



**PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE *Heterorhabditis amazonensis* A *Armadillidium vulgare* (ISOPODA: ARMADILLIDIIDAE)**

**PATHOGENICITY AND VIRULENCE OF *Heterorhabditis amazonensis* OF *Armadillidium vulgare* (ISOPODA: ARMADILLIDIIDAE)**

ANDRESSA LIMA DE BRIDA<sup>1\*</sup>, JULIESER BOTELHO MACHADO<sup>1</sup>, SANDRA MARA CHANEIKO<sup>1</sup>, LUIS GARRIGÓS LEITE<sup>2</sup>, FLÁVIO ROBERTO MELLO GARCIA

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Laboratório Ecologia de Insetos. Campus Universitário s/n. Capão do Leão. CEP: 96010-900, Pelotas, RS. Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Controle Biológico (CEIB), Instituto Biológico, Alameda dos Videiros, 1097, CEP:13101-680, Campinas, São Paulo, Brasil.

\*Autor para correspondência: andressa\_brida23@hotmail.com

**RESUMO**

*Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) isopoda, conhecido popularmente como tatuzinho-de-jardim encontra-se distribuído em diversos habitats. Devido aos seus hábitos alimentares pode ocasionar danos a diferentes culturas, se alimentando principalmente de plantas novas, onde gera prejuízos de até 80%. Por habitarem no solo, o uso de nematoides entomopatogênicos encontra-se como um método de controle altamente promissor. Diante a pouca informação sobre o uso de NEPs no controle deste crustáceo o objetivo do presente trabalho foi avaliar a patogenicidade e a virulência de *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 em adultos de *A. vulgare* em três concentrações. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições. Cada parcela foi constituída por uma placa de Petri (9 cm) revestida com duas folhas de papel filtro. Os juvenis infectantes (JIs) do isolado *H. amazonensis* IBCBn 24, foram inoculados no volume de 2 mL nas concentrações de 300, 500 e 1000 JIs/crustáceo e a testemunha foi composta por 2 mL de água destilada (sem nematoide). Após a inoculação foram liberados cinco adultos de *A. vulgare* em cada placa de Petri,



que foram vedadas e armazenadas em câmara climatizada BOD a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $70\pm 10\%$  UR. As avaliações foram realizadas cinco dias após a mortalidade dos crustáceos com a dissecação dos cadáveres para a observação da causa morte e posterior quantificação de JIs. *H. amazonensis* IBCBn 24, casou 100% de mortalidade de adultos de *A. vulgare*. A mortalidade de *A. vulgare* variou de 44,00 a 60,00% nas três concentrações avaliadas. A concentração de 1000 JIs/mL proporcionou a maior taxa de infecção dos JIs (11,80 JIs/crustáceo).

**Palavras-chave:** Nematoides entomopatogênicos; Controle biológico; crustáceo

### ABSTRACT

*Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) Isopoda, popularly known as garden turtle is distributed in several habitats. Due to their eating habits can cause damage to different crops, feeding mainly on new plants, where it generates losses of up to 80%. Because they inhabit the soil, the use of entomopathogenic nematodes is a highly promising method of control. Due to the lack of information on the use of EPNs in the control of this crustacean the objective of this work was to evaluate the pathogenicity and virulence of *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 in adults of *A. vulgare* at three concentrations. The experiment was conducted in a completely randomized design with four treatments and five replicates. Each plot consisted of a Petri dish (9 cm) coated with two sheets of filter paper. The infective juveniles (JIs) of the *H. amazonensis* isolate IBCBn 24 were inoculated in the volume of 2 mL at the concentrations of 300, 500 and 1000 IJs / crustacean and the control was composed of 2 mL of distilled water (without nematode). After inoculation five adults of *A. vulgare* were released into each Petri dish, which were sealed and stored in a BOD heated chamber at  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $70 \pm 10\%$  RH. The evaluations were performed five days after crustacean mortality with cadaver dissection for observation of the cause of death and subsequent quantification of IJs. *H. amazonensis* IBCBn 24, married 100% of adult mortality of *A. vulgare*. Mortality of *A. vulgare* varied from 44.00 to 60.00% in the three concentrations evaluated. The concentration of 1000 IJs/ mL provided the highest infection rate of IJs(11.80 IJs/crustacean).

**Keywords:** Entomopathogenic nematode; biological control; crustacean

## INTRODUÇÃO

*Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) (Isopoda: Armadillidae) é originário da região mediterrânea e popularmente conhecido como tatuzinho-de-jardim, apresenta uma ampla distribuição mundial, ocupando uma grande variedade de habitats, sendo mais frequente em ambientes antropizados (SCHUMALFUSS, 2003). A espécie *A. vulgare* é de fácil reconhecimento, devido a capacidade de enrolar o corpo em forma de bola, quando acuada. O corpo é convexo cinza escuro (CAMARGO, 1955). O macho mede 13,6 mm de comprimento por 6,4 mm de largura e a fêmea 15,1 mm de comprimento por 7,3 mm de largura (ARAÚJO et al., 1999).

Este crustáceo ataca principalmente no período noturno, é detritívoro e pode alterar seu hábito alimentar de acordo com as condições do meio, passando a realizar a fitofagia se alimentando principalmente de sementes, plantas recém-emergidas, cotilédones, raízes e brotos de diferentes plantas (CORSEUIL et al., 1986; SALUSO, 2004; MASTRONARDI, 2006).

Entre as culturas que *A. vulgare* pode acometer, as mais atacadas pelo Isopoda está a soja (*Glycine max* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), milho (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) colza (*Brassica napus* L.), orquídeas (*Orchis* sp. L. 1753), pimentão, (*Capsicum annum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e ervilha (*Pisum sativum* L.) (CAMARGO, 1955; SALUSO, 2004; MANETTI et al., 2009; SAGPYA, 2009; VILLARINO et al., 2011). Segundo Camargo (1955) em pimentões recém transplantados as perdas podem atingir 40%, sendo que as plantas são cortadas na base. Em tomate as perdas podem chegar a 70% e em feijoeiro a 80%.

A alteração de comportamento associada a grande disponibilidade de alimento resultam em um aumento acelerado de sua população, atingindo o status de praga e gerando grandes prejuízos (FABERI, 2010). Atualmente o principal método de controle do mesmo consiste no uso de inseticidas químicos (BENETTI et al., 2002; VILLARINO et al., 2011), no entanto estes apresentam alta toxicidade, elevado período de carência e reduzida seletividade aos inimigos naturais (BAKER et al., 2002, HARTER et al., 2015). Nesse sentido o

uso do controle biológico se mostra muito promissor, pois além de grande eficiência, é inócuo ao homem e ao ambiente (DRIESCHÉ et al., 2010).

Entre os métodos de controle biológico, os nematoides entomopatogênicos (NEPs), são considerados eficazes no controle de certos tipos de praga, pois são organismos exclusivos do solo e podem ser encontrados em todo o globo terrestre, em áreas agrícolas, florestas, gramados, desertos e praias (GREWAL, 2001).

As espécies que compreendem as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são as mais utilizadas, são efetivos nas estratégias de controle biológico de inseto, devido à associação mutualista com bactérias do gênero *Xenorhabdus* (Thomas e Poinar) e *Photorhabdus* (Boemare, Louis e Kuhl), respectivamente (Poinar e Grewal 2012). Os juvenis infectantes (JIs) penetram no hospedeiro através de aberturas naturais ou através da cutícula e liberam a bactéria na hemocele, onde se reproduzem e matam o hospedeiro por septicemia em 24 a 48 horas, tornando o ambiente favorável para o desenvolvimento e reprodução dos nematoides (Dowds e Peters 2002, Poinar 1990). Estudos demonstram que isópodos dos gêneros *Armadillidium* pode ser infectado por algumas espécies de NEPs (JAWORSKA, 1994; POINAR, 1989; POINAR; PAFF, 1985), a exemplo as espécies *Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis bacteriophora* que permitiu redução da sobrevivência de *A. vulgare*. (SICARD et al., 2008).

Diante a pouca informação sobre o uso de NEPs no controle deste crustáceo o objetivo do presente trabalho foi avaliar a patogenicidade e a virulência de *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 em adultos de *A. vulgare* em três concentrações.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ecologia de Insetos, do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. O isolado *Heterorhabditis amazonensis* (Andaló, Nguyen e Moino) IBCBn 24, foi obtido da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos "Oldemar Cardim Abreu" do Instituto Biológico de São



Paulo, São Paulo, Brasil.

Os adultos de *A. vulgare* foram coletados em uma área de vegetação nativa pertencente a Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, e mantidos em um terrário, armazenados em câmara climatizada (BOD) a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , e  $70 \pm 10\%$  UR e alimentados com folhas de alface, *Lactuca sativa*, até o início dos experimentos. O isolado *H. amazonensis* IBCBn 24 foi multiplicado em larvas de quinto instar de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae). Para a multiplicação cinco larvas de *G. mellonella* foram colocadas em placa de Petri (9 cm) com duas folhas de papel filtro, sobre as quais foram inoculados 1,5 ml de solução de nematoides na concentração com 500 JIs/cm<sup>2</sup>, (disponibilizando 100 JIs/larva). As placas de Petri foram vedadas com filme de PVC e armazenadas em câmara climatizada BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $80 \pm 10\%$  UR. Após três dias da mortalidade, as larvas foram transferidas para armadilha de White (WHITE, 1927) para a emergência dos JIs. Os JIs que deixaram os cadáveres da larva de *G. mellonella*, foram coletados em água destilada (1 cm de profundidade) em Erlemeyers mantidos em câmara climatizada BOD a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  UR e utilizados dois dias após a coleta.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições. Cada parcela foi constituída por uma placa de Petri (9 cm) revestida com duas folhas de papel filtro. Os JIs do isolado *H. amazonensis* IBCBn 24, foram inoculados no volume de 2 mL na concentração de 300, 500 e 1000 JIs/crustáceo. O tratamento com testemunha foi constituído de 2 mL de água destilada (sem nematoide). Após a inoculação foram colocados cinco adultos de *A. vulgare*/placa em cada tratamento. As placas de Petri foram vedadas e armazenadas em câmara climatizada BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$   $70 \pm 10\%$ UR, sem luminosidade.

As avaliações foram realizadas diariamente durante cinco dias. Após a mortalidade os crustáceos foram dissecados para a observação da causa morte e quantificação de JIs no interior do hospedeiro.

As médias de mortalidade e virulência foram calculadas utilizando a análise Anova e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade,

através do programa estatístico Sisvar 5.6 (2010) (Universidade Federal de Lavras-Minas Gerais, Brazil).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*A. vulgare* foi suscetível ao nematoide *H. amazonensis* IBCBn 24 em todas as concentrações avaliadas, apresentando taxas de mortalidades que variaram de 44,00% a 60,00% (Tabela 1).

A concentração de 1000 JIs/mL permitiu a maior taxa de virulência 11,80 JIs/crustáceo, e as menores taxas de virulência 6,80 e 9,80 JIs/crustáceo nas concentrações de 300 e 500 JIs/mL respectivamente.

**Tabela 1.** Mortalidade (%) de adultos de *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Armadillidiidae) por *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 em concentrações de 300, 500 e 1000 juvenis infectantes (JIs/mL) e N°. JIs número de juvenis infectantes dentro do hospedeiro

Concentração (JIs/mL)	(%) Mortalidade (Med.±DP)	N°. JIs (Med±SE)
300	44,00±16,73a	6,80±3,42a
500	60,00±20,00a	9,80±4,02a
1000	60,00±24,49a	11,80±9,88b
Testemunha	0,00±0,00	0,00±0,00
CV = (%)	37,79	68,35
F (df)	1,00 (2)	0,756 (2)
P	0,396	0,490

Média seguida pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para que ocorra o sucesso no controle biológico de pragas, são necessários estudos sobre o comportamento do inseto perante a baixa ou a alta concentração de JIs (GAUGLER, 1988). No presente estudo pode-se observar que *A. vulgare* foi suscetível a *H. amazonensis* IBCBn 24, independentemente da concentração, entretanto, os dados expressados

biologicamente, a concentração de 500 e 1000 JIs/ml permitiu as maiores taxas de mortalidade, entretanto a maior virulência foi conferida na maior concentração 91000 JIs/mL). Segundo Poinar e Paff (1985), os isópodes terrestres embora possam ser mortos pela ação do nematoide, não são hospedeiros adequados como a maioria dos insetos, porque as membranas intersegmentares quebram logo após a morte e a cavidade do corpo é rapidamente invadida por outros organismos restringindo o desenvolvimento dos nematoides. R

Ressalta-se que há poucas pesquisas sendo desenvolvidas utilizando nematoides entomopatogênicos no controle de *A. vulgare*, e das poucas verificadas, os autores relatam, baixa efetividade de controle, porém com moderada taxa de sobrevivência de adultos, quando aplicado o nematoide. Diante disto a presente pesquisa colabora com informações importantes sobre a eficiência de *H. amazonensis* IBCBn 24 na mortalidade de *A. vulgare* além da capacidade dos JIs utilizarem o crustáceo para a multiplicação, dados expressados na taxa de virulência de JIs, permitindo buscar estratégias do emprego deste agente a campo no controle de *A. vulgare*.

## CONCLUSÃO

*H. amazonensis* IBCBn 24, causou 100% de mortalidade de adultos de *A. vulgare*. A mortalidade de *A. vulgare* variou de 44,00 a 60,00% nas três concentrações avaliadas. A concentração de 1000/JIs/mL proporcionou a maior taxa de infecção dos JIs (11,80 Jis/crustáceo).

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, P. B. Subordem Oniscidea (isópodes terrestres, “tatuzinhos”). In: BUCKUP, L; BOND-BUCKUP, G. (Eds.): **Os Crustáceos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Ed. Universidade/UFRGS, p.237-256, 1999.



BAKER, B. P.; BENBROOK, C. M.; GROTH, E.; BENBROOK, K. L. Pesticide residues in conventional, integrated pest management (IPM)-grown and organic foods: insights from three US data sets. **Food Additives Contaminants**, v.19, p.427-446, 2002.

BENETTI, A. S.; CAMPOS, J. V.; GARCIA, F. R. M. Efficiency of toxic baits in the control of *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) (Crustacea, Isopoda) in the laboratory. **PUC-Campinas**, v.16, n.1/2, p. 41-44, 2002.

CAMARGO, O. R. **Tatuzinhos (Crustacea, Isopoda) do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, p1-9, 1955.

CORSEUIL, E.; CRUZ, F. Z. DA; SILVA, R. F. P. DA. Ensaios laboratoriais visando o controle de *Armadillidium vulgare* (Latr.,1804) (Crustacea, Isopoda). **Publicações Avulsas Museu Nacional**, v.66, p.7-12, 1986.

DRIESCHE, R.G. V.; CARRUTHERS, R.I.; CENTER, T.; HODDLE, M.S.; HOUGH-GOLDSTEIN, J.; MORIN, L.; SMITH, L.; WAGNER, D. L.; BLOSSEY, B.; BRANCATINI, V.; CASAGRANDE, R.; CAUSTON, C. E.; COETZEE, J. A.; CUDA, J.; DING, J.; FOWLER, S. V.; FRANK, J. H.; FUESTER, R.; GOOLSBY, J.; GRODOWITZ, M.; HEARD, T. A.; HILL, M.P.; HOFFMANN, J. H.; HUBER, J.; JULIEN, M.; KAIRO, M. T. K.; KENIS, M.; MASON, P.; MEDAL, J.; MESSING, R.; MILLER, R.; MOORE, A.; NEUENSCHWANDER, P.; NEWMAN, R.; NORAMBUENA, H.; PALMER, W. A.; PEMBERTON, R.; PEREZ-PANDURO, A.; PRATT, P. D.; RAYAMAJHI, M.; SALOM, S.; SANDS, D.; SCHOOLER, S.; SCHWARZLÄNDER, M.; SHEPPARD, A.; SHAW, R.; TIPPING, P. W.; VAN KLINKEN, R. D. Classical biological control for the protection of natural ecosystems. **Biological Control**, v. 54, p. 2-33, 2010.

FABERI, A. J. **Importancia de la relación C:N de los residuos vegetales en la biología y la dinámica poblacional de *Armadillidium vulgare* (Latreille) (Crustacea: Isopoda) bajo condiciones de siembra directa**. (Tese), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, 87p., 2010.





GAUGLER, R. Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v 24, n. 1, p. 351-360, 1988.

GREWAL, P.S.; NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, M. M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, v.30, p.191-205, 2001.

HARTER, W. R.; BOTTON, M.; NAVA, D. E.; GRUTZMACHER, A. D.; GONÇALVES, R. S.; JUNIOR, R. M.; BERNARDI, D.; ZANARDI, O. Z. Toxicities and residual effects of toxic Baits containing spinosad or malathion to control the adult *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist.**, v.98, n.1, p.202-208, 2015.

JAWORSKA, M. Entomopathogenic nematodes for the biological control of crustaceans (*Porcellio scaber* Latr.) and millipedes (*Blaniulus guttulatus* Bosc.) in greenhouse. *Journal of Pest Science*, v.67, n. 5, p.107–109, 1994.

MANETTI, P.L.; FABERI, A. J.; ANDRADE, J.; BIOCCHA, M.; CA-MEZZANA, J.; DE MARCO, G.; VIANI, G.; VOULLIOZ, J.P. **Control de *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda) con cebos tóxicos en el cultivo de girasol.** XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Santiago del Estero, p.3, 2009.

MASTRONARDI, F. **Control químico de isópodos y babosas en un cultivo de girasol bajo siembra directa** (Tese). Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata, 65p., 2006.

POINAR, G. O. J.; PAFF, M. Laboratory infection of Terrestrial Isopods (Crustacea: Isopoda) with Neoaplectanid and Heterorhabditid Nematodes (Rhabditida: Nematoda). **Journal of invertebrate pathology**, v.45, n.1, p.24-27, 1985.

POINAR JR., G. O. Non-insect hosts for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). **Revue Nématol**, v.12, n.4, p.423–428, 1989.



POINAR G. O.; GREWAL P. S. History of entomopathogenic nematology. **Journal of Nematology**, v.44, n.1, p.153-161, 2012.

SAGYA. 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. **Trigo Siembra Directa**. Disponível em: [www.sagpya.mecon.gov.ar](http://www.sagpya.mecon.gov.ar). Acesso em 08 set. 2017.

SALUSO, A. **Determinación del Nivel de Daño Económico y plan de decisión secuencial para el manejo de Armadillidium vulgare (Crustacea: Isopoda) en soja**. (Tese). Universidad Nacional de La Rioja. Argentina, 75p., 2004.

SCHUMALFUSS, H. World catalogo of terrestrial isopods (Isopoda, Oniscidea). **Stuttgarter Beitrage zur Naturkunde**, v.654, 341p., 2003.

SICARD, M.; RAIMOND, M.; PRATS, O.; LAFITTE, A.; BRAQUART-VARNIER, C. Pathogenic effect of entomopathogenic nematode–bacterium complexes on terrestrial isopods. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.99,n.1, p.20-27, 2008.

SISVAR. **Programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos**. Versão 5.3 (Biud 75). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2010.

VILLARINO, S. V.; MANETTI, P. L.; LÓPEZ, A. N.; CLEMENTE, N. L.; FABERI, A. J. Formulaciones con combinación de ingredientes activos para el control de *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda), plaga en el cultivo de colza. **Revista de Investigaciones Agropecuarias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria**, v.30, n.1, p.6-91, 2011.

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