevivência em dias	Período de Pré Postura em dias	Período de Postura em dias
1	0,2437 ^a (198) ±0,0179	15,5 ^a (198) ±0,7654	3,1 ^a (196) ±0,1367	13,4 ^a (196) ±1,2349
2	0,2543 ^a (232) ±0,0184	14,8 ^a (232) ±0,8102	2,8 ^a (228) ±0,2251	12,8 ^a (228) ±2,0041
3	0,2376 ^a (215) ±0,0199	15,2 ^a (215) ±0,6431	3,3 ^a (210) ±0,1002	13,6 ^a (210) ±1,9976

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao nível de 5% de significância

Tabela 4: Massa de ovos (g), taxa de eclosão larval (%), índices médios de postura de ovos e nutricional das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* do grupo controle (Grupo 1) e dos grupos expostos à ação dos nematóides entomopatogênicos *Steinernema glaseri* estirpe CCA (Grupo 2) e *Heterorhabditis baujardi* estirpe LPP7 (Grupo 3), Juiz de Fora, 2007.

Grupo	Massa de Ovos (g)	Taxa Eclosão (%)	Índice de Postura de Ovos	Índice Nutricional
1	0,1267 ^a (198) ±0,0078	98,1 ^a (196) ±9,512	52,0012 ^a (198) ±0,9854	75,0013 ^a (198) ±1,1375
2	0,1316 ^a (232) ±0,0061	97,7 ^a (228) ±7,608	51,7636 ^a (232) ±0,1749	74,8922 ^a (232) ±0,9934
3	0,1218 ^a (215) ±0,0059	98,5 ^a (210) ±8,165	51,2540 ^a (215) ±0,8866	75,1181 ^a (215) ±1,0751

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao nível de 5% de significância

O Percentual de Controle (eficiência do tratamento) calculado foi de 0,87% para o Grupo 2 (tratado com *S. glaseri*) e de 0,99% para o Grupo 3 (tratado com *H. baujardi*). Tal fato se explica pela ausência de qualquer efeito dos NEPs sobre a biologia dos carrapatos tratados, ficando os parâmetros analisados muito próximos aos do Grupo 1, controle.

Entre os dois grupos tratados, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$), contrariando o esperado. Apesar das espécies de NEPs utilizadas possuírem algumas características semelhantes, como seu comportamento de procura do hospedeiro, classificados como cruzadores (Lewis, 2002), era esperado que a presença do dente quitinoso no *H. baujardi* LPP7 lhe conferisse maior capacidade de penetrar

pela cutícula das fêmeas ingurgitadas, como relatado por Dolinski, (2006b) e por Kaya e Gaugler (1993). Além desse fato, *H. baujardi* LPP7 havia sido isolado de amostra de solo da região de Monte Negro – RO sendo, portanto, mais tolerante a temperaturas mais elevadas, como publicado por Dolinski et al. (2008).

Segundo Somvanshi et al. (2008), nematóides entomopatogênicos utilizados como agentes de controle biológico encontram diversas condições de estresse durante sua fase infectante. Essas condições de estresse incluem fatores abióticos e bióticos que possuem um papel importante na sua persistência e infectividade (Glazer, 2002). Dentre esses fatores, são incluídas a radiação ultravioleta,

umidade e temperatura (Kaya, 1990). A dessecação é um dos fatores mais importantes apesar de os JIs serem bastante resistentes por reterem a cutícula do segundo estágio como bainha e, ainda, por não se alimentarem e terem a boca e o ânus cobertos pela cutícula (Glazer, 1996).

Na Tabela 5 observam-se o valor médio de temperatura, a precipitação total e a umidade relativa do ar, segundo o serviço de meteorologia do CECAP, no período de execução do presente experimento. Tais informações visaram à observação de possíveis condições climáticas adversas, as quais poderiam ter influenciado os resultados.

Tabela 5: Médias da temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar no Campo Experimental de Coronel Pacheco – MG, no período de janeiro a julho de 2007.

Mês	Temperatura média (°C)	Precipitação total (mm)	Umidade relativa do ar (%)
Jan	23,8	681,4	85
Fev	23,4	78	80
Mar	23,2	119,2	77
Abr	21,9	45,7	80
Mai	17,9	37,1	81
Jun	16,3	8,8	80
Jul	16,3	7,1	78

Nos meses de março, maio, junho e julho (quando os animais foram banhados) as temperaturas médias foram inferiores a 23,2 °C, sendo nos últimos três meses as temperaturas médias inferiores a 18 °C. O volume de chuva registrado no período foi baixo, não obstante as baias dos animais serem cobertas. Coincidentemente, não foi registrada chuva nos dias de experimentação. Apesar dos baixos índices pluviométricos, a umidade relativa do ar permaneceu elevada, acima de 75%. Tais dados nos permitiram inferir que, provavelmente, as condições climáticas nos dias de aplicação dos JIs nos bovinos foram propícias para a aplicação das soluções contendo os NEPs.

Contudo, mesmo na presença de condições climáticas aparentemente favoráveis, o vento e a radiação solar podem ter dessecado ou matado os JIs antes de sua penetração no hospedeiro. Foi possível observar que, por pelo menos duas horas havia JIs vivos se movimentando nos pêlos dos animais, assim como em gotículas de água sobre as fêmeas ingurgitadas. Era esperado que, nesse período de exposição, pelo menos parte das teleóginas fossem infectadas, mesmo não atingindo uma porcentagem que gerasse um controle efetivo, como indicaram os resultados obtidos no Experimento 1.

A respeito do manejo dos nematóides, devem se considerar três momentos associados à mortalidade dos nematóides: o

período de pré-aplicação que se refere à produção, estoque e condições de transporte, fase de aplicação devido à pressão do equipamento e o período mais solar e desidratação, em associação com a predação, infecção por antagonistas e depleção de energia (Gaugler e Han, 2002; Grewal, 2002; Shapiro-Ilan et al., 2006). Durante o presente experimento, procurou-se controlar eficientemente a produção, estocagem, preparo das soluções, transporte e aplicação (Fan e Hominik, 1991; Woodring e Kaya, 1988), ficando a última fase (pós-aplicação) sujeita às intempéries, o que nos permite inferir que, provavelmente, a não infecção das teleóginas pelos JIs ocorreu pela ação dos fatores ambientais. Vale ressaltar a constatação de que os NEPs estavam com sua capacidade infectante plena, já que lagartas de *G. mellonella in vitro* foram infectadas, concomitantemente, com uma alíquota da solução preparada, pois verificou-se mortalidade dessas lagartas, mudança na sua coloração e emersão dos JIs.

Outro aspecto importante a se considerar é a temperatura corporal do bovino, que é em média, de 38,6 °C (Andersson e Jónasson, 1996). Conforme relatado por Downes e Griffin (1996), os JIs se dispersam ativamente à procura de microambiente adequado e hospedeiro susceptível, que por sua vez atrai os nematóides através de seus materiais fecais e gradientes térmicos. A temperatura relativamente uniforme da pele do bovino pode ter atrapalhado a busca pelos JIs das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* através do gradiente térmico. Conforme relata Molyneux (1986) cada estirpe de NEP possui uma faixa de temperatura ideal para a sua sobrevivência, infectividade e reprodução, e essa faixa de temperatura considerada ideal, é inferior à temperatura corporal dos bovinos. Por exemplo, as faixas de temperatura ideais para manutenção de *S. glaseri* e *H. baujardi in vitro* estão em torno de 16 °C e 25 °C, respectivamente.

É descrito por Dolinski (2006a) que os níveis de CO₂ emitidos pelo hospedeiro susceptível, no caso as teleóginas,

crítico, que são as primeiras horas após a aplicação. A morte de 40 a 80% dos juvenis ocorre nessa última fase, devido à radiação

que aumentam a probabilidade de encontro das mesmas pelos JIs. A emissão de CO₂ pelo bovino pode também ter dificultado ou até impossibilitado o encontro e reconhecimento das teleóginas pelos JIs, embora tenha sido observado JIs sobre algumas teleóginas logo após a aplicação.

Em relação à concentração da solução utilizada e, com base nos estudos *in vitro*, foi tomado o cuidado para que houvesse um número satisfatório de JIs por teleóquina fixada no bovino. Quando o hospedeiro é colonizado por nematóides entomopatogênicos, um número seguro de JIs é necessário para que as defesas do hospedeiro seja superada (Wang et al., 1994) e para garantir o acasalamento (no caso de Steinernematidae). Porém, muitos nematóides infectando o hospedeiro podem impedir seriamente o desenvolvimento, a sobrevivência, e a reprodução nos hospedeiros individuais, por competição (Selvan et al., 1993), o que parece não ter ocorrido no presente experimento, já que testou-se previamente a concentração das soluções utilizadas.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi observado que um período de duas horas de exposição foi suficiente para que fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* fossem infectadas pelo nematóide entomopatogênico *Steinernema glaseri* estirpe CCA *in vitro*.

Um período de exposição mínimo de 24h, *in vitro*, foi necessário para que houvesse infecção de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* por *S. glaseri* estirpe CCA, capaz de gerar eficácia no tratamento superior a 90%.

A infecção *in vivo* de fêmeas de *R. microplus*, ingurgitadas e fixadas em bovinos estabulados, pelos nematóides entomopatogênicos *S. glaseri* estirpe CCA e *Heterorhabditis baujardi* estirpe LPP7, através de banhos por aspersão, não se

mostrou eficaz nas condições experimentais do presente estudo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não obstante serem comprovadamente eficientes como agentes de controle biológico de algumas espécies de insetos-praga, algumas características dos nematóides entomopatogênicos podem ser melhoradas, como aumento da tolerância a altas temperaturas, aos raios ultra-violeta e à dessecação, melhora na busca pelo hospedeiro, melhora na habilidade de penetração, aumento da especificidade ao hospedeiro, quebra da imunidade do parasita e aumento da resistência a nematocidas, como relatado por Glazer et al. (1991), além da possibilidade da criação de substâncias adjuvantes para aplicação das soluções contendo JIs e do desenvolvimento de técnicas diferenciadas para utilização dos NEPs no controle biológico de carrapatos.

Estudos como os realizados por Dolinski et al. (2008), que caracterizaram molecularmente duas espécies de *Heterorhabditis* isolados da floresta amazônica, tropical, poderão refletir de forma prática no futuro, já que esses isolados apresentam maior tolerância a temperaturas mais elevadas. Estudos com pressão de seleção para linhagens mais tolerantes a temperaturas mais elevadas sem perda da infectividade também são de interesse. Akhurst (1980) relatou que o isolamento das bactérias simbiotes seria útil para aumentar a produção de culturas

de NEPs em laboratório, reduzindo desse modo o custo da produção, e Grewal e Conserve (1997) revelaram que a interação entre as bactérias simbióticas e os nematóides não é tão específica como se pensava. Tal fato permite que seja selecionada uma espécie de NEP que reúna as melhores qualidades para matar os carrapatos em simbiose com uma bactéria mais virulenta.

Pelo fato de algumas espécies de NEPs habitarem a camada mais superficial do solo e as teleóginas compartilharem o mesmo nicho quando estão na fase não parasitária, o método de controle biológico nesse ambiente poderia ser beneficiado, através de técnicas de inundação.

Muitos pesquisadores entenderam que o uso de nematóides como bioinseticidas seja ecologicamente correto, já que são inofensivos à maioria dos vertebrados. No entanto, Poinar (1989) demonstrou que eles podem ser patogênicos a anfíbios, moluscos, crustáceos e diplópodos. Isto demonstra a grande necessidade no crescimento das pesquisas, tanto no campo quanto no laboratório, na busca de informações seguras para a correta utilização destes organismos, a fim de se evitar a ocorrência, no futuro, de possíveis desequilíbrios ecológicos nas áreas de sua aplicação.

Mais estudos se fazem necessários para o domínio da utilização NEPs no controle biológico de pragas agrícolas e pecuárias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, J.P.M.; SAMUELS, R.I.; MACHADO, I.R.; et al. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.*, v.96, n.2, p.187-192, 2007.
- ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. *Entomopathogenic nematology*. 1.ed. New York: CABI Publishing, 2002. p.01-33.
- AKHURST, R.J. Neoplectana species: Specificity of association with bacteria of the genus *Xenorhabdus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.33, p.38-45, 1980.
- ANDERSSON, B.E.; JÓNASSON, H. Regulação da temperatura e fisiologia ambiental. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. (Ed.) *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 47, p. 805-813
- BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação da eficácia *in vitro* de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.6, n.1, p.42-52, 1997.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. Trials to control south american ticks with entomopatogenic fungi. In: FIFTH BIENNIAL CONFERENCE OF SOCIETY FOR TROPICAL VETERINARY MEDICINE, 1999, Key West. *Annals...* Florida: Tropical Diseases: control and prevention in the context of "The New World Order", 1999, p. 45.
- BRUM, J.G.W.; TEIXEIRA, M.O. Doenças em teleóginas de *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) causada por *Cedecea lapagei* e *Escherichia coli*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.44, n.5, p.441-443, 1992a.
- BRUM, J.G.W.; TEIXEIRA, M.O. Acaricidal activity of *Cedecea lapagei* on engorged females of *Boophilus microplus* exposed to the environment. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.44, n.6, p.543-544, 1992b.
- CAMPBELL, J.F.; KAYA, H.K. Variation in entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) infective-stage jumping behaviour. *Nematol.*, v.4, n.4, p. 471-482, 2002.
- CARDOSO, A.C. *Exigências térmicas de Galleria mellonella Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae)*. 2004. 40f. Dissertação (Mestrado em Comportamento e Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.
- CARES, J.E. Nematóides como indicadores ambientais de solo. In: 26º CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 2006, Campos dos Goytacazes. *Anais...* Rio de Janeiro, 2006, p.14-16.
- CHICHE, T.A.; ENSIGN, J.C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, wick end of a nematode is out? *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, n.4, p.1890-1897, 2003.
- CORDOVÉS, C.O.; TAMAYO, S.; FLEITE, R. et al. *Pérdidas económicas producidas por las garrapatas en Cuba*. 1.ed. Informativo Técnico Directivo Nacional del Instituto de Medicina Veterinaria, 1980. 17p.
- DEL VALLE, E.; DOLINSKI, C.; SOUZA, R.M. et al. Performance de *Heterorhabditis baujardi* LPP7(28) (Nematoda: Rhabditida), selecionada para tolerância a altas temperaturas, no controle de *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematol. Bras.*, v.29, n.2, p.199-205, 2005.
- DOLINSKI, C. Nematóides como agentes do controle biológico de insetos. In: OLIVEIRA FILHOS, E.C.; MONNERAT, R.G. *Fundamentos para regulação de semioquímicos inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas*. 1.ed. Brasília: EMBRAPA, 2006a. Cap. 4, p.73-101.

- DOLINSKI, C. Tecnologia de produção e formulação de nematóides entomopatogênicos. In: OLIVEIRA FILHOS, E.C.; MONNERAT, R.G. Fundamentos para regulação de semioquímicos inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. 1.ed. Brasília: EMBRAPA, 2006b. Cap. 9, p.197-218.
- DOLINSKI, C. Biotecnologia e genética de nematóides entomopatogênicos aplicada ao controle de insetos-praga. In: 26º CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 2006, Campos dos Goytacazes. *Anais...* Rio de Janeiro, 2006c, p.28-29.
- DOLINSKI, C.; KAMITANI, F.L.; MACHADO, I.M. et al. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 2, p.150-159, 2008.
- DOUCET, M.M.A.; MIRANDA, M.B.; BERLOTTI, M.A. Infectivity of entomogenous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae). *Fund. Appl. Nematol.*, v. 21, n. 1, p. 13-16, 1998.
- DOWDS, B.C.A.; PETERS, A. Virulence Mechanisms. In: GAUGLER, R. *Entomopathogenic nematology*. 1.ed. New York: CABI Publishing, 2002. p.79-98.
- DOWNES, M.J.; GRIFFIN, C.T. Dispersal behaviour and transmission strategies of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* and *Steinernema* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae). *Biocontrol Sci. Tech.*, v.6, p.347-356, 1996.
- DREYER, K.; FOURIE, L.J.; KOK, D.J. Predation of livestock ticks by chickens as a tick-control method in a resource-poor urban environment. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.64, p.273-276, 1997.
- DRUMMOND, R.O.; ERNST, S.E.; TREVINO, J.L. et al. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. *J. Econ. Entomol.*, v.66, p.130-133, 1973.
- FAN, X.; HOMINICK, W. M. Efficiency of the *Galleria* (Wax Moth) Baiting Technique for Recovering Infective Stages of Entomopathogenic Rhabditids (Steinernematidae e Heterorhabditidae) from Sand and Soil. *Rev. Nématol.*, v.14, n.3, p.381-387, 1991.
- FREITAS, D.R.J.; POHL, P.C.; VAZ JR, I.S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. *Acta Sci. Vet.*, v.2, n.33, p. 109-117, 2005.
- FREITAS-RIBEIRO, G.M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V.O. et al. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* Santa Rosa and All strains (Steinernema: Rhabditida). *Braz. Arch. Biol. Tech.*, v.48, n.6, p.911-919, 2005.
- FRIEDMAN, M.J. Commercial production and development. In: GAUGLER, R; KAYA, H.K. *Entomopathogenic nematodes in biological control*, 1.ed. Florida: CRC, Boca Raton, 1990. p.153-172.
- FURLONG, J. Diagnostico de la susceptibilidad de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* a los acaricidas en el estado de Minas Gerais, Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, n.4, 1999, Puerto Vallarta. *Resumos...* Puerto Vallarta, p. 41-46.
- FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S.; PRATA, M.C.A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. *A Hora Vet.*, v.23, n.137, p. 53-56, 2004.
- GAUGLER, R.; HAN, R. 2002. Production technology. In: GAUGLER, R. *Entomopathogenic nematology*. 1.ed. New York: CABI Publishing, 2002. p.289-310.

- GEORGIS, R. Presente and future prospects for entomopathogenic nematodes products. *Biocontrol Sci. Tech.*, v.2, p.83-99, 1990.
- GEORGIS, R.; MANWEILER, S.A. Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. *Agricultural Zool. Rev.*, v.6, p.63-94, 1994.
- GLAZER, I. Prospects for application of entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.*, v.62, p.185-200, 1996.
- GLAZER, I. Survival biology. In: GAUGLER, R. *Entomopathogenic nematology*. 1.ed. New York: CABI Publishing, 2002. p.169-187.
- GLAZER, I.; GAUGLER, R.; BIRD, A.F. et al. Genetics of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88. *J. Nematol.*, v. 23, p.324-333, 1991.
- GLÓRIA, M.A.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. et al. Influência de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (Can.; 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 2(2): 85-91, 1993.
- GOMES, A. O carrapato do boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenicidade e controle. In: KRESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. *Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos*. Campo Grande: Embrapa-cnpq, 1998. Cap.2, p.9-44.
- GREWAL, P.S. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R. *Entomopathogenic Nematology*. Oxon: CABI Publishing, 2002. Cap.13, p.265-288.
- GREWAL, P.S.; CONSERVE, V. Mechanisms of specificity of association between the nematode *Steinernema scapterisci* and its symbiotic bacterium. *Parasitol.*, v.114, p.483-488, 1997.
- GREWAL, P.S.; NARDO, E.A.B.; AGUILLERA, M.M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. *Neotropical Entomol.*, v.30, n.20, p.191-205, 2002.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Vet.*, v. 21, n.125, p.8-10, 2002.
- HAN, R.; EHLERS, R. Effects of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the in vivo and in vitro development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *Microbiol. Ecol.*, v.35, n.3, p.239-247, 2001.
- HARA, A.H.; KAYA, H.K. *Monoxenic mass production of the entomogenous nematode Neoplectana carpocapsae Weiser, on dog food/agar medium* 1.ed. Oakland: USDA, 1983. 16p.
- HILL, D. E. Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black legged tick, *Ixodes scapularis*. *J Parasitol.*, v.84, n.6, p.1124-1127, 1998.
- HOMINICK, W.M.; REID, A.P.; BOHAN, D.A. et al. Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and deconvention on biological diversity. *Biocontrol Sci. Tech.*, v.6, p.317-331, 1996.
- HORN, S. C.1983. *Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos no Brasil*. Boletim de Defesa Sanitária Animal, N° 01, 15p.
- KAYA, H.K. Soil Ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. 1.ed. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 93-111.
- KAYA, H.K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. *Ann. Rev. Entomol.*, v.38, p.181-206, 1993.

- KAYA, H.K.; BEDDING, R.A.; AKHURST, R.J. An overview of insect-parasitic and entomopathogenic nematodes. In: BEDDING, R.A.; AKHURST, R.J.; KAYA, H.K. *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. 1.ed. East Melbourne: CSIRO Publications, 1993. p.1-10.
- KOCAN, K.M.; PIDHERNEY, M.S.; BLOUIN, E.F. et al. Interaction of some entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) with selected species of ixodid ticks (Acari:Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, v.35, n.4, p.514-520, 1998a.
- KOCAN, K.M.; PIDHERNEY, M.S.; BLOUIN, E.F. et al. Entomopathogenic nematodes as a potential biological control method of ticks. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.9, p.355-364, 1998b.
- KONDO, E.; ISHIBASHI, N. Nictating behavior and infectivity of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp., to the larvae of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), on the soil surface. *App. Entomol. Zool.*, v.21, p.553-560, 1986.
- KUNZ, E.S.; KEMP, H.D. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev. Sci. Tech.*, v.13, n.4, p.1249-1286, 1994.
- LARANJA, R.J.; MARTINS, J.R.; CERESER, V.H. et al. Identificação de uma estirpe de *Boophilus microplus* resistente a carrapaticidas piretróides no Estado do Rio Grande do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, n.1, 1989, Bagé. *Anais...* Bagé, 1989. p.83.
- LEAL, A.T.; FREITAS, D.R.J.; VAZ JR, I.S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Sci. Vet.*, v.1, n.31, p. 01-11, 2003.
- LEITE, R. C. *Boophilus microplus* (can. 1887): Susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticida em propriedades das regiões fisiogeográficas da baixada do grande-Rio e Rio de Janeiro, uma abordagem epidemiológica. 1988. 122f. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ.
- LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B.; OLIVEIRA, P.R. et al. *In vitro* susceptibility of engorged female from different populations of *B. microplus* to comercial acaricides. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.4, n.2, p.283-294, 1995.
- LEWIS, E.E. Behavioural ecology. In: GAUGLER, R. *Entomopathogenic Nematology*, 1.ed. New York: CABI Publishing, 2002. p.205-223.
- LINDEGREN, J.E.; VALERO, K.A.; MACKEY, B.E. Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juvenile. *J. Nematol.*, v.25, n.2, p.193-197, 1993.
- MARTIN, W.R.J. Using entomopathogenic nematodes to control insects during stand establishment. *HortSci.*, v.32, n.2, p.196-200, 1997.
- MARTINS, J.R.S.; CORREA, B.L.; CERESER, V.H. et al. A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick *Boophilus microplus* in the State of Rio Grande do Sul, southern Brazil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, n.3, 1995, Acapulco. *Anais...* Acapulco, 1995.
- MARTINS, J.R.S.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.*, v. 149, n. 2, p. 64, 2001.
- MAULÉON, H.; BARRÉ, N.; PANOMA, S. Pathogenicity of 17 isolates of entomophagous nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the ticks *Amblyomma variegatum* (Fabricius), *Boophilus microplus* (Canestrini) and *Boophilus annulatus* (Say). *Exp. Appl. Acarol.*, v.17, p.831-838, 1993.

- MOLYNEUX, A.S. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (= *Neoplectana*) spp: temperature and aspects of behaviour and infectivity. *Exp. Parasitol.*, v.62, p.169-180, 1986.
- MURREL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtrice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, v. 56, n. 3, p. 169–172, 2003.
- NGUYEN, K.B.; SMART JR, G.C. *Heterorhabditis* spp.: nematode parasite of insects. *J. Nematol.*, v.23, p.7-11, 1990.
- NGUYEN, K.B.; SMART JR, G.C. Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Nematol.*, v.27, p.206-212, 1994.
- O'LEARY, S.A.; STACK, C.M.; CHUBB, M.A. et al. The effect of day of emergence from the insect cadaver on the behavior and environmental tolerances of infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* (strain UK211). *J. Parasitol.*, v.84, n.4, p.665-72, 1998.
- PEREIRA, M.C.; LUCAS, R. Estudos *in vitro* da eficiência de carrapaticidas em linhagem de *Boophilus microplus* proveniente de Jacareí, SP, Brasil. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. USP*, v. 24, n.1, p. 7-11, 1987.
- POINAR JR., G.O. Non-insect host for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoplectana* (Steinenematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Rev. Nematol.*, v.12, n.4, p.423-428, 1989.
- POINAR JR., G.O. Taxonomy and biology os Steinernematidae and Heterorhabditidae. In.: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. *Entomopathogenic nematodes in biological control*, 1.ed. Florida: CRC, Boca Raton, 1990, p. 23-61.
- REIS-MENINI, C.M.R.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J. et al. Compatibility between the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) and an acaricide in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.*, v.103, n.6, p.1391-1396, 2008.
- SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. Efficacy of entomopathogenic nematode strains against engorged *Boophilus annulatus* females (Acari:Ixodidae) under simulated field conditions. *Entomol. Soc. America*, v.36, n.6, p.727-732, 1999.
- SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. Biocontrol of ticks by entomopathogenic nematodes: research update. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.916, p.589-594, 2000.
- SAMISH, M.; GLAZER, I. Pathogenicity of parasitic nematodes to ticks. *Modern Acarol.*, v.2, p.629-632, 1991.
- SAMISH, M.; GLAZER, I. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodidae). *Entomol. Soc. America*, v.29, n.4, p.614-618, 1992.
- SAMISH, M.; GLAZER, I. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *Trends Parasitol.*, v.17, n.8, p.368-371, 2001.
- SAMISH, M., REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Ann. Rev. Entomol.*, v.44, p.159-182, 1999.
- SCHROEDER, W.J.; BEAVERS, W.M. Laboratory Bioassays and field trials of entomogenous nematodes for control of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in citrus. *Environ. Entomol.*, v.16, p.987-989, 1987.
- SELVAN, S.; GAUGLER, R.; LEWIS, E.E. Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.*, v.64, p.39-45, 1993.

- SHAPIRO-ILAN, D.I.; GOUGE, D.H.; PIGGOT, S.J. et al. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biol. Control*, v.38, p.124-133, 2006.
- SMART JR, G.C. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *J. Nematol.*, V.27, n.4S, p.529-534, 1995.
- SOMVANSHI, V.S.; KOLTAI, H.K.; GLAZER, I. Expression of different desiccation-tolerance related genes in various species of entomopathogenic nematodes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.158, p. 65-71, 2008.
- STUART, R.J.; GAUGLER, R.; GEORGIS, R. Genetic adaptation and founder effect in laboratory populations of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*. *Can. J. Zool.*, v.74, p.164-170, 1996.
- SUTHERST, R.W.; WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W. *Guide to studies on tick ecology*. Sidney: CSIRO. 1978, 59p.
- SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G.F.; KERR, J.D. et al. The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos Taurus* steers. *Aust. J. Agric. Res.*, v.34, p.317-327, 1983.
- SUTHERST, R.W.; WILSON, L.J.; COOK, I.M. Predation of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae), in three Australian pastures. *Aust. J. Entomol.*, v.39, p.70-77, 2000.
- TAYLOR, D.B.; SZALANSKI, A.L.; ADAMS, B.J. et al. Susceptibility of house fly (Diptera: Muscidae) larvae to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae). *Biol. Control*, v.27, n.6, p.1514-1519, 1998.
- VARGAS, M.S.; CÉSPEDES, N.S.; SÁNCHEZ, H.F. et al. Avaliação *in vitro* de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente a amitraz. *Ciênc. Rural*, v.33, n. 4, p.737-742, 2003.
- VASCONCELOS, V.O.; FURLONG, J.; FREITAS, G.M. et al. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.*, v.94, p.201-206, 2004.
- WANG, Y. Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese beetle larvae. *J. Invertebr. Parasitol.*, v.72, n.3, p.313-318, 1994.
- WOODRING, J.L.; KAYA, H.K. *Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A handbook of techniques*. Arkansas: Agricultural Experiment Station Southern Cooperative Bulletin, 1988. 30p.
- WOUTS, W.M. *Steinernema* (Neoplectana) and *Heterorhabditis* species. In: NICKLE, W.R. *Manual of agricultural nematology*. 1.ed. New York, 1991. p.855-897.
- ZHIOUA, E.; LEBRUN, R.A.; GINSBERG, H.S. et al. Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* and *S. glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, v.32, n.6, p.900-905, 1995.