

Longevidade de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro em *Rhynchophorus palmarum*.

R.R. Costa e Carvalho¹; D.R.N. Warwick²; P.E. Souza¹; J. L. S. Carvalho Filho¹.

¹Universidade Federal de Lavras (UFLA), 37200-000, Lavras- MG, Brasil

²Embrapa Tabuleiros Costeiros, 49025-040, Aracaju-Se, Brasil

rejanercosta@yahoo.com.br

(Recebido em 13 de junho de 2010; aceito em 06 de abril de 2011)

O objetivo do presente trabalho foi discutir a longevidade do fungo *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do estirpe do coqueiro, em seu vetor, o besouro *Rhynchophorus palamarum*. Foi realizado um estudo microbiológico da superfície e do tubo digestivo dos insetos adultos que foram coletados em duas regiões do Estado de Sergipe: uma com plantações apresentando sintomas da resinose e outra sem focos da doença. Os insetos foram divididos em dois lotes de 40 insetos (20 machos e 20 fêmeas) para cada região. Os besouros foram esfregados um a um em placa de petri contendo meio BDA, um besouro por placa, desinfetados externamente com hipoclorito sódico e o tubo digestivo de cada um dos insetos esfregados foi retirado e dividido em suas três partes principais: estomodeu, mesêntero e proctodeu. Estas partes foram inseridas em meio de cultura BDA e mantidas em BOD a 25 ° C por 5 dias. Foi verificada a patogenicidade dos isolados de *T. paradoxa* em coqueiros utilizando três métodos de inoculação. Os isolamentos realizados a partir da parte externa e no tubo digestivo dos insetos do município de Neópolis resultaram em 96,3% e 77,5% de crescimento micelial de *T. paradoxa* respectivamente e foi comprovada a patogenicidade dos isolados em plantas de coqueiro. Ficou comprovado a perda de longevidade do patógeno dentro do vetor após 7 dias, na ausência de nova fonte de infecção.

Palavras-chaves: longevidade, vetor, resinose, coco

The purpose of this study was to discuss the longevity of the fungus *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of resinose strain the coconut in its vector, the beetle *Rhynchophorus palamarum*. We carried out a microbiological study of surface and gut of adult insects that were collected in two regions of the State of Sergipe: a plantation resinose presenting symptoms and one without disease outbreaks. The insects were divided into two batches of 40 insects (20 males and 20 females) for each region. Beetles were scrubbed one by one in a petri dish containing PDA medium, one beetle per plate and disinfected externally with sodium hypochlorite and digestive tract of each insect was removed and scrubbed divided into its three main parts: estomodeu, midgut and proctodeus. These shares were placed in PDA culture medium and incubated at 25 ° C for 5 days. It was verified the pathogenicity of isolates of *T. paradoxa* in coconut using three methods of inoculation. Isolations made from the outside and in the gut of insects in the city of Neopolis resulted in 96.3% and 77.5% mycelial growth of *T. paradoxa*, respectively, and was confirmed the pathogenicity of the isolates in coconut plants. It was proven the loss of longevity of the pathogen within the vector after 7 days in the absence of a new source of infection.

Keywords: longevity, vector, resinose, coconut

1. INTRODUÇÃO

Nas condições do nordeste brasileiro a cultura do coqueiro pode ser infectada por diversos patógenos causadores de várias doenças. Dentre estas, a ocorrência da resinose do estirpe do coqueiro ou “stem bleeding”, causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Höhn, tem-se tornado motivo de extrema preocupação dentre produtores, instituições de pesquisa, órgãos de assistência técnica e de defesa sanitária, devido a sua rápida disseminação e consequente queda de produção. As palmeiras, de um modo geral, são suscetíveis à *T. paradoxa* e sujeitas a grandes perdas. Dentre os principais sintomas da doença, destaca-se o aparecimento de um líquido marrom-avermelhado que escorre através de rachaduras no tronco,

que ao secar pode adquirir uma coloração avermelhada ou enegrecida; redução na frequência de emissão de folhas e no tamanho das mais novas; afinamento do tronco na região próximo à copa, sintoma este observado com a evolução da doença; folhas amarelo-pardacentas frágeis e sujeitas à quebra [1].

T. paradoxa é a fase imperfeita ou assexual do patógeno, sendo responsável pela produção de dois tipos de esporos, os endoconídeos e os clamidósporos. Em sua fase sexual ou perfeita é denominado *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau, (1952) (Ascomycetes, Microascales, família Ophiostomatacea), fase esta raramente encontrada na natureza e até o momento não verificado nas condições nacionais.

O besouro *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus (1758), agente causal da broca-do-olho do coqueiro, também é o principal vetor do nematóide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard [2], organismo este, causador do anel vermelho do coqueiro e possível vetor da resinose do coqueiro. O *R. palmarum* quando no estágio adulto apresentam coloração preta opaca, tamanho variado podendo medir de 40 a 60 cm de comprimento; rostro recurvado; élitros com oito sulcos longitudinais e de aspecto aveludado não cobrindo totalmente a extremidade do abdômen; dimorfismo sexual, onde somente os machos apresentam pêlos no dorso do rostro. Podem viver até 60 dias e, durante esse período a fêmea pode colocar até 700 ovos [3]. De uma maneira geral o *R. palmarum* localiza sua planta hospedeira a longas distâncias através do olfato, devido a liberação pela planta de voláteis químicos [3]. Isso ocorre quando a planta apresenta ferimento ou outro tipo de stress. Uma vez localizada a planta, desce para a base axilar da palmeira e ao encontrar as partes mais tenras do meristema, tanto se alimenta quanto oviposita.

O objetivo do presente trabalho foi de investigar a longevidade de *T. paradoxa*, agente da resinose do coqueiro, em seu vetor, o coleóptero *R. palmarum*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Área Estudada e Coleta de *R. palmarum*

A coleta dos coleópteros foi realizada em duas regiões do estado de Sergipe: Fazenda H-Dantas, no Município de Neópolis, onde continha diversos focos da resinose e no Povoado Nova Descoberta no Município de Itaporanga D'Ajuda onde não havia focos da doença. Foram coletados em cada região 80 insetos adultos de *R. palmarum* (40 machos e 40 fêmeas), através de armadilhas do tipo balde [4], que são armadilhas contendo iscas atrativas, como toletes de cana-de-açúcar.

2.2. Transporte e Condicionamento

Os insetos foram transportados para o laboratório de Fitopatologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju-SE, em câmaras térmicas, onde foram divididos em dois lotes de 40 insetos (20 machos e 20 fêmeas) para cada região. O primeiro lote foi dessecado e avaliado assim que chegou ao laboratório, enquanto o segundo lote foi avaliado 7 dias após a coleta para que se pudesse avaliar a longevidade do fungo dentro dos insetos. Os besouros foram mantidos à temperatura de 25°C, em jejum por 24 horas antes do processo de dessecação. Os insetos que foram dessecados 7 dias após a coleta foram alimentados com cana autoclavada e também foram mantidos sob jejum por 24h antes do processo de dessecação.

2.3. Avaliação da longevidade de *T. paradoxa* em *R. palmarum*

Na verificação da presença do fungo na parte externa do *R. palamarum*, os besouros foram esfregados um a um em placa de petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar), no número de um besouro por placa.

Posteriormente, na avaliação da presença de *T. paradoxa* no tubo digestivo do besouro, os insetos foram desinfetados externamente através da imersão dos mesmos por cinco minutos em uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO), seguindo-se da dessecação dos mesmos com o auxílio de uma lupa binocular com um aumento entre 10 e 40X. Cada inseto foi introduzido em um recipiente com água destilada esterelizada para afrouxar os élitros e as asas membranosas e posteriormente foram realizados cortes dorsolaterais no tórax e abdômen, e um corte da região

cefálica, separando a cabeça [5]. O tubo digestivo foi removido e posteriormente dividido em suas três partes principais: estomodeu, mesêntero e proctodeu [4, 5]. Cada uma das três partes do tubo digestivo foi seccionada em três outras partes que foram inseridas em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e mantidas em BOD a 25 ° C. A avaliação foi realizada após um período de 5 dias. As amostras foram observadas em microscópio óptico, onde as estruturas do fungo foram caracterizadas, chegando-se a sua identificação taxonômica. A presença de estruturas do fungo em qualquer uma das partes do seu tubo digestivo caracterizava o inseto como infectado. Lembrando-se que toda esta metodologia descrita foi realizada com metade dos insetos assim que chegaram ao laboratório e com a outra metade aos 7 dias, para que a longevidade do fungo no inseto pudesse ser observada.

Para verificar a patogenicidade dos isolados, foram selecionadas colônias de *T. paradoxa* com 7 dias de idade obtidos do tubo digestivo dos insetos para inoculação em plantas de coco com um ano de idade mantidos em sacos de polietileno negro em casa de vegetação. Foram utilizados três métodos de inoculação: 1) Inoculação de um disco de cultivo artificial de *T. paradoxa* - Através de um extrator de casca especial foi retirado um cilindro do estirpe do coqueiro, onde foi inserido o disco de micélio fúngico; 2) Injeção de 10 ml de uma suspensão de 100 esporos/ml de *T. paradoxa* - O estirpe do coqueiro foi cortado transversalmente para posterior injeção da seringa contendo a suspensão de esporos e 3) Inoculação artificial de *T. paradoxa* por *R. palmarum* - Foi realizado um furo no estirpe do coqueiro onde foi introduzido um besouro previamente infectado pelo patógeno. O besouro foi mantido no estirpe por 24 horas. Cinco plantas foram inoculadas por cada um dos 3 métodos descritos e pelos isolados das duas localidades (Neópolis e Itaporanga).

O controle foi constituído de 15 plantas, sendo que 5 plantas foram inoculadas por discos de meio BDA sem o fungo, 5 foram injetadas com 10 ml de água destilada esterilizada e mais 5 foram somente furadas no estirpe sem a introdução do besouro. Em todos os métodos de inoculação, a região inoculada foi recoberta por uma fita adesiva a fim de oferecer condições de câmara úmida e posteriormente foi realizado um novo isolamento das plantas inoculadas que apresentaram os sintomas da resinose.

Os dados relativos ao número de indivíduos infectados e não infectados com *T. paradoxa* aos 0 e 7 dias; o número de indivíduos infectados à região do tubo digestivo e número de indivíduos infectados com relação ao sexo nas duas regiões foram submetidos ao teste de qui-quadrado (χ^2) a 5% de probabilidade utilizando os procedimentos estatísticos do software SAS – Statistical Analysis System [7].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolamentos realizados a partir da parte externa dos insetos evidenciaram 96,3% de crescimento micelial de *T. paradoxa*. Resultado semelhante foi obtido na avaliação das diferentes partes do tubo digestivo do inseto, com 77,5% de infecção. As colônias apresentaram crescimento radial uniforme, inicialmente hialino, tornando-se totalmente cinza aos 4 dias. Microscopicamente, o fungo apresentou conidióforos hialinos a marrom pálido de até 250 μ m de comprimento. Os conídios hialinos a marrom pálido, foram produzidos endogenamente em cadeias, de forma cilíndrica a elipsoidal (7-14 x 2,7-6 mm). Os clamidósporos lisos e de parede dupla, localizados nas cadeias de terminais apresentavam coloração que variava de marrom-pálido a marrom escuro (25/09 x 15/06 mm). Esses caracteres permitiram identificar o fungo como *T. paradoxa*, anamorfo do fungo *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau [1, 8, 9].

Não houve diferença significativa entre os sexos aos 0 e 7 dias após coleta em relação a presença do fungo na superfície do corpo (Tabela 1). Entretanto, os machos apresentaram um maior registro de *T. paradoxa* no tubo digestivo dos insetos (80%) em relação às fêmeas (75%), havendo diferença significativa tanto aos 0 quanto aos 7 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Número de indivíduos de *Rhynchophorus palmarum* (machos e fêmeas) no município de Neópolis com a presença de *Thielaviopsis paradoxa* externamente e internamente ao seu corpo aos 0 e 7 dias após sua coleta.

	Sexo		Total	Parâmetros*	
	Fêmea	Macho		χ^2	P
Externamente					
0 dias					
Infectados	20	19	39		
Não infectados	0	1	1	1,026	0,014
Total	20	20	40		
7 dias					
Infectados	18	20	38		
Não infectados	2	0	2	2,105	0,057
Total	20	20	40		
Internamente					
0 dias					
Infectados	16	20	36		
Não infectados	4	0	4	4,444	0,008
Total	20	20	40		
7 dias					
Infectados	16	10	26		
Não infectados	4	10	14	3,956	0,001
Total	20	20	40		

* $\alpha = 0,05$; G.L. = 1

O trato digestivo dos insetos é constituído de um tubo de células epiteliais que se estende da boca até o ânus no qual é dividido em três regiões principais baseado na sua origem embrionária e na sua função fisiológica em estomodeu (região anterior), mesêntero (região média) e proctodeu (região posterior) [10, 11]. Na avaliação da infectividade no tubo digestivo, 77,5% dos besouros apresentaram-se infectados, sendo 68,75% no estomodeu, 60% no mesêntero e 70% no proctodeu. Pode-se observar que não houve diferença significativa entre o número de indivíduos infectados e não infectados em relação às partes do tubo digestivo (Tabela 2).

Estudos anteriores demonstraram uma menor frequência de *T. paradoxa* no mesêntero de *R. palmarum* [4]. Este resultado pode ser explicado pela limitação do acúmulo de esporos de *T. paradoxa* nesta região devido à ação de enzimas [5, 11] e de bactérias associadas à mesma [5].

Tabela 2. Número de indivíduos de *Rhynchophorus palmarum* do município de Neópolis com a presença de *Thielaviopsis paradoxa* nas diferentes partes de seu tubo digestivo aos 0 e 7 dias após sua coleta.

	Parte do tubo digestivo			Total	Parâmetros*	
	Estomodeu	Mesêntero	Proctodeu		χ^2	P
0 dias						
Infectados	30	31	33	94		
Não Infectados	10	9	7	26	0,687	0,008
Total	40	40	40	120		
7 dias						
Infectados	25	17	23	65		
Não infectados	15	23	17	55	3,491	0,019
Total	40	40	40	120		

* $\alpha = 0,05$; G.L. = 2

Houve diferença significativa entre os insetos obtidos no município de Neópolis quanto ao número de besouros infectados com *T. paradoxa* no tubo digestivo em relação ao dia de avaliação, com 90% de infectividade aos 0 dias e à 65% de infectividade aos 7 dias (Tabela 3),

evidenciando uma perda na longevidade do fungo dentro do tubo digestivo do inseto após 7 dias. Os fungos, diferentemente de alguns fitovírus não têm a capacidade de alcançar a hemolinfa do inseto e assim percorrer o corpo do mesmo, multiplicando-se. Dessa forma, o coleóptero *R. palmarum* adquire o fungo *T. paradoxa* durante a alimentação, passando por todo canal digestivo e no processo de excreção elimina-o pelas fezes, o que explica a perda gradual de longevidade do fungo dentro do tubo digestivo do inseto após 7 dias na ausência de nova fonte de infecção.

Tabela 3. Número total de indivíduos de *Rhynchophorus palmarum* no município de Neópolis com a presença de *Thielaviopsis paradoxa* tanto externamente quanto em seu tubo digestivo com 0 e 7 dias após a coleta (longevidade).

	Avaliação		Total	Parâmetros*	
	0 dias	7 dias		χ^2	P
Externamente					
Infectados	39	38	77	0,5263	0,022
Não infectados	1	2	3		
Total	40	40	80		
Internamente					
Infectados	36	26	62	10,9890	< 0,001
Não infectados	4	14	18		
Total	40	40	80		

* $\alpha = 0,05$; G.L. = 1

Na verificação da patogenicidade foram utilizados os indivíduos ou insetos do município de Neópolis. Todas as plantas morreram após 40 dias da realização das inoculações. Isolamentos realizados à partir do tecido doente das plantas sintomáticas confirmaram a patogenicidade por *T. paradoxa*. Inicialmente as plantas inoculadas apresentaram encurtamento das folhas novas, levando ao aparecimento de resina no estipe e posteriormente à morte das plantas. As testemunhas não apresentaram quaisquer sintomas no decorrer do experimento (Tabela 4).

Tabela 4. Resultado da prova de patogenicidade em mudas de coqueiro de 1 ano de idade, a partir de isolados de *T. paradoxa* obtidos de besouros oriundos do município de Neópolis.

Método de inoculação	n ^a	Plantas mortas ^b
Disco de ágar	5	5
Injeção de suspensão	5	5
Inoculação vetor	5	5
Testemunha ágar	5	0
Testemunha injeção	5	0
Testemunha vetor	5	0

^aTotal de plantas mortas em cada método, ^bNúmero de plantas mortas após 40 dias

O fato de encontrar o fungo no trato digestivo do inseto, após a desinfecção externa do exoesqueleto, indica uma relação de associação entre ambos organismos [5]. Como o *R. palmarum* completa todo seu ciclo de vida dentro do hospedeiro [12] e apresenta uma rápida dispersão por ambos os sexos [13] é provável que a transmissão do fungo seja realizada tanto pelos esporos do fungo que são carregados externamente ao seu corpo, quanto pela alimentação do inseto em plantas doentes e, em seguida em plantas saudáveis, liberando dessa forma suas excretas nos tecidos internos da planta [5].

Não foi encontrado *T. paradoxa* tanto externamente quanto no tubo digestivo dos besouros isolados do Povoado Nova Descoberta no Município de Itaporanga D'Ajuda onde não havia focos da doença (Tabela 5).

Tabela 5. Número total de indivíduos de *Rhynchophorus palmarum* nos municípios de Neópolis e de Itaporanga D'Ajuda com a presença de *Thielaviopsis paradoxa* tanto externamente quanto em seu tubo digestivo.

	Municípios		Total
	Neópolis	Itaporanga D'Ajuda	
Externamente			
Infectados	77	0	77
Não infectados	3	80	83
Total	80	80	160
Internamente			
Infectados	62	0	62
Não infectados	18	80	58
Total	80	80	120

4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra a perda gradual da longevidade do fungo *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro, em seu vetor, o besouro *Rhynchophorus palmarum* na ausência de nova fonte de infecção.

1. WARWICK, D.R.N.; PASSOS, E.E.M. Ataque de resinose do coqueiro causada por *Thielaviopsis paradoxa* em Sergipe, Brasil. *Tropical Plant Pathology* 34: 175-177 (2009).
2. GERBER K.; GIBLIN, R. Association of the red ring nematode and other nematodes species with the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* L. *Journal Nematology* 22: 143- 149 (1990).
3. LACERDA, I.J. Coqueiro sob ataque. *Revista Cultivar Hortaliças e Frutas* 6:25-28(2001).
4. MOURA, J.I.L.; RESENDE, M.L.V.; SGRILLO, R.B.; NASCIMENTO, L.A.; ROMANO, R. Diferentes tipos de armadilhas e iscas no controle de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Agrotropica* 2 :165-169 (1990).
5. PARRA, D., MORILLO, F., SÁNCHEZ, P., PINEDA, J., GUERRA, J. Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes Höhn em el tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum* Linneo (Coleóptera: Curculionidae). *Entomotropica* 18(1):49-55 (2003).
6. SÁNCHEZ P, SÁNCHEZ F, CAETANO F. El tubo digestivo em adultos de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae): Morfología y ultraestructura. *Bol Entomol Venez* 15(2): 195-216 (2000).
7. SAS Institute user's guide: statistics. *Raleigh, SAS* 1985. p.956 (1985).
8. MORGAN-JONES C. CMI descriptions of pathogenic Fungi and Bacteria. N° 143. *Commonwealth Agricultural Bureaux* (1967).
9. SULEMAN P, AL-MUSALLAM A, MENEZEZ CAA. The effect of solute potential and water stress on black scorch caused by *Chalara paradoxa* and *Chalara raidicicola* on date palms. *Plant Disease* 85(1): 80-83 (2001).
10. WIGGLESWORTH VB. The principles of insect physiology. *London: Chapman and Hall*. 827 p (1972).
11. TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Review. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B(1):1-62 (1994).
12. SÁNCHEZ, P.A. & H. CERDA. El complejo *Rhynchophorus palmarum* (L) (Coleoptera: Curculionidae) – *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) (Tylenchida: Aphelenchoididae), en palmeras. *Bol. Entomol. Venez.* 8: 1-18 (1993).
13. HAGLEY, E.A.C. On the life history and habitats of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.). *Annals of the Entomological Society of America* 58:22-28 (1965).