Avaliação *in vitro* da patogenicidade dos isolados CG17, EP01 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin sobre larvas do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae)

Patogenicity of isolates CG17, EP01 and 986 of the fungi *Beauveria bassiana* on larvae of the tick *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) in laboratory

Silvia Gonzalez Monteiro,* Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt,** Erik Daemon**

Resumo

A patogenicidade *in vitro* de três isolados do fungo *Beauveria bassiana*, CG17 e EP01 e 986 foi avaliada em larvas do carrapato *Anocentor nitens* mantidas em temperatura controlada (27°C e 80% U.R.). A susceptibilidade das larvas aos isolados foi determinada experimentalmente por imersão de grupos de larvas não alimentadas com 25mg de larvas por grupo, durante três minutos, em quatro concentrações (10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml) de cada isolado e um grupo controle imerso em água (com dez repetições para cada tratamento). Após dez dias de infecção, a concentração 10^8 causou a mortalidade de aproximadamente 93% das larvas para todos os isolados, e a concentração 10^5 causou a mortalidade de 7,6%, 17,5% e 43%, nos tratamentos com os isolados 986, EP01 e CG17, respectivamente. A mortalidade média de larvas do grupo controle não excedeu a 0,9%, fato este que demonstra o poder patogênico deste fungo em larvas de *A. nitens*. A CL 50 para os isolados 986, CG17 e EP01 foi $1,8 \times 10^7$; $1,6 \times 10^6$ e $2,5 \times 10^7$, respectivamente.

Palavras-chave: *Anocentor nitens*, *Beauveria bassiana*, fungos entomopatogênicos, controle microbiano.

Abstract

The *in vitro* pathogenicity of three isolates of the fungi *Beauveria bassiana* (CG17, EP01 and 986) were evaluated against the larvae of *Anocentor nitens* ticks under controlled conditions (27°C; 80% RH). The susceptibility of its larvae to the isolated was experimentally determined by immersion of groups of larvae weighting 25 mg each group, during three minutes in four different suspension (10^8 , 10^7 , 10^6 , and 10^5 conidia/ml), and a control group immersed in water (ten repetitions for each treatment). After 10 days of infection, the concentrations of 10^8 conidia/ml caused a mortality of approximately 93% of the larvae for all isolates, and the concentration 10^5 caused a mortality of 7,6, 17,5 and 43%, in treatments with isolated 986, EP01 and CG17, respectively. The mean mortality in control group was 0,9%. The results proves the pathogenicity of these fungi in *A. nitens* larvae. The LC 50 of 986, CG17 and EP01 were $1,8 \times 10^7$, $1,6 \times 10^6$ and $2,5 \times 10^7$ respectively.

Keywords: *Anocentor nitens*, *Beauveria bassiana*, fungi, control microbial.

Introdução

O carrapato *Anocentor nitens* pertence à família Ixodidae e é responsável pela transmissão de vários agentes causadores de enfermidades em equídeos. Denning (1988) cita esta espécie como transmissora de Piroplasmose equina. Além disso, a lesão causada por sua picada pode servir de porta de entrada para bactérias e miíases.

Beauveria bassiana é um fungo Deuteromiceto encontrado comumente no solo e considerado por diversos autores (Kaaya et al., 1996, Mwangi, 1991, Bittencourt et al., 1996) como entomopatogênico para diferentes espécies de carra-

pato, sendo bastante empregado no controle biológico de plantas. Uma grande vantagem desse fungo sobre os pesticidas convencionais é a sua persistência sobre a população hospedeira, redução da longevidade e altas taxas de mortalidade em larvas e adultos das populações de insetos.

O fungo *B. bassiana* é uma das espécies mais conhecidas para o controle de pragas, e isso se deve à sua ampla distribuição geográfica, variedade de hospedeiros e ocorrência em condições naturais de forma enzoótica ou provocando epizootias em algumas espécies de insetos pragas.

No Brasil, o trabalho de Monteiro et al. (1998c) demonstrou que o uso de suspensões de *B. bassiana* em larvas de

* Doutoranda do CPGMV-PV, bolsista CAPES.

** Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil, CEP 23890-000

Rhipicephalus sanguineus originou uma mortalidade proporcional a concentração dos conídios utilizada.

Monteiro et al. (1998a), ao utilizar esse isolado em fêmeas ingurgitadas de *A. nitens* verificaram uma diminuição gradativa, inversamente proporcional à concentração utilizada no período de postura, no peso da massa de ovos, no período médio de sobrevivência, no período de incubação, no período de eclosão e nos índices de eficiência reprodutiva e nutricional. Contrariamente, houve aumento proporcional à concentração utilizada no peso das quenóginas e na mortalidade de larvas.

Monteiro et al. (1998b) testaram esse mesmo isolado em ovos de *R. sanguineus* e constatou que a porcentagem de eclosão de larvas oriundas desses ovos foi inferior a 30% nos grupos tratados com a suspensão 10^8 conídios/ml.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* dos isolados CG17, EP01 e 986 do fungo *B. bassiana* sobre larvas do carrapato *A. nitens* em condições de temperatura e umidade controlada.

Material e métodos

Fêmeas do carrapato *A. nitens* coletadas de equinos naturalmente infestados foram lavadas, secas, colocadas em placas de Petri isoladamente e mantidas em câmara climatizada (27 °C e 80% UR) para obtenção da postura.

Após o início da postura foram feitas pesagens de 25 mg de ovos/cada. Esses ovos foram postos em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófilo na extremidade e mantidos nas mesmas condições climáticas citadas anteriormente para eclosão das larvas (aproximadamente 800 larvas).

Os isolados utilizados foram o EP01 (isolado de *Cosmopolites sordidus*), CG17 (isolado de *Hypothenemus hampei*) e 986 (isolado de *Boophilus microplus*). Estes isolados foram repicados previamente em meio de arroz (Alves, 1998) para a obtenção dos conídios e com o auxílio de câmara de Neubauer, foram preparadas quatro suspensões com diferentes concentrações (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 conídios/ml) de cada um dos isolados contendo água destilada e 1% de espalhante adesivo (Tween 80) mais um grupo controle contendo apenas água destilada e 1% de espalhante adesivo.

Após a eclosão, cada tubo de ensaio contendo as 25 mg de larvas foi imerso com três mililitros de cada suspensão durante três minutos após os quais, os tubos foram invertidos para o escoamento através do algodão do excesso de suspensão. Foram utilizadas dez repetições em cada tratamento.

Os parâmetros analisados através da análise de variância ANOVA e MICROPBIBIT foram: porcentagem de mortalidade de larvas e concentração letal para 50 e 90% (CL 50 e CL 90) da população de larvas.

Tabela 1: Média e desvio-padrão da mortalidade de larvas de *Anocentor nitens* tratadas com os isolados CG17, EP01 e 986 do fungo *Beauveria bassiana*.

Concentração de conídios/ ml		Mortalidade das larvas		
		Isolado CG17	Isolado EP01	Isolado 986
10^8	x	99,3 a	99,9 a	93,6 a
	s	1,5	0,3	8,3
10^7	x	91,2 a	83,5 b	36 b
	s	14,3	19	13,4
10^6	x	92,7 a	34 c	17 b
	s	7,6	29,5	8,2
10^5	x	43 b	17,5 c	7,6 c
	s	25,8	13,5	6,3
Controle	x	0,9 c	0,9 d	0,9 d
	s	0,7	0,7	0,7

As médias seguidas pela mesma letra, numa mesma coluna, não diferem entre si.

x = média; s = desvio-padrão

Figura 1: Concentração letal para 50 e 90% da população de larvas de *Anocentor nitens* tratadas com os isolados CG17, EP01 e 986 do fungo *Beauveria bassiana*.

Resultados e discussão

Os percentuais de mortalidade observados nos bioensaios com larvas com suas respectivas médias e desvios-padrão estão demonstrados na Tabela 1, e as concentrações letais para 50% e 90% da população de larvas estão demonstradas na Figura 1.

Observou-se que o percentual de mortalidade médio verificado nos grupos tratados com os diferentes isolados do fungo *B. bassiana* foi maior que o observado no grupo controle. Dez dias após a infecção, as larvas tratadas com os isolados de *B. bassiana* na concentração 10^8 tiveram mortalidade superior a 93%, sendo que a mortalidade foi proporcional à concentração de conídios utilizada em todos os tratamentos com os diferentes isolados. Na concentração 10^5 a mortalidade foi de

43%, 17,5% e 7,6 para os isolados CG17, EP01 e 986, respectivamente, enquanto a média de mortalidade do grupo controle foi de 0,9%.

Na análise de próbites a concentração letal para 50% dos isolados CG17, EP01 e 986 ficaram em $1,6 \times 10^6$ conídios/ml, $2,5 \times 10^7$ conídios/ml, e $1,8 \times 10^7$ respectivamente e a concentração letal para 90% da população de larvas foi superior para o isolado 986 ($2,3 \times 10^8$ conídios/ml) se comparado aos isolados EP01 ($2,2 \times 10^8$ conídios/ml) e CG17 ($4,4 \times 10^7$).

O trabalho de Monteiro et al. (1998c) utilizando os isolados 747 e 986 deste mesmo fungo entomopatogênico infectando larvas de *R. sanguineus* mantidas nas mesmas condições de temperatura e umidade deste trabalho, demonstraram uma mortalidade de 100% das larvas após dez dias da infecção na concentração 10^8 conídios/ml para ambos isolados. Em um trabalho similar, Bittencourt et al. (1996) avaliaram a ação dos mesmos isolados de *B. bassiana* em larvas do carrapato *B. microplus* e observaram 82% de mortalidade máxima para

a concentração 10^8 conídios/ml, fatos esses que mostram que o percentual de mortalidade observado nos experimentos está relacionado à especificidade dos isolados para cada espécie de carrapato envolvida. Na análise de próbites realizada com os dados referentes ao percentual de mortalidade dos isolados de *B. bassiana* testados neste experimento verificou-se que as concentrações letais para 50% da população ficaram próximas às encontradas no trabalho de Bittencourt et al. (1996) com $6,8 \times 10^6$ e $1,01 \times 10^7$ conídios/ml e superiores ao encontrado no trabalho de Monteiro et al. (1998c) ($2,2 \times 10^5$ e $2,1 \times 10^6$ conídios/ml), o que pode reforçar a hipótese de maior ou menor especificidade para cada espécie em questão, visto que Monteiro et al. (1998c) trabalharam com *R. sanguineus*.

Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram uma redução da quantidade de larvas que sobreviveram à infecção e são similares aos encontrados na literatura, o que com relação a outras espécies de carrapatos, nos leva a concluir que estes isolados são patogênicos para larvas de *A. nitens*.

Referências

- ALVES, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2. ed., São Paulo: FEALQ, Piracicaba, 1998, 1163 p.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. S.; VIEGAS, E. C.; ALVES, S. B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 5, n. 2, p. 81-84, 1996.
- DENNING, F. *Unsuccessful attempts to transmit Amblyomma cajennense*. 1988. 112 p. Tese (Doutorado) - Escola de Medicina Veterinária, Hannover.
- KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. Prospects for Biological Control of Livestock Ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, Using the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.*, v. 67, p. 15-20, 1996.
- MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H. Patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 7, n. 2, p. 113-116, 1998c.
- MONTEIRO, S. G.; CARNEIRO, M. E.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E. Efeito do isolado 986 do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill sobre fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* NEUMANN, 1897. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, v. 50, n. 6, p. 673-676, 1998a.
- MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Rev. Ciência Rural*, v. 28, n. 3, p. 461-466, 1998b.
- MWANGI, E. N.; DIPEOLU, O. O.; NEWSON, R. M.; KAAYA, G. P.; HASSAN, S. M. Predators, Parasitoids and Pathogens of Ticks: a Review. *Bioc. Sci. Technol.*, v. 1, p. 147-156, 1991.