

DESENVOLVIMENTO DE *Heterorhabditis amazonensis* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) EM DIFERENTES TEMPERATURAS

ANDRESSA LIMA DE BRIDA¹; FLÁVIO ROBERTO MELLO GARCIA²; LUÍS GARRIGÓS LEITE³; SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia/PPG em Entomologia;
andressa_brida23@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia/Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética-flaviormg@hotmail.com

³ Instituto de Biológico, Centro experimental, Campinas SP, Brasil-
lgleite@biologico.sp.gov.br

⁴ Departamento de Proteção Vegetal, Botucatu, SP, Brasil-
srenata@fca.unesp.br

1. INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) do gênero *Heterorhabditis* Poinar (Rhabditida: Heterorhabditidae) vivem no solo e são patógenos letais de insetos pragas. Estes agentes têm sido amplamente utilizados no controle biológico de pragas em diferentes sistemas de produção agrícola com potencial de ocasionar morte rápida do hospedeiro (POINAR; GREWAL, 2012). O juvenil infectante (JI) pode penetrar no inseto através da boca, ânus e espiráculos e via tegumento liberando bactérias simbiotes dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente na hemocele a qual, em combinação com toxinas produzidas pelos nematoides, mata o hospedeiro entre 24 a 48 horas (CHASTON; GOODRIH-BLAIR, 2010). O sucesso de NEPs no controle de pragas agrícolas induz o aumento do número de estudos, especialmente na otimização de condições para infecção e desenvolvimento desses organismos (WAAL et al., 2010). As estratégias de sobrevivência destes agentes em condições adversas são pouco conhecidas, mas pode estar relacionada à permanência do nematoide no solo em estado quiescente, migração ou a permanência no cadáver dos insetos por períodos longos, uma vez que os NEPs podem abrigar-se no cadáver, quando expostos a condições ambientais não favoráveis (WANG et al., 2014). Diferentes espécies e isolados de nematoides entomopatogênicos apresentam requisitos térmicos distintos, podendo ter a sobrevivência, reprodução, desenvolvimento e virulência afetados quando expostos a temperaturas extremas. O impacto da temperatura e substrato de produção in vivo são parâmetros que influenciam no período de persistência dos nematoides, na liberação no campo em programas de controle biológico, necessitando ser estudados, para melhorar o processo de produção em laboratório e a sobrevivência dos JIs no meio ambiente. Diante ao exposto o objetivo foi avaliar o período de mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) após a infecção de *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24; o período da emergência e a quantidade de JIs multiplicados durante o período de 30 dias em cinco temperaturas.

2. METODOLOGIA

A espécie de NEPs foi obtida da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos do Banco de Nematoides Entomopatógenos "Oldemar Cardim Abreu" do Instituto Biológico (GOULART et al., 2003). Os nematoides foram multiplicados em

lagartas de quinto instar de *G. mellonella*, criada em temperatura de 30°C com dieta à base de favo e cera de abelha sem luminosidade. Foram utilizadas cinco lagartas por placas de Petri de nove cm com duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5 mL de suspensão com 500 juvenil/placa, disponibilizando 100 juvenil/lagarta e acondicionadas em BOD com temperatura a 25°C (WOODRING; KAYA, 1988). Após três dias, as lagartas mortas foram transferidas para armadilha de White (WHITE, 1927) e armazenadas em BOD a 25°C por um período de três a 15 dias. Os JIs que abandonaram os cadáveres foram recolhidos com água destilada e quantificados em placas de contagem. Os tratamentos consistiram do nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 inoculado em *G. mellonella* e uma testemunha (sem nematoide) nas temperaturas de 14, 18, 22, 26 e 30°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 tratamentos e dez repetições, totalizando 100 parcelas. Cada parcela teve uma placa de Petri de cinco cm com papel filtro umedecido com 1,5 mL de suspensão contendo 100 juvenis/repetição. As placas da testemunha foram umedecidas com 1,5 mL de água destilada e armazenadas nas temperaturas estudadas. A mortalidade de *G. mellonella*, o número de dias de emergência dos JIs e o de JIs emergido por *G. mellonella* após 30 dias (taxa de multiplicação) foram avaliados a cada 24 horas. As lagartas de *G. mellonella* mortas foram individualizadas em armadilhas de White e acondicionadas nas mesmas temperaturas para a avaliação da emergência dos JIs. As suspensões com JIs foram recolhidas no primeiro dia de emergência e as mesmas quantificadas diariamente até 30 dias, em Siracusa graduada, sob microscópio estereoscópio. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis (HOLLANDER; WOLFE, 1973) e pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve 100% mortalidade em todas as temperaturas, mas nem todas apresentaram emergência de JIs. Na temperatura de 14°C não houve emergência de JIs, a 18°C e 26°C houve 40% de lagartas com emergência de JIs, a 22°C, 60% e a 30°C, 80%. O menor período para a mortalidade de lagartas de *G. mellonella* infectadas por *H. amazonensis* foi às temperaturas de 26°C e 30°C, três dias. E a 14°C e 18°C maior período para mortalidade, oito e sete dias ($P=0,001$). A 22°C, a mortalidade teve ocorrência cinco dias após a infecção não diferindo significativamente das demais temperaturas. A emergência de *H. amazonensis* IBCBn 24 em lagartas de *G. mellonella* diferiu entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p<0,05$), (ANOVA, $F_{3;18}=4,3068$; $P<0,05$) demonstrou uma variabilidade de 50% entre os tratamentos. O número de JIs emergidos nas temperaturas de 26°C e 30°C não apresentaram diferenças (229.563 e 127.157), assim como as temperaturas de 18°C e 22°C (11.815 e 223.886). Os maiores números de JIs emergidos foram encontrados em lagartas armazenadas nas temperaturas de 22°C, 26°C e 30°C. Não houve emergência de JIs na temperatura de 14°C. Temperaturas entre 20°C e 35°C são adequadas para a patogenicidade, infecciosidade e reprodução de nematoides entomopatogênicos (KOPPENHOFER; KAYA, 1999). A temperatura de 14°C, provavelmente seja crítica para o desenvolvimento dos JIs, devido às lagartas apresentarem um maior período de tempo para mortalidade (oito dias) e sem emergência de JIs ao longo de 30 dias. O nematoide *H. amazonensis* é uma espécie que se adapta em temperaturas entre 25 a 27°C (ANDALÓ; NGUYEN; MOINO JR, 2006), portanto houve a infecção pelo nematoide, mais não o seu desenvolvimento no cadáver

hospedeiro. O maior período de tempo para a emergência de *H. amazonensis* IBCBn 24 foi a 18°C, 24,7 dias quando comparado com o período de tempo da temperatura de 30°C, 9,4 dias. A primeira emergência dos nematoides a 20°C ocorre após 20 dias em temperaturas mais baixa, e após 45 dias após a infecção nas temperaturas mais altas (MORTON; GARCIA-DEL-PINO, 2009), no entanto, embora o aparecimento dos juvenis de *H. amazonensis* tenha sido mais tarde, a 18°C, o número de juvenis recuperados são maiores nas temperaturas de 26°C indicando que esta é a temperatura ótima e favorável para a reprodução e recuperação de JIs, embora não houve diferença com o número de juvenis recuperados a 22 e 30°C. Segundo Sáenze; Lopez (2011), a temperatura de 25°C indica ser uma ótima temperatura para o desenvolvimento de NEPs, embora o fato de que o ciclo de vida e o número de gerações de um nematoide podem depender da disponibilidade de alimento e do tamanho de hospedeiro (ADAMS; NGUYEN, 2002). A emergência dos JIs nas temperaturas 18, 22, 26 e 30°C caíram drasticamente no décimo dia de emergência. Quando há um longo período de incubação de cadáveres de insetos, há uma redução da emergência de JIs (KOPPENHOFER et al., 1995). *H. amazonensis* apresentou um ciclo longo, possivelmente com três gerações, mesmo com um número menor de JIs emergidos a 18°C, a emergência estendeu-se mais que 15 dias chegando aos 30 dias ainda com JIs emergindo dos cadáveres. A amplitude da temperatura para o aproveitamento máximo das potencialidades dos nematoides é relativamente estreita, principalmente na capacidade de infecção e persistências no solo que são comprometidas acima de 30°C e abaixo de 15°C. Esse trabalho colabora com informações importantes sobre o conhecimento do comportamento de *H. amazonensis*, nas diferentes temperaturas, e que a característica climática do biótipo onde um isolado se encontra pode ter um impacto em sua temperatura ideal de infecciosidade.

4. CONCLUSÕES

As temperaturas de 26°C e 30°C foram as melhores para a infecção, emergência e multiplicação de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 em lagartas de *G. mellonella*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Nguyen. K.B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed. Cab International). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University. 2002, Cap.1, p. 1-28.
- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K.B.; MOINO, A.JR. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, Leiden, v.8, n.6, p.853-867, 2006.
- CHASTON, J.; GOODRICH-BLAIR, H. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. **FEMS microbiol reviews**, v. 34, n.1, p.41-58, 2010.
- GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.; LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M. 2003. Formação de um banco de nematoides entomopatogênicos no Instituto Biológico, SP. In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO XIII**, São Pedro, 2003, **Resumos...**São Pedro, SP, v.1, p.83.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D.A. 1973. **Nonparametric statistical methods**. Chichester & New York, USA, John Wiley & Sons, 503p.

KOPPENHOOFFER, A.M.; KAYA, H.K.; TAORMINO, S.P. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.65, n.1, p.193–199, 1995.

KOPPENHOOFFER, A.M.; KAYA, H.K. Ecological characterization of *Steinernema rarum*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, n.1, p. 120–128, 1999.

MORTON, A.; GARCIA-DEL-PINO, F. Ecological characterization of entomopathogenic nematodes isolated in stone fruit orchard soils of Mediterranean areas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.102, n.3, p.203–213, 2009.

POINAR, G.O.; GREWAL, P.S. History of entomopathogenic nematology. **Journal of Nematology**, v. 44, n.2, p. 153–161, 2012.

SÁENZ, A.; LÓPEZ, J.C. Ciclo de vida y patogenicidad de un aislamiento nativo de *Heterorhabditis* sp., (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, n. 1, 43–47, 2011.

WANG, X.; WANG, H.; FENG, Q. Z.; CUI, X.Y.; LIU, R.Y.; SUN, Y.B.; LI, G.C.; SONG, D.M.; LIU, W.; RUAN, W. B.; HARVEY, J. Desiccation and cold storage of *Galleria mellonella* cadavers and effects on in vivo production of *Steinernema carpocapsae*. **Pest Management Science**, v. 70, n.6, p. 895–904, 2014.

WAAL, J.Y.; MALAN, A.P.; LEVINGS, J.; ADDISON, M.F. Key elements in the successful control of diapausing codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in wooden fruit bins with a South African isolate of *Heterorhabditis zealandica* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Biocontrol Science Technology**, v.20, n.1, p. 489–502, 2010.

WOODRING, J.L.; KAYA, H.K. “*Steinernematid and Heterorhabditid* Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques.” **Southern Cooperative Series Bulletin 331**, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AR, 1988.

WHITE, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science** 66, p.302–303.