

EFEITO DA TEMPERATURA NA MORTALIDADE DE *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) E *Tenebrio molitor* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) POR *Heterohabditis bacteriophora*

ANA LUCIA CHAVES MACHADO¹; MAGUINTONTZ CEDNEY JEAN BAPTISTE²;
JOSÉ JÚNIOR DOS SANTOS³; SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN⁴ FLÁVIO
ROBERTO MELLO GARCIA⁵; ANDRESSA LIMA DE BRIDA⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia/ Laboratório de Ecologia de Insetos –
ana.lchaves.machado@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, PPG em Entomologia –
magcedneyjeanbaptiste@yahoo.fr

³ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, PPG em Entomologia –
j.terion@unochapeco.edu.br

⁴ UNESP – Universidade Estadual Paulista, Departamento de Proteção Vegetal –
srenata@fca.unesp.br

⁵ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Ecologia, Zoologia e
Genética- flaviormg@hotmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Ecologia, Zoologia e
Genética – andressa_brida23@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs), são conhecidos como nematoides parasitas de insetos, utilizados no controle biológico de pragas, principalmente aqueles insetos com uma fase de vida no solo (BRIDA et al., 2017). As espécies pertencentes aos gêneros *Steineinerma* e *Heterorhabditis* carregam em seu intestino, bactérias específicas do gênero *Xenorhabdus* spp. E *Photorhabdus* spp. que são os agentes patogênicos (BRIDA et al., 2017). O juvenil infectante (J3) invadem o corpo do inseto hospedeiro através de seus orifícios e liberam uma bactéria simbiótica que causa a morte por septicemia, dentro de 24 a 48 horas. Além de produzirem toxinas para matar os insetos, as bactérias entomopatogênicas produzem antibióticos, que lhes permitem crescerem, no inseto, livres de outros agentes oportunistas (DOLINSKI et al., 2017). Existem diferentes hospedeiros que são suscetíveis a NEPs, entre eles estão: a Lagartas-das-maçãs *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781), a traça *Amyelois transitella*, (Walker), a falsa medideira *Trichoplusia ni* (Hübner), a Lagarta-rosada-do-algodão *Pectinophora gossypiella* (Saund, 1844), a traça *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808), a Lagarta-da-espiga do milho *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850), a Mariposa cigana *Limantrya dispar* (Linnaeus, 1758), o Grilo-doméstico *Acheta domesticus* (Linnaeus, 1758) (BLINOVA; IVANOVA, 1987; CABANILLAS; RAULSTON, 1994; ELAWAD et al., 2001; GREWAL; CONVERSE; GEORGIS, 1999; LINDEGREN et al., 1979; SHAPIRO; POINAR JUNIOR; LINDEGREN, 1985). Entretanto alguns hospedeiros são específicos. A principal forma de se isolar um nematoide entomopatogênico é a partir dos hospedeiros ou do solo em que habitam, pois estes são o substrato de multiplicação dos nematoides, sendo a traça-dos-favos, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) a espécie mais utilizada, devido a sua

vulnerabilidade a maioria das espécies de NEPs (GAUGLER; HAN 2002). Um outro inseto bastante utilizado é o besouro *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae), que em estágio de larva tem sido bastante utilizado para a multiplicação de nematoides entomopatogênicos em laboratório (Embrapa Trigo, 2007). A produção de NEPs *in vivo* é considerada uma técnica simples e a vantagem principal desta produção é que a partir de populações previamente selecionadas várias linhagens podem ser produzidas com menos tempo e esforço de trabalho (ANBESSE et al., 2013). As produções *in vivo* são dependentes da concentração de nematoides e do tamanho do hospedeiro. Concentrações muito baixas resultam em baixa mortalidade do hospedeiro e concentrações muito altas resultam em falhas na infecção devido à competição com invasões secundárias (WOODRING; KAYA, 1988). Por isso a escolha do inseto hospedeiro e de suma importância para maximizar o tempo e a produção de NEPs. O objetivo do trabalho foi avaliar o período de mortalidade de lagartas de *G. mellonella* e de larvas *T. molitor* após a infecção de *Heterorhabditis bacteriophora* HB e período de emergência do JIs no inseto hospedeiro.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Ecologia de Insetos, pertencente ao Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética da Universidade Federal de Pelotas, RS. A espécie de NEPs foi obtida da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos do Banco de Nematoides Entomopatogênicos “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 Ø=9 cm com duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5 mL de suspensão com 500 juvenil/placa, disponibilizando 100 juvenil/lagarta. Essas placas foram vedadas com papel filme PVC 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, filtrados e decantados para a retirada dos corpos gordurosos dos insetos e quantificados em placas de contagem. Os tratamentos consistiram do nematoide *H. bacteriophora* HB inoculado em *G. mellonella* e *T. molitor* e a testemunha (hospedeiro sem nematoide) na temperatura de 25°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e oito repetições, totalizando 34 parcelas. Cada parcela teve uma placa de Petri (Ø=5 cm) com papel filtro umedecido com 1,5 mL de suspensão contendo 100JIs/repetição. As placas da testemunha foram umedecidas com 1,5 mL de água destilada e armazenadas na temperatura estudada. Uma lagarta de *G. mellonella* (quarto ao quinto instar) e uma larva de *T. molitor* foi colocada por placa separadamente. O período para a mortalidade de *G. mellonella* e de *T. molitor* o número de dias de emergência dos JIs foram avaliados a cada 24 horas.

Os cadáveres de *G. mellonella* e de *T. molitor* foram individualizadas em armadilhas de White (White, 1927) e acondicionadas na mesma temperatura para a avaliação da emergência dos JIs. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa computacional de estatística BioEstat. versão 5.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve 87,5% de mortalidade de lagartas de *G. mellonella* e de 75% de larvas de *T. molitor*. O período de mortalidade de lagartas de *G. mellonella* foram de 2,7 dias e de *T. molitor* de 6,5 dias. O período para emergência dos JIs de *H. bacteriophora* HB em cadáveres de *G. mellonella* foi de 5 dias, e para *T. molitor* de 14, 6 dias. Na presente pesquisa, pode-se perceber que o período de mortalidade foi menor em lagartas de *G. mellonella* comparado com larvas de *T. molitor*. Lagartas de *G. mellonella* apresenta cutícula mais fina comparada com as larvas de *T. molitor*, isto pode ter contribuído para a rápida infecção dos JIs no hospedeiro. Embora os JIs de NEPs possam penetrar por aberturas naturais (boca, anus, espiráculos e via cutícula), os JIs de *H. bacteriophora* apresentam dente córneo que ajuda na penetração via cutícula do inseto hospedeiro (SHAPIRO-ILAN et al., 2008) e mesmo com esta característica, houve maior o período para a mortalidade e período para a emergência dos JIs em larvas de *T. molitor*. 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).

4. CONCLUSÕES

Lagartas de *G. mellonella* foi considerado o melhor hospedeiro para a produção *in vivo* de *H. bacteriophora* HB, permitiu o menor período para mortalidade e emergência dos JIs do nematoide.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS B.J., NGUYEN, K.B. Taxonomy and systematics. In: **R. Gaugler (ed.), Entomopathogenic Nematology**, CABI Publishing, Oxon, New York, 2002, pp. 1-34.

ANBESSE, S. et al. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berli, Alemanha, v. 97, p. 731-739, 2013.

BRIDA, A. L. et al. Entomopathogenic nematodes in agricultural areas in Brazil. **Scientific Reports**. 7: 45254, 2017.

DOLINSKI, C. et al. Efeito de Substratos com diferentes classes texturais na mobilidade de *Heterorhabditis baujardi* 'LPP7' (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, n. 2, p. 123-128, 2010.

EMBRAPA TRIGO, 2007. **MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA TRIGO**, 3. Passo Fundo. resumos. 36 p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 82). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do82.htm> Acesso de 26 agosto de 2018.

GAUGLER, R.; HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. (Ed.) **Entomopathogenic nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 289-312.

GOULART, R. M. et al. 2003. Formação de um banco de nematoides entomopatogênicos no Instituto Biológico, SP. In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO**, Resumos... São Pedro, 83.

SÁENZE, A., LÓPEZ, J. C. Ciclo de vida y patogenicidad de un aislamiento nativo de *Heterorhabditis* sp., (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Revista Colombiana de Entomología**. 37, 43-47, 2011.

SHAPIRO-ILLAN, D. et al. 2008. Effects of host nutrition on virulence and fitness of entomopathogenic nematodes: Lipid and protein based supplements in *Tenebrio molitor* diets. **Journal Nematology**. V.40, p.13-19, 2008.

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

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. *Steinernematid* and *Heterorhabditid* nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. **Southern Cooperative Series Bulletin. Agricultural Experiment Station**. Fayetteville, Arkansas, v. 331, p. 1–17, 1988.