

**PATOGENICIDADE DE *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* sp. (NEMATODA: RHABDITIDA) À NINFAS DA CIGARRINHA DA RAÍZ DA CANA-DE-AÇÚCAR, (*Mahanarva fimbriolata*)**

Luís G. Leite<sup>1</sup>  
Laerte A. Machado<sup>1</sup>  
Marineide M. Aguilera<sup>2</sup>  
Regina C. D. Rodrigues<sup>2</sup>  
Aldomário S. Negrisoni Jr.<sup>2</sup>

**RESUMO**

*Mahanarva fimbriolata* (Hemíptera: Cercopidae) tornou-se uma das principais pragas da cana-de-açúcar com a expansão do sistema de colheita mecanizada. As ninfas atacam as raízes e são de difícil controle por inseticidas. Nematóides entomopatogênicos apresentam-se como candidatos a serem avaliados no controle dessa praga por diversos motivos, dentre os quais o comportamento de busca do hospedeiro. Este estudo teve por objetivo avaliar a patogenicidade dos nematóides *Heterorhabditis* sp. (isolado CCA), *Steinernema glaseri*, *S. carpocapsae* e *S. anomali* contra ninfas da cigarrinha em condições de laboratório. Foram consideradas 5 repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por 5 ninfas em estágios de 3º a 5º instar, em placas de Petri com 10 cm de diâmetro. O inóculo constou de 2,0 mL de suspensão aquosa contendo 2.000 juvenis infectivos do nematóide por placa de Petri, aplicado sobre papel de filtro colocado no fundo da placa. Dentro de cada placa foi colocado um pedaço de colmo de cana-de-açúcar com aproximadamente 5 cm de comprimento. As ninfas foram então liberadas nas placas e estas foram seladas e acondicionadas a 24°C no escuro. *S. glaseri* e *Heterorhabditis* sp. foram os mais patogênicos, apresentando

<sup>1</sup> Laboratório de Controle Biológico, Centro Experimental do Instituto Biológico, C.P. 70, 13001-970, Campinas-SP, e-mail: lgleite@biologico.br

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Carlos/ CCA, C.P. 153, Araras, SP, CEP 13600-970, Brasil, e-mail: marineide@dbv.cca.ufscar.br

o mesmo nível de mortalidade (84,2%) no 5 dia da avaliação, seguidos de *S. carpocapsae* (52,6%). *S. glaseri*, causando 56% de mortalidade já no segundo dia, foi mais agressivo do que *Heterorhabditis* sp. com 24%. O número de juvenis infectivos que penetraram nos insetos não correspondeu à patogenicidade dos nematóides, pois para *S. glaseri* foi observada média de 4 nematóides por inseto enquanto que para *Heterorhabditis* sp., a média foi de 32. Os nematóides que apresentaram resultados promissores neste estudo são nativos do Estado de São Paulo e provavelmente estão adaptados à região.

**Palavras-chave:** *Steinernema* spp., *Heterorhabditis* sp., nematóides entomopatogênicos, controle biológico.

### ABSTRACT

#### **PATHOGENICITY OF *Steinernema* spp. AND *Heterorhabditis* sp. (NEMATODA: RHABDITIDA) AGAINST NYMPHS OF THE SUGARCANE ROOT SPITTLEBUG *Mahanarva fimbriolata* (HEMIPTERA: CERCOPIDAE)**

*Mahanarva fimbriolata* is one of the most important pests of sugar cane with the expansion of row-plant harvesting system. The nymphs attack the root and are difficult to control with chemical insecticides. Entomopathogenic nematodes are candidates to be evaluated for the control of this pest for several reason, among them, their behavior to search the host. This study aimed to evaluate the pathogenicity of *Heterorhabditis* sp. (CCA strain), *Steinernema glaseri*, *S. carpocapsae* and *S. anomaly* against nymphs of the froghopper in laboratory conditions. Five replications per treatment were used, with each replication represented by 5 nymphs of 3 and 5 instars inside a 10 cm diameter Petri dish. The inoculum was 2 mL of an aqueous suspension containing 2000 infective juvenile (IJ) nematodes, applied in each Petri dishes, over a double filter paper laid on the bottom of the dish. A piece of 5 cm sugarcane stem was also put inside each dish to feed the insects. The dishes containing the nymphs were sealed and incubated under 24° C and darkness. *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis* sp. were the

most pathogenic, killing 84,2% of the insects at the 5<sup>th</sup> day of evaluation, followed by *S. carpocapsae* (52,6%). *S. glaseri* was the most aggressive, causing 56% of mortality at the second day of evaluation, followed by *Heterorhabditis* sp. with 24%. The number of IJ which penetrated inside host did not correspond to the nematode pathogenicity, as four *S. glaseri* and 32 for *Heterorhabditis* sp. were found per insect. These two nematodes are native from São Paulo State and are probably adapted to the region.

**Keywords:** *Steinernema* spp., *Heterorhabditis* sp., entomopathogenic nematodes, biological control.

## INTRODUÇÃO

Cigarrinhas representam um dos grupos de insetos mais importantes para a cana-de-açúcar em vários países da América Latina, como Brasil, Argentina, Venezuela, México, América Central e Trinidad Tobago (Georgis & Hom, 1992). A cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854), tornou-se uma das principais pragas da cultura no Estado de São Paulo com a expansão do sistema de colheita mecanizada (cana-crua). Esse inseto vinha sendo observado apenas em pastagens, no Vale do Paraíba, especialmente a do napier (Batista *et al.*, 1997). As ninfas atacam a raiz e são de difícil controle por inseticidas.

O controle biológico tem sido um método bastante explorado no controle da cigarrinha da raiz, principalmente com o fungo *Metarhizium anisopliae*, patógeno de ocorrência natural (Alves, 1998). No entanto mais de uma aplicação parece ser necessária para obter resultados satisfatórios com esse fungo (Almeida *et al.*, 2001).

El-Kadi (1977) realizou o primeiro estudo referente ao uso de nematóides para o controle de *M. fimbriolata*, avaliando em condições de campo o rhabditídeo *Caenorhabditis elegans* para o controle de ninfas desse inseto na cultura da cana-de-açúcar. Foram obtidos até 81% de controle, no entanto o estudo não foi continuado.

Os nematóides mais frequentemente encontrados atacando cigarrinhas em geral pertencem à família Mermithidae, sendo exemplos os registros de ataque a *M. posticata* na cultura da cana-de-açúcar no Brasil (Magro, 1980), e a *Nilaparvata lugens* em cultura de arroz na

Coréia (Choo & Kaya, 1993). Esses nematóides não têm sido estudados para o controle da cigarrinha da raiz por serem considerados parasitos obrigatórios e por se desenvolverem individualmente no hospedeiro, o que dificulta a sua produção massal *in vivo* (Ferraz, 1998). Já os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* apresentam-se como fortes candidatos a serem avaliados no controle dessa praga por diversos motivos, dentre os quais destacam-se a possibilidade de produção *in vitro*, a exequível formulação e o comportamento de busca do hospedeiro. Um grande número de pragas de gramíneas constitui-se em mercado em potencial para esses nematóides (Berg *et al.*, 1988).

Segundo Allard & Chase (1987), citados por Georgis & Hom (1992), os nematóides steinernematídeos e heterorhabditídeos possuem potencial para serem usados como parte de uma estratégia de manejo de pragas para o controle da cigarrinha da cana-de-açúcar *Aeneolamia* sp. (Hemiptera: Cercopidae). Um isolado mexicano de *S. carpocapsae* apresentou-se altamente patogênico para ninfas e adultos desse inseto. O nematóide sobreviveu em areia por mais de 4 semanas e moveu-se a uma distância de 10 cm em solo argiloso compactado, para localizar o hospedeiro.

Este estudo teve por objetivo avaliar a patogenicidade dos nematóides *Heterorhabditis* sp. (isolado CCA), *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929), *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) e *S. anomali* (Kozodoi, 1984) contra ninfas da cigarrinha das raiz da cana-de-açúcar em condições de laboratório.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram considerados 5 tratamentos, representados pelos nematóides *Heterorhabditis* sp. (isolado CCA), *S. glaseri*, *S. carpocapsae* e *S. anomali*, e a testemunha. Cada tratamento teve 5 repetições, sendo cada repetição representada por 5 ninfas em estágios de 3º a 5º ínstar, agrupadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro.

Os nematóides foram multiplicados *in vivo*, em lagartas de último ínstar de *Galleria mellonella* (L.), sendo utilizados dentro de período de aproximadamente 30 dias após a produção. O inóculo constou de 2,0 mL de suspensão aquosa contendo 2.000 juvenis infectivos do nematóide

por placa de Petri, aplicado sobre papel de filtro colocado no fundo da placa. Em cada placa foi colocado um pedaço de colmo de cana-de-açúcar com aproximadamente 5 cm de comprimento. As ninfas foram então liberadas nas placas e estas seladas e acondicionadas a 24° C no escuro. As avaliações foram feitas diariamente a partir de 24 horas após a inoculação, em um período de 5 dias.

Foram feitas determinações de mortalidade e número de nematóides adultos presentes nos cadáveres, resultantes dos juvenis infectivos que penetraram no hospedeiro. Para isso, as ninfas mortas foram transferidas para câmara úmida e acondicionadas nas mesmas condições já referidas. As avaliações do número de adultos por inseto morto eram feitas no terceiro dia após a morte do hospedeiro. Os cadáveres eram transferidos para placas de Petri de 6 cm de diâmetro com solução de NaCl (1%) e, em seguida, dissecados tendo em vista permitir a liberação e a contagem dos nematóides adultos. Foram considerados insetos mortos por nematóides somente os que continham os agentes. Os experimentos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os nematóides *S. glaseri* e *Heterorhabditis* sp. foram os mais patogênicos às ninfas da cigarrinha, com 84,2% de mortalidade no 5° dia da avaliação (Figura 1 e Tabela 1), diferindo significativamente dos demais tratamentos ( $F = 14,8$ ;  $P < 0,01$ ), exceto de *S. carpocapsae*, o qual foi o terceiro mais patogênico (52,6%). *S. glaseri* foi o mais agressivo às ninfas da cigarrinha, com 56% de mortalidade no segundo dia da avaliação, diferindo-se significativamente dos demais nematóides, exceto de *Heterorhabditis* sp. ( $F = 10,2$ ;  $P < 0,01$ ), o qual proporcionou 24% de mortalidade no segundo dia de avaliação (Tabela 1). *Heterorhabditis* sp. e *S. carpocapsae* penetraram em maior número no hospedeiro, com 32 e 47 nematóides por ninfa, respectivamente, diferindo significativamente das demais espécies, com 4 nematóides por hospedeiro.

O ambiente do solo é o local ideal para se aproveitar a interação entre nematóides entomopatogênicos e alguns dos mais de 90% dos insetos que nele passam parte do seu ciclo em contato com o solo (Klein 1990).

**Tabela 1.** Porcentagem de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* infectadas por diferentes nematóides entomopatogênicos no segundo e quinto dia após a exposição aos agentes, e número de nematóides que penetraram no hospedeiro.

Nematóide	Infecção (%)*		Nº nematóides/ninfa*
	2º dia	5º dia **	
<i>Steinernema glaseri</i>	56 a	84,2 a	4 a
<i>Heterorhabditis</i> sp.	24 ab	84,2 a	32 b
<i>S. carpocapsae</i>	8 b	52,6 ab	47 b
<i>S. anomali</i>	0 b	31,6 b	4 a
Testemunha	0 b	0 b	0 a

\* Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

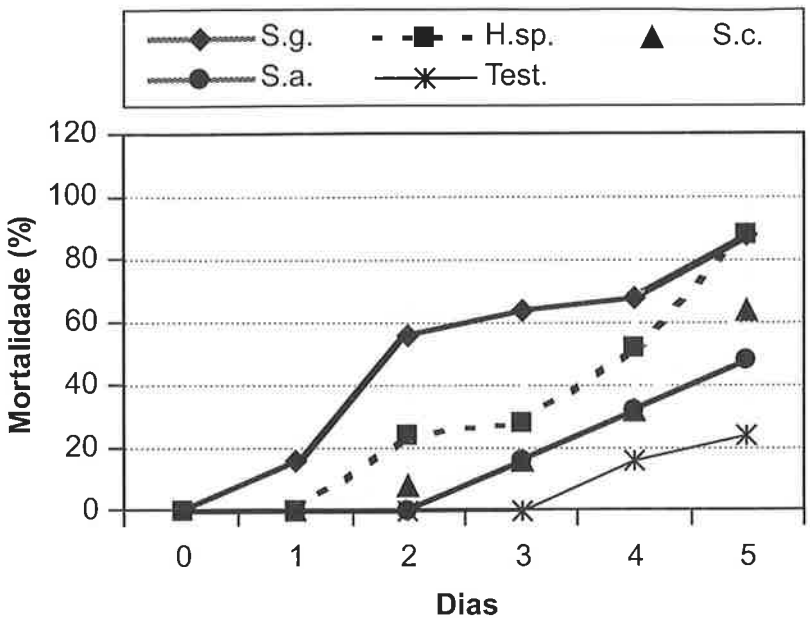
\*\* Dados corrigidos pela fórmula de Abbott (Alves *et al.*, 1998).

*S. glaseri* e *Heterorhabditis* spp. têm apresentado maior eficiência no controle de insetos, especialmente larvas de escarabeídeos, quando comparados com isolados de *S. carpocapsae* (Klein 1990). Isto também foi observado em nosso estudo, pois *S. glaseri* e *Heterorhabditis* sp. foram os mais patogênicos às ninfas da cigarrinha. O número de juvenis infectivos que penetraram nos insetos não correspondeu à patogenicidade e agressividade dos nematóides, pois para os dois mais patogênicos, *S. glaseri* e *Heterorhabditis* sp., foram observadas médias de 4 e 32 nematóides por inseto respectivamente, enquanto que para o terceiro mais patogênico, *S. carpocapsae*, a média foi de 47 nematóides. Estudos indicam que, após a infecção inicial pelos nematóides, ocorre a liberação de uma substância que reduz as invasões subseqüentes no hospedeiro. Isso beneficia os nematóides, já que evita o superpovoamento do hospedeiro e, conseqüentemente, a morte dos agentes por falta de alimento (Glaser, 1997). Assim, é possível que *S. glaseri*, por ser a maior espécie, seja a mais prejudicada em casos de superpovoamento do hospedeiro e, portanto, a mais sensível a essa substância.

Nossos dados mostram que ninfas da cigarrinha *M. fimbriolata* são suscetíveis a nematóides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*. Isso encoraja futuros estudos visando avaliar a eficiência de *S. glaseri* e *Heterorhabditis* sp. no controle da cigarrinha da raiz em condições de

campo. Esses agentes pertencem ao grupo dos nematóides cruzadores, caracterizados por irem atrás dos hospedeiros ao invés de esperá-los em emboscada (Georgis & Kaya, 1998). As ninfas localizam-se na superfície do solo, embaixo da palhada da cana com espessura em torno de 15 cm, portanto em um ambiente úmido, bastante favorável para a atuação dos nematóides. Deve-se considerar ainda que esses insetos geralmente localizam-se próximos um do outro, o que pode favorecer a ocorrência de uma epizootia.

O uso de nematóides para o controle da cigarrinha da raiz pode resultar no controle também de outras pragas da cana-de-açúcar, como os escarabeídeos, os quais são geralmente bastante suscetíveis a esses agentes. Akhurst *et al.* (1992) registraram uma epizootia de



**Figura 1.** Mortalidade de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* expostas a diferentes nematóides entomopatogênicos: *Steinernema glaseri* (S.g.), *S. carpocapsae* (S.c.), *S. anomali* (S.a.), *Heterorhabditis* sp. (H.sp.) e testemunha (Test.). Barras = desvio padrão.

*Heterorhabditis* sp. em população de larvas de escarabeídeos na cultura da cana-de-açúcar na Austrália. Os nematóides que apresentaram resultados promissores neste estudo são nativos do Estado de São Paulo e provavelmente estão adaptados à região.

Com base nesses resultados, sugere-se a realização de novos experimentos visando verificar a eficiência destas duas espécies de nematóides entomopatogênicos no controle da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar em condições de campo.

## CONCLUSÕES

*Steinernema glaseri* e *Heterorhabditis* sp. são os mais patogênicos, apresentando o mesmo nível de mortalidade (84,2%) no 5º dia da avaliação. *S. glaseri* é mais agressivo do que *Heterorhabditis* sp., causando 56% de mortalidade já no segundo dia comparado com 24% proporcionado pelo segundo nematóide. O número de juvenis infectivos que penetraram nos insetos não correspondeu à patogenicidade dos nematóides.

## AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi financiado, em parte, pela FAPESP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILLERA, M.M. 2001. Nematóides do bem. **Cultivar**, **25**: 52-54.
- AKHURST, R.J.; BEDDING, R.A.; BULL, R.M.; SMITH, D.R.J. 1992. An epizootic of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda) in sugar cane scarabaeids (Coleoptera). **Fundamental and Applied Nematology**, **15**: 71-73.
- ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A.S.; ANDRADE, O. 2001. Controle de Cigarrinha da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom.:Cercopidae) com *Metarhizium anizopliae* em sistemas de cultivo orgânico. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 7., 2001, Poços de Caldas. **Resumos**. Poços de Caldas: EMBRAPA/CNPMA, p. 141.



- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO JR., A.; ALVES, L.F.A. 1998. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 637-711.
- ALVES, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 289-370.
- BATISTA FILHO, A.; LEITE, L.G.; TAKADA, H.M.; LAMAS, C.; RAMIRO, Z.A. 1997. Incidência do fungo entomopatogênico *Batkoa apiculata* (Entomophthorales) sobre cigarrinhas das pastagens em Pindamonhangaba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, **64**: 82.
- BERG, G.N.; WILLIAMS, P.; BEDDING, R.A.; AKHURST, R.J. 1987. A commercial method of application of entomopathogenic nematodes to pasture for controlling subterranean insect pests. **Plant Protection Quarterly**, **2**: 174-177.
- CHOO, H.Y.; KAYA, H.K. 1990. Parasitism of brown planthopper and whitebacked planthopper by *Agamermis unka* in Korea. **Journal of Nematology**, **22**: 513-517.
- EL-KADI, M.K. 1977. Produção comercial de nematóides parasitos de cigarrinhas. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, **2**: 71-74.
- FERRAZ, L.C.C.B. 1998. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 541-570.
- GEORGIS, R.; HOM, A. 1992. Introduction of entomopathogenic nematode products into Latin America and the Caribbean. **Nematropica**, **22**: 81-98.
- GEORGIS, R.; KAYA, H.K. 1998. Formulation of entomopathogenic nematodes. In: BURGESS, H.D. (Ed.), **Formulation of Microbial Biopesticides**. London: Kluwer Academic Publishers, p. 289-308.
- GLASER, I. 1997. Effects of infected insects on secondary invasion of Steinernematid entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, **114**: 597-604.
- KLEIN, M.G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boston: CRC Press, p. 195-214.

- MAGRO, J.A.E.B.V.; MACEDO, N.; LORDELLO, L.G.E. 1980. Primeiras informações sobre nematóide parasito da broca da cana-de-açúcar. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, **4**: 203-204. **Nematropica**, **22**: 81-98.
- GEORGIS, R.; KAYA, H.K. 1998. Formulation of entomopathogenic nematodes. In: BURGESS, H.D. (Ed.), **Formulation of Microbial Biopesticides**. London: Kluwer Academic Publishers, p. 289-308.
- GLASER, I. 1997. Effects of infected insects on secondary invasion of Steinernematid entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, **114**: 597-604.
- KLEIN, M.G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boston: CRC Press, p. 195-214.
- MAGRO, J.A.E.B.V.; MACEDO, N.; LORDELLO, L.G.E. 1980. Primeiras informações sobre nematóide parasito da broca da cana-de-açúcar. **Soc. Bras. de Nematol.**, **4**: 203-204.