

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

AÇÃO DO NEMATÓIDE ENTOMOPATOGÊNICO
***Heterorhabditis indica* LPP1 (POINAR, KRANUKAR & DAVID, 1992)**
(RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) SOBRE A BIOLOGIA REPRODUTIVA
DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Boophilus microplus*
(CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE)

Edilena Rodrigues da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e
Biologia Animal)

Juiz de Fora, Minas Gerais

Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

AÇÃO DO NEMATÓIDE ENTOMOPATOGÊNICO
***Heterorhabditis indica* LPP1 (POINAR, KRANUKAR & DAVID, 1992)**
(RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) SOBRE A BIOLOGIA REPRODUTIVA
DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Boophilus microplus*
(CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE)

Edilena Rodrigues da Silva

Orientador: John Furlong

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e
Biologia Animal)

Juiz de Fora, Minas Gerais

Fevereiro de 2007

Dedico este trabalho a minha família, ao meu amor e as minhas paixões, aos meus amigos e a aqueles que acreditam que um passo a mais é sempre possível.

AGRADECIMENTOS

Na estrada da minha vida percorri mais um trecho. Aos que me acompanharam até aqui e aos que vão continuar me acompanhando, quero agradecer.

Agradeço a Deus por tudo na minha vida.

Agradeço a minha família, meus pais, irmãos e sobrinha que são minha estrutura, onde encontro apoio, amor, compreensão e amparo.

Agradeço ao meu orientador Dr John Furlong pelo ensinamento, compreensão, paciência, carinho e confiança. Tenho admiração pelo profissional e pela pessoa, além de orientador hoje é um amigo.

Agradeço a Dr Márcia Prata pela amizade, ajuda, incentivo, paciência durante todos esses anos e pela imensa ajuda na execução deste trabalho.

Agradeço a Dr Cláudia Dolinski pela amizade, incentivo e pelos nematóides utilizados neste trabalho.

Agradeço aos amigos que estiveram ao meu lado durante todo o mestrado e aos que fiz nestes dois anos, todos deixaram algo de especial que levarei sempre comigo.

Agradeço aos amigos de laboratório Adriana, Aline, Caio, Cíntia, Eder, Elder, Erica, Leandro, Mateus, Patrícia, e todos que passaram por lá, pela ajuda na realização do trabalho e pelas risadas.

Agradeço em especial aos amigos que me auxiliaram neste trabalho, Cíntia, Fernando, Leandro e João Paulo.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro, ao curso de pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal, aos professores e colegas.

Obrigada a todos que estiveram ao meu lado nestes anos.

“... um dia você aprende que realmente pode suportar
...Que realmente é forte e que pode ir muito mais
longe depois de pensar que não se pode mais.
Nossas dádivas são traidoras e nos fazem perder o bem
que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.”

William Shakespeare

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1- BIOLOGIA E CONTROLE DE <i>Boophilus microplus</i>	3
2.2 - ASPECTOS BIOLÓGICOS DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (NEPS).....	4
2.4 -CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS COM NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (NEPS).....	6
2.5-CONTROLE BIOLÓGICO DE CARRAPATOS COM NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS.....	7
3 – MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 - LOCAL DE REALIZAÇÃO, OBTENÇÃO DOS IXODÍDEOS E DOS NEMATÓIDES.....	10
3.2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	11
3.3 - PARÂMETROS BIOLÓGICOS ANALISADOS.....	12
3.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	13

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4.1 - PESO INICIAL DA FÊMEA.....	15
4.2 - PESO FINAL DA FÊMEA E ALTERAÇÃO DO PESO.....	15
4.3-PERÍODO DE PRÉ-POSTURA, PERÍODO DE POSTURA E PERÍODO DE SOBREVIVÊNCIA.....	17
4.4-PESO DE MASSA DE OVOS, ÍNDICE DE PRODUÇÃO DE OVOS (IPO) E ÍNDICE NUTRICIONAL(IN).....	19
4.5 - PERÍODO DE INCUBAÇÃO DOS OVOS E PERCENTUAL DE ECLOSÃO DAS LARVAS.....	24
4.6 - EFICÁCIA DOS TRATAMENTOS.....	24
5 – CONCLUSÕES.....	28
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Pesos médios (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP1, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.....16

TABELA 2: Períodos referentes a fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP1, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.....18

TABELA 3: Peso da massa de ovos (mg), índice de produção de ovos (IPO) e índice nutricional (IN) de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP1, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.....20

TABELA 4: Médias referentes ao período de incubação dos ovos (PIO) percentual de eclosão das larvas (%EC) de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP1, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 : Comparação entre fêmeas de *Boophilus microplus* do grupo controle (á esquerda) com o grupo tratado com concentração de 1200 JI/♀ (á direita) *Heterorhabditis indica* LPP1 (á direita), após 48 horas (A). Fêmeas de *Boophilus microplus* após tratamento com concentração de 4800 JI/♀ de *H.indica* LPP1 (B).....21

Figura 2 : Controle de fêmeas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP1, em condições de laboratório a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR >80%.....27

RESUMO

Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) o carrapato dos bovinos é um ectoparasito associados à diversas doenças que podem levar o animal a diminuição de sua produção e até mesmo à morte. O principal meio de controle deste carrapato é realizado por meio de carrapaticidas, os quais, estão possibilitando a disseminação da resistência das populações de carrapatos. Os nematóides entomopatogênicos, têm sido apontados como excelentes candidatos ao controle biológicos de insetos, e trabalhos recentes mostram suas eficácias contra carrapatos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do isolado LPP1 (proveniente da cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil) da espécie *Heterorhabditis indica* (Poinar, Karanukar & David, 1992), sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*. Foram testadas diferentes concentrações com 75, 150, 300, 600, 1200, 2400 e 4800 juvenis dispersos água destilada, por fêmea. Cada grupo de 30 fêmeas foi separado em seis placas de Petri com areia, cada uma com cinco fêmeas, totalizando 8 grupos. Os tratamentos e o controle foram acondicionados em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%, durante 48 horas. Depois o tempo de exposição, as fêmeas que estavam vivas foram individualmente acondicionadas em potes plásticos, e observadas diariamente até a última morte. Foi observado início e final da postura para fêmeas que ovipositaram, data da morte e aspecto pós-morte, para todas as fêmeas. Foram avaliados: peso inicial da fêmea, período de pré-postura, período postura, período de sobrevivência, peso da postura, alteração do peso da fêmea, peso final da fêmea, período de incubação dos ovos (PIO), percentual de eclosão (%EC), índice de produção de ovos

(IPO), índice nutricional (IN), percentual de controle (%C). Os pesos iniciais, períodos de pré-postura, do grupo controle em relação a todos os tratamentos não mostraram diferenças. Os pesos finais mostraram diferença entre o grupo controle e os grupos tratados, o que não ocorreu entre os tratamentos. Na alteração do peso da fêmea e índice nutricional houve diferença entre o grupo controle e os grupos tratados, aumentando à medida que a concentração de juvenis crescia. Tanto no período de postura quanto no período de sobrevivência houve evidente 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 a menor concentração e diferente entre os demais tratamentos. Todas as concentrações apresentaram eficácia acima de 95% de controle do carrapato.

Palavras-chave: *Heterorhabditis indica*, *Boophilus microplus*, controle biológico, nematóides entomopatogênicos.

ABSTRACT

The cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) is an ectoparasite associated with various diseases that can reduce animals' production or even cause their death. The main control method is application of acaricides, which can lead to resistant tick populations. Entomopathogenic nematodes have been indicated as excellent candidates for biological control of insects, and recent studies have shown their efficacy against ticks. The objective of this study was to assess the effects of the LPP1 isolate (from Monte Negro, Rondônia, Brazil) of the species *Heterorhabditis indica* (Poinar, Karanukar & David, 1992) on the reproductive biology of ingurgitated *B. microplus* females. Different nematode concentrations were tested, with 75, 150, 300, 600, 1200, 2400 and 4800 infective juveniles dispersed in distilled water per female. Each group of 30 females was separated into six Petri dishes containing sand, each with five females, for a total of eight groups including the control. The Petri dishes were then kept in a climate controlled chamber at $27 \pm 1^\circ \text{C}$ and $\text{RH} > 80\%$, for 48 hours. After the exposure time, the females that were still alive were placed individually in plastic cups and observed daily until the last one died. The start and end of laying was observed for females that laid eggs, and the date of death and post mortem aspects were noted for all females. The other parameters recorded were initial weight, pre-laying period, laying period, survival period, egg mass weight, change in weight and final weight of the female ticks, egg incubation period (EIP), larval hatching rate (% HR), egg production index (EIP), nutritional index (NI), and control percentage (%C). There were no differences observed in the initial weight and pre-laying period between the control group and all the

treatments. There was a difference in the final weight of the control group and treated groups, but none among the treatments. In relation to female weight and nutritional index, there was a difference between the control group and treated groups, which increased as the concentration of infective juveniles went up. There was an evident reduction in the treated groups both in laying period and survival period. The egg mass and the hatching percentage were smaller in the treated groups. The egg production index was similar in the control group and the treated group with the lowest concentration, and different for the other concentrations. All the treatments with nematodes showed efficacy greater than 95% in controlling the ticks.

Key words: *Heterorhabditis indica*, *Boophilus microplus*, biological control, entomopathogenic nematodes.

1-INDRODUÇÃO

Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) é um ectoparasito comum em bovinos, ocorre em quase todo território nacional, e está relacionado à inúmeras doenças que promovem diminuição na produção ou causam a morte do animal. O principal meio de controle deste ectoparasito é através do uso de carrapaticidas, mas a generalizada resistência das populações de carrapatos aliada a reações tóxicas em animais e homens, devido a resíduos químicos deixados no ambiente, tem levado a procura de alternativas de controle não químico que diminuam os efeitos negativos causados pelos carrapaticidas.

SAMISH *et al.* (2004), mostram que os carrapatos apresentam vários inimigos naturais, predadores invertebrados e vertebrados, fungos, bactérias; poucos foram utilizados com sucesso até o momento no controle biológico do carrapato. Existe boa perspectiva quanto ao uso dos nematóides entomopatogênicos das famílias Steinernematidae (Chitwoody & Chitwoody, 1937) e Heterorhabditidae (Poinar, 1976) (Nematoda: Rhabditida) no controle dos carrapatos.

Estudos sobre controle biológico de *B. microplus* utilizando nematóides entomopatogênicos em laboratório no Brasil vêm demonstrando a eficácia do uso dos mesmos no controle do carrapato de bovinos (VASCONCELOS, 2004; FREITAS-RIBEIRO *et al.*, 2005; REIS, 2005).

Estudos vêm demonstrando que espécies da família Heterorhabditidae são mais virulentas do que as da família Steinernematidae e alguns atributos que podem explicar este fato, como são: presença de uma espécie de bactéria simbiote mais virulenta; e presença de um dente quitinoso na região anterior do nematóide que ajuda na penetração ativa através

cutícula dos hospedeiros. GLAZER *et al.* (2001) demonstraram que injetando apenas um juvenil de *Heterorhabditis* sp. foi possível matar um carrapato *Boophilus annulatus* (Say,1891). Assim sendo, é possível que espécies desta família possam ser promissor agente de controle biológico para o carrapato *B. microplus*.

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.

O presente trabalho é parte de uma linha de pesquisa desenvolvida pela Embrapa Gado de Leite, em que estudos relacionados com o uso de nematóides entomopatogênicos para controle biológico de *B. microplus* demonstraram a eficiência destes agentes de controle.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do isolado LPP1 (proveniente da cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil) da espécie *Heterorhabditis indica* (Poinar, Karanukar & David, 1992), sobre a biologia reprodutiva de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Biologia e Controle de *Boophilus microplus*

Boophilus microplus é ectoparasito de bovinos, distribuído entre os paralelos de 32° N e 32° S (GONZALEZ, 2003), sendo de grande importância, pois causa prejuízos econômicos para produtores. Além da transmissão de agentes patogênicos, o elevado custo de produtos para o controle deste carrapato acarreta perdas significativas. O mau uso destes produtos traz consequências como seleção de carrapatos resistentes, produtos mais tóxicos, contaminação do ambiente, dos animais e dos alimentos (BITTENCOURT, 2000).

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

Trabalhos avaliando a biologia de *B. microplus*, sob condições de laboratório, foram realizados. ALVARADO & GONZÁLES (1979) analisaram o período de sua fase não parasitária, à temperatura de 26° C, avaliaram o período de pré-postura e a percentagem 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 *B. microplus* em temperaturas de 27° C e 32° C, sendo que 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, percentual de eclosão, período de sobrevivência das fêmeas, índice de eficiência reprodutiva (IER) e índice de eficiência nutricional (IEN).

Os carrapaticidas têm sido o principal meio de controle de *B. microplus*, mas a dependência de poucas bases químicas disponíveis no mercado, aliada à forma incorreta da utilização destes produtos levou à dispersão generalizada da resistência das populações de carrapatos, chegando a ponto da maioria dos produtos comercializados no Brasil não apresentarem eficiência superior a 75% (FURLONG, 1999). Se por um lado existe a resistência dos carrapatos aos produtos químicos, por outro, há grande preocupação mundial em alimentos sem resíduos químicos para o consumo humano e diminuição da aplicação e de resíduos deixados no ambiente, de modo que o controle alternativo tem sido estudado para combater a população destes artrópodes (SAMISH *et al.*, 2000).

SAMISH *et al.* (2004), mostraram que os carrapatos têm numerosos inimigos naturais; alguns resultados em laboratório sugerem que várias bactérias são patogênicas a carrapatos, mas o seu modo de ação e seu potencial como controladoras precisam ser ainda determinados para uso em controle biológico. Os fungos entomopatogênicos mais promissores apontados, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikof, 1879) e *Beauveria bassiana* (Balsamo), estão comercialmente disponíveis para o controle de algumas pragas e o desenvolvimento de formulações efetivas destes fungos para administração no carrapato faz-se necessário.

2.2 - Aspectos Biológicos de Nematóides Entomopatogênicos (Neps)

Os nematóides entomopatogênicos estão em duas famílias, Steinernematidae (Chitwoody & Chitwoody, 1937) e Heterorhabditidae (Poinar, 1976). Estes apresentam estágio de vida livre, chamado de juvenil três ou juvenil infectante (JI), sendo os outros estágios obrigatoriamente parasitos de artrópodes. Os *Steinernema* spp. e os *Heterorhabditis* spp. estão associados mutualisticamente com enterobactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* respectivamente. Os juvenis infectantes transportam estas bactérias na parte anterior do intestino. A bactéria é importante, pois ela produzirá toxinas que levarão o hospedeiro à morte e ixoenzimas que irão digerir os tecidos do hospedeiro provendo assim nutrientes satisfatórios para o crescimento e desenvolvimento do nematóide (BURNELL & STOCK, 2000).

O ciclo de vida começa quando os juvenis infectantes (JI) localizam seu hospedeiro através de suas excretas, níveis de gás carbônico e gradientes de temperatura. Os juvenis infectantes de *Steinernema* spp. penetram no hospedeiro através de aberturas corporais naturais (boca, ânus, espiráculos e poro genital). Os juvenis infectantes de *Heterorhabditis* spp. utilizam além destas aberturas, um dente dorsal localizado na região anterior do nematóide, para penetrar ativamente através da cutícula ou por entre as membranas intersegmentais do inseto. Uma vez na hemocele do hospedeiro, o nematóide libera suas bactérias que se multiplicam levando o hospedeiro à morte por septicemia normalmente dentro de 24 – 48 horas (KAYA, 1990; POINAR, 1990; ADAMS & NGUYEN, 2001). Após a morte do inseto os nematóides retomam seu desenvolvimento, mudam à fase de juvenil quatro e depois para a fase adulta em de 2 ou 3 dias. A reprodução continua por mais duas ou três gerações até o esgotamento dos nutrientes e deterioração do cadáver, o desenvolvimento dos adultos cessa e os juvenis acumulados no interior do hospedeiro começam a abandonar o cadáver. Os juvenis infectantes, que não se alimentam, vão para o ambiente a procura de novos hospedeiros e podem permanecer no solo por vários meses até encontrar um hospedeiro (BURNELL & STOCK, 2000)

Em *Steinernema* spp. a reprodução é amfimítica, e o juvenil se desenvolve para tornar-se um macho ou uma fêmea, e a determinação do sexo parece ser do tipo XX/XO, típico de nematóides. Por outro lado, em *Heterorhabditis* spp. os juvenis se desenvolvem na primeira geração de fêmeas hermafroditas e estas dão origem a uma segunda geração amfimítica com machos e fêmeas e ainda hermafroditas. Dados sobre a determinação do sexo neste gênero sugerem que o fenótipo sexual é determinado pelo ambiente dentre outros fatores (DIX *et al.*, 1992; STRAUCH *et al.*, 1994).

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) cruzador, que busca ativamente seu hospedeiro movimentando-se no ambiente e com curtas pausas para escaneamento; (2) emboscador, estrategista, senta-e-espera, que se locomove pouco no ambiente e apresenta maior tempo de escaneamento, exibindo ainda o comportamento de nictação, onde o nematóide ergue o corpo ficando apoiado em sua cauda sobre um grão de areia, por exemplo, movendo apenas a região anterior (escaneamento) e na presença do hospedeiro “salta” em sua direção.

As inúmeras espécies de nematóides entomopatogênicos estão distribuídas ao longo de um contínuo de características das estratégias de busca por hospedeiro, cruzador e emboscador, onde não se pode afirmar precisamente o comportamento de uma espécie ou isolado e sim para qual das estratégias eles tendem a seguir. Observações feitas por GREWAL

et al. (1994) em laboratório, mostraram que nematóide cruzador percebe melhor seu hospedeiro através de quimiorrecepção (sem contato prévio com hospedeiro) e seu comportamento é mais eficiente em substratos arenosos, quando comparado utilizando papel filtro como substrato. Já os buscadores foram mais eficientes em papel filtro como substrato e mostraram-se mais sensíveis à quimiorrecepção, depois que tiveram contato prévio com o hospedeiro ou com suas fezes. Estudos sobre a ecologia comportamental dos nematóides entomopatogênicos, LEWIS *et al.* (2006) mostraram a importância de se conhecer melhor o comportamento e a ecologia das espécies, relação parasito-hospedeiro, para que se escolha o nematóide certo para a praga que se deseja controlar. Deste modo será possível intensificar os resultados do controle biológico e diminuir possíveis impactos.

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 sua utilização e o desenvolvimento de novas formulações (NEVES *et al.*, 2000).

2.3 - Controle Biológico de insetos com Nematóides Entomopatogênicos

O uso de nematóides entomopatogênicos para controle de pragas agrícolas já vem de algum tempo (KAYA & GAUGLER, 1993). Nos últimos dez anos os estudos vêm sendo realizados não só em experimentos laboratoriais como também em aplicações a campo (MCCOY *et al.*, 2000).

Nos Estados Unidos, SHAPIRO-ILAN *et al.* (2003), testaram em laboratório 15 isolados de quatro espécies de nematóides entomopatogênicos, contra larvas de besouros Curculionidae em plantações de pêssego. A mortalidade das larvas foi de 30% para todos os isolados. Anteriormente foram testadas três espécies de Neps, *Steinernema riobrave* (Cabanillas *et al.*, 1994) *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) e *H. indica*, produzidos comercialmente na América do Norte, para avaliar a eficiência e persistência em campo destes Neps em plantações de *Citrus* spp. (MCCOY *et al.* 2000). Os nematóides foram aspergidos em concentrações variando de 11 a 216 juvenis/cm² no solo abaixo das copas das árvores. O número de nematóides no solo diminuiu com o passar dos dias e até o 14º dia foram observados nematóides vivos no campo. Apenas em concentrações elevadas, 54 JI/cm², foi observada eficiência dos nematóides.

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

A virulência de *Steinernema scarabei* (Stock & Koppenhöfer, 2003), *Heterorhabditis zelandica* (Poinar, 1990) e *H. bacteriophora* foi verificada em laboratório e em casa de vegetação por KOPPENHÖFER *et al.* (2006), contra cinco espécies de besouros Scarabeideos. Os nematóides *H. bacteriophora* e *H. zelandica* foram virulentos para quatro das cinco espécies de besouro; *S. scarabei*, apresentou baixa virulência em apenas uma espécie de besouro e alta para as outras.

No Brasil, 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 a maior mortalidade alcançada, para as larvas do besouro, quando comparada ao controle foi observada apenas para *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Phan *et al.*,2003) e *H. indica* Hom1. Em casa de vegetação foi testado apenas *H. baujardi* LPP7, nas concentrações de 500, 1000 e 2000 JI/ 50ml, sendo que as concentrações de 1000 e 2000 JI/ 50 ml por vaso alcançaram uma mortalidade de 60% para a larva do besouro.

2.4 - Controle Biológico de Carrapatos com Nematóides Entomopatogênicos

Vários organismos podem ser usados no controle biológico de carrapatos, tais como bactérias, fungos, nematóides, parasitóides, predadores. Mas a falta de estudos em laboratório para determinação de formulações e soluções de aplicação em campo é o que mais limita o sucesso do controle biológico. Os Neps foram testados em várias fases e estágios de vida do carrapato. A fêmea ingurgitada demonstrou ser mais susceptível aos nematóides. Durante a fase parasitaria os carrapatos foram extremamente resistentes e seus ovos também não foram afetados (SAMISH *et al.*, 2004)

SAMISH *et al.* (2000) avaliaram a virulência de *Steinernema carpocapsae* (Weiser,1967), *H. bacteriophora* e *Heterorhabditis* spp. (isolados S3 e IS5) para quatro espécies de carrapatos *Boophilus annulatus* (Say,1821), *Hyalomma excavatum* (Koch, 1844), *Rhipicephalus bursa* (Canestrini & Fanzago, 1877) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Para todos os carrapatos foram utilizadas as concentrações de 200, 1000 e 5000 juvenis. A mortalidade de todos carrapatos aconteceu em média após sete dias de exposição. *B. annulatus* obteve 90% de mortalidade na concentração de 200 JI por placa, para todos os nematóides. Para os demais carrapatos apenas a concentração de 5000 JI por placa apresentou

mortalidade de 90% para todos os Neps. Foi comprovada a susceptibilidade de treze espécies ixodídeos, e duas espécies de argasídeos aos nematóides entomopatogênicos (SAMISH & GLAZER, 2001).

A virulência de isolados de Neps (três heterorhabditídeos e seis steinernematídeos) à 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 *Steinernema* sp., obtendo a morte dos carrapatos com maior eficiência para os heterorhabditídeos .

Dois isolados (Santa Rosa e ALL) de *S. carpocapsae* foram testados por FREITAS-RIBEIRO *et al.* (2005) em *B. microplus*, analisando os efeitos dos nematóides sobre parâmetros biológicos do carrapato. Foram utilizadas concentrações 600, 3000 e 30.000 juvenis dispersos em 2mL 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, *Steinernema glaseri* Santa Rosa (Steiner, 1929) e *H. bacteriophora* CCA, para o controle de *B. microplus*, avaliou a mortalidade das fêmeas, peso da massa de ovos, período de pré-postura, percentagem de eclosão e índices de eficiência reprodutiva e nutricional. Neste trabalho foram utilizadas sete concentrações, 375, 500, 750, 1500, 2500, 5000 e 25.000, de nematóides colocados em areia umedecida com água destilada em placa de Petri. O estudo mostrou que os nematóides foram eficientes no controle do carrapato, com alta mortalidade e baixo peso de massa de ovos.

A associação de um nematóide entomopatogênico com um carrapaticida foi testada por Reis (2005) para o controle de *B. microplus* e foram avaliados os parâmetros mortalidade das fêmeas, peso da massa de ovos, período de pré-postura, percentagem de eclosão e índices eficiência reprodutiva e nutricional. Neste estudo a autora utilizou *S. glaseri* Santa Rosa nas concentrações de 10.000 juvenis dispersos em 3mL 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 submergidos nesta solução por cinco minutos, depois transferidos para placas de Petri com papel de filtro e incubados em câmaras climatizadas. Os tratamentos apresentaram eficiência na mortalidade de 99,8-100% e redução dos valores dos parâmetros analisados. O acaricida não afetou a viabilidade do

nematóide e aumentou sua eficiência nos tratamentos com doses mais baixas de carrapaticida. Ocorreu o primeiro relato na literatura de um nematóide entomopatogênico conseguir completar seu ciclo biológico, com juvenis emergindo num 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 juvenis 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 em 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 o ambiente que o nematóide está: o solo. Foram conduzidos experimentos em casa de vegetação, a fim de avaliar o efeito da textura e umidade do solo na atividade do nematóide em controlar fêmeas ingurgitadas de *B. annulatus*. Foi utilizada a concentração de 200 JI/ cm² dispersos em 40 mL de água destilada. Três espécies de heterorhabditídeos e três espécies de steinernematídeos e vinte fêmeas de *B. annulatus* para cada repetição. Todas as espécies de nematóides não penetraram mais que seis cm no solo, a maior taxa de mortalidade foi para dois isolados nativos de *Heterorhabditis* spp., maior que 85% e para as outras espécies não passou de 50%, principalmente para *Steinernema* spp.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Local de realização, obtenção dos ixodídeos e dos nematóides

O estudo foi realizado no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG; durante os meses de Agosto de 2006 á Janeiro de 2007.

As fêmeas ingurgitadas todas em mesmo estágio de vida, de *Boophilus microplus* (estirpe sensível Porto Alegre) utilizadas no estudo foram provenientes da colônia mantida no Campo Experimental de Coronel Pacheco, MG.

O isolado LPP1 da espécie *Heterorhabditis indica* foi cedido pela Dr. Claudia Dolinski, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.

Para o experimento foram utilizados juvenis infectivos acondicionados em água destilada em garrafas de cultura de tecidos, armazenados em câmara climatizada a $15 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR>80%.

Para multiplicação dos nematóides foram utilizadas lagartas do último ínstar de *Galleria mellonella* (Linnaeu, 1759) (Lepidoptera: Pyralidae) da colônia mantida no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite. As lagartas foram infectadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, forradas com duas folhas de papel filtro umedecida com 2 mL da suspensão de nematóides. As placas de Petri foram seladas com filme plástico, identificadas e acondicionadas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%, durante um período de 48 horas. Após a morte as lagartas foram transferidas para armadilhas de White (WHITE, 1927). Depois de 11 a 12 dias os primeiros juvenis de *H. indica* LPP1 começaram a

emergir dos cadáveres, sendo coletados utilizando-se pipetas de Pasteur e Becker 60 mL, em dias alternados, identificados quanto à data de coleta, acondicionados em garrafas de cultura de tecidos de 40 mL e armazenados em câmara climatizada a $15 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR > 80%.

3.2 - Procedimento experimental

O procedimento experimental foi baseado na metodologia utilizada por VASCONCELOS *et al.* (2004).

Para este experimento foi utilizado volume total de 550 mL de solução de nematóides, contendo aproximadamente 418.000 juvenis infectantes de *H. indica* LPP1. A quantificação foi feita sob microscópio óptico, através de lâmina e lamínula, com 20 repetições com alíquotas de 10 μl e homogeneizando-se a solução a cada amostragem. O número de nematóides encontrados em 200 μl foi de 152 indivíduos, e estabeleceu-se uma regra de três simples, obtendo-se assim a quantidade estimada de nematóides em 550ml. A partir desta solução foram determinadas as concentrações utilizadas: 375, 750, 1500, 3000, 6000, 12000 e 24000 juvenis dispersos em 4 mL de água destilada, por placa de Petri de 5cm de diâmetro, com 15 g de areia peneirada e esterilizada para cada placa. Para o controle foi utilizada a mesma quantidade de água destilada, isenta de nematóides, por placa.

Foram utilizadas fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* desprendidas naturalmente do hospedeiro, no dia anterior, marcadas com tinta atóxica para tecido. Cada grupo de 30 fêmeas foi separado em seis placas de Petri com areia, cada uma com cinco fêmeas, totalizando 8 grupos. Para cada tratamento foram feitas 30 repetições por grupo, sendo que cada fêmea correspondeu a uma unidade experimental. Assim sendo, a quantidade de nematóides em cada concentração por fêmea foi de 75, 150, 300, 600, 1200, 2400 e 4800 JI por fêmea.

Depois de distribuídas dentro de cada grupo, as fêmeas foram infectadas com 4mL por placa da solução de nematóides correspondente a cada tratamento, sendo a solução aplicada de maneira uniforme sobre as fêmeas em cada placa com areia. O mesmo procedimento foi feito para o grupo controle. Os tratamentos e o controle foram acondicionados em câmara climatizada à $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR>80%, durante um período de 48 horas.

Após o tempo de exposição, as fêmeas que estavam vivas após o tratamento foram individualmente acondicionadas em potes plásticos com tampa (3 cm de diâmetro por 2 cm de altura). As fêmeas foram observadas diariamente até a última morte, data da postura inicial e postura final para fêmeas, data da morte e aspecto pós-morte, para todas as fêmeas.

As posturas foram separadas todos os dias, para observar o último dia de postura de cada fêmea e três dias após o período de postura a quenógina foi pesada. A postura total de cada fêmea foi pesada, identificada, acondicionada em seringa plástica adaptada e incubada em câmara climatizada à $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e $\text{UR} > 80\%$.

Depois de 15 dias de incubação as posturas foram revisadas todos os dias, para avaliar 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 à estimativa visual da taxa de eclosão de larvas de cada massa de ovos, para obter-se o percentual de eclosão.

3.3 - Parâmetros Biológicos analisados

- Peso inicial da fêmea: peso da fêmea ingurgitada
- Peso final da fêmea: obtido após final de postura (peso da quenógina).
- 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 oviposição.
- Período de sobrevivência: período que compreende a data da queda da fêmea ingurgitada até o dia de sua morte.
- Peso da postura: peso da massa de ovos total da fêmea.
- Índice de produção de ovos (IPO): calculado segundo BENNETT (1974): $(\text{IPO} = \text{massa de ovos} \times 100 / \text{peso inicial das fêmeas ingurgitada})$
- Índice nutricional (IN): calculado segundo BENNETT (1974): $(\text{IN} = \text{massa de ovos} \times 100 / \text{peso inicial} - \text{peso final das fêmeas ingurgitadas})$.
- Período de incubação dos ovos (PIO): período que abrange o dia do início da postura até o dia da eclosão da primeira larva.
- Percentual de eclosão (%EC): estimativa visual de larvas eclodidas em relação à massa de ovos de cada fêmea.
- Percentual de controle (%C): foi calculado segundo fórmula de DRUMMOND *et al.* (1973): $(\%C = \text{ER grupo controle} - \text{ER grupo tratado} / \text{ER grupo controle} \times 100)$.

Os valores de todos os parâmetros correspondem às médias obtidas através do valor de cada parâmetro, de cada unidade experimental, de cada grupo.

3.4 - Análise estatística

Foram empregados ANOVA (análise de variância) e teste de Tukey-Kramer em nível de significância de 5%, para verificar a existência de diferenças significativas nos parâmetros biológicos dos carrapatos, determinados pela ação dos tratamentos utilizados. Nos tratamentos em que as diferenças entre desvios-padrão caracterizavam uma amostragem de distribuição não normal, foram utilizados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn.

O índice nutricional, índice de produção de ovos e a percentagem de eclosão larval tiveram seus valores transformados em $\sqrt{\text{arco seno}}$, para avaliar a significância estatística.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao tamanho das amostras em cada grupo, que foi de 30 fêmeas por tratamento, no grupo controle e nas concentrações de 75, 150, e 4800 juvenis infectantes por fêmea, o tamanho da amostra passou a ser considerado 29 fêmeas para os referidos tratamentos. Essa diminuição foi devida à morte de uma fêmea nos referidos tratamentos, sendo esta morte provavelmente causada por fatores alheios a ação dos tratamentos. Os demais grupos tratados tiveram o tamanho da amostra com 30 carrapatos. Todos os grupos foram submetidos às mesmas condições de temperatura e umidade.

4.1 - Peso inicial da Fêmea

Os pesos iniciais das fêmeas ingurgitadas foram analisados estatisticamente e não mostraram diferença significativa entre o controle e os tratados, também não ocorreram diferenças entre os tratados (TAB. 1). Uma vez que não foram encontradas diferenças entre os pesos iniciais das fêmeas dos diferentes grupos, pode-se sugerir que as diferenças encontradas nos parâmetros biológicos entre os grupos experimentais foram devidas à ação dos tratamentos com o nematóide entomopatogênico. Esta análise foi feita com o intuito de avaliar se haviam diferenças entre os pesos das fêmeas ingurgitadas nos grupos que pudessem interferir nos resultados dos demais parâmetros propostos.

4.2 - Peso final da fêmea e alteração do peso

Os pesos finais das fêmeas mostraram diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados, o que não ocorreu entre os tratamentos (TAB. 1).

Em relação ao parâmetro alteração do peso da fêmea houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados, sendo que a alteração de peso foi aumentando à medida que a concentração de juvenis por fêmea aumentou. Entre os grupos tratados não houve diferença na alteração do peso entre os tratamentos com 75 juvenis infectantes por fêmea ingurgitada (JI/♀) para o tratamento com 150 JI/♀ e deste para o tratamento com 300 JI/♀. A partir do tratamento com 300 JI/♀ não observou-se diferenças para os demais grupos tratados (TAB. 1).

Essa diferença entre os pesos finais e alteração do peso da fêmea, mostra que pode ter havido interferência do nematóide no processo metabólico de conversão dos nutrientes em ovos.

Tabela 1 – Pesos médios (mg) de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP1, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.

Concentração de juvenis por fêmea	Parâmetros analisados		
	Peso Inicial ¹	Peso Final ²	Alteração de peso ²
0	230,90 ^a ± 43,21 (29)	38,41 ^b ± 16,15 (29)	189,72 ^a ± 45,88 (29)
75	231,59 ^a ± 44,42 (29)	199,31 ^a ± 36,35 (29)	32,28 ^{b c} ± 18,70 (29)
150	230,48 ^a ± 43,22 (29)	212,03 ^a ± 43,47 (29)	18,45 ^{c d} ± 27,80 (29)
300	232,40 ^a ± 36,00 (30)	223,97 ^a ± 38,86 (30)	8,43 ^{d e} ± 18,24 (30)
600	231,73 ^a ± 45,12 (30)	231,20 ^a ± 45,78 (30)	0,53 ^e ± 2,30 (30)
1200	231,73 ^a ± 45,02 (30)	227,77 ^a ± 39,63 (30)	3,97 ^e ± 11,43 (30)
2400	231,97 ^a ± 37,48 (30)	231,87 ^a ± 37,61 (30)	1,00 ^e ± 0,55 (30)
4800	232,72 ^a ± 36,52 (29)	218,76 ^a ± 51,41 (29)	13,96 ^e ± 46,28 (29)

LPP1 – população isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico – Kruskal-Wallis e Dunn

4.3 - Período de pré-postura, período de postura e período de sobrevivência

Não foram observadas diferenças entre os períodos de pré-postura do grupo controle em relação a todos os tratamentos (TAB.2), mostrando que *Heterorhabditis indica* LPP1 não interferiu nessa etapa da reprodução do carrapato. Esse fato também foi observado por REIS (2005) para carrapatos tratados apenas com *Steinernema glaseri*. Comparando-se com o trabalho de RIBEIRO-FREITAS *et al.* (2005), onde foram avaliadas diferentes concentrações do nematóide *S. carpocapsae* ALL e Santa Rosa sobre *B. microplus*, os autores não encontraram diferenças entre o grupo controle e os tratados. VASCONCELOS *et al.* (2004), utilizando diferentes concentrações dos nematóides *S. glaseri* Santa Rosa e *H. bacteriophora* CCA contra *B. microplus*, também não encontraram diferenças entre os grupo controle e os tratados. O período de pré-postura deste trabalho ficou dentro da variação de dois a quatro dias, para estirpe sensível a 27°C, segundo estudo de GLORIA *et al.* (1993).

O período de postura do grupo controle ocorreu em média durante 12 dias, sendo que para os grupos tratados variou de 1,08 – 3,33 dias. A análise estatística de três concentrações (600, 1200 e 2.400 JI/♀) não pode ser realizada devido a morte das fêmeas antes do início da postura. Entre o grupo controle e os grupos tratados, o período de postura apresentou diferença significativa, o que não ocorreu entre os tratamentos (TAB 2).

Para o período de sobrevivência da fêmea, foram encontradas diferenças entre o grupo controle, com média de 17 dias, em relação aos grupos tratados sendo de quatro dias o período de sobrevivência para o de menor dose (75 JI/♀) e três dias para os demais tratamentos. Nos grupos tratados foram observadas diferenças para o período de sobrevivência da fêmea, entre o tratamento de 75 JI/♀ em relação aos demais tratamentos. Apenas essa diferença foi observada entre os grupos tratados (TAB. 2).

Os resultados tanto para período de postura quanto para período de sobrevivência evidenciaram uma redução dos parâmetros quando comparados grupo controle e tratamentos, indicando o efeito do nematóide nas médias dos parâmetros. Os resultados mostram que as baixas doses do nematóide por carrapato neste trabalho, que são mais interessantes para o controle biológico, tiveram respostas satisfatórias.

Diferenças não significativas entre os grupos tratados quanto ao período de postura, denotam que o efeito da redução no valor deste parâmetro foi devido ao nematóide utilizado e não a concentração de juvenis infectivos por fêmea. Contudo para o período de sobrevivência os grupos tratados apresentaram diferenças significativas entre si, indicando que para este parâmetro a concentração de nematóides utilizados foi a causa da diminuição do período de sobrevivência.

Tabela 2 – Períodos referentes a fase não parasitária de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP1, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.

Concentração de juvenis por fêmea	Parâmetros analisados		
	Período de Pré-postura ¹ (dias)	Período de Postura ² (dias)	Período de sobrevivência ² (dias)
0	2,07 ^a ± 0,37 (29)	12,59 ^a ± 2,92 (29)	17,17 ^a ± 5,84 (29)
75	2,00 ^a ± 0,00 (28)	1,18 ^b ± 0,48 (28)	4,03 ^b ± 0,62 (29)
150	2,04 ^a ± 0,20 (26)	1,08 ^b ± 0,27 (26)	3,10 ^c ± 0,31 (29)
300	2,00 ^a ± 0,00 (10)	1,10 ^b ± 0,32 (10)	3,20 ^c ± 0,41 (30)
600	2,00 [*] ± 0,00 (04)	1,00 [*] ± 0,00 (04)	3,07 ^c ± 0,25 (30)
1200	2,00 ^a ± 0,00 (05)	1,00 [*] ± 0,00 (05)	3,20 ^c ± 0,41 (30)
2400	2,00 [*] ± 0,00 (01)	1,00 [*] ± 0,00 (01)	3,03 ^c ± 0,18 (30)
4800	2,00 ^a ± 0,00 (06)	3,33 ^b ± 4,32 (06)	3,62 ^c ± 2,14 (29)

LPP1 – população isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico – Kruskal-Wallis e Dunn

Porém, nos grupos tratados com concentrações acima de 150 JI/♀ não foi observada essa relação de diminuição no tempo de sobrevivência do carrapato. Nesta relação entre o período de postura e o período de sobrevivência nos tratamentos, onde as fêmeas após cessar a postura ainda estavam vivas, evidencia-se que o pico de ação, do conjunto nematóide e bactéria pode ser provavelmente durante o período de postura. O tempo de exposição de 48 horas do carrapato ao nematóide, foi suficiente para os JIs de *H. indica* LPP1 infectarem e levarem o carrapato à morte, sendo este tempo de exposição menor quando comparado ao tempo de exposição de 72 horas em ambos trabalhos de VASCONCELOS *et al.* (2004) e RIBEIRO-FREITAS *et al.* (2005) no controle de *B. microplus*.

A diminuição do período de postura neste estudo, quando comparado ao estudo de VASCONCELOS *et al.* (2004), foi bastante significativa. Os autores não observaram diminuição deste parâmetro para as espécies testadas e seu controle, e de uma espécie para outra. O valor do período de postura encontrado pelos autores foi em torno de 10-13 dias para os tratamentos, sendo que este período aproxima-se do período de postura do grupo controle do presente trabalho.

REIS (2005) encontrou uma diminuição no período de sobrevivência, em testes com *S. glaseri* em associação ou não com carrapaticida, obtendo resultados parecidos com este trabalho. RIBEIRO-FREITAS *et al.* (2005) obtiveram uma redução dos períodos de pré-postura e sobrevivência, entre seus tratamentos e destes com o grupo controle, fato que ocorreu também neste estudo.

4.4 - Peso de Massa de Ovos, índices de produção de ovos (IPO) e nutricional (IN)

O nematóide utilizado neste estudo provocou a redução da massa de ovos das fêmeas, apresentando diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados (TAB.3). O peso da massa de ovos do grupo controle foi estatisticamente igual ao peso do tratamento com 75 JI/♀. Porém, em relação aos demais grupos tratados foi bastante diferente (FIG.1)

A média do peso dos ovos do grupo controle foi de 114mg, enquanto que para os demais grupos variou de 9 – 0.03 mg. Entre os tratamentos, o grupo tratado com 75 JI/♀ apresentou a maior massa de ovos sendo estatisticamente igual ao grupo tratado de 150 JI/♀. A partir do tratamento com 300 JI/♀ até o maior tratamento de 4.800JI/♀ não foram observadas diferenças.

Tabela 3 – Peso da massa de ovos (mg), índice de produção de ovos (IPO e índice nutricional (IN) de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP1, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80%.

Concentração de juvenis por fêmea	Parâmetros analisados		
	Peso da massa de ovos ¹ (mg)	IPO ¹ (%)	IN ¹ (%)
0	114,45 ^a ± 31,06 (29)	49,24 ^a ± 9,09 (29)	59,07 ^a ± 8,04 (29)
75	9,83 ^{ab} ± 9,78 (29)	4,03 ^{ab} ± 3,52 (28)	26,75 ^a ± 18,28 (28)
150	6,80 ^b ± 7,29 (29)	2,59 ^b ± 2,74 (26)	33,12 ^a ± 51,90 (26)
300	2,20 ^c ± 4,32 (30)	0,88 ^c ± 1,85 (29)	5,48 ^b ± 27,21 (29)
600	0,13 ^c ± 0,34 (30)	0,06 ^c ± 0,17 (30)	1,10 ^b ± 26,69 (30)
1200	0,33 ^c ± 0,99 (30)	0,14 ^c ± 0,41 (30)	0,17 ^b ± 7,96 (30)
2400	0,03 ^c ± 0,18 (30)	0,18 ^c ± 0,10 (30)	1,10 ^b ± 6,02 (30)
4800	7,03 ^c ± 25,18 (29)	2,72 ^c ± 9,87 (29)	3,93 ^c ± 15,77 (29)

LPP1 – população isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

(n) – tamanho da amostra

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

¹ Teste paramétrico ANOVA



Figura 1 - Comparação entre fêmeas de *Boophilus microplus* do grupo controle (á esquerda) com o grupo tratado com concentração de 1200 JI/♀ (á direita) *Heterorhabditis indica* LPP1 (á direita), após 48 horas (A). Fêmeas de *Boophilus microplus* após tratamento com concentração de 4800 JI/♀ de *H.indica* LPP1 (B).

VASCONCELOS *et al.* (2004) observaram que apenas dois tratamentos com *S. glaseri* diminuíram a massa de ovos em relação ao grupo controle. Para *H. bacteriophora* CCA, não foram observadas diferenças no tamanho da massa de ovos em nenhum dos tratamentos, em relação ao controle. Em comparação com este trabalho pode-se inferir que *H. indica* LPP1 foi mais eficiente na redução do tamanho da massa de ovos quando comparado a *S. glaseri* e *H. bacteriophora*. Em seu estudo, REIS (2005) obteve uma redução no tamanho da massa de ovos na associação entre *S. glaseri* (1000JI/♀) com carrapaticida, sendo que as associações com doses mais baixas do carrapaticida foram mais eficientes. RIBEIRO-FREITAS *et al.* (2005), também observaram redução na massa de ovos no tratamento com 100 JI/♀ de *S. carpocapsae* ALL e Santa Rosa, sendo que a redução da massa de ovos aumentava, em relação ao aumento das concentrações de juvenis cresceu nos tratamentos.

Os valores do tamanho da amostra para os índices de produção de ovos e nutricional, nos tratamentos com 75 JI/♀, 150 JI/♀ e 300 JI/♀, foram reduzidos devido a algumas fêmeas em cada grupo cujos valores de seus índices foram distorcidos pela alteração do peso, saindo da variação de 0 – 100% (mínimo e máximo) do valor dos índices. Nos referidos tratamentos algumas fêmeas aumentaram seu peso após a morte, o esperado era que após o tratamento o peso diminuísse para as fêmeas que realizaram postura. Este fato foi observado pela primeira vez neste tipo de experimento. Os carrapatos que sofreram essa alteração foram desconsiderados para análise destes parâmetros.

Em relação ao índice de produção de ovos, o qual avalia quanto do sangue ingerido pela fêmea foi convertido em ovos, o grupo controle foi estatisticamente igual para o grupo tratado com 75JI/♀. Com relação aos demais tratamentos o grupo controle apresentou diferença significativa (TAB.3). Entre os grupos tratados, o tratamento com 75 JI/♀ não apresentou diferença comparado ao tratamento com 150 JI/♀ e este diferiu em relação aos demais grupos tratados, sendo que a partir do tratamento com 300 JI/♀ os grupos mantiveram médias iguais para o índice de produção de ovos.

GLORIA *et al.* (1993), obtiveram para uma estirpe sensível de *B. microplus*, 58% a 27°C para o índice de produção de ovos, sendo este valor maior que o observado neste estudo que foi de 49% para o grupo controle e de 0,06 – 4% para os tratamentos. Em relação aos valores de índice de produção de ovos encontrados por VASCONCELOS *et al.* (2004), que foram de 48% para *S. glaseri* e de 50% para *H. bacteriophora* tanto para o controle quanto para os tratamentos, em comparação com este estudo houve redução no valor deste índice. REIS (2005) encontrou 39% para o grupo controle com apenas nematóides. RIBEIRO-FREITAS

et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes em relação a este trabalho, com o índice de produção de ovos diminuindo à medida que a quantidade de juvenis por fêmeas aumentou.

O índice nutricional indica quanto da perda de peso da fêmea foi destinada à produção de ovos, sendo que o restante gasto com outras funções como excreção, respiração, deslocamento entre outros. Para o grupo controle o índice nutricional foi de 59 %, não apresentando diferenças em comparação aos grupos tratados com 75 JI/♀ e o grupo tratado com 150 JI/♀ (TAB.3). Em relação aos demais tratamentos foram observadas diferenças a partir do grupo tratado com 300JI/♀, sendo que este foi semelhante aos tratamento com 600 JI/♀, 1200 JI/♀ e 2400 JI/♀. A maior diferença para o índice nutricional, tanto em relação ao grupo controle quanto entre os tratamentos, foi do grupo tratado com 4800 JI/. A relação entre o aumento de concentração de juvenis por fêmea e diminuição das médias dos valores manteve-se também para o índice nutricional, assim como para o de produção de ovos.

GLORIA *et al* (1993), observaram para uma estirpe sensível de *B.microplus* um índice nutricional de 78% a 27°C; VASCONCELOS *et al.* (2004) não observaram diferenças entre os grupos controle e grupos tratados obtendo valores maiores que 50%, sendo que os valores do índice nutricional para *H. bacteriophora* foram maiores que em *S. glaseri*. Os resultados aqui obtidos mostram uma redução mais acentuada quando comparado aos trabalhos citados anteriormente. Em contra partida REIS (2005), obteve índices nutricionais mais baixos em relação a este trabalho.

Neste trabalho, os resultados mostram uma redução no peso da postura dos grupos tratados, sendo que em todos os tratamentos, ao menos uma fêmea em cada tratamento não realizou postura. A redução do peso da postura relacionada ao baixo índice de produção de ovos, mostrando que as fêmeas transferiram uma taxa muito baixa de nutrientes para fins reprodutivos. O índice nutricional também evidencia que a fêmea gastou mais energia para outros fins que não oviposição. Os resultados destes parâmetros mostram que houve interferência dos tratamentos no processo de produção dos ovos, sendo que esta interferência foi apenas do nematóide utilizado, já que os grupos foram mantidos nas mesmas condições ambientais e as diferenças de valores dentro de cada parâmetro foram devidas as diferentes concentrações de juvenis infectivos utilizados.

4.5 - Período de incubação dos ovos e percentual de eclosão das larvas

O período de incubação dos ovos no grupo controle foi em média de 29 dias sendo semelhante apenas ao grupo tratado com 150 JI/♀ (TAB. 4). Entre os tratamentos, o grupo

tratado com 75JI/♀ foi semelhante ao grupo tratado com 150JI/♀ . Nos grupos tratados com 300 JI/♀, 1200 JI/♀ e 4800 JI/♀ não houve análise estatística devido ao tamanho da amostra. Os grupos tratados com 600 JI/♀ e 2400 JI/♀este parâmetro não foi avaliado porque não houve eclosão de larvas (TAB. 4).

ALVARADO & GONZÁLES (1979) encontraram um período de incubação de 22 a 24 dias, GLORIA *et al.* (1993) observaram um período de incubação de 24 a 27 dias a 27°C. Em relação ao presente trabalho que foi de 29 dias, esta diferença entre o período de incubação pode ser devido à estirpe do carrapato utilizado nos experimentos.

O percentual de eclosão de larvas no grupo controle foi em média de 91% e apresentou diferença significativa em relação aos tratamentos. Entre os grupos tratados não houve diferenças para o percentual de eclosão estando as médias entre 5 – 22% (TAB.4). Dois grupos tratados não apresentaram eclosão de larvas, 600JI/♀ e 2400JI/♀. Quando comparado o percentual de eclosão entre o grupo controle e os grupos tratados observa-se que houve diferenças significativas entre os mesmos, estando estes dados em desacordo com os trabalhos de ALVARADO & GONZÁLES (1979), GLORIA *et al.* (1993), VASCONCELOS *et al.* (2004) e REIS (2005).

Os resultados mostram que o nematóide causou a morte do carrapato rapidamente. A grande maioria das fêmeas morreu antes de realizar postura, e as que realizaram tiveram sua massa de ovos reduzida. Com essa redução de ovos haverá uma diminuição da quantidade de indivíduos na geração seguinte, assim reduzindo o número de larvas que permaneceram no ambiente para retomada do ciclo.

4.6 - Eficácia dos tratamentos

Neste trabalho foram apresentados sete tratamentos com diferentes concentrações de juvenis infectivos de *H indica* LPP1, tendo este nematóide se mostrado eficaz no controle biológico de *B. microplus*. Todas as fêmeas tratadas morreram com quatro dias em média. O percentual de controle para a menor concentração (75 JI/♀) foi de 97,90%, sendo este o menor valor do percentual de controle. Dois tratamentos (600 JI/♀ e 24000 JI/♀) obtiveram 100% de controle do carrapato (FIG.2).

Estes resultados mostram maior eficácia do que a obtida por VASCONCELOS *et al.* (2004), utilizando as mesmas concentrações e maior tempo de exposição do carrapato ao nematóide, sendo que apenas na concentração com 5000JI/♀ obtiveram 100% de eficácia para

S. glaseri; em comparação com RIBEIRO-FREITAS *et al.* (2005) cujos resultados foram semelhantes para concentrações acima de 750 JI/♀ com *S. carpocapsae* com maior tempo de exposição. Os valores de eficácia de tratamento deste trabalho parecem semelhantes aos valores encontrados por REIS (2005). GLAZER *et al.* (2001) observaram uma taxa de mortalidade de 90% para *B. annulatus* na concentração com 1000 JI/♀ de *Heterorhabditis* spp e de 20 -65% para 1000 JI/♀ de *Steinernema* spp., em 24 horas de exposição. ALEKSEEV *et al.* (2006), observaram uma taxa de mortalidade de 85% para *B. annulatus* na concentração com 20 JI/♀ de *Heterorhabditis* spp. e de 50% para 20 JI/♀ de *Steinernema* spp..

As menores concentrações, 75 a 300 juvenis infectantes por fêmea, de *Heterorhabditis indica* LPP1 utilizadas apresentaram eficácia acima de 90% o que benefício para o controle biológico. Os resultados aqui obtidos com *H. indica* isolado LPP1 se mostraram superiores aos encontrados com *H. bacteriophora* CCA, *S. glaseri* Santa Rosa e *S. carpocapsae* Santa Rosa e ALL no controle do *B. microplus* em laboratório..

Tabela 4 – Médias referentes ao período de incubação dos ovos (PIO) percentual de eclosão das larvas (%EC) de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP1, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR >80% .

Concentração de juvenis por fêmea	Parâmetros analisados	
	PIO ¹ (dias)	% EC ²
0	29,34 ^a ± 1,59 (29)	91,17 ^a ± 14,73 (29)
75	27,85 ^b ± 1,10 (14)	22,32 ^b ± 7,20 (28)
150	28,25 ^{ab} ± 1,83 (08)	12,50 ^b ± 21,32 (26)
300	2,20 * ± 4,32 (02)	5,00 ^b ± 10,80 (10)
600	-	0,00 * ± 0,00 (04)
1200	33,00 * ± 0,00 (01)	2,00 * ± 4,47 (05)
2400	-	0,00 * ± 0,00 (01)
4800	30,00 * ± 0,00 (01)	23,00 * ± 40,07 (06)

LPP1 – população isolada na Cidade de Monte Negro, Rondônia, Brasil

(n) – tamanho da amostra

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

* Análise estatística não realizada devido ao tamanho reduzido da amostra

¹ Teste paramétrico ANOVA

² Teste não paramétrico – Kruskal-Wallis e Dunn

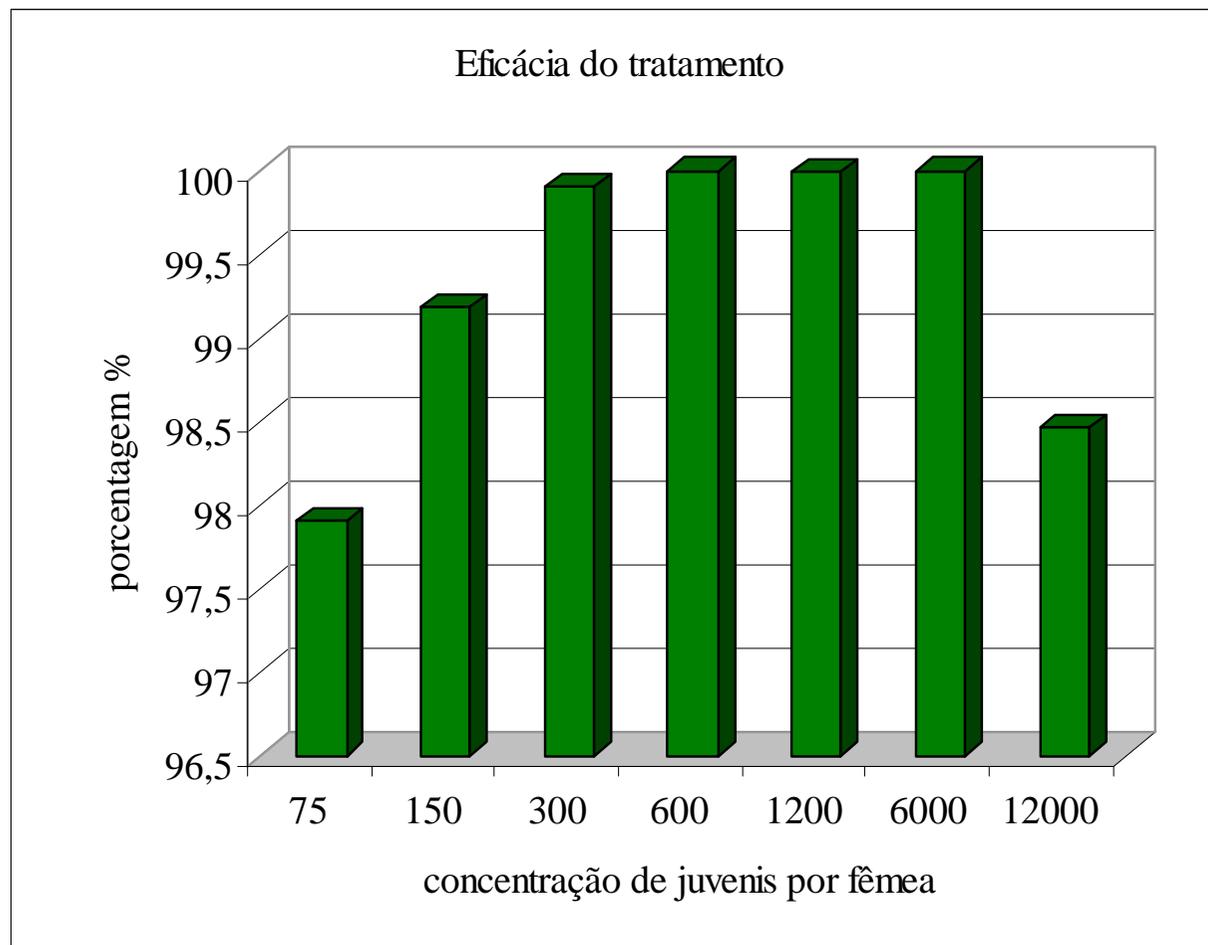


Figura 2 – Controle de fêmeas de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de *Heterorhabditis indica* LPP1, em condições de laboratório a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $>80\%$.

5 – CONCLUSÕES

Heterorhabditis indica LPP1 demonstrou ser eficaz para o controle biológico de *Boophilus microplus*.

As menores concentrações, 75 a 300 juvenis infectantes por fêmea, de *Heterorhabditis indica* LPP1 utilizadas apresentaram eficácia acima de 90%.

O nematóide afetou período postura, período de sobrevivência, peso da postura, peso final da fêmea, percentual de eclosão (%EC), índice de produção de ovos (IPO), índice nutricional (IN) das fêmeas de *B. microplus*, a partir da concentração de 75 JI/♀.

O período de 48 horas foi suficiente para infectar e causar a morte do carrapato.

São necessários mais estudos em laboratório e a campo no controle de *Boophilus microplus* utilizando o nematóide *Heterorhabditis indica* LPP1, a fim de corroborar os resultados obtidos.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B.J. & K.B. NGUYEN. 2002. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**, CABI Publishing, New York. 1ª ed: 01-33.

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.

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.

BENNETT, G. F. 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, **16** (1): 52 - 61.

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.

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

DIX, I., BURNELL, A.M., GRIFFIN, C.T., JOYCE, S.A., NUGENT, M.J. & DOWNES, M.J. 1992. The identification of biological species in the genus *Heterorhabditis* (Nematoda:

Heterorhabditidae) by cross-breeding second generation amphimictic adults. **Parasitology** **104**: 509-518.

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.

DRUMMOND R.O.; S.E. ERNEST; J.L. TREVINO; W.J. GLADNEY & O.H. GRAHAM.1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. **J. Econ. Entomol.** **66**: 130–133.

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.

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.1999. Diagnostico de la susceptibilidad de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* a los acaricidas en lo estado de Minas Gerais, Brasil. In: **Seminario Internacional de Parasitologia Animal**, 4. Puerto Vallarta. Resumos. Puerto Vallarta. 41-46.

GAUGLER, R. 2002. **Entomopathogenic nematology**, CABI Publishing, New York.1^a ed: 388.

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

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

GONZALEZ, J. C. 2003. **O Controle do carrapato do boi**. Passo Fundo, RS: UPF. 129.

GREWAL, P.S.; E.E. LEWIS; R. GAUGLER & J.F. CAMPBELL. 1994. Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. **Parasitology** **108**: 207–215.

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.

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.

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.; S. SELVAN; J.F. CAMPBELL & R. GAUGLER. 1995. Changes in foraging behaviour during the infective juvenile stage of entomopathogenic nematodes. **Parasitology** **110**: 583–590.

LEWIS, E.E.; J. CAMPBELL; C. GRIFFIN; H. KAYA & A. PETERS. 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control** **38**: 66–79.

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

NEVES, J.M.; N. SIMÕES & M. MOTA. 2000. Nematodes Entomopatogénicos: Uso e novas perspectivas. **Boletim de Biotecnologia**. 23-29.

POINAR, JR. G. O. 1990. Taxonomy and Biology of Steinenematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R & KAYA, H.K. (ed), **Entomopathogenic nematodes in Biological Control**. CRC Press. Boca Raton. Florida. 23 – 61.

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). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Juiz de Fora. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento e Biologia Animal. 61.

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.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; W. A. GARDNER; J.R. FUXA; B.W. WOOD; K.B. NGUYEN; B.J. ADAMS; R.A. HUMBER & M.J. HALL. 2003. Survey of Entomopathogenic Nematodes and Fungi Endemic to Pecan Orchards of the Southeastern United States and Their Virulence to the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Environ. Entomol.** **32** (1): 187 – 195.

STRAUCH, O., STOESSEL, S. & EHLERS, R.-U. 1994. Culture conditions define automictic or amphimictic reproduction in entomopathogenic rhabditid nematodes of the genus *Heterorhabditis*. **Fundamental and Applied Nematology** , **17**: 575-582.

VASCONCELOS, V.O. 2003. Ação dos nematóides entomopatogênicos *Steinernema glaseri* strain Santa Rosa (Steiner,1929) e *Heterorhabditis bacteriophora* strain CCA (Poinar,1975) sobre o comportamento biológico de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini,1887) (Acari: Ixodidae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Juiz de Fora. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento e Biologia Animal.54.

VASCONCELOS, V.O.; J. FURLONG ; G.M. FREITAS; C. DOLINSKI; M.M. AGUILLERA.; 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.

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