

EFEITOS DE DOIS ISOLADOS DO FUNGO *BEAUVERIA BASSIANA* (BALS.) VUILL. SOBRE A MUDA LARVAL E A SOBREVIVÊNCIA DE NINFAS DE *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS* (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE).

J.V. BARBOSA¹; E. DAEMON²; V. R. E. P. BITTENCOURT² & J. L. H. FACCINI².

(1) Laboratório de Educação Ambiental e em Saúde, Setor de Parasitologia, Departamento de Biologia, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Cx. Postal 926, CEP 21045-900, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ; (2) Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47 antiga Rio - São Paulo, CEP 23851-970, Seropédica, E-mail: jvbarbosa@dece001.criet.fiocruz.br

SUMÁRIO: Objetivando-se investigar o efeito do fungo *Beauveria bassiana* sobre a muda larval e a sobrevivência de ninfas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, amostra de 450 larvas ingurgitadas foi exposta a dois isolados de *B. bassiana* (747 isolado de formiga e 986 isolado de carrapato) em diferentes concentrações de conídios (10^4 , 10^6 e 10^8), além dos grupos de controle que continham 150 larvas cada, que foram imersas na solução de Tween 20 diluída em água destilada. Verificou-se que o percentual de muda diminuiu à medida que aumentaram-se as concentrações de conídios, chegando a percentuais de 100% de mortalidade de larvas ingurgitadas, nas concentrações mais elevadas. No que diz respeito a sobrevivência de ninfas oriundas da ecdise de larvas ingurgitadas, foi verificado que, para o isolado 747, os percentuais de sobrevivência foram semelhantes no controle e na concentração de 10^4 , (93% e 92% respectivamente). Na concentração de 10^6 esse percentual foi de 11%, enquanto na concentração mais elevada (10^8) não houve presença de ninfas, pois a mortalidade de larvas ingurgitadas foi de 100%. O mesmo ocorreu nas concentrações de 10^6 e 10^8 do isolado 986, em que também não foi observada a presença de ninfas, pois, nessas concentrações, houve uma mortalidade de 100% de larvas ingurgitadas.

PALAVRAS - CHAVE: *Rhipicephalus sanguineus*; carrapato. *Beauveria bassiana*; controle biológico.

INTRODUÇÃO

Rhipicephalus sanguineus é um importante ectoparasita de cães em vários países, tanto pela ação expoliativa, quanto pela transmissão de agentes patogênicos, tais como *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozon canis* (CONCEIÇÃO-SILVA *et alii*, 1988), resultando, muitas vezes, em altas taxas de morbidade e mortalidade. Desse modo, são essenciais métodos adequados de controle para a manutenção de baixos níveis de infestação, tanto em criações com fins econômicos quanto em animais de companhia. Até o presente, o controle desta espécie de carrapato vem sendo feito através do uso de produtos químicos, o que pode levar a problemas ligados a intoxicação dos animais e do homem, poluição ambiental e seleção de populações resistentes.

A utilização de fungos entomopatogênicos vêm sendo amplamente investigada como alternativa de controle para

pragas agrícolas (FERRON, 1981; ANDERSON *et alii*, 1988; MANIANIA, 1993). Porém, pouco se sabe sobre seu potencial bio-controlador em carrapatos. No Brasil, BITTENCOURT *et alii* (1994a,b, 1995) realizaram experimentos com o fungo *Metarhizium anisopliae*, avaliando seu potencial carrapaticida frente ao carrapato *Boophilus microplus* e relatando efeitos letais acentuados em diversas fases do ciclo biológico desta espécie.

Outro fungo entomopatogênico que vem sendo amplamente investigado como controlador de pragas agrícolas é *Beauveria bassiana*. Entretanto, também pouco se sabe acerca de seu potencial carrapaticida. Na África os trabalhos de MWANGI *et alii* (1994) e KAAVA *et alii* (1996) relataram a utilização deste fungo no controle biológico de *Rhipicephalus appendiculatus*, parasito do pavilhão auricular de bovinos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, sob condições de laboratório, os efeitos de dois isolados do fungo *B. bassiana* sobre larvas ingurgitadas de *R. sanguineus* e, eventualmente, sobre as ninfas delas provenientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos carrapatos: Fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram coletadas de cães naturalmente infestados no bairro Campo Grande, cidade do Rio de Janeiro, RJ. Após a coleta, as fêmeas foram levadas ao laboratório, limpas, pesadas e acondicionadas individualmente em placas de Petri devidamente identificadas e transferidas para câmara climatizada regulada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa superior a 80% e escotofase. Três dias após o início da postura, as massas de ovos foram reunidas, pesadas em alíquotas de 100 mg, acondicionadas em seringas plásticas descartáveis e recolocadas na câmara climatizada.

Para obtenção das larvas ingurgitadas, foram realizadas infestações artificiais em coelhos mestiços Califórnia x Nova Zelândia, de ambos os sexos, pesando entre 1,5 e 2,5 kg, provenientes do Setor de Cunicultura do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Esses coelhos não tiveram contato prévio com carrapatos ou carrapaticidas. Nas infestações, realizadas através da técnica de saco de pano aderido à orelha (NEITZ *et alii*, 1971), foram empregadas cerca de 2.300 larvas com 15-25 dias pós-eclosão, correspondentes à eclosão total de 100 mg de ovos.

Obtenção do fungo: Os isolados denominados 747 (proveniente de formigas) e 986 (proveniente de carrapatos) do fungo *B. bassiana*, foram obtidos do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) e trazidos ao Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes, onde foram mantidos em meio de arroz, à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ à umidade relativa superior a 80% e ao fotoperíodo 12/12 até ao momento de sua utilização nos bioensaios.

Experimento: Foram testadas três concentrações de cada isolado do fungo. Para tal, foi utilizada uma alíquota de conídios diluída em água destilada (100 ml) e espalhante adesivo (Polyoxethylene Sorbitan Tween 80 - 3 gotas), resultando nas concentrações de 10^4 , 10^6 e 10^8 conídios por mililitro de solução.

Para cada concentração foram utilizadas 150 larvas ingurgitadas, que foram acondicionadas em três tubos de ensaio, vedados com algodão hidrófilo, na razão de 50 larvas/tubo/concentração. Formou-se ainda um grupo controle, composto por 150 larvas ingurgitadas.

Para exposição ao fungo foram vertidos nos tubos de ensaio um ml das diversas concentrações dos dois isolados, ficando as larvas imersas nessa solução por um período de cinco minutos. Ao término desse tempo, os tubos foram invertidos, para retirada da solução em que as larvas estavam imersas. A seguir, o material foi colocado em câmara climatizada regulada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa superior a 80% e 12 horas de fotofase. O grupo controle foi imerso em água

destilada e no espalhante adesivo por igual período de tempo, sendo posteriormente mantido em câmara climatizada regulada conforme descrito acima.

As observações foram realizadas diariamente, visando detectar o início e o final das ecdises, bem como para verificar a mortalidade das larvas, os percentuais de muda larvais e a longevidade das ninfas delas provenientes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que 30 dias após a exposição, a mortalidade das larvas no controle foi de 24% para o isolado 986, enquanto nos demais tratamentos esse percentual aumentou conforme aumentaram as concentrações, sendo de 67%, 94% e 100% para as concentrações 10^4 , 10^6 e 10^8 respectivamente, no isolado 747. No isolado 986, a mortalidade variou de 35% em 10^4 a 100% nas concentrações de 10^6 e 10^8 (Fig. 1). Resultados semelhantes foram obtidos por KAYA *et alii* (1996) os quais, trabalhando com larvas não ingurgitadas e imersas em solução contendo concentração de 10^9 conídios/ml de *B. bassiana*, verificaram mortalidade de aproximadamente 100%.

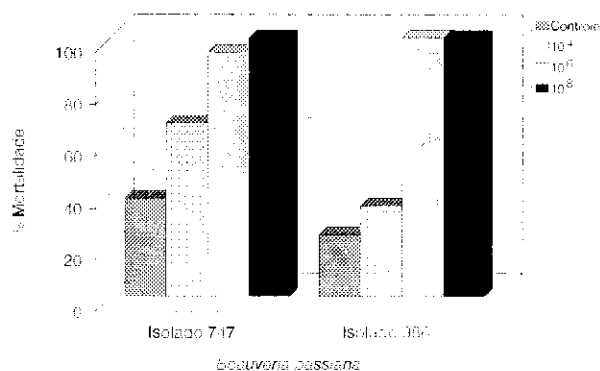


Fig. 1 - Percentual de mortalidade de larvas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* após exposição a dois isolados (747 e 986) do fungo *Beauveria bassiana*.

GORSKOVA (1966), estudando o efeito de *B. bassiana* no carrapato *Ixodes ricinus* na fase de larva, observou mortalidade que variou entre 86% a 100%, dependendo do isolado do fungo. Resultado semelhante foi encontrado em nosso estudo (100%). Porém, aquele autor não menciona se as larvas estudadas foram alimentadas, além de não fazer referência quanto às concentrações do fungo. Do mesmo modo, BITTENCOURT *et alii* (1994b), também encontraram resultados semelhantes quanto à mortalidade de larvas quando estudaram o efeito do fungo *M. anisopliae* sobre ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*, encontrando mortalidade que variou de 29,3% a 97,3%, dependendo da concentração utilizada.

Com relação à sobrevivência de ninfas oriundas das ecdises de larvas ingurgitadas após exposição aos isolados, foi observado que, para o isolado 747, os percentuais de sobrevivência foram semelhantes no controle e na concentração de 10^2 , quinze dias após as ecdises, já para a concentração de 10^6 esse percentual foi de 11%, enquanto na concentração mais elevada (10^8) não houve presença de ninfas, pois a mortalidade de larvas ingurgitadas foi de 100% (Fig. 2). O mesmo fato ocorreu nas concentrações de 10^6 e 10^8 do isolado 986, em que também não foi observada a presença de ninfas, pois, conforme citado anteriormente, nessas concentrações houve mortalidade de 100% de larvas ingurgitadas. Entretanto, em contraste com o verificado para o isolado 747, a concentração de 10^4 do isolado 986 diminuiu acentuadamente a sobrevivência das ninfas (24% de ninfas vivas quinze dias após a ecdise - Fig. 2), evidenciando uma maior persistência do entomopatôgeno no carrapato.

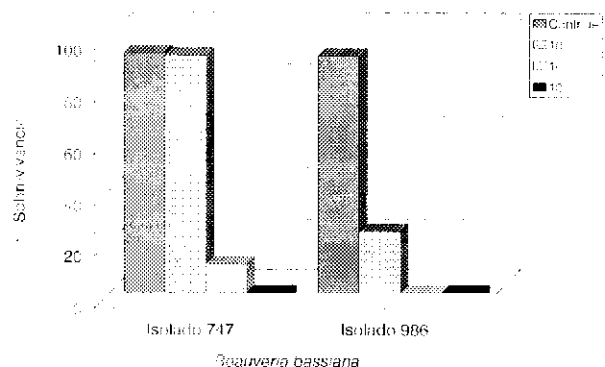


Fig. 2 - Percentual de sobrevivência de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus*, 15 dias após ecdise de larvas ingurgitadas, expostas a dois isolados (747 e 986) do fungo *Beauveria bassiana*.

KAAYA *et alii* (1996) constataram mortalidade de 76 a 96% de ninfas de *R. appendiculatus* submetidas à aspersão com solução contendo 10^9 conídios de *B. bassiana*/ml, resultado semelhante ao do presente trabalho; entretanto deve-se levar em conta que esta mortalidade refere-se a ninfas provenientes de larvas ingurgitadas expostas ao fungo, podendo-se supor que haja maior susceptibilidade de *R. sanguineus* e/ou maior patogenicidade do isolado empregado, reforçada pela constatação de 100% de mortalidade em concentração de 10^6 .

Ficou assim evidenciado que os isolados apresentam acentuado efeito deletério *in vitro* sobre os estágios de *R. sanguineus* utilizados no presente trabalho. Embora haja necessidade de avaliação *in vivo*, os resultados obtidos nestes experimentos sugerem um real potencial controlador do fungo *B. bassiana* sobre as fases larval e ninfal de *R. sanguineus*.

SUMMARY

Aiming to investigate the effect of the fungus *Beauveria bassiana* on the moulting of larvae and on the survival of nymphs of the tick *Rhipicephalus sanguineus*, 450 engorged larvae were exposed to two isolates of *B. bassiana* (747, isolated from ants and 986, isolated from ticks) in different conid concentrations (10^4 , 10^6 and 10^8). Two control groups were formed by 150 engorged larvae that were immersed in a solution of Tween 80 in distilled water. The percentages of moulting decreased when the concentrations increased. Mortality of engorged larvae exposed to the higher concentrations reached 100%. The survival of the nymphs (hatched from the engorged larvae) from the control group and the group exposed to the isolate 747 at a concentration of 10^4 were similar (93% and 92%, respectively), 15 days after the ecdysis. At the concentration of 10^6 of the isolate 747, the survival of nymphs was 11%, while at the higher concentration (10^8) no nymphs hatched since larval mortality was 100%. The same result occurred at the concentrations of 10^6 and 10^8 of the isolate 986, in which no nymphs emerged, since the mortality of larvae was also 100%.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, T. E.; ROBERTS, D. W. & SOPER, R. S. (1988). Use of *Beauveria bassiana* for suppression of Colorado potato beetle in New York State (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 17:140-145.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L. & LIMA, A. F. (1994a). Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. *Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, 16(1-2): 49-55.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L. & LIMA, A. F. (1994b). Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. *Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, 16(1-2):41-47.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L. & LIMA, A. F. (1995). Dinâmica da infecção do carrapato *Boophilus microplus* pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. *Revista da Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, 17(1):83-88.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F. M.; ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D. & JANZ, J. G. (1988). Hepatozoonosis in foxes from Portugal. *Journal of Wildlife*, 24(2):344-347.
- FERRON, P. (1981). Pest control by the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*. In: *Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980*. Burges, H. D. (Ed.) Academic Press, London, p. 465-482.

- GORSKOVA, G. J. (1966). Reduction of fecundity of ixodid ticks females induced by fungal infection. *Veterinary Leningrad University*, 21:13-16.
- KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N. & OUNA, E. A. (1996). Prospects for Biological Control of Livestock Ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, Using the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium Anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67:15-20.
- MANIANIA, N. K. (1993). Effectiveness of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. for control of the stem borer *Chilo partellus* (Swinhoe) in maize in Kenya. *Crop. Prot.*, 12:601-604.
- MWANGI, E. N.; KAAYA, G. P.; ESSUMAN, S. KIMONDO, M.G.; AND OUNA, E. 1994. Experimental and natural infections of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biol. Cont.*, v.4, p.101- 104.
- NEITZ, W. O. D.; BOUGHTON, F. & WALTERS, H. S. (1971). Laboratory investigations on the life cycle of Karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann., 1904). *Onderspoort Journal of Veterinary Research*, 38(3):215-224.

(Received 1 November 1997, Accepted DD mmmm 199x)