

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

### NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS INFECTAM OVOS E ADULTOS CIGARRINHA-DAS-PASTAGENS?

E.S. de P. Batista<sup>1</sup>, A.M. Auad<sup>1</sup>, M.P. Frias<sup>1</sup>, C.M. de O. Monteiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, CEP 36038-330, Juiz de Fora, MG, Brasil. E-mail: elderspb@gmail.com

#### RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são potenciais controladores biológicos das ninfas de cigarrinhas-das-pastagens. Com o objetivo de avaliar a eficiência dos NEPs contra as demais fases de vida (ovos e adultos) de *Mahanarva spectabilis*, desenvolveu-se experimento sob condições de laboratório. Ovos em diferentes fases de desenvolvimento embrionário foram expostos aos NEPs *Steinernema anomali*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobrave*, *Heterorhabditis amazonensis* RSC1, *H. amazonensis* RSC5, *Heterorhabditis* sp. JPM3, *Heterorhabditis indica* LPP1 e *Heterorhabditis* sp. PI no volume de 2 mL com concentração de 2.000 JIs/mL. A eficiência do patógeno foi avaliada através da dissecação dos ovos após sete dias de exposição. No experimento com adultos as unidades experimentais (UEs) consistiram de gaiolas contendo adultos da cigarrinha submetidas a uma suspensão aquosa com 20 mL contendo 8.000 JIs/mL de *S. riobrave* (tratamento) das quais se compararam a mortalidade e número de ovos recuperados com os mesmos parâmetros das UEs livres de nematoides (testemunha). Os nematoides não foram capazes de penetrar os ovos do cercopídeo. Não foi observada morte de indivíduos adultos de cigarrinha, tampouco se observou redução no número de ovos entre as UEs tratadas e testemunhas. Não houve influência da presença de nematoides sobre a frequência de adultos que permaneciam sobre o substrato. Não foi caracterizada vulnerabilidade destas fases de desenvolvimento do inseto às espécies testadas desses patógenos, portanto, não devem ser aplicados visando o controle dessas fases de desenvolvimento do inseto.

PALAVRAS-CHAVE: Cercopidae, controle microbiano, *Heterorhabditis*, pastagens, *Steinernema*.

#### ABSTRACT

CAN ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES INFECT EGGS AND ADULTS OF SPITTLEBUGS? Entomopathogenic nematodes (EPNs) are potential biological controllers of spittlebug nymphs. With the aim to evaluate the efficiency of EPNs against the other life stages (eggs and adults) of *Mahanarva spectabilis*, an assay was developed in laboratory conditions. Eggs at different embryonic development phases were exposed to the EPNs *Steinernema anomali*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobrave*, *Heterorhabditis amazonensis* RSC1, *H. amazonensis* RSC5, *Heterorhabditis* sp. JPM3, *Heterorhabditis indica* LPP1 and *Heterorhabditis* sp. PI in a 2 mL aqueous suspension of 2,000 IJ/mL concentration. The efficiency of the pathogens was evaluated by way of egg desiccation after 7 days. In the assay with adults the experimental units consisted of cages containing spittlebug adults exposed to an aqueous suspension (20 mL) with 8,000 IJs/mL of *Steinernema riobrave* (treatment), and mortality and recovered eggs number were compared with the same parameters of cages free of nematodes (control group). No individual mortality was observed, nor was there a reduction in recovered egg number between the treated and control cages. The presence of nematodes presented no influence on the adults staying on the substrate. Thus, there was no vulnerability in these stages of development of the insect to these pathogens, and therefore it should not be applied for the control of these insect development phases.

KEY WORDS: Cercopidae, microbial control, *Heterorhabditis*, pastures, *Steinernema*.

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae tem sido estudados e utilizados como controladores biológicos de diversas pragas agrícolas que vivem

no solo ou possuem hábitos crípticos (GEORGIS *et al.*, 2006, GREWAL *et al.*, 2001).

As pastagens destinadas à alimentação bovina têm como praga a cigarrinha-das-pastagens,

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909), que se alimenta da seiva das folhas prejudicando a manutenção deste cultivo (AUAD *et al.*, 2007).

A eficiência de NEPs é conhecida contra diversas pragas agrícolas (GREWAL *et al.*, 2001), e contra cigarrinhas esses patógenos foram aplicados sobre ninfas de *M. fimbriolata*, provocando mortalidade de 100% em laboratório e 70% em campo (LEITE *et al.*, 2005).

Os ovos de cigarrinhas-das-pastagens passam pelo período seco do ano em diapausa e assim representam a fase deste inseto que permanece por mais tempo no ambiente (PECK, 2002). Adultos de cigarrinhas-das-pastagens realizam postura predominantemente na superfície do solo próximo à planta hospedeira (VALÉRIO; NAKANO, 1988). É possível que os machos que ocasionalmente caminham sobre o solo ou as fêmeas no momento da oviposição sobre o solo sejam infectadas pelos NEPs, ou ainda que a presença dos nematoides atrapalhem esse tipo de oviposição, já que a fase de vida livre (juvenis infectantes) desses patógenos explora a superfície do solo (KAYA; GAUGLER 1993). Por essa razão é possível também que os ovos sejam infectados durante o período de incubação no solo. Assim buscou-se avaliar a eficiência desses patógenos contra os ovos e adultos dessa praga.

Os nematoides utilizados foram multiplicados de acordo com metodologia proposta por KAYA; STOCK (1997) e WHITE (1927), que utilizaram larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) como hospedeiro.

Para o primeiro experimento utilizaram-se ovos diapáusicos e não-diapáusicos em segundo (S2) e quarto (S4) estágio de desenvolvimento embrionário, classificados segundo PECK (2002).

Placas de Petri de 5 cm de diâmetro com papel filtro como substrato receberam dez ovos da cigarrinha e 2 mL de suspensão aquosa contendo 2.000 juvenis infectantes (JIs) de cada nematoide separadamente, sendo eles: *Steinernema anomali* Kozodoi, 1984, *S. carpocapsae* (Weiser, 1955), *S. feltiae* (Filipjev, 1934), *S. riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994, *Heterorhabditis amazonensis* RSC1 Andaló, Nguyen & Moino Jr. 2006, *H. amazonensis* RSC5, *Heterorhabditis* sp. JPM3, *H. indica* LPP1 Poinar, Karunakar & David, 1992 e *Heterorhabditis* sp. PI. Foram montados dez tratamentos (nove isolados e um controle) e para cada um destes, dez repetições. As placas foram vedadas e armazenadas sob 25° C, 70% de UR e 12 horas de fotofase.

As unidades experimentais foram observadas diariamente a fim de se flagrar comportamentos realizados pelos nematoides e, após sete dias, avaliou-se a penetração no conteúdo dos ovos através de estereomicroscopia. Sendo observados JIs no interior do ovo este foi considerado inviabilizado.

Para o experimento com adultos foram utilizados indivíduos oriundos de criação mantida em casa de vegetação.

Uma gaiola de acrílico (30 x 55 x 30 cm) com uma planta de capim-elefante, *Pennisetum purpureum*, (25 cm de altura) mantida em copo descartável de 500 mL, teve o assoalho e base da planta cobertos com seis camadas de gaze hidrófila (composta de algodão, não estéril, nove fios) umedecida que serviu como substrato de oviposição. Nessa gaiola foram adicionados seis fêmeas e três machos da cigarrinha. Esse aparato consistiu uma Unidade Experimental (UE).

Após a adição dos adultos foram aplicados juvenis infectantes de *S. riobrave* sobre as gazes em suspensão aquosa (20 mL) de 8.000 JI/mL, com auxílio de borrifador. Unidades experimentais testemunha também foram montadas com a mesma configuração, exceto pela aplicação de NEPs. Esse procedimento foi repetido seis vezes para o grupo tratado e para a testemunha. O experimento foi conduzido à temperatura de 25 ± 3° C e umidade relativa de 70 ± 15%.

Diariamente os adultos mortos foram observados ao microscópio estereoscópico para verificação da presença de nematoides no seu interior. Quando constatada, atribuíam-se a morte do indivíduo a esse patógeno. Após três dias as gazes foram recolhidas e os ovos recuperados de cada uma delas foram contabilizados. O número absoluto de adultos mortos e ovos recuperados foram comparados entre os grupos tratado e testemunha.

Adicionalmente, duas UEs tratadas e duas não-tratadas foram filmadas duas vezes por dia (às 12 e 18h), com duração de uma hora, durante três dias. Compararam-se os dados das UEs tratadas e não-tratadas e a frequência de adultos (obtida por amostragem tipo *scan* com intervalos de 5 minutos) que permaneciam sobre a gaze e na parte aérea numa mesma unidade experimental, através do teste t de Bonferroni.

Observou-se que os nematoides buscaram e permaneceram ao redor dos ovos, desempenhando comportamentos de forrageio e penetração (Fig. 1). No entanto, não foram capazes de penetrar nos ovos em nenhuma das fases de desenvolvimento embrionário testadas, o que se repetiu para ovos diapáusicos e não-diapáusicos, em virtude da diferença nesse caso ficar restrita a características fisiológicas e não morfológicas.

Com relação aos ovos em S2, acredita-se que a ausência de aberturas naturais foi determinante para o insucesso dos nematoides do gênero *Steinernema* (Travassos, 1927), já que esses invadem o hospedeiro exclusivamente por aberturas naturais. Já em ovos S4, a abertura da casca e exposição do cório não foi suficiente para que o ovo apresentasse aberturas que permitissem a penetração de nematoides desse gênero.

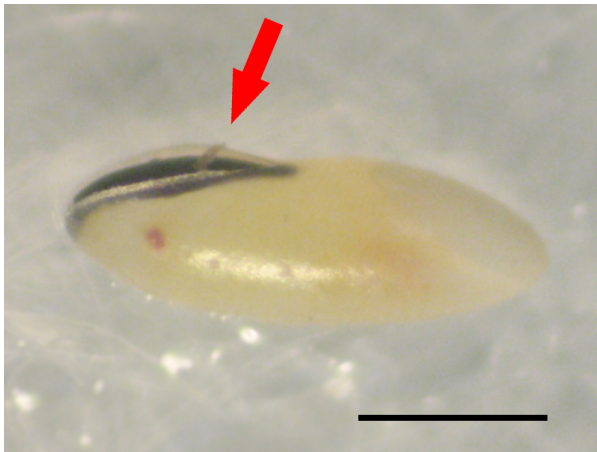


Fig. 1 - Nematóide entomopatogênico, *Steinernema carpocapsae* (seta), desempenhando comportamento de penetração em ovo não diapúsico no quarto estágio embrionário (S4) de *Mahanarva spectabilis*. (Barra = 0,5 mm).

Para o gênero *Heterorhabditis* (Poinar, 1976) a resistência da casca dos ovos foi o fator atribuído ao impedimento da penetração nos ovos em S2, já que nesse gênero os JIs possuem um dente quitinoso dorsal anterior (ADAMS; NGUYEN 2003), que é utilizado para a penetração através do tegumento do hospedeiro e, em ovos S4, o cório exposto não foi vulnerável à esse tipo de penetração. Nessa situação há também a possibilidade de as altas concentrações utilizadas terem influenciado negativamente a penetração, pois acarretaria um aumento na competição pelos ovos como hospedeiros potenciais, maior gasto energético e consequente queda na infectividade dos NEPs (ANDALÓ, comunicação pessoal).

MACHADO *et al.* (2005) observaram 45% de ovos de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae) inviabilizados por *H. indica*, com a invasão ocorrendo pela aerópila, por onde se acredita acontecer as trocas gasosas do ovo o que, além de permitir o encontro destes pelos nematoides, permite a penetração.

Não foi observada morte de adultos da cigarrinha das pastagens provocada por *S. riobrave*. Foram observados indivíduos mortos com nematoides sobre o corpo, mas não dentro da hemolinfa, o que caracterizaria com segurança a morte provocada por esse patógeno. Infere-se que os nematoides reconheceram os adultos como hospedeiros potenciais, mas não foram capazes de infectá-los. Além disso, a média de ovos recuperados entre as gaiolas tratadas (120) e não tratadas (121), não foi diferente, configurando ausência de influência dos nematoides sobre o comportamento de oviposição das fêmeas.

Observou-se que a média de adultos que exploraram o substrato no ambiente tratado foi de 1,58, o que não configurou diferença àqueles com o mesmo comportamento no ambiente não tratado (1,35). Isso evidencia que a presença dos nematoides no

substrato não influenciou no número de adultos que explora esse ambiente e que mesmo estando em contato com os adultos de cigarrinha, os nematoides não foram capazes de infectá-los. Ocorreu diferença na frequência de adultos que permaneciam sobre o substrato e os que não o faziam em ambos os grupos, sendo de 1,58 e 7,42, no grupo tratado e 1,35 e 7,65 no grupo não-tratado. A baixa frequência de adultos no substrato confirma as observações de VALÉRIO; NAKANO (1988) para a cigarrinha *Zulia entreriana*, que constatarem maior atividade de adultos de cigarrinha no terço superior das plantas hospedeiras.

Outra razão que possivelmente explica a ausência de infecção dos adultos pelos NEPs foi que, como observado por ALVES *et al.* (2005) e RODRIGUEIRO *et al.* (2008) estudando nematoides contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus*, a mortalidade de adultos foi menor do que de larvas, talvez pelo fato de os primeiros apresentarem tegumento mais quitinizado, resistindo melhor à penetração dos nematoides, além da habilidade de realizar comportamentos de auto-limpeza, não exibido pelas larvas, percebendo a presença dos nematoides no corpo e diminuindo assim a incidência de infecções por esses patógenos.

A gaze servindo como substrato de locomoção dos nematoides pode ter afetado sua capacidade de infecção, já que a granulometria do substrato exerce influência nesse processo (KOPPENHÖFER; FUZY, 2007). No presente trabalho a gaze configurou substrato com lacunas grandes entre as partículas, possivelmente fazendo com que os juvenis infectantes tendessem para camadas mais baixas, dificultando o contato com os hospedeiros.

Nematoides entomopatogênicos não são capazes de penetrar nos ovos de *Mahanarva spectabilis* e a fase adulta dessa cigarrinha não foi vulnerável a *Steinernema riobrave*. Portanto estes patógenos não devem ser utilizados visando o controle destas fases de desenvolvimento da praga.

## AGRADECIMENTOS

À Embrapa Gado de Leite pela estrutura utilizada no trabalho. Ao Laboratório de Patologia de Insetos da Universidade Federal de Lavras pelos isolados de nematoides entomopatogênicos.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. Cambridge: CABI Publishing, 2003. chap. 1, 388p.
- ALVES, L.F.A.; ROHDE, C.; ALVES, V.S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus*

- (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, v.34, n.1, p.139-141, 2005.
- AUAD, A.M.; SIMÕES, A.D.; PEREIRA, A.V.; BRAGA, A.L.F.; SOBRINHO, F.S.; LÉDO, F.J.S.; PAULA-MORAES, S.V.; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, R.B. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.1077-1081, 2007.
- GEORGIS, R.; KOPPENHOFER, A.M.; LACEY, L.A.; BÉLAIR, G.; DUNCAN, L.W.; GREWAL, P.S.; SAMISH, M.; TAN, L.; TORR, P.; VAN TOL, R.W.H.M. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control*, v.38, p.103-123, 2006.
- GREWAL, P.S.; DE NARDO, E.A.B.; AGUILLERA, M.M. Entomopathogenic nematodes: potencial for exploration and use in South America. *Neotropical Entomology*, v.30, p.191-205, 2001.
- KAYA, H.K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, v.38, p.181-206, 1993.
- KAYA, H.K.; STOCK, S.P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego: Academic Press, 1997. Chap. 6, 409p.
- KOPPENHÖFER, A.M.; FUZY, E.M. Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *H. bacteriophora*. *Applied Soil Ecology*, v.35, p.128-139, 2007.
- LEITE, L.G.; MACHADO, L.A.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M.; BATISTA-FILHO, A. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugar cane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology*, v.34, p.785-790, 2005.
- MACHADO, L.A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; CALEGARI, L.C.; GOULART, R.M.; TAVARES, F. M. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, n.2, p.221-226, 2005.
- PECK, D.C. Distribución y reconocimiento del salivazo de los pastos (Homoptera: Cercopidae) em la Costa Caribe de Colombia. *Pasturas Tropicales*, v.24, p.4-15, 2002.
- RODRIGUEIRO, T.S.C.; GINARTE, C.M.A.; LEITE, L.G.; TAVARES, F.M.; GOULART, R.M.; GIOMETTI, F.H.C. Eficiência de *Heterorhabditis indica* IBCB-N05 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) sob comedouros de granja avícola. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.75, n.3, p.279-284, 2008.
- VALERIO, J.R.; NAKANO, O. Locais de alimentação e distribuição vertical de adultos da cigarrinha *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae) em plantas de *Brachiaria decumbens* Stapf. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.17, n.2, p.519-529, 1988.
- WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, v.66, p.302-303, 1927.

Recebido em 1/6/10  
Aceito em 27/4/11