

## COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS NO ESTADO DE SANTA CATARINA

VITÓRIA BARBOSA DE SOUZA<sup>1,2\*</sup>, CLAUDIA KULBA SETTE<sup>3</sup>, ANA JULIA  
WALTER AGATTI<sup>2,3</sup>, MARCO AURÉLIO TRAMONTIN<sup>2,4</sup>

### 1 Introdução

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) têm a sua virulência detectada devido à simbiose com bactérias existentes em seu corpo, as quais penetram nos insetos por vias abertas, como boca, ânus e espiráculos. Após sua entrada, a bactéria se encarrega da mortalidade do inseto alvo (TRAMONTIN, 2022), em um período de aproximadamente 72h.

O uso de produtos químicos para o controle de pragas criou muitos efeitos indesejados sendo que um dos maiores problemas é devido aos resíduos de inseticidas químicos e ao desenvolvimento de resistência a estes pelas pragas. Assim, o manejo integrado de pragas (MIP) com NEPs surge como uma alternativa para substituir o uso desses agrotóxicos químicos (REDDY & CHOWDARY, 2021 ; TRAMONTIN, 2022).

Os NEPs são afetados pelas propriedades do solo, como textura, umidade, temperatura e matéria orgânica. Essas propriedades podem ser drasticamente alteradas pela agricultura e suas práticas de manejo (JAFFUEL et al., 2016). Dessa forma, é necessário que ocorra estudos para detectar a ocorrência de NEPs em localidades ainda não exploradas.

### 2 Objetivos

Coletar amostras de solo e, se positivas, isolar nematoides e testar a infectividade e virulência e posteriormente identificar os isolados por meio de análise molecular.

### 3 Metodologia

Para o isolamento dos NEPs foram realizadas coletas de solos nos municípios de Coronel Freitas, Lajeado Grande e Xaxim. Ao todo foram avaliadas seis áreas diferentes e

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó, contato: vitoria.barbosa@estudante.uffs.edu.br

<sup>2</sup> Grupo de Pesquisa: Núcleo de Estudo em Fitossanidade (NEFIT)

<sup>3</sup>Acadêmica do curso de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó

<sup>4</sup>Dr. em Entomologia, Universidade Federal da Fronteira Sul, **Orientador**.

coletadas 10 amostras em cada uma, o que totalizou 60 amostras.

As amostras foram coletadas de 0 a 5 cm de profundidade do solo. Em cada ponto da amostragem foram coletados cerca de 500 g de solo e acondicionados em sacos plásticos, e posteriormente encaminhados ao Laboratório de Botânica, Ecologia e Entomologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó.

No laboratório, cada uma das amostras foi subdividida em subamostras de 100 g. A pesagem do solo úmido e solo seco foi realizada para verificar a porcentagem de umidade presente no solo e para isso foi utilizado aproximadamente de 5 g das amostras. Para o restante do solo foi adotada como referência a metodologia citada por Kaya & Stock (1997). Dessa forma, foi feito subamostras com 100 g de solo e colocadas em copos plásticos de 300 mL. Em seguida foram adicionadas quatro larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) em último ínstar para cada recipiente com o solo umedecido com água destilada e posteriormente vedados com tecido “voile” e atilho de borracha para evitar possível fuga e possibilitar trocas gasosas.

As amostras foram dispostas sobre bancada e mantidas em temperatura ambiente. Após sete dias foi realizada a retirada das mesmas e verificada a sintomatologia dos cadáveres encontrados. Larvas vivas foram descartadas e as larvas mortas passaram por um processo de desinfecção, os cadáveres passaram pela etapa de desinfecção, inicialmente foram lavados em água destilada para que o excesso de solo fosse retirado e em seguida eram esterilizados (cerca de um segundo em contato com álcool 96%), depois com hipoclorito de sódio a 10 % e finalizando novamente com água destilada, de modo com que possíveis nematoides de vida livre ou contaminações foram retiradas das larvas, em seguida as larvas foram transferidas para uma placa de Petri contendo papel filtro ficando em câmara seca (CS), em um período de cinco dias em uma incubadora B.O.D. com ambiente controlado para que o ciclo do nematoide seja finalizado (MOLINA & LÓPEZ, 2001).

Após passados os cinco dias dentro da CS, as larvas foram colocadas na armadilha de White (AW) para que os NEPs pudessem emergir com o estímulo da umidade e dessa forma, os juvenis infectantes (JIs) pudessem ser coletados. Em seguida, foi realizada a coleta dos NEPs e para a comprovação de que os isolados são de fato NEPs, os mesmos foram multiplicados em larvas de *T. molitor* até atingir a quinta geração (WHITE, 1927).

Para a identificação molecular dos isolados, esses foram enviados para a UENP

*Campus* Cornélio Procópio - PR, e o DNA genômico foi extraído de juvenis infecciosos (JIs), e utilizado o kit comercial Pure Link® Genomic DNA (Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A metodologia utilizada para a análise molecular foi descrita por Tamura (TAMURA et al., 2021).

#### 4 Resultados e Discussão

Nas seis áreas coletadas houve mortalidade de larvas em cinco delas, entretanto nem todas as larvas mortas no restante das amostras foram decorrentes do efeito dos NEPs (Tabela 1).

**Tabela 01:** Larvas Mortas e Positivas para Nematoides Entomopatogênicos

Município	Área Coletada	Larvas Mortas	Positivas para Nematoides	Amostras positivas
Lajeado Grande	Área de pastagem 1 – gramado	9	1	1; 2
	Área de pastagem 2 – tifton 85	6	1	3
	Lavoura 2 - milho/milho/cobertura	6	1	5
Xaxim	Área de Preservação Permanente	14	1	6
	Área de pastagem Tifton-85/Azevém	8	1	7
Coronel Freitas	Lavoura - milho/feijão/aveia	0	0	-

Fonte: Elaboração do Autor

Em alguns estudos foi observado a presença de NEPs em amostras positivas de áreas de florestas, pastagens nativas, árvores frutíferas e milho, além de soja e tabaco (BARBOSA-NEGRISOLI, 2010). E em áreas de cerrado e mata e que são caracterizadas pela presença de cobertura vegetal de alta densidade (ANDALÓ, 2018). E também em áreas agrícolas do oeste catarinense (MORAIS, TRAMONTIN & ANDALÓ, 2020).

**Tabela 2:** Identificação dos nematoides e percentual de similaridade

Amostras	Identificação	% de similaridade
1	<i>Oscheius tipulae</i>	100
2	<i>Oscheius tipulae</i>	100
3	<i>Oscheius tipulae</i>	100
4	<i>Oscheius tipulae</i>	99,75
5	<i>Oscheius tipulae</i>	99,27
6	<i>Oscheius tipulae</i>	100
7	-	-

Fonte: Elaboração do Autor

Os NEPs identificados a partir da análise molecular foram predominantemente da espécie *Oscheius tipulae* (Rhabditidae) (Tabela 2). É uma das espécies de nematoides mais comuns no solo de diferentes partes (não desérticas) do mundo. É amplamente distribuído e abundante em amostras de solo. É encontrado principalmente (ou exclusivamente) no estágio Dauer (estágio de resistência) e foi originalmente isolado de larvas de *Tipula paludosa* (Diptera: Tipulidae) (FÉLIX, 2006).

## 5 Conclusão

Dessa forma, conclui-se que ocorreu a confirmação da presença de NEPs, das subamostras feitas, seis foram positivas e continham nematoides entomopatogênicos confirmados após realização da multiplicação e sequenciamento de DNA, na áreas amostradas foi possível detectar a presença da espécie *Oscheius tipulae*.

## Referências Bibliográficas

ANDALÓ, Vanessa et al. Entomopathogenic nematode distribution and edaphoclimatic conditions in the Cerrado of Minas Gerais, Brazil. **Applied Entomology and Zoology**, v.53, n.1, p.129- 136, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13355-017-0538-4>

BARBOSA-NEGRISOLI, Carla R.B. et al. Survey of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Nematologia Brasileira**, v.34, n.4, p.189-197, 2010.



FÉLIX, Marie Anne. 2006. **The Online Review of *C. elegans* Biology**. Pasadena (CA): WormBook; 2005-2018.

JAFFUEL, Geoffrey et al. Prevalence and activity of entomopathogenic nematodes and their antagonists in soils that are subject to different agricultural practices. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.230, p.329-340, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.009>.

KAYA, Harry .K.; S. Patrícia. STOCK. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L. (ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. Academic press, p.281-324.

MOLINA, Juan Pablo Acevedo; LÓPEZ, Juan Carlos Núñez. 2001. Producción in vivo de tres entomonemátodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, 27(1/2):73-78.

MORAIS, Danyelle Cristine Orsolin et al. Isolation of Entomopathogenic nematodes in the West Region of Santa Catarina, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico** (impresso), v. 87, p. 1-6, 2020.

TAMURA, Koichiro; STECHER, Glen; KUMAR, Sudhir. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology And Evolution**, [S.L.], v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 23 abr. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TRAMONTIN, Marco Aurélio. Nematoides entomopatogênicos como agentes de controle biológico. In: Robson Marcelo Di Piero; Ricardo Barbosa Felipini. (Org.). **SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO NA AGRICULTURA (COBIAGRI)**. 1ed. Florianópolis: COBIAGRI, 2022, v. 1, p. 15-18.

REDDY, D. Srinivas; CHOWDARY, N. Mounica. 2021. Botanical biopesticide combination concept—a viable option for pest management in organic farming. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 31 , 23 (2021). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00366-w>

WHITE, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v. 66, n. 1709, p.302-303.

**Palavras-chave:** *Oscheius tipulae*, Rhabditidae, Controle microbiano.

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES 2023-0489.

**Financiamento:** CNPq.