

# AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONTATO DE *BEAVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. COM OVOS E LARVAS DE *BOOPHILUS MICROPLUS* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE).

V. R. E. P. BITTENCOURT<sup>1</sup>, S. L. E. S. PERALVA<sup>1</sup>, E. C. VIEGAS<sup>2</sup> & S. B. ALVES<sup>3</sup>

(1) Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ; (2) Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia, UFRRJ. 23.851-970, Seropédica, RJ; (3) Departamento de Entomologia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

**SUMÁRIO:** Este trabalho teve como objetivo verificar a patogenicidade *in vitro* de dois isolados de *Beauveria bassiana* para ovos e larvas de *Boophilus microplus*, observar alterações causadas em ovos e calcular a concentração letal 50 e 90. Foram preparadas cinco suspensões com concentrações diferentes de conídios ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$ ), que foram estabelecidas em pré experimento e quantificadas em câmara de Neubauer. O percentual de eclosão verificado nos grupos tratados com ambos os isolados do fungo foi muito menor que o observado nos grupos controles. Nestes, obteve-se um percentual de eclosão de 93,3%, enquanto nos tratados este percentual variou entre 20% a 86,6%, de acordo com o isolado e a concentração do fungo. Nos bioensaios com larvas, observou-se nos grupos controle que o percentual de mortalidade ficou em torno de 13% a 16,5%, enquanto nos tratados o percentual de mortalidade variou entre 18,8% a 88%. Na análise de próbites realizada com os dados referentes ao percentual de eclosão dos ovos tratados com o isolado 986, verificou-se a CL 50 de  $2,46 \times 10^7$  conídios/ml; e com o isolado 747 verificou-se a CL 50 de  $2,49 \times 10^7$  conídios/ml. Com os dados referentes ao percentual de mortalidade das larvas tratadas com o isolado 986, verificou-se uma CL 50 de  $6,83 \times 10^8$  conídios/ml, e com o isolado 747 verificou-se uma CL 50 de  $1,01 \times 10^7$  conídios/ml.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Boophilus microplus*, *Beauveria bassiana*, fungos entomopatogênicos, controle microbiano.

## INTRODUÇÃO

O carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) apresenta grande importância para a pecuária nacional. Segundo WHARTON (1974), este carrapato é originário do Continente Asiático, sendo introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais através da importação de bovinos. Estima-se que todo território brasileiro esteja incluído em zona favorável a este carrapato (EVANS, 1978).

As perdas diretas e indiretas devidas a este parasita são: mortalidade de gado, principalmente das raças européias; desenvolvimento lento de animais parasitados, acarretando na diminuição da produção de carne e leite; transmissão de agentes patogênicos, perdas na produção de couro e gastos com produtos carrapaticidas (PENNA, 1990).

A mortalidade de carrapatos em colônias laboratoriais devido a fungos foi observada por BOYCEV & RIZVANOV (1960). Estes autores verificaram que o fungo *Botrytis cinerea* inviabilizava os ovos do *Ixodes ricinus*, obtendo um percentual de eclosão dos ovos infectados em torno de 6,5%. Mais tarde, LIPA (1971) listou 15 fungos encontrados em ovos e larvas dos seguintes carrapatos: *Argas persicus*, *A.reflexus*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma detritum*, *Ixodes persulcatus*, *I. ricinus*, *Ornithodoros papillipes* e *Rhipicephalus bursa*. O fungo *Aspergillus fumigatus* foi isolado de todas as espécies e o *Penicilium insectivorum* foi isolado de seis espécies.

Os fungos *Beauveria bassiana*, *B. cinerea* e *P. insectivorum* também foram utilizados para promover infecções artificiais em *I. ricinus*. Os resultados

demonstraram uma diminuição do percentual de eclosão dos ovos e uma mortalidade variável de 86% a 100% (GORSKOVA, 1966).

Este trabalho teve como objetivos: verificar a patogenicidade *in vitro* do fungo *B. bassiana*, inoculado sob forma de suspensão conidial em ovos de *B. microplus*; verificar a patogenicidade *in vitro* deste fungo, inoculado sob forma de suspensão em larvas não alimentadas de *B. microplus*; observar alterações ocasionadas pelo fungo em etapas do desenvolvimento embrionário de ovos de *B. microplus* e calcular a concentração letal (CL) 50 e 90 para os ovos e larvas deste carrapato.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ovos e larvas não alimentadas de *B. microplus* utilizadas neste experimento foram obtidas na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, a partir de teleóginas coletadas em estábulo, de animais artificialmente infestados. Para manutenção da colônia de carrapatos foi mantido um bovino jovem de aproximadamente dez meses de idade, que foi submetido a infestações artificiais quinzenais com larvas de *B. microplus*. As fêmeas ingurgitadas foram coletadas 21 dias após a infestação, lavadas com água deionizada, secas em papel filtro, pesadas em balança analítica, colocadas em placas de petri e levadas a incubadora tipo BOD a 27°C com umidade relativa (UR) superior a 80%, para a obtenção dos ovos e das larvas não alimentadas.

Os dois isolados de *B. bassiana* foram obtidos do Departamento de Entomologia, da Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz/USP. Um isolado designado como 986, foi obtido de carrapatos naturalmente infectados e outro, designado 747, foi isolado de formigas. As suspensões de conídios foram preparadas a partir do cultivo do fungo *B. bassiana* em meio de arroz em sacos de polipropileno, utilizando 50 ml de água destilada e três gotas de espalhante adesivo Tween 80. Foram preparadas cinco suspensões com concentrações diferentes de conídios ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ , e  $10^8$ /ml), que foram estabelecidas em pré experimento, e quantificadas em câmara de Neubauer (BITTENCOURT *et alii*, 1994 a, b).

Estas suspensões foram utilizadas para imersão *in vitro* de ovos e larvas não alimentadas de *B. microplus*, com base nas técnicas de avaliação de carrapaticidas descritas por TORRADO & GUTIERREZ (1969) e STENDEL (1980), para avaliação do percentual de mortalidade e controle destes estádios evolutivos. Com relação aos ovos de *B. microplus*, também, foram avaliados parâmetros da fase não parasitária como período de incubação e de eclosão.

Cada grupo de tratamento ficou constituído de três repetições, com de 0,1 g de ovos. Os ovos foram colocados em tubos de ensaio e receberam 0,5 ml de cada suspensão. Após um minuto, o excesso da suspensão foi eliminada e os ovos foram levados para câmara climatizada a 27 + 1°C e 80% UR. As observações sobre a duração dos períodos de incubação e eclosão foram realizadas diariamente através de observação visual, durante 45 dias. A avaliação da eclosão foi feita, 30 dias após, a infecção com o auxílio de microscópio estereoscópico.

Nos testes para avaliação da susceptibilidade larval foram utilizados grupos com 30 larvas. Cada grupo foi colocado em tubo de ensaio, tampado e invertido, para que as larvas se deslocassem para o fundo. Foram colocados 0,5 ml de cada suspensão e após um minuto, o excesso de suspensão foi eliminado e os tubos com as larvas colocados em câmara climatizada. A leitura do percentual de mortalidade foi feita após dez dias, quando os tubos foram examinados com o auxílio de microscópio estereoscópico.

Com os dados obtidos foi realizada a análise de variância fatorial inteiramente casualizado, entre os dois isolados e as diferentes concentrações, denominadas tratamentos, posteriormente foi realizado o teste de Tukey com os dados obtidos, utilizando o software Sistanvax - EMBRAPA. A análise de próbites foi realizada com o auxílio do software Micro Probit 3.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual médio de eclosão de larvas nos grupos de ovos tratados com ambos isolados do fungo foi menor que o observado nos grupos controle. Nestes, obteve-se um percentual de eclosão de 93,3%, enquanto nos grupos tratados este percentual variou entre 20% a 86,6%, de acordo com os diferentes isolados e as concentrações do fungo utilizadas (Fig. 1).

Nos bioensaios onde foram testados os dois isolados em larvas de *B. microplus*, observou-se nos grupos controle que o percentual de mortalidade ficou em torno de 13% a 16,5%, enquanto nos grupos tratados o percentual de mortalidade variou entre 18,8% a 88%, dependendo da concentração utilizada (Fig. 1).

Na análise de próbites realizada com o auxílio do software Micro Probit 3.0, com os dados referentes ao percentual de eclosão de larvas nos ovos tratados com o isolado 986, verificou-se a concentração letal (CL) 50 de  $2,46 \times 10^7$  conídios/ml e a CL 90 de  $1,68 \times 10^{11}$ ; nos ovos tratados com o isolado 747 verificou-se a CL 50 de  $2,49 \times 10^7$  conídios/ml e a CL 90 de  $3,69 \times 10^9$ . Na mesma análise realizada com os dados

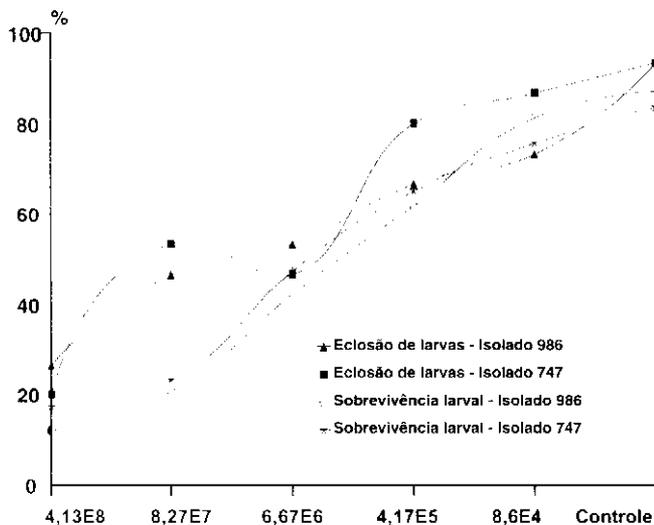


Fig. 1. Percentual de eclosão e sobrevivência de larvas de *Boophilus microplus* infectadas com diferentes concentrações dos isolados 986 e 747 do fungo *Beauveria bassiana*.

referentes ao percentual de mortalidade das larvas tratadas com o isolado 986, verificou-se uma CL 50 de  $6,83 \times 10^6$  conídios/ml e a CL 90 de  $5,95 \times 10^8$ , enquanto para as tratadas com o isolado 747 verificou-se uma CL 50 de  $1,01 \times 10^7$  conídios/ml e CL 90 de  $1,15 \times 10^9$ .

O percentual médio de eclosão das larvas foi inferior ao observado nos grupos controle. Nos trabalhos de DAVEY *et alii*. (1980) e BITTENCOURT *et alii* (1990) foram observados resultados semelhantes aos obtidos no grupo controle deste experimento, utilizando temperatura e umidade relativa semelhantes. No presente trabalho, os grupos tratados com o isolado 986 apresentaram CL 50 inferior ao isolado 747, apesar desta diferença não ser significativa., à nível de 5%. Os grupos tratados apresentaram um percentual de eclosão inversamente proporcional à concentração de conídios/ml, isto é, à medida que eleva-se a concentração da suspensão ocorre uma diminuição do percentual de eclosão das larvas em ovos tratados.

BOYCEV & RIZVANOV (1960) obtiveram um percentual de eclosão de 6,5% nos grupos de ovos de *I. ricinus* tratados com *B. cinerea*. GORSKOVA (1966) também observou um percentual de eclosão muito baixo quando tratou *I. ricinus* com *B. bassiana*, mostrando que a atuação dos dois microorganismos no percentual de eclosão é semelhante, apesar destes autores não terem quantificado as suspensões utilizadas. Várias espécies de fungos isolados de ovos, larvas, ninfas e adultos de oito espécies de carrapatos também foram listadas por LIPA (1971), que demonstrou que os fungos estudados foram infectantes para todos os estágios dos carrapatos. GORSKOVA (1966) também estudou a

Tabela 1. Período1 médio de Incubação e de Eclosão de larvas, observados nos ovos de *Boophilus microplus* tratadas com diferentes concentrações de dois isolados de *Beauveria bassiana* (Temperatura 27°C, Umidade relativa 80% e fotoperíodo de 14/10 hs).

Concentração	Isolado 986a <sup>2</sup>		Isolado 747b <sup>2</sup>	
	Incubação	Eclosão	Incubação	Eclosão
$4,13 \times 10^8$	28,0 a	9,67 a	30,67 a	8,67 a
$8,27 \times 10^7$	27,33 a	8,67 b	28,67 a	8,0 b
$6,67 \times 10^6$	27,0 b	8,0 bc	28,33 b	7,67 bc
$4,17 \times 10^5$	23,67 c	8,0 bc	24,33 c	7,0 bc
$8,67 \times 10^4$	22,33 c	7,67 cd	23,0 c	6,33 cd
Controle	21,33 d	5,67 d	22,0 d	5,33 d

<sup>1</sup> Período em dias.

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

mortalidade de larvas de *I. ricinus* infectadas com o fungo *B. bassiana*, porém este autor não quantificou a infecção e obteve uma mortalidade variável entre 86% a 100%, dependendo do isolado utilizado. Resultados similares aos citados acima foram obtidos neste trabalho com ambos isolados de *B. bassiana*. Os períodos médios de incubação e o de eclosão, em dias, observados nos grupos de ovos tratados com os isolados 986 e o 747 de *B. bassiana* foram maiores que os observados nos grupos controle (Tabela 1). O resultado do teste de Tukey realizado nos dados da análise fatorial mostrou que existe diferença significativa a nível de 5% entre os dois isolados, entre as concentrações, mas não apresenta significância na interação entre isolados e concentrações. No período de incubação dos ovos tratados com ambos isolados, as concentrações  $10^8$  e  $10^7$  apresentaram diferença significativa das demais concentrações, e no período de eclosão dos ovos tratados com ambos isolados, a concentração  $10^8$  apresentou diferença significativa das demais concentrações (Tabela 1). BOYCEV & RIZVANOV (1960) obtiveram um aumento do período de incubação após o tratamento de *I. ricinus* com *B. bassiana*, com o grupo controle apresentando um período de 27 dias, enquanto os grupos tratados, apresentaram um período de 40 dias. GORSKOVA (1966) verificou que o tratamento deste mesmo carrapato com três fungos distintos também resultou na ampliação do período de incubação, concordando com BOYCEV & RIZVANOV (1960) e o presente trabalho. Da mesma forma que ocorre com o período de incubação, o período de eclosão sofre um aumento que é diretamente proporcional ao aumento da concentração de conídios/ml. Os resultados obtidos nos grupos controle foram semelhantes aos obtidos por DAVEY *et alii*. (1990) e BITTENCOURT *et alii*. (1990).

Assim, pode-se concluir que os isolados tratados de *B. bassiana* foram patogênicos para ovos e larvas de *B. microplus*, sendo este patógeno, inimigo natural de importância potencial para ser usado no controle microbiano desta praga.

## SUMMARY

The purpose of this study was to confirm the *in vitro* pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to the eggs and larvae of *Boophilus microplus*, to observe the damage made to eggs and to calculate the lethal concentration (LC) 50 and 90 to both stages. Five suspensions with different spore concentrations ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$ /ml), were prepared before the trial by counts in a Neubauer's chamber. The percentage hatching observed in the treated groups with two isolates of fungus was much smaller than that observed in the controls. Hatching was 93.3% in the controls, while in the treated groups it ranged from 20% to 86.6%, depending upon the isolate and fungus concentration. In larval bioassays, the mortality in the control groups varied from 13% to 16.5%, while in the treated groups it ranged from 18.5% to 88%. Probit analysis of data from the hatching of eggs treated with the 986 isolate showed a LC 50 of  $2.46 \times 10^7$  conidia/ml. Isolate 747 showed a LC 50 of  $2.49 \times 10^7$  conidia/ml. Data from the mortality of larvae treated with isolate 986 showed a LC 50 of  $6.83 \times 10^7$  conidia/ml and with the isolate 747 it was  $1.01 \times 10^7$  conidia/ml.

KEY-WORDS: *Boophilus microplus*, *Beauveria bassiana*, entomopathogenic fungus, microbial control.

## REFERÊNCIAS

- BOYCEV, D. & RIZVANOV, K. (1960). Relation of *Botrytis cinerea* to ixodid ticks. *Zoologie Zeitschrift Ukranien.*: 39: 460.
- BITTENCOURT, A. J.; FONSECA, A. II. & FACCINI, J. L. (1990). Comportamento das fases parasitárias e não parasitárias do *Boophilus microplus* (Canestrini) ingurgitados em diferentes hospedeiros. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, 14:32-38.

- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L. & LIMA, A. F. (1994a). Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, 16 (1-2): 32 - 38.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L. & LIMA, A. F. (1994b). Ação do *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico do *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, 16 (1-2): 39 - 45.
- DAVEY, R. B.; GARZA JR., J.; THOMPSON, G. D. & DRUMMOND, R. O. (1980). Ovipositional biology of the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, 17: 117-121.
- EVANS, D. E. (1978). *Boophilus microplus*: ecological studies and a tick fauna synopsis related to the developing cattle industry of the Latin American and Caribbean Region. 43p. Tese (PhD) - Polytechnic/Council for National Academic Awards, London.
- GORSKOVA, G. J. (1966). Reduction of fecundity of ixodid ticks females induced by fungal infection. *Vetsnik Leningradkogo Universititk*, 21: 13-16.
- LIPA, J. J. (1971). Microbial Control of Mites and Ticks. In: BURGESS, H. D. & HUSSEY, N. W. ed. *Microbial Control of Insects and mites*. 2ed, London, Academic Press, p. 357 - 373.
- PENNA, V. M. (1990). *Boophilus microplus*: A resistencia genética do hospedeiro como forma de controle. *Cadernos Tecnicos da Escola de Veterinária da UFMG*, Belo Horizonte, (4): 3-65.
- STENDEL, W. (1980). The relevance of different test methods for the evaluation of tick controlling substances. *Journal of the South Africa Veterinary Association.*, 51: 147-152.
- TORRADO, J. M. G. & GUTIERREZ, R. O. (1969). Metodo para medir la actividad de los acaricidas sobre larvas de garrapata. Evolucion de sensibilidad. *Revista do Instituto Agropecuario de Patologia Animal*, 6:135-158.
- WHARTON, R. II. (1974). Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In: PAL, R.; WHARTON, R. II. *Control of arthropods of medical and veterinary importance*. London, Plenum Press, p.134-177.

(Received 14 December 1995, Accepted 19 April 1996)