

Avaliação de isolados de nematoides entomopatogênicos para controle de *Rhynchophorus palmarum*

Patricia da Silva Santos¹, Elisson Teixeira da Silva², Natália Tavares Santos Ferreira³, Aldomário Santo Negrison Junior⁴, Juan Pablo Molina Acevedo⁵, Valdemir Albuquerque da Silva Junior⁶

Resumo - O *Rhynchophorus palmarum* L., 1764 (Coleoptera: Curculionidae), está dentre as principais pragas de relevância econômica na cultura do coqueiro. A sua fase larval, responsável por causar os danos diretos à cultura, ocorre no interior da planta. Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) possuem o comportamento de busca e localização de agentes nocivos à planta. Em países da Europa, o uso de nematoides vem sendo utilizado visando o controle do *Rhynchophorus ferrugineus* em Arecaceae, demonstrando seu potencial no controle biológico desta espécie de inseto. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade e virulência de sete espécies de NEPs em larvas de *R. palmarum*, testando a hipótese se este método pode vir a se tornar uma medida de controle eficiente. As larvas foram inoculadas com os nematoides das espécies *Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis amazonensis* JPM4, *S. feltiae*, *Heterorhabditis* P5, *H. amazonensis* RSC 05, *S. brasiliense* e *H. bacteriophora*. nas concentrações de 100JIs e 500JIs, sendo a avaliação da mortalidade dos insetos realizada diariamente durante 12 dias. Com uma concentração de 100JIs os resultados indicam uma maior virulência com *S. brasiliense* e *S. feltiae* com 80% e 50%, respectivamente, seguidas de *Heterorhabditis* P5 e *S. carpocapsae* com 40% e 30%. Ao utilizar concentração de 500JIs, a porcentagem de mortalidade de larvas de *R. palmarum* foi maior com a inoculação das espécies *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* e *H. amazonensis* JPM4, com 100%, 90%, 90% e 80%, respectivamente, seguidas de *S. brasiliense* e *H. amazonensis* RSC 05 com 70% e 50%.

Termos para indexação: entomopatogênico, controle biológico, virulência.

Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera*) é uma cultura amplamente cultivada na região intertropical de todo planeta. Na faixa litorânea do nordeste brasileiro encontra-se condições propícias para um bom rendimento da cultura, entretanto, o crescimento na incidência de pragas e o manejo inadequado e de forma empírica, acarreta baixa produtividade e rendimento, sendo assim as pragas em especial as coleobrocas um dos fatores limitantes da cultura.

Rhynchophorus palmarum (L.) tem sido hoje uma das grandes preocupações no que diz respeito às coleobrocas em palmeiras de modo geral, é um inseto de hábito diurno, podendo ser encontrado em todas as fases de seu desenvolvimento e em qualquer época do ano, o que favorece o crescimento populacional de forma exponencial. O maior dano é causado pela fase de larva, já que a larva se alimenta do tecido meristemático da planta, abrindo galerias que são portas de entrada para pragas e doenças secundárias. Além de causar danos diretos, o inseto também é vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb), agente causal do “anel vermelho”, que ocasiona a morte das plantas (Sánchez; Cerda, 1993).

Existe atualmente uma dificuldade do controle da broca-do-olho no coqueiro pela complexidade no manejo de inseticidas capazes de controlar a densidade população do inseto, visto que as larvas que causam o maior dano, estão no interior da planta, impossibilitando o uso de um inseticida de contato, ou controle biológico com bactérias ou fungos. A possibilidade de uso de nematoides entomopatogênicos pode trazer para a cultura uma sobrevida e ainda com a vantagem de não de utilizar químicos, que garante ao produtor uma maior biossegurança e ao consumidor uma qualidade superior aos produtos que recorrem aos químicos na fase de produção.

Os nematoides entomopatogênicos são agentes encontrados no solo, em diversas regiões do globo, e após penetrarem no hospedeiro pelas aberturas naturais, liberam uma bactéria entomopatogênica que carregam em seu trato digestório, causando septicemia no inseto entre 24 e 48 horas (Ferraz, 1998; Hominick, 2002).

¹Graduanda em Engenharia Agrônoma, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

²Graduando em Engenharia Agrônoma, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

³Graduanda em Engenharia Agrônoma, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

⁴Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitossanidade/Entomologia, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo (UEP-Rio Largo), Rio Largo, AL.

⁵Engenheiro-agrônomo, doutor em Entomologia, Corpoica, Colômbia.

⁶Engenheiro-agrônomo, Rio Largo, AL.

No estágio larval, o inseto tem seu crescimento dentro das galerias no interior do coqueiro, o que dificulta os métodos de controle biológico com bactérias e fungos, já que estes não têm estruturas que possibilitem a busca da presa. Por sua vez, o comportamento dos nematoides entomopatogênicos (NEP's) permite a busca e a localização desta praga. Esses atributos tornam estes inimigos naturais, uma promissora alternativa para ser usada no controle de *R. palmarum* (Gaugler; Campbell, 1991). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de sete espécies de nematoides entomopatogênicos em larvas de *R. palmarum*, testando a hipótese se esse método pode vir a se tornar uma medida de controle eficiente.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Entomologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros, UEP Rio Largo, AL. A obtenção dos adultos de *R. palmarum* foi realizada no coqueiral situado no Município de São Miguel dos Milagres, Alagoas. A coleta foi feita com o auxílio de armadilhas tipo balde com iscas à base de cana-de-açúcar e feromônio de agregação Rincoforol®.

Os nematoides que foram usados para o experimento foram multiplicados em larvas de *Galleria mellonella* através da criação já estabelecida no laboratório. Foram feitas avaliações da patogenicidade e virulência utilizando os nematoides *Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis amazonensis* JPM4, *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis* P5, *Heterorhabditis amazonensis* RSC 05, *Steinernema brasiliense* e *Heterorhabditis bacteriophora*, nas concentrações 100 juvenis infectantes por mililitro (JIs/ mL). Como controle, foi utilizado 1 mL de água destilada. Foram realizadas dez repetições, cada repetição constituída por uma larva de *R. palmarum*. Em um segundo momento, utilizando a mesma quantidade de repetições e com intervalo de tempo com uma dose maior houve a reinoculação, com uma concentração de 500 JIs/ mL. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Aplicaram-se as suspensões com o auxílio de uma pipeta. Os tratamentos foram mantidos em BOD com temperatura de 25±1 °C, foto fase de 12 horas e umidade relativa de 60±10%.

Nas avaliações de ambos os experimentos, a mortalidade das larvas de *R. palmarum* foi observada durante doze dias consecutivos. Após a morte das larvas, estas foram individualizadas em câmara seca (White, 1927), e posteriormente colocados 2 mL água destilada. No dia seguinte, os insetos foram observados em microscópio estereoscópio e assim dissecados com auxílio de pinças retirando-se a hemolinfa das larvas, deste modo verificando se haviam NEPs e/ou sintomas. Os dados de mortalidade dos insetos foram utilizados para determinar a patogenicidade de cada isolado, bem como a virulência, em diferentes isolados.

Foi avaliada a porcentagem de mortalidade (PM), a qual foi estimada como relação entre o número de larvas de *R. palmarum* mortas e o número de larvas total utilizadas (vivas e mortas).

$$PM = \left(\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de lagartas mortas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de lagartas vivas e mortas}} \right) \times 100$$

Após a obtenção das porcentagens de mortalidade para cada isolado de nematoide e para a testemunha foi estimada a porcentagem de mortalidade corrigida (PMC) para os tratamentos segundo Abbott (Alves, et. al., 1998).

$$PMC = \left(\frac{PM \text{ do tratamento} - PM \text{ da testemunha}}{100 - PM \text{ da testemunha}} \right) \times 100$$

A avaliação do índice de mortalidade foi efetuada considerando o percentual de mortalidade corrigida (PMC) das larvas: Alta de 80% a 100%, média de 50% a 80% e baixa de 50% a 10%.

Resultados e Discussão

A porcentagem de mortalidade (PM) de larvas de *R. palmarum* foi maior nos tratamentos com *S. brasiliense* e *S. feltiae* com 80% e 50% respectivamente, seguidas de *Heterorhabditis* P5 e *S. carpocapsae* com 40% e 30%. A partir das porcentagens de mortalidade (PM) de larvas de *R. palmarum* foram calculadas as porcentagens de mortalidade corrigida (PMC) sendo que a espécie *S. brasiliense* foi a que apresentou maior virulência com 71%, sendo seguida pelas espécies *S. feltiae* e *Heterorhabditis* P5 com 28,6% e 14,3%, respectivamente. Tais resultados indicam uma maior virulência destas espécies de nematoides entomopatogênicos (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade (PM) e porcentagem de mortalidade corrigida (PMC) de *R. palmarum* infectadas com diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos.

NEPs	PM (%)	PMC±EP (%)
<i>S. brasiliense</i>	80	71,4±9,31A
<i>S. feltiae</i>	50	28,6±6,84B
<i>Heterorhabditis</i> P5	40	14,3±4,63C
<i>S. carpocapsae</i>	30	0
<i>H. bacteriophora</i>	20	0
<i>H. amazonensis</i> RSC 05	10	0
<i>H. amazonensis</i> JPM4	10	0
Testemunha	30	-

Letras diferentes nas colunas representam diferenças significativas a 5% entre médias, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$)

No teste de patogenicidade, avaliado após seis dias de inoculação dos NEPs, verificou-se que a espécie *S. brasiliense* ocasionou sintomas de infecção por nematoides em 30% das larvas de *R. palmarum*. Além disso, 20% das larvas inoculadas com a espécie *S. feltiae* também apresentaram tais sintomas (Tabela 2).

Durante as avaliações foi observado que alguns insetos mortos com sintomatologia de infecção por NEPs, mas não foram encontrados nematoides. Isto sugere que o sistema imunológico das larvas de *R. palmarum* foram eficientes para contenção da infecção por nematoides, mas não impediu que estes liberassem suas bactérias.

Tabela 2. Sintomatologia, produção de juvenis infectantes (JI) e duração do ciclo dos nematoides entomopatogênicos.

NEPs	Sintomatologia por infecção	Produção de juvenis (JIs)**	Duração do ciclo*
<i>S. brasiliense</i>	30% das larvas com sintomas (6 dias)	Não houve	Longo
<i>S. feltiae</i>	20% das larvas com sintomas (6 dias)	10% das larvas JI (1dia)	Longo
<i>Heterorhabditis</i> P5	20% das larvas com sintomas (6 dias)	Não houve	Curto
<i>S. carpocapsae</i>	Não houve sintomas	Não houve	Longo
<i>H. bacteriophora</i>	Não houve sintomas	Não houve	Longo
<i>H. amazonensis</i> RSC 05	Não houve sintomas	Não houve	Longo
<i>H. amazonensis</i> JPM4	Não houve sintomas	Não houve	Longo

*Ciclo Curto (até 5 dias) Ciclo Longo (Mais de 5 dias). **JIs = juvenis infectantes.

As porcentagens de mortalidade (PM) de larvas de *R. palmarum* foram maiores com a inoculação das espécies *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* e *H. amazonensis* JPM4, com 100%, 90%, 90% e 80%, respectivamente, seguidas de *S. brasiliense* e *H. amazonensis* RSC 05 com 70% e 50%.

A partir dos dados de mortalidade (PM) de larvas de *R. palmarum* foram calculadas as porcentagens de mortalidade corrigida (PMC), onde as espécies *R. feltiae*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* e *H. amazonensis* JPM4 apresentaram valores de 100%, 80%, 80% e 60%, respectivamente, confirmando a maior virulência destes nematoides entomopatogênicos (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de mortalidade (PM) e porcentagem de mortalidade corrigida (PMC) de larvas de *R. palmarum* infectadas com diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos (Reinoculação com 500 JIs/ mL).

NEPs	PM (%)	PMC±EP (%)
<i>S. feltiae</i>	100	90±4,28A
<i>S. carpocapsae</i>	90	80±6,45B
<i>H. bacteriophora</i>	90	80±6,45B
<i>H. amazonensis</i> JPM4	80	60±7,11C
<i>S. brasiliense</i>	70	0
<i>H. amazonensis</i> RSC 05	50	40±5,35D
<i>Heterorhabditis</i> P5	30	0
Testemunha	50	-

Letras diferentes nas colunas representam diferenças significativas a 5% entre médias, pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

No teste de patogenicidade, efetuado 24 horas após a inoculação dos NEPs, verificou-se que os NEPs que mais desencadearam sintomas de infecção nas larvas de *R. palmarum* foram das espécies *S. carpocapsae*, *H. amazonensis* JPM4 e *S. feltiae*, em 70%, 60% e 50%, respectivamente. Além disso, as espécies *H. bacteriophora* e *S. brasiliense* também provocaram sintomas de infecção em 30% das larvas aos 3 e 8 dias após a inoculação, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Sintomatologia, produção de juvenis infectantes (JI) e duração do ciclo dos nematoides (Reinoculação com 500 JIs/ mL).

NEPs	Sintomatologia por infecção	Produção de juvenis (JIs)	Duração do ciclo
<i>S. carpocapsae</i>	60% das larvas com sintomas (1 dia)	Não houve	Curto
<i>H. amazonensis</i> JPM4	50% das larvas com sintomas (1 dia)	Não houve	Curto
<i>S. feltiae</i>	40% das larvas com sintomas (1 dia)	Não houve	Curto
<i>H. bacteriophora</i>	25% das larvas com sintomas (3 dias)	Não houve	Curto
<i>S. brasiliense</i>	25% das larvas com sintomas (8 dias)	Não houve	Longo
<i>H. amazonensis</i> RSC 05	Não houve sintomas	Não houve	Longo
<i>Heterorhabditis</i> P5	Não houve sintomas	Não houve	Longo

Conclusões

Com uma concentração de 100 JIs os resultados indicam uma maior virulência com *S. brasiliense* e *S. feltiae* com 80% e 50% respectivamente, seguidas de *Heterorhabditis* P5 e *S. carpocapsae* com 40% e 30%. Ao utilizar concentração de 500JIs a porcentagem de mortalidade de larvas de *R. palmarum* foram maiores com a inoculação das espécies *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* e *H. amazonensis* JPM4, com 100%, 90%, 90% e 80%, respectivamente, seguidas de *S. brasiliense* e *H. amazonensis* RSC 05 com 70% e 50%. Esses resultados demonstram que os nematoides entomopatogênicos possuem capacidade de matar as larvas de *R. palmarum*, bem como apresentam capacidade de busca por esta praga. Estudos posteriores serão realizados para avaliar o efeito dos NEPs em outros estágios deste inseto, como ovos, adultos e pupas.

Agradecimentos

Agradecemos primeiramente ao CNPq pela concessão da bolsa à primeira autora; à Embrapa por ceder sua estrutura para realização desta pesquisa; e ao Dr. Aldomário Santo Negrisoni Junior pela orientação.

Referências

GAUGLER, R.; CAMPBELL, J. Behaviour response to the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* to oxamyl. **Annals of Applied Biology**, v. 119, p. 131-138, 1991.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematoides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998. p. 541-569.

HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University, 2002. p. 115-143.

SÁNCHEZ, P. A.; CERDA, H. El complejo *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) – *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) (Tylenchida: Aphelenchoididae), en Palmeras. **Boletín de Entomología Venezolana**, v. 8, n. 1 p. 1 – 18, 1993.