NEMÁTODES ENTOMOPATOGÉNICOS: UMA SOLUÇÃO SUSTENTÁVEL PARA O CONTROLO DE PRAGAS EMERGENTES

iStock

Os insetos constituem uma das maiores ameaças à segurança alimentar a nível global, comprometendo fortemente as culturas agrícolas. De entre os inimigos naturais desses insetos, os nemátodes entomopatogénicos têm especial relevância, uma vez que são de fácil aplicação no campo, de baixo impacto ecológico, de ação rápida e grande eficácia no controlo populacional destas pragas.

David Pires, Luís Bonifácio, Maria Lurdes Inácio
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Um dos maiores desafios sociais deste século é o de satisfazer as necessidades alimentares de uma população humana em crescimento exponencial, manter a produtividade dos solos e conservar a biodiversidade. Este desafio é transversal a vários dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ambiciosa Agenda 2030, fixada pela Organização das Nações Unidas.

A produção de alimentos e a segurança alimentar podem ser severamente comprometidas por diversas pragas e doenças que afetam a qualidade e o rendimento das culturas. Destas, estima-se que os insetos possam ser responsáveis por perdas na ordem dos 10% a 16% pré-colheita a nível global, e uma percentagem semelhante pós-colheita, com os maiores produtores de alimentos – a China e os Estados Unidos da América – a apresentar os prejuízos mais avultados (Paini *et al.*, 2016). No entanto, é provável que estes números sejam uma subestimativa (Bradshaw *et al.*, 2016). Além disso, a voracidade destas pragas não se limita apenas às culturas agrícolas: vários outros insetos desfolham árvores ou alimentam-se dos tecidos lenhosos das plantas, degradando assim a biodiversidade vegetal das florestas e ameaçando a silvicultura comercial e, em

última instância, comprometendo a mitigação das alterações climáticas promovida pelas florestas, um dos maiores reservatórios de carbono da biosfera terrestre (Kurz *et al.*, 2008). Prevê-se um cenário catastrófico em relação à dispersão e aumento populacional de insetos no contexto de alterações globais, dificultando ainda mais o seu controlo.

As substâncias per- ou polifluoroalquiladas, vulgarmente conhecidas como PFAS ou "químicos eternos", são substâncias químicas muito tóxicas, muito utilizadas em pesticidas de síntese, e altamente persistentes no ambiente, que podem contaminar a cadeia alimentar e aquíferos e, assim, ser transportadas por longas distâncias. Esta preocupação ambiental e de saúde pública levou a uma restrição progressiva da utilização de pesticidas de largo espectro, no qual se enquadram os inseticidas de síntese. Para colmatar a sua substituição faseada, a procura de soluções sustentáveis, como o controlo biológico com agentes microbianos ou outros inimigos naturais, tem adquirido maior relevância na última década e esta tendência deverá manter uma trajetória ascendente por muito tempo.

Os nemátodes fazem parte da microfauna do solo e representam aproximadamente 80% de todos os animais multicelulares da biosfera terrestre. São animais vermiformes, altamente adaptáveis e bem-sucedidos, que colonizaram quase todos os ecossistemas conhecidos do planeta. A grande maioria dos nemátodes do solo são de vida livre e ocupam nichos ecológicos importantes. Um quarto de todos os nemátodes são parasitas de plantas ou de animais e, entre estes últimos, algumas espécies estão associadas a insetos.

Os nemátodes entomopatogénicos (NEP) são parasitas obrigatórios de insetos e muito utilizados como agentes de controlo biológico contra pragas economicamente relevantes. Os NEP podem induzir esterilidade, reduzir a fecundidade, a longevidade e a capacidade de movimentação. Podem, ainda, induzir atraso no desenvolvimento, provocar alterações morfológicas e, eventualmente, levar à morte do hospedeiro. Os dois principais géneros de NEP são *Heterorhabditis* Poinar e *Steinernema* Travassos. Estes nemátodes estabeleceram uma relação simbiótica com bactérias patogénicas dos géneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, associadas a *Heterorhabditis* e *Steinernema*, respetivamente, responsáveis pela morte dos insetos.

Ciclo de vida de NEP

Algumas espécies de NEP são altamente específicas quanto ao seu hospedeiro, enquanto outras são mais generalistas. O ciclo de vida é, no entanto, transversal à maioria das espécies (Figura 1).

A partir do ovo, os NEP passam por quatro estádios de desenvolvimento antes de atingir o estádio adulto. O jovem de primeiro estádio (J1) desenvolve-se após a embriogénese e transforma-se num jovem de segundo estádio (J2) no interior do ovo.

Após a eclosão, o J2 alimenta-se e continua o seu desenvolvimento, crescendo em tamanho e passando por duas novas mudas (J3 e J4) antes de atingir o estádio adulto. Algumas espécies dividem-se entre machos e fêmeas, enquanto noutras podem ocorrer hermafroditas e machos.

Quando os recursos alimentares no cadáver do inseto escasseiam, os J2 desenvolvem-se num estádio de resistência – conhecido como jovem *dauer* ou jovem "infecioso" (JI) – como alternativa aos J3, e migram para o solo.

O JI é o único estádio de vida livre e é altamente especializado, sendo capaz de sobreviver fora do hospedeiro e persistir em condições ambientais adversas. Quando localiza um inseto-alvo, o JI invade-o pela boca, ânus ou espiráculos. O JI migra depois para a hemocele, onde retoma o seu desenvolvimento normal para J4, e liberta bactérias simbióticas na hemolinfa do inseto. Esta infeção ultrapassa a resposta imunitária do hospedeiro e atua rapidamente, provocando uma septicémia e causando-lhe a morte em poucas horas – geralmente entre 24 e 120 h – seguindo-se uma proliferação bacteriana acentuada e reprodução ativa de nemátodes.

As bactérias secretam enzimas hidrolíticas, como proteases, lipases e quitinases, transformando o cadáver do inseto num substrato utilizável pelos nemátodes. Quando atingem a maturidade sexual, estes reproduzem-se, põem ovos, completam o ciclo de vida e um novo começa.

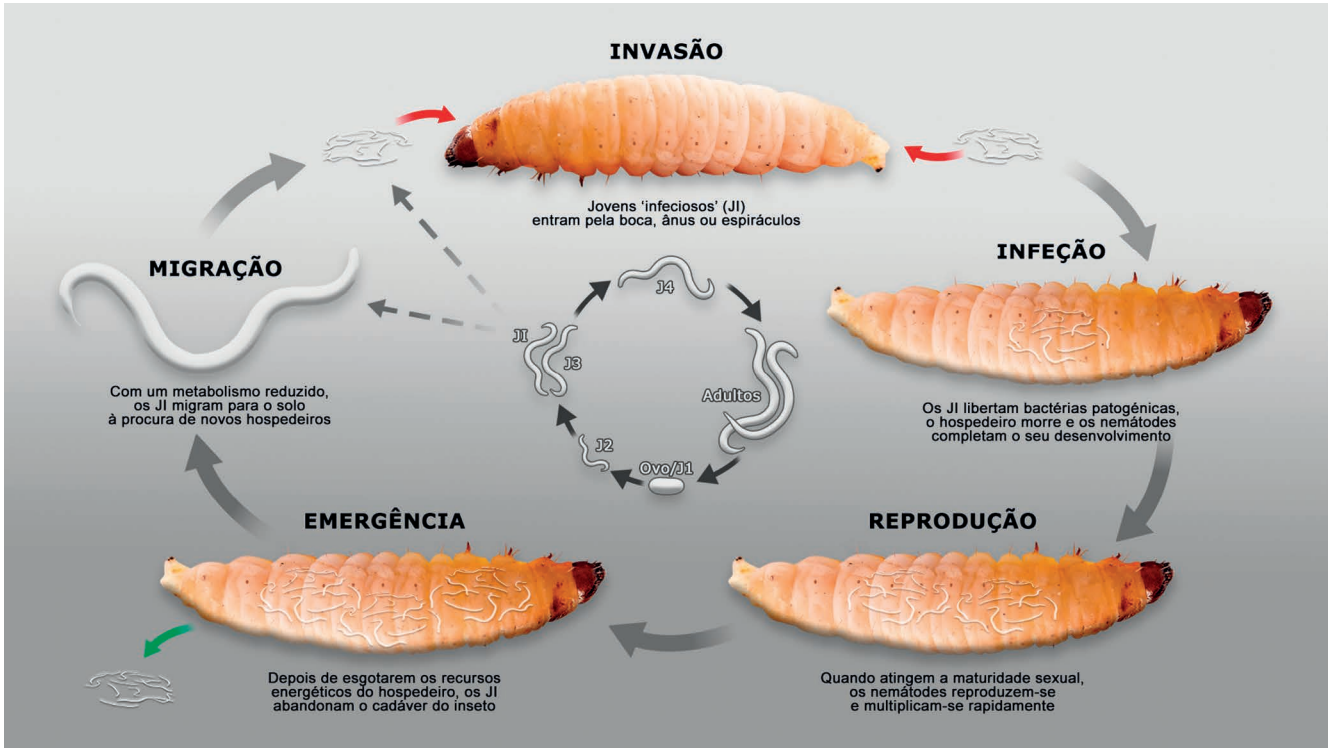

Figura 1 – Esquema ilustrativo do ciclo de vida geral de nemátodes entomopatogénicos e dos vários estádios de desenvolvimento, desde o ovo, passando por quatro estádios juvenis (J1–J4), até chegar ao estádio adulto.

Depois da embriogénese e da eclosão do ovo, o J2 sofre uma muda e transforma-se em J3 ou JI, consoante a disponibilidade de alimento. A depleção de recursos energéticos leva os JI a abandonar o cadáver do inseto e a migrar para o solo, à procura de novos hospedeiros. No solo, os JI orientam-se através de estímulos físicos e químicos do solo, do inseto-alvo, de plantas ou outros membros da mesma espécie. Este comportamento de forrageamento e a capacidade de localizar um hospedeiro-alvo são aspetos centrais da bioecologia dos NEP que lhes permitem assegurar a sua sobrevivência.

Produção de NEP em larga escala

Os NEP são atualmente produzidos através de vários métodos, tanto em fase sólida como líquida (Shapiro-Ilan *et al.*, 2012). Para nichos de mercado e pequenos produtores, ou para utilização em laboratório ou experiências de campo em pequena escala, a produção *in vivo* é o método mais apropriado e vantajoso em termos económicos, uma vez que não implica grandes investimentos em infraestruturas. Por outro lado, as tecnologias *in vitro* são utilizadas quando é necessária a produção de NEP em grande escala (Figura 2).

O processo geral de cultura *in vivo* consiste na inoculação, recolha, concentração e, se necessário, desinfeção de nemátodes. Os insetos hospedeiros são inoculados num prato ou tabuleiro forrado com papel absorvente ou outro substrato propício à infeção por NEP, como solo ou gesso. Após aproximadamente 2 a 5 dias, os insetos infetados são transferidos para armadilhas, que consistem num prato ou tabuleiro sobre o qual repousam os cadáveres, rodeados de água. À medida que os JI emergem, migram para a água circundante, onde são recolhidos. A escala da armadilha pode ser adaptada para níveis comerciais, se necessário.

Os rendimentos da produção *in vivo* variam muito consoante os insetos hospedeiros e as espécies de NEP. No entanto, devido à sua elevada suscetibilidade à maioria das espécies de NEP, à sua ampla disponibilidade e facilidade de manutenção, os hospedeiros mais comummente utilizados para

Figura 2 – Esquema simplificado das etapas de desenvolvimento de um biopesticida contendo uma nova espécie de nemátode entomopatogénico.

manter e multiplicar culturas de NEP em laboratório e à escala comercial são larvas da traça-da-cera, *Galleria mellonella*.

A produção de NEP em condições controladas pode ser assegurada por fermentação sólida em placas de Petri ou fermentação líquida em biorreatores. A fermentação sólida consiste na introdução de ovos de nemátodes em meio nutritivo com uma cultura pura da sua bactéria simbiótica. Vários meios de cultura foram propostos ao longo do tempo e a sua composição pode ter efeitos consideráveis no rendimento da fermentação sólida.

Um dos maiores desafios de manter culturas de NEP em fermentação líquida é fornecer oxigénio suficiente e, ao mesmo tempo, evitar a rutura do corpo dos nemátodes. Os tempos de cultura em fase líquida podem variar consoante a composição do meio e a espécie de NEP, com a produção máxima de JI a ser atingida em duas semanas ou menos em muitas espécies.

Modos de aplicação de NEP

As formulações de qualquer agente de controlo biológico têm sempre dois propósitos fundamentais: (1) manter a estabilidade durante o armazenamento; e (2) facilitar o manuseamento durante a aplicação.

Para permitir níveis de sobrevivência e prazos de validade aceitáveis visando a sua comercialização, o metabolismo dos NEP pode ser abrandado expondo-os a baixas temperaturas, restringindo fisicamente o movimento e/ou utilizando ingredientes de formulação que reduzem o movimento e, assim, a sua taxa metabólica. A formulação deve também acautelar um ambiente apropriado para a sobrevivência dos NEP, incluindo níveis adequados de oxigenação e humidade.

Os NEP são geralmente administrados em suspensão aquosa e podem ser distribuídos utilizando a maioria dos pulverizadores agrícolas e sistemas de irrigação-padrão, tais como irrigação por microjato, pulverizadores pressurizados, pulverizadores

eletrostáticos, pulverizadores de tronco, pulverizadores aéreos e pistolas. Para aplicações em pequena escala, podem ser utilizados pulverizadores de mochila ou regadores.

O equipamento mais apropriado para uma aplicação específica dependerá da praga-alvo e do sistema de cultivo em questão. Os fatores a considerar incluem o volume, o tipo de bico, a pressão, as condições ambientais, a natureza do local ou sistema a inocular (por exemplo, solo, folhas, tronco) e o padrão de distribuição de pulverização necessário.

Aplicações na agricultura, desafios e oportunidades

A inconsistência e a falta de previsibilidade são os principais desafios para a adoção de agentes de controlo biológico na gestão de pragas. No caso dos NEP, o seu sucesso depende da formulação, dos parâmetros de aplicação e de fatores bióticos e abióticos (Shapiro-Ilan *et al.*, 2012). O tipo de solo, fertilizantes e pesticidas aplicados e condições ambientais como temperatura, humidade e radiação UV podem afetar a sua eficácia. Além disso, o equipamento de pulverização e a correta combinação entre a espécie de NEP e a praga-alvo são essenciais para um controlo biológico eficiente.

Os NEP demonstraram potencial de biocontrolo contra pragas emergentes na Europa, como o percevejo-asiático (*Halyomorpha halys*) e o longicórnio-preto-e-branco-dos-citrinos (*Anoplophora chinensis* e *A. glabripennis*), embora não tenham sido detetados em Portugal. Na Ásia, NEP mostraram resultados promissores no controlo de *Monochamus* spp., vetor do nemátode-da-madeira-do-pinheiro, presente em Portugal.

Pensando além dos limites atuais e olhando para o futuro, a exploração espacial surgirá como um dos maiores desafios da humanidade nas próximas décadas. Nesse contexto, estudar a eficácia de agentes de biocontrolo, como os NEP, em condições de microgravidade – um fator que pode impactar a locomoção e a patogenicidade destes parasitas – será crucial para viabilizar uma agricultura sustentável e garantir a proteção de plantas no espaço, fundamentais para o êxito de missões tripuladas de longa duração. Em 2020, uma experiência na Estação Espacial Internacional mostrou que os NEP mantiveram a sua capacidade de localizar e infetar hospedeiros no espaço, mas os NEP que se desenvolveram a partir de ovos não sobreviveram ao regressar à Terra (Kaplan *et al.*, 2020). Para missões espaciais de longa duração, os NEP podem necessitar de ser transportados sob a forma de *dauers*/JI, criopreservados ou mantidos na fase parasitária. Além disso, os estudos espaciais podem contribuir para melhorar o uso de NEP no controlo biológico na Terra.

Bibliografia

Bradshaw, C. *et al.* (2016). Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications*, **7**:12986.

Kaplan, F. *et al.* (2020). Dynamics of entomopathogenic nematode foraging and infectivity in microgravity. *npj Microgravity*, **6**:20.

Kurz, W.A. *et al.* (2008). Mountain pine beetle and forest carbon feedback to climate change. *Nature*, **452**:987–990.

Paini, D.R. *et al.* (2016). Global threat to agriculture from invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**:7575–7579.

Shapiro-Ilan, D.I. *et al.* (2012). Entomopathogenic nematode production and application technology. *Journal of Nematology*, **44**(2):206–217.

Tarasco, E. *et al.* (2023). Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria: from genes to field uses. *Frontiers in Insect Science*, **3**:1195254.