

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**LEVANTAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
EM ÁREAS AGRÍCOLAS E INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E
DO SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA, MULTIPLICAÇÃO E
ARMAZENAMENTO**

ANDRESSA LIMA DE BRIDA

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia
(Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Dezembro 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**LEVANTAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
EM ÁREAS AGRÍCOLAS E INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E
DO SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA, MULTIPLICAÇÃO E
ARMAZENAMENTO**

ANDRESSA LIMA DE BRIDA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Profa. Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken
Co-orientador: Dr. Luís Garrigós Leite

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia
(Proteção de Plantas).

BOTUCATU - SP
Dezembro 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Brida, Andressa Lima de, 1986-

B851L Levantamento de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e influência da temperatura e do substrato na sobrevivência, multiplicação e armazenamento / Andressa Lima de Brida. - Botucatu : [s.n.], 2015
xi, 141 f. : ils., grafs. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2015

Orientador: Silvia Renata Siciliano Wilcken

Coorientador: Luís Garrigós Leite

Inclui bibliografia

1. Nematoides entomopatogênicos - Identificação. 2. Pragas agrícolas - Controle biológico. 3. Substratos. I. Wilcken, Silvia Renata Siciliano. II. Leite, Luís Garrigós. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: LEVANTAMENTO DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS E INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA, MULTIPLICAÇÃO E ARMAZENAMENTO

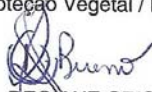
AUTORA: ANDRESSA LIMA DE BRIDA

ORIENTADORA: Profa. Dra. SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN


CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS GARRIGÓS LEITE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu


Profa. Dra. REGIANE CRISTINA OLIVEIRA DE FREITAS BUENO
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu


Profa. Dra. NÁDIA CRISTINA DE OLIVEIRA
Faculdade Integrada de Campo Mourão


Profa. Dra. SOLANGE MARIA BONALDO
UFMT Campus de Sinop


Profa. Dra. JULIANA-MAGRINELLI OSÓRIO ROSA
Instituto Biológico - Campinas

Data da realização: 03 de dezembro de 2015.

*A meus pais, José Sidnei De Brida e Marineide Lima De Brida, pelo amor,
carinho e ensinamento.*

Dedico

A meu esposo Ederson Roberto Pinheiro

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora Aparecida, acima de tudo, por sempre estar ao meu lado, guiando os meus passos, protegendo-me em todos os momentos que eu mais precisei, dando-me sabedoria e paciência para que eu completasse mais esta jornada em minha vida.

À minha orientadora *Profa. Dra Silvia Renata Siciliano Wilcken*, pela paciência e pelos momentos em que se dispôs a ensinar, aconselhar e direcionar os meus objetivos contribuindo para que eu chegasse até aqui. Meus mais sinceros agradecimentos pela orientação e confiança durante a realização dos trabalhos.

Ao meu co-orientador *Prof. Dr. Luís Garrigós Leite*, que não mediu esforços para o desenvolvimento desta Tese, pela amizade, oportunidade, ensinamentos e otimismo. Obrigada pela orientação e confiança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Proteção de Plantas, da Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP – Campus de Botucatu/SP.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Proteção Vegetal, pelo conhecimento e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Ao *Prof. José Cola Zanuncio* pela dedicação a correção destes capítulos.

À *Dra. Juliana Magrinelli Osório Rosa*, pela contribuição no desenvolvimento de parte da Tese desenvolvida.

À Ana Lucia Kempinas, pela ajuda dispensada.

À equipe do Laboratório de Nematologia Agrícola UNESP/FCA.

À equipe do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, em Campinas-SP.

Aos amigos, Miguel Jara, Érika Cristina Roberto Camargo, Fátima Almeida, Abrahão Haddad, Cassiano Forner, Tomas Miorini, Marylia Gabriella, Tais Dadazio, Maria Bulgari, Bruna Carmona, Nádia Caldato, Bruna Favetti, pelo convívio e pela ajuda dispensada.

À minha família, meu esposo Ederson Roberto, meus pais José Sidini e Marineide, pelo amor incondicional e compreensão nas horas mais difíceis.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
1. RESUMO	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUÇÃO	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
4.1 Nematoides entomopatogênicos	8
4.1.1 Ciclo de vida.....	11
4.2 Utilização de NEPs no controle biológico de insetos	12
4.3 Produção de NEPs “<i>in vivo</i>” e “<i>in vitro</i>”	18
4.3.1 Isolamento de bactérias simbióticas.....	22
4.3.2 Manutenção de NEPs pela obtenção de isolinhas.....	24
4.4 Formulação e armazenamento de NEPs	26
4.4.1 Fatores que afetam a produção, formulação e armazenamento.....	28
CAPÍTULO I - “Análise filogenética de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e florestais em diferentes áreas do Brasil”	34
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	50
CAPÍTULO II - “Desenvolvimento de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> (Rhabditida: Heterorhabditidae) em diferentes temperaturas”	56
RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
1. Introdução.....	59
2. Material e métodos.....	60
2.1 Multiplicação do isolado.....	60

3. Resultados	62
3.1 Mortalidade de <i>G. mellonella</i>	62
3.2 Multiplicação dos juvenis infectantes (JIs).....	62
4. Discussão.....	62
Referências.....	65
CAPÍTULO III - “Influência da temperatura na sobrevivência de nematoides entomopatogênicos”	71
RESUMO.....	72
ABSTRACT.....	73
1. Introdução.....	74
2. Material e métodos.....	75
3. Resultados.....	76
4. Discussão.....	77
Referências.....	81
CAPÍTULO IV - “Influência do substrato e da luminosidade na infecção de nematoides entomopatogênicos em <i>Galleria mellonella</i>”	86
RESUMO.....	87
ABSTRACT.....	89
INTRODUÇÃO.....	90
MATERIAL E MÉTODOS.....	92
RESULTADOS.....	93
DISCUSSÃO.....	94
LITERATURA CITADA.....	97
CAPÍTULO V - “Preservação de <i>Steinernema brazilense</i> e <i>Heterorhabditis amazonensis</i> (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) armazenados em diferentes substratos”	102
RESUMO.....	103
ABSTRACT.....	105
1. Introdução.....	106
2. Material e métodos.....	108
2.1 Multiplicações dos isolados.....	108
3. Resultados.....	111
4. Discussão.....	112

Referências.....	113
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	119
6. CONCLUSÕES.....	121
7. REFERÊNCIAS.....	123

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I - Análise filogenética de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e florestais em diferentes áreas do Brasil	
Tabela 1. Código (Cod.), espécies, local de coleta (Local), tipo de solo (Solo), cultura, coordenadas geográficas (coordenadas) e época de coleta (Época) de nematoides entomopatogênicos (NEPs) em áreas com plantas anuais, florestais e frutíferas de 2010 a 2013, Brasil	49
CAPÍTULO II - Desenvolvimento de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> (Rhabditida: Heterorhabditidae) em diferentes temperaturas	
Tabela 1. Período de mortalidade (dias) de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) após infecção por <i>Heterorhabditis amazonensis</i> IBCB 24 e período para emergência (dias) de juvenis infectivos em diferentes temperaturas	69
CAPÍTULO III - Influência da temperatura na sobrevivência de nematoides entomopatogênicos	
Tabela 1. Efeito de cinco temperaturas na sobrevivência (%) de <i>Steinernema carpocapsae</i> IBCB 02, <i>Heterorhabditis amazonensis</i> IBCB 24 e <i>Steinernema feltiae</i> IBCB 47 após 5, 10, 15, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI)	85
CAPÍTULO IV - Influência do substrato e da luminosidade na infecção de nematoides entomopatogênicos em <i>Galleria mellonella</i> .	
Tabela 1. Infecção (%) de juvenis infectantes (J3) dos isolados <i>Steinernema carpocapsae</i> IBCB 02, <i>Steinernema brazilense</i> IBCB 06, <i>Heterorhabditis amazonensis</i> IBCB 24 e <i>Steinernema feltiae</i> IBCB 47 em lagartas de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) em diferentes substratos	101

CAPÍTULO V - Preservação de nematoides entomopatogênicos *Steinernema brazilense* e *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) armazenados em diferentes substratos.

Tabela 1. Efeito de diferentes substratos na sobrevivência (%) de *Steinernema brazilense* IBCB 06 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 aos 20, 30, 60, 120 e 180 dias após inoculação (DAI)117

Tabela 2. Sobrevivência (%) de *Steinernema brazilense* IBCB 06 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 aos 20, 30, 60, 120 e 180 dias após inoculação (DAI) em diferentes substratos 118

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I - Análise filogenética de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e florestais em diferentes áreas do Brasil

- Figura 1.** Árvore filogenética mostrando a relação entre os isolados de nematoides entomopatogênicos detectados no estudo e sua similaridade com populações obtidas no GenBank baseado nas sequências da expansão D2/D3 da região 28S do rDNA. *Caenorhabditis elegans* foi utilizado como *outgroup*46
- Figura 2.** Áreas amostradas para a detecção de nematoides entomopatogênicos nos estados de São Paulo e Paraná, de 2010 a 2013, Brasil48

CAPÍTULO II - Desenvolvimento de *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) em diferentes temperaturas

- Figura 1.** Média diária de juvenis infectivos (JIs) de *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 emergidos por lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) em cinco temperaturas durante 30 dias70

LEVANTAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS E INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DE SUBSTRATO NA SOBREVIVÊNCIA, MULTIPLICAÇÃO E ARMAZENAMENTO. Botucatu, 2015. 141 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Autora: ANDRESSA LIMA DE BRIDA

Orientadora: SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN

Co-orientador: LUIS GARRIGÓS LEITE

1. RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são promissores para o controle biológico de pragas. Os fatores abióticos, temperatura e os tipos de solos e substratos, influenciam a sobrevivência de juvenis infectantes em condições de armazenamento e a campo. Os objetivos do presente estudo foram: isolar e identificar espécies de NEPs coletadas em áreas de culturas florestais, anuais e frutíferas no Brasil; avaliar o período de mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella* após a infecção de *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24, o período da emergência e JIs (juvenis infectantes) multiplicados durante o período de 30 dias em cinco temperaturas; avaliar a influência da temperatura na sobrevivência JIs de *Steinernema carpocapsae* IBCB 02 *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 e *Steinernema feltiae* IBCB 47 em condições de armazenamento; avaliar a influência da luminosidade e do substrato na capacidade de infecção de juvenis dos isolados IBCB 06 *Steinernema brazilense*, IBCB 02 *Steinernema carpocapsae*, IBCB 47 *Steinernema feltiae* e IBCB 24 *Heterorhabditis amazonensis* em lagartas de *G. mellonella* e avaliar o uso de diferentes substratos para prolongar a sobrevivência de JIs de *S. brazilense* IBCB 06 e *H. amazonensis* IBCB 24 em condições de armazenamento. O presente estudo foi dividido em cinco capítulos. Após a coleta de dados, as espécies foram identificadas como *H. amazonensis*, *S. rarum*, *M. rainai* e *O. tipulae*. As temperaturas de 26°C e 30°C proporcionaram o menor período de tempo (três dias) para a mortalidade de lagartas de *G. mellonella* causadas por *H. amazonensis*. O menor período de tempo para a

emergência de JIs foi na temperatura 30°C, (9,4 dias). O número médio de JIs produzidos a 26°C (229.563) foi superior a todas as temperaturas estudadas, mas sem diferença estatística quando comparado aos JIs produzidos na temperatura de 30°C (127.157). A temperatura de 22°C (223.886) não diferiu estatisticamente da menor temperatura de 18°C, esta que obteve o menor número de JIs produzidos (11.813). As temperaturas de 18°C e 22°C foram consideradas ideais para a sobrevivência de *S. carpocapsae* IBCB 02, e as temperaturas 18, 22 e 26°C para as populações de *H. amazonensis* IBCB 24 e 14, 18 e 22°C, para *S. feltiae* IBCB 47 permitindo a manutenção da população até 90 dias de armazenamento. As maiores taxas de infecção foram encontradas nos tratamentos areia/luz (95,5 JIs/lagarta) e areia/escuro (68,2 JIs/lagarta) para *S. brazilense* IBCB 06, areia/luz (186,0 JIs/lagarta) para *H. amazonensis* IBCB 24 e para *S. feltiae* IBCB 47 os tratamentos areia/escuro (176,8/JIs/lagarta) e areia/luz (160,8/JIs/lagarta). O melhor substrato para o armazenamento de JIs de *S. brazilense* foi à espuma fenólica Green-up[®] com a taxa de 85,8% de sobrevivência e a vermiculita expandida Dimy[®] 78% de sobrevivência para os JIs de *H. amazonensis* ao longo de 120 dias de armazenamento, e aos 180 dias a sobrevivência dos JIs em ambos os substratos foram de 48,8% e 70,6% respectivamente. Com apenas a vermiculita, a sobrevivência de JIs de *H. amazonensis* IBCB 24 e *S. brazilense* IBCB 06 foram de 62,7% e 5,5% respectivamente, não havendo sobrevivência quando os JIs de ambas as espécies de NEPs foram inoculados diretamente no substrato vermiculita.

Palavras-chave: *Galleria melonella*, desenvolvimento, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, substrato, preservação.

SURVEY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN AGRICULTURAL AREAS AND IT INFLUENCES OF TEMPERATURE AND SUBSTRATES ON SURVIVAL, MULTIPLICATION AND STORAGE. Botucatu, 2015. 153f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Author: ANDRESSA LIMA DE BRIDA

Adviser: SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN

Co-adviser: LUIS GARRIGÓS LEITE

2. SUMMARY

Entomopathogenic nematodes (EPNs) show promising for biological control of pests. The abiotic factors, temperature, soil types and substrates, may influence the survival of infective juveniles storage and field conditions. The objectives of this study were to isolate and identify species of EPNs collected in areas of forestry, annual and fruit crops in Brazil; assess the period of mortality of larvae *Galleria mellonella* after infection of *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24, the emergency period and IJs (infective juveniles) multiplied during the 30-day period in five temperatures; evaluate the influence of temperature on survival IJs of *Steinernema carpocapsae* IBCB 02 *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 and *Steinernema feltiae* IBCB 47 storage conditions; evaluate the influence of light and substrate on juvenile infection capacity of isolates IBCB 06 *Steinernema brazilense*, IBCB 02 *Steinernema carpocapsae*, IBCB 47 *Steinernema feltiae* and IBCB 24 *Heterorhabditis amazonensis* in larvae *G. mellonella* and evaluate the use of different substrates to prolong the survival of IJs of *S. brazilense* IBCB 06 and *H. amazonensis* IBCB 24 storage conditions. This study was divided into five chapters. After collecting data, the species were identified as *H. amazonensis*, *S. rarum*, *M. rainai* and *O. tipulae*. The at temperatures of 26°C and 30°C gave the shortest time period (three days) for the crawler mortality caused by *H. amazonensis* in *G. mellonella*. The shortest duration for emergency IJs was found at 30°C temperature (9.4 days). The average number of IJs produced at 26°C (229.563) was higher at all temperatures studied, but no statistical difference when compared to 30°C IJs produced in the temperature (127.157). The temperature of 22°C (223.886) did not differ statistically from the lower temperature

of 18°C, this that got the fewest of IJs produced (11.813). At temperatures of 18 and 22°C were considered ideal for the survival of *S. carpocapsae* IBCB 02, and the temperatures 18, 22 and 26°C for populations of *H. amazonensis* IBCB 24 and 14, 18 and 22°C, *S. feltiae* IBCB 47 for allowing the maintenance of the population up to 90 days of storage. The highest rates of infection were found in treatments sand / light (95.5 IJs / caterpillar) and sand / dark (68.2 IJs / caterpillar) to *S. brazilense* IBCB 06, sand / light (186.0 IJs / caterpillar) *H. amazonensis* IBCB 24 and *S. feltiae* IBCB 47 treatments sand / dark (176.8 / IJs / caterpillar) and sand / light (160.8 / IJs / caterpillar). The best substrate for the IJs storage *S. brazilense* was the phenolic foam Green-up® with the rate of 85.8% survival and the expanded vermiculite Dimy® 78% survival for IJs *H. amazonensis* over 120 days storage and after 180 days the survival of IJs in both substrates were 48.8% and 70.6% respectively. With only vermiculite, survival IJs of *H. amazonensis* IBCB 24 and *S. brazilense* IBCB 06 were 62.7% and 5.5% respectively, with no survival when IJs of both species of EPNs were inoculated directly into vermiculite substrate.

Key-words: Development, *Galleria mellonella*, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, substrate preservation.

3. INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são considerados organismos exclusivos do solo e podem ser encontrados em todo globo terrestre, seja em áreas agrícolas, florestas, gramados, desertos e praias (GREWAL, 2000). São promissores no controle de pragas, pois possuem adaptação a novos ambientes, capacidade de disseminar-se em busca por hospedeiros e ainda podem ser produzidos em larga escala, aplicados com equipamentos convencionais, apresentam ampla gama de hospedeiros e são inócuos ao ambiente (GREWAL et al., 2001). Além disso, alguns produtos químicos apresentam sinergismo com NEPs possibilitando redução na quantidade de produto aplicado, tempo e custo de aplicação (KOPPENHOFER; KAYA, 1998).

Os NEPs pertencem à ordem Rhabditida e estão reunidos nas famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae. Atualmente são conhecidos três gêneros: *Heterorhabditis* Poinar, 1976, pertencentes à família Heterorhabditidae, e *Steinernema* Travassos, 1927 pertencentes a família Steinernematidae e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, 1994 (BURNELL; STOCK, 2000). Entretanto, os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são os mais intensivamente pesquisados (FERRAZ et al., 2008).

A particularidade dos NEPs é a relação simbiótica e mutualísticas com bactérias entomopatogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* Thomas & Poinar, 1979 e *Photorhabdus* Louis & Kuhl, 1983 (DOLINSKI et al., 2010). Esses nematoides têm a capacidade de localizar e invadir o corpo de insetos hospedeiros e liberar uma bactéria simbiótica que causa a morte por septicemia, dentro de 24 a 48 horas. Os nematoides alimentam-se dessas bactérias e do conteúdo do inseto morto. Com o fim do alimento, os juvenis infectantes (JIs) buscam um novo hospedeiro (CHASTON; GOODRIH-BLAIR,

2010). A rápida mortalidade que a bactéria causa no inseto hospedeiro tem despertado interesse mundial para ser utilizados como biocontroladores de insetos pragas (BOEMARE, 2002).

A ampla distribuição geográfica desses organismos é um indicativo das habilidades genéticas para adaptação e sobrevivência em condições de estresses ambientais, como mudanças na tensão osmótica, temperatura e dessecação do solo, além de serem adaptados coevolutivamente a uma grande diversidade de insetos (FINNEGAN et al., 1999; GLAZER; SALAME, 2000; WOODRING; KAYA, 1988).

A obtenção de NEPs é feita por meio de isolamentos realizados a partir de insetos infectados ou amostras de solo (HOMINICK, 2002). Após o isolamento, é possível identificar isolados ou mesmo novas espécies com maior precisão através de técnicas moleculares (ALBERTS, 1994).

Desde que a utilização de NEPs entrou em uso comercial, para o controle biológico de pragas, o problema da curta vida de prateleira tem inibido a expansão da utilização, entretanto houve progressos nas tecnologias de formulações de NEPs nos últimos 15 anos (HUSSEIN; ABDEL-ATY, 2012).

A produção de NEPs pode ser tanto *in vivo*, que possibilita a produção estável, quanto *in vitro*, com a possibilidade de produção em larga escala, este por sua vez, torna os produtos mais competitivos no mercado (NEVES et al., 1998). No entanto, a sobrevivência dos NEPs ainda tem sido muito discutida, uma vez que em condições de laboratório tem ocorrido alta mortalidade em função do tempo de armazenamento (GLAZER, 2002; ABU HATAB; GAUGLER; EHLERS, 2001), pois a sobrevivência destes nematoides em condições de laboratório é baixa, devido à redução da mobilidade e da infectividade (WESTERMAN, 1999).

Os nematoides dependem de reservas lipídicas para manterem-se vivos e obter energia suficiente para encontrar um novo hospedeiro (VAN GUNDY, 1985). Contudo fatores tais como umidade, dispersão, ambiente, e a elevada sensibilidade a temperaturas pode gerar mortalidade, principalmente quando os NEPs são armazenados por longos períodos (GREWAL et al., 1994; DEL VALLE, 2005).

Desse modo os objetivos do trabalho foram: a) realizar o isolamento e identificação de espécies de NEPs coletadas em áreas de culturas florestais, anuais e frutíferas em diferentes localidades do Brasil; b) Avaliar a mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella*, a emergência e multiplicação dos JIs de *Heterorhabditis*

amazonensis IBCB 24; c) Avaliar o efeito da luminosidade e substrato na infecção por juvenis de *Steinernema carpocapsae* IBCB 02, *Steinernema brazilense* IBCB 06, *Steinernema feltiae* IBCB 47 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 em lagartas de *G. mellonella*; d) Avaliar a influência da temperatura na sobrevivência de JIs de *Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis amazonensis* e *Steinernema feltiae* durante o período de três meses de armazenamento; e) Avaliar o uso de diferentes substratos para prolongar a sobrevivência de JIs de *Steinernema brazilense* e *Heterorhabditis amazonensis* durante o período de armazenamento.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Nematoides entomopatogênicos

Nematoides ou vermes cilíndricos não segmentados pertencem ao Filo Nematoda e estão entre os organismos mais numerosos do planeta (DE LEY, 2006). A ordem Rhabditida compreende famílias de nematoides entomopatogênicos (NEPs) utilizados no controle biológico, de várias espécies de insetos-praga (ALMENARA et al., 2012).

Dentro da ordem Rhabditida, as duas famílias mais utilizadas de NEPs são Steinernematidae e Heterorhabditidae. Atualmente são conhecidos três gêneros de nematoides entomopatogênicos: *Heterorhabditis* Poinar, 1976, *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, 1994 (BURNELL; STOCK, 2000). Entretanto, os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são os mais pesquisados (FERRAZ et al., 2008), e vem sendo utilizados na América do Norte, Europa, Ásia e Austrália para o controle de pragas de solo e de ambientes crípticos (GREWAL; NARDO; AGUILLERA; 2001; LEITE et al., 2006a; NEGRISOLI et al., 2010).

Embora sejam conhecidas mais de 30 famílias de nematoides associados com insetos, apenas nove famílias contêm espécies com potencial para serem usadas como agentes de controle biológico sendo elas: Tetradonematidae, Mermithidae, Steinernematidae, Heterorhabditidae, Phaenopsitylenchidae, Iotonchiidae, Allantonematidae, Parasytylenchidae e Sphaerulariidae (VAN DRIESCHE; BELLOWS JR, 1996).

Os juvenis infectantes (JIs) pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* apresentam associação simbiote com bactérias patogênicas

do gênero *Xenorhabdus* sp. associado a *Steinernema* e *Photorhabdus* sp. a *Heterorhabditis* (POINAR, 1990). Esses dois gêneros de NEPs são cosmopolitas, com ampla distribuição no mundo (HOMINICK, 2002; BURNELL; STOCK, 2000).

O nematoide entomopatogênicos com a maior distribuição mundial é *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) sendo encontrado em mais de 30 países, o segundo é *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) coletado em mais de 25 países, seguido de *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (24 países) e *Heterorhabditis indica* (Poinar; Karunakar; David, 1992) (23 países) (POINAR; KARUNAKAR; DAVID, 1992). *S. feltiae* e *S. carpocapsae* têm sido relatados com frequência em países de clima temperado, enquanto *H. bacteriophora* e *H. indica* em países tropicais e subtropicais (BURNELLI; STOCK, 2000; HOMINICK, 2002).

No Brasil, o primeiro registro de NEPs foi de *Neoaplectana glaseri* (Steiner, 1929) (sinônimo júnior de *Steinernema glaseri*) em ovo de *Migdolus fryanulus* (Coleoptera: Cerambycidae) besouro da cana-de-açúcar, encontrado na Usina Amália em Santa Rosa de Viterbo, no Estado de São Paulo (PIZANO et al., 1985). Além disso, *Heterorhabditis (Rhabditis) hambletoni* (Pereira, 1937) parasitou a broca-da-raiz do algodoeiro *Eutinobothrus brasiliensis* (Hambleton) (PEREIRA, 1937); *Heterorhabditis* sp. foi relatado em citros no Estado de São Paulo (PAIVA; GARCIA; AGUILLERA, 2003) e *Heterorhabditis baujardi* (Phan; Subbotin; Nguyen; Moens, 2003) no Estado de Rondônia (PHAN et al., 2003; DEL VALLE, 2005). *Heterorhabditis amazonensis* (Andaló, 2006) foi descrita no Brasil a partir de isolados de amostras de solos do Estado do Amazonas (ANDALÓ; NGUYEN; MOINO JUNIOR, 2006). *Steinernema brasilense* (Nguyen, 2010) foi descrita em amostras de solo do Estado do Mato Grosso (NGUYEN et al., 2010). *S. brasilense*, *Steinernema diaprepesi* n. sp. *S. glaseri*, *Steinernema rarum* (De Doucet, 1986), *H. amazonensis*, *H. indica*, *Metarhabditis rainai*, *Oscheios tipulae* (Lam & Webster, 1971) foram relatadas em áreas agrícolas e vegetação nativa em diferentes regiões brasileiras (ROSA et al., 2013).

Levantamentos de NEPs têm sido desenvolvidos em diversos países, demonstrando a ampla distribuição geográfica destes organismos, indicativo de possuir habilidades genéticas para se adaptar e sobreviver a estresses ambientais, mudanças na tensão osmótica, temperatura e dessecação do solo, além de serem adaptados coevolutiveamente a uma grande diversidade de insetos (FINNEGAN et al., 1999; GLAZER; SALAME, 2000; WOODRING; KAYA, 1988).

A principal maneira de se isolar um NEP é a partir dos hospedeiros ou do solo em que habitam. Em áreas de cultivo de milho no México e Texas, a espécie *Steinernema riobrave* (Cabanillas; Poinar; Raulston, 1994) foi isolada a partir de pupas da lagarta-da-espiga-do-milho, *Helicoverpa zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera: Noctuidae) e da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera fugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) (RAULSTON et al., 1994). Nas regiões dos Pampas na Argentina, 310 amostras de solo foram coletadas em 14 regiões e as espécies encontradas foram *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *Steinernema scapterisci* (Nguyen; Smart 1990) *H. bacteriophora* e *Heterorhabditis argentinensis* n. sp. (STOCK; KAYA, 1996).

Além dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, outros gêneros com capacidade de se alimentar de insetos, ou mesmo levá-los à morte e são encontrados no solo (TOMAZINI et al., 2013). De maneira geral, os rhabditídeos são reconhecidos como bacteriófagos, encontrados se alimentando de bactérias em cadáveres de insetos (STOCK et al., 2005), entretanto, *M. rainai* foi descrito a partir de espécimes presentes no tubo digestivo de cupins em New Orleans, LA, EUA (isolado LKC20) (CARTA; OSBRINK, 2005). Em 2010, *M. rainai* foi detectado em amostras de solo de cultivo de soja em Araras-SP (TOMAZINI et al., 2013), em 2013, foi detectado em diferentes regiões brasileiras (ROSA et al., 2013).

Outras espécies de *Metarhabditis* têm sido consideradas entomopatogênicas, *Metarhabditis blumi* (Sudhaus, 1974) se mostrou associado às bactérias *Alcaligenes faecalis* (Castellani; Chalmers, 1919) e *Flavobacterium* sp., (Bernardet; Grimont, 1989) e *Providencia vermicola*, que foram capazes de causar a morte de larvas de *Galleria mellonella* (PARK et al., 2011). *Oscheius tipulae*, pode parasitar insetos, e foi encontrado associado às larvas de díptero *Tipula paludosa* (Meigen, 1830) (Tipulidae: Diptera) (BAILE; BARRIERI; FELIX, 2008). Também foi encontrado em área de cana-de-açúcar no município de Rio Verde-GO (ROSA et al., 2013). Amostras deste nematoide podem ser facilmente isoladas de solos em diferentes regiões do mundo possibilitando estudo genético de população e microevolução (FÉLIX, 2008).

O gênero *Oscheius* pertence à família Rhabditidae, do clado Rhabditina que inclui tanto representantes de vida livre, quanto parasitas de vertebrados e invertebrados (PARKISON et al., 2004), tal como a espécie *Oscheios chongmingensis* n. sp. considerada entomopatogênica facultativa (JAROSOVÁ, PUZA; ZUROVCOVÁ,

2015). A simbiose de suas espécies com bactérias, assim como ocorre nos representantes das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, já foi verificada (ANJU et al., 2015).

4.1.1 Ciclo de vida

OS NEPs possuem quatro estádios de desenvolvimento (ovo, J1, J2, J3, J4 e adulto), sendo o modo de reprodução a diferença marcante entre os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* (LEWIS et al., 2006). Esses dois gêneros são encontrados frequentemente no solo ou infectando insetos, em diversas regiões do mundo (HOMINICK, 2002). No solo, esses nematoides são encontrados na fase de juvenis infectivos de terceiro estágio (J3), forma responsável pela busca e infecção do hospedeiro. Nessa fase o nematoide não se alimenta, podendo resistir por um bom tempo às ações do intemperismo (GLAZER, 2002). O juvenil de terceiro estágio (infectante) carrega suas bactérias mutualísticas (*Xenorhabdus* e *Photorhabdus*) no intestino, que são altamente patogênicas a insetos (POINAR; GREWAL, 2012). Ao penetrar em um hospedeiro pelas aberturas naturais, tais como o ânus, boca e espiráculos ou pelo tegumento e invadir a sua hemocele, liberam a bactéria que causa septicemia no inseto entre 24 e 48 horas (FERRAZ, 1998).

Ao penetrarem no hospedeiro os JIs de *Steinernema* sp. passam para o último estágio juvenil (J4) e posteriormente a adultos de primeira geração; machos e fêmeas quando *Steinernema* e adultos hermafroditas quando *Heterorhabditis*. Os adultos formados nas gerações seguintes apresentam cada sexo em indivíduos distintos em ambos os gêneros (ADAMS; NGUYEN, 2002). No interior do hospedeiro, ocorrem de duas a três gerações. Quando as reservas de alimentos se exaurem, os nematoides se desenvolvem em JIs, saem do corpo do inseto e vão para o ambiente em busca de novos hospedeiros (GREWAL et al., 2001). Os nematoides do gênero *Steinernema*, antes de deixarem o cadáver na fase de JI, armazenam as bactérias simbiotes em vesícula especializada. Nematoides do gênero *Heterorhabditis* armazenam as bactérias simbiotes na região anterior do intestino dos JIs, sem a presença de vesícula (ADAMS; NGUYEN, 2002). O ciclo de vida para a maioria das espécies de *Steinernema* e *Heterorhabditis*, da infecção à emergência dos juvenis infectivos, varia de 7 a 10 e 12 a 15 dias, respectivamente, em temperatura ambiente (EHLERS, 2001).

Os NEPs se destacam dos demais agentes de controle microbiano devido ao comportamento de busca pelo hospedeiro, sendo este dependente da espécie de nematoide (RAMOS-RODRIGUEZ; CAMPBELL; RAMASWAMY, 2007), e do seu comportamento de busca. Os NEPS podem ser classificados como “emboscada” ou “busca” (LEWIS; GAUGLER; HARRISON, 1992; LEWIS; GAUGLER; HARRISON, 1993). As espécies “emboscadas” locomovem-se pouco no ambiente e exibem o comportamento de nictação, onde suspendem o corpo sustentando-o sobre a ponta da cauda. Ficando a parte anterior do corpo livre, o nematoide aguarda a aproximação do hospedeiro e ao perceber a proximidade, salta na direção deste (LEWIS et al., 2006).

S. carpocapsae e *Steinernema scapterisci* n. sp. são exemplos de NEPs que fazem nictação (LEWIS; GAUGLER; HARRISON, 1992). Existem indivíduos que são classificados como intermediários, uma vez que podem combinar as duas estratégias, dependendo da proximidade do hospedeiro, intercalando as buscas pelo hospedeiro com paradas para nictar, como é o caso de *S. feltiae* (GREWAL; SELVAN; GAUGLER, 1994). As espécies *H. bacteriophora* Poinar 1976 e *S. glaseri* Steiner 1929 são exemplos típicos de comportamento “busca”, estes nematoides são atraídos por subprodutos das atividades metabólicas do hospedeiro, como a respiração, que ocasiona em diferentes teores de CO₂ deslocando-se por meio da liberação de substâncias voláteis liberados pelos insetos que são respostas aos fatores químico-atraentes (KAYA; GAUGLER, 1993). A utilização da estratégia apropriada de busca do inseto é essencial para o sucesso de encontro com o hospedeiro. Os NEPs com estratégia “busca” apresentam alta probabilidade de sucesso no controle de insetos praga com hábito sedentário ou críptico, que se movem lentamente abaixo da superfície do solo. Em contrapartida, os “emboscada” são mais indicados para o controle de insetos ativos, que se movimentam na região mais superficial do solo (LEWIS, 2002; LEWIS et al., 2006).

4.2 Utilização de NEPs no controle biológico de insetos

A utilização de NEPs no controle biológico vem assumindo maior importância nos programas de manejo integrado de pragas (MIP), devido à intensa busca por uma agricultura sustentável com alta produtividade (PARRA et al., 2002; GAUGLER et al., 2002). Esses agentes são considerados promissores e particularmente efetivos

quando aplicados a insetos que habitam ou cujo estágio larval ocorre no solo (FERRAZ et al., 2008).

Os nematoides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae têm sido considerados bastante promissores (KAYA, 1985), por serem produzidos em larga escala, aplicados com equipamentos convencionais e apresentarem uma ampla gama de hospedeiros e serem inócuos ao ambiente (GREWAL et al., 2001). Existem empresas especializadas na produção massal de NEPs e de formulações prontas para a aplicação destes (LEITE et al., 2006b).

A aplicação de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* em citros na Flórida (EUA) resultou em 70% de supressão da população de *Diaprepes abbreviatus* (L) (Coleoptera: Curculionidae) (SCHROEDER, 1990).

Os nematoides *S. carpocapsae*, *S. glaseri* e *S. bibionis* mostraram eficiência no controle da broca da bananeira, *Cosmopolites sordidus* (Germ.1824) (Coleoptera: Curculionidae) em Porto Rico, tanto em testes de laboratório como em casa de vegetação (FIGUEROA, 1990).

No Hawaii, Lindegren; Valero; Harrison (1990) testaram a supressão em campo de três espécies de mosca-das-frutas (Diptera: Tephritidae) utilizando o nematoide *S. carpocapsae* (Mexican), e obteve 87% de mortalidade no tratamento com 500 juvenis/cm² de solo.

No Brasil, em testes a campo, bons níveis já foram alcançados no controle do moleque-da-bananeira *C. sordidus* mediante aplicação de *S. carpocapsae* (raças All e UK) sobre pseudocaulis partidos, utilizados como “iscas” (SCHMITT; GOWEN; HAGUE, 1992).

Estudos apontam os NEPs sendo eficientes no controle de diferente espécies de cochonilhas *Planococcus* sp. e *Dysmicoccus vachinii* (Miller & Polavarapu) (Hemiptera: Pseudococcidae) (STUART et al., 1997).

Após coleta nos estados de Aragua e Miranda, na Venezuela Rosales; Suarez (1998) realizaram estudos com nematoides entomopatogênicos exóticos *H. bacteriophora* (FRG-1 e HT1); *H. indicus* (FRG-09 e FRG-15); *Steinernema bibionis* (Bovien, 1937) e *S. carpocapsae* e os isolados nativos (HV1, HV2, HV3, HV4, HV5 e HV6) no controle de *C. sordidus*.

S. riobrave foi capaz de causar 50% de redução da sobrevivência de larvas do besouro *Acalymma vittatum* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae),

em condições de campo, tanto em sistema orgânico como em sistema comercial, estes nematoides apresentaram maiores potenciais de controle para esta praga em pepino (ELLERS-KIRK et al., 2000).

Os JIs produzidos *in vivo* e *in vitro* de *S. riobraves* no controle de larvas, em condições de campo, proporcionaram resultados satisfatórios com o uso desse agente, independentemente do modo de produção do entomopatógeno (SHAPIRO; McCOY, 2000). A espécie *S. riobrave* induziu mais de 80% de mortalidade sob larvas de terceiros instar de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera:tephritidae) (GAZIT; ROSSLER; GLASER, 2000).

O nematoide *Heterorhabditis* sp. quando aplicado sobre o solo (teste em condições de laboratório), proporcionou 75% de mortalidade de larvas do curculionídeo-da-raiz do citros *Naupactus* sp. (Coleoptera: Curculionidae) (LEITE et al., 2002). Esse mesmo nematoide proporcionou alto índice de mortalidade (70%) em larvas da mosca-dos-fungos *Bradysia* sp. (Diptera: Sciaridae) (TAVARES et al., 2003).

Estudo com a eficiência de NEPs sobre larvas do crisomelídeo *Luperomorpha suturalis* Chen, 1938 (Coleoptera: Chrysomelidae), uma das principais pragas da cebolinha na China, foram verificadas em condições de laboratório, em que *Steinernema feltiae*, *S. ceratophorum* Jian, Reid e Hunt, 1997 e *S. carpocapsae*, na concentração de 100 JI/inseto, foram patogênicos as larvas e as pupas, com mortalidade entre 55,8% e 97,1% (YANG et al. 2003).

No Brasil, o bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*, (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) é uma praga de importância econômica, controlada com inseticidas em altas doses, atualmente os NEPs são considerados promissores para o controle deste inseto, pois *Steinernema* sp., em um teste em estufa ocasionou 69% de mortalidade das larvas (TAVARES et al., 2003).

A patogenicidade de *S. carpocapsae*, *S. glaseri* e *Heterorhabditis* sp. foram verificadas a larvas do coro-do-trigo *Phyllophaga triticophaga* (Morón & Salvadori, 1998) (Coleoptera: Melolonthidae) após 10 dias de avaliação, *S. glaseri* causou 93,33% de mortalidade e *S. carpocapsae* e *Heterorhabditis* sp. 46,67% e 43,33% (PARON et al., 2003).

Os nematoides *S. glaseri*, *Steinernema arenarium* Artyukhovsky, 1967, *Steinernema abassi* sp. n., *Steinernema bicornutum* sp. n., *S. feltiae*, *S. kraussei*, *S. carpocapsae* e *H. bacterophora* foram patogênicas as larvas da lagarta-da-raiz-do-milho

Diabrotica virgifera virgifera (Leconte, 1968) (Coleoptera: Chrysomelidae), praga da cultura do milho nos EUA. O mesmo estudo demonstrou que em concentração de 7,9 e 15,9 JI/cm² as espécies *S. glaseri*, *S. arenarium*, *S. abassi* e *H. bacteriophora* causaram mortalidade larval superior a 77% (TOEPFER et al., 2005).

Em teste de campo *Heterorhabditis indica* proporcionou 70% de mortalidade em ninfas da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal., 1854) (Hemiptera: Cercopidae) (LEITE et al., 2005). Esta mesma praga *M. fimbriolata* foi suscetível a diferentes espécies de NEPs *Steinernma anomali*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobravis*, *H. amazonensis* RSC5, *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7 (BATISTA et al., 2011a).

Estudos para o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro, *Dysmicoccus texensis* (Tinsley, 1900) (Hemiptera: Pseudococcidae) foram conduzidos por Andaló et al. (2004) e Alves et al. (2009a). Em laboratório os NEPs são virulentos a *D. texensis* e causam altas taxas de mortalidade.

Em experimento de campo na cultura do milho, as espécies *H. bacteriophora*, *H. megidis* e *S. feltiae* sobreviveram no solo após pulverizações e persistiram de 2 a 5 meses no campo, assim as larvas de *D. v. vergifera* podem ser controladas por nematoides durante a estação de cultivo em que foi realizado a aplicação, não apresentando efeito de controle de um ano para o outro (KURTZ et al., 2007).

Rosa et al. (2007), ao avaliarem a suscetibilidade de operários e soldados de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) inoculados com *S. carpocapsae* CBn-23, CBn-10, CBn-09, verificaram a mortalidade 100% dos soldados que foi atingida no 1°, 3°, 7° e 10° dia e os operários após o 4° dia de inoculação.

Os isolados *H. indica* IBCB-n5 e *Steinernema* sp. IBCB-n6 aos serem aplicados sobre larvas de *S. levis* verificaram que *H. indica* IBCB-n5 proporcionou mortalidade de 26, 63 e 95% nas dosagens de 2,4; 12 e 60 JI/ cm² e *Steinernema* sp. IBCB-n6 após o aumento da dosagem a mortalidade foi de 32%, 47% e 42% (TAVARES et al., 2007).

A eficiência de NEPs em condições de casa de vegetação e campo, detectaram que *Heterorhabditis* sp. (isolado JPM3), aplicado pelo método de suspensão aquosa, se mostra eficiente no controle de *D. texensis* (ALVES et al., 2009b).

Bortoluzzi (2009), ao testar *Heterorhabditis* CB 24 e CB 40 contra *C. sordidus* (Germ 1824) verificaram patogenicidade.

S. carpocapsae é uma espécie abundante na América do Norte, sendo utilizada no controle de uma larva de mariposa que ataca culturas de amêndoas. A eficiência obtida foi bastante significativa, atingindo até 78% de morte das larvas e pupas (CHAMBERS et al., 2010).

A mortalidade de pré-pupas do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) em consequência da aplicação em suspensão aquosa de *H. indica*, verificaram taxas de mortalidade de 50% (SILVA et al., 2010).

Os nematoides *H. indica* e *S. feltiae* ao serem testados contra a mosca-dos-fungos *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) (Diptera: Sciaridae) em cultivo protegido de crisântemo *Chrysanthemum* sp. *H. indica*, verificou maior redução na população da mosca-dos-fungos 6% a 67,5% no primeiro ensaio, de 17% a 77,5% no segundo, e de 62,5% a 78,5% no terceiro, quando comparado com *S. feltiae* (TAVARES, 2010).

As maiores mortalidades foram verificadas na maior dose de 400 JI/ml de *S. rarum* quando aplicados em larvas do mosquito *Culex apicinus* (Philippi, 1865) (Diptera: Culicidae) (CAGNOLO; WALTER, 2010).

A eficiência dos NEPs *Steinernema anomali*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. riobrave*, *Heterorhabditis amazonensis* RSC1, *H. amazonensis* RSC5, *Heterorhabditis* sp. JPM3, *H. indica* LPP1 e *Heterorhabditis* sp. não foram verificadas contra (ovos e adultos) da cigarrinha-das-pastagens *Mahanarva spectabilis* (Distant, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) não foram capazes de penetrar em ovos e não ocasionaram a morte de indivíduos adultos (BATISTA et al., 2011b).

Heterorhabditis sp. e *S. carpocapsae* quando aplicados em diferentes níveis de solo, contra larvas de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) verificaram que a aplicação na superfície do solo, por si só ou em combinação, as taxas de mortalidade variaram entre em 26% e 74% (ROHDE et al., 2012).

A eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *S. levis* e *Leucothyreus* sp. (Coleoptera, Scarabaeidae, Rutelinae) em cana-de-açúcar, foram verificadas e *S. brazilense* foi mais eficaz no controle deste inseto, quando comparado com *H. indica*, mas sem diferenças significativas. *S. brazilense* proporcionou 50% de controle das larvas de *Leucothyreus* sp., e os melhores tratamentos para controle deste inseto foram as misturas do nematoide com fipronil (78%) e tiametoxam (83%) (LEITE et al. 2012).

Diferentes isolados de NEPs foram testadas contra pragas de grão armazenadas, e larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) foram altamente suscetíveis a *H. bacteriophora* RS56 e *H. bacteriophora* RS57 com 96% e 94% mortalidade, enquanto as pupas foram altamente sensíveis apenas a *H. bacteriophora* RS33 com 80% de mortalidade. Os adultos do caruncho-de-feijão *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) foram mais suscetíveis à *H. bacteriophora* RS57 68% de mortalidade, já as larvas do Bicho-da-farinha *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) altamente sensíveis a *S. carpocapsae* ALL com 100% de mortalidade. *H. bacteriophora* RS33, RS57 causaram 90% e 80% de mortalidade, respectivamente. *H. bacteriophora* RS72; RS88 causaram grande mortalidade na menor dose ao gorgulho do arroz *Sitophilus oryzae* (Linné, 1763) (Coleoptera: Curculionidae) 26% e 20%, respectivamente e 34% e 28% de mortalidade ao gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae) (NEGRISOLI et al., 2013).

Vieux; Malan (2013) caracterizaram os NEPs como potenciais agentes de controle da cochonilha *Planococcus ficus* (Signoret, 1875), (Hemiptera: Pseudococcidae) importante praga dos vinhedos no Sul da África.

O uso combinado de NEPs e fungos entomopatogênicos, contra *S. levis* e a broca-do-fruto *Conotrachelus humeropictus* (Fielder) (Coleoptera: Curculionidae), verificou que os melhores resultados foram encontrados para os isolados mais virulentos de *Bauveria bassiana*; IBCB 276 e IBCB 165 e *S. brasilense* usados em mistura com suspensão de conídios de *B. bassiana*, isolado IBCB 170; *S. brasilense* com *B. bassiana* IBCB 276 causou efeito aditivo na mortalidade de larvas de *C. humeropictus* (SIMI, 2014).

A patogenicidade e a virulência do isolado de *Heterorhabditis* sp. LPP35 sobre os estádios L3 e L4 de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae) proporcionou mortalidade inferior a 50% nas doses de 10, 20 e 40 JIs por larva, e nas doses de 80 e 100 JIs mortalidade acima de 70%, chegando a 100% de mortalidade na dose de 160 JIs por larva. Em condições de semicampo larvas expostas aos diferentes ambientes e a diferentes volumes dos criadouros tiveram de 27% a 92% de mortalidade e em tanques de bromélias, *Heterorhabditis* sp. LPP35 causou taxa de 24 % de mortalidade em larvas L3 e L4 de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (CARDOSO, 2014).

4.3 Produção de NEPs “*in vivo*” e “*in vitro*”

O uso de NEPs como agentes no controle de inúmeras pragas depende da produção em grande escala. Para isso, a produção de nematoides entomopatogênicos pode ser realizada através de dois métodos de produção massal: *in vivo* ou *in vitro* (meio sólido e líquido) (BARBOSA, 2005).

A produção *in vitro*, consiste no cultivo do nematoide em meio artificial onde é previamente inoculado com a bactéria simbiote, alimentando-se dos componentes do meio e da cultura do microrganismo (LEITE et al., 2011).

Os nematoides entomopatogênicos são criados inicialmente *in vitro* em um meio sólido axênico, e os NEPs desinfestados em um meio monoxênico onde são colocados sobre as bactérias simbiotes. A esterilização superficial dos JIs é insuficiente para estabelecer uma cultura monoxênica porque a bactéria contaminante pode sobreviver abaixo da cutícula. Assim, foi desenvolvido um método em que ovos de nematoides são obtidos da ruptura de fêmeas grávidas em solução alcalina, colocadas em culturas com o simbiote (SHAPIRO; GAUGLER, 2002).

O primeiro sucesso comercial em escala de cultura monoxênica foi desenvolvido por Bedding e ficou conhecido como cultura sólida (BEDDING, 1981; 1984). Nesse método, os nematoides são criados em esponjas de poliéster e poliuretano impregnadas com vísceras de porco e gordura bovina contendo a bactéria simbiote. Esse método produz em torno de $6 \text{ a } 10 \times 10^5$ JIs/g de meio de cultura (BEDDING, 1984) comercialmente utilizado na Austrália, China e Estados Unidos.

Friedman (1990) relatou que o método de cultura sólida é viável economicamente com um nível de produção de aproximadamente 10×10^{12} nematoides/mês. (GREWAL; NARDO; AGUILLERA, 2001). O custo da mão-de-obra aumenta na produção de nematoides neste nível, tornando-se necessário um método mais barato para a produção em larga escala (GREWAL; NARDO; AGUILLERA, 2001). Na produção em meio líquido, a bactéria simbiote é cultivada antes do nematoide. Vários ingredientes da cultura líquida são relatados incluindo farinha de soja, extrato de levedura, óleo de milho e canola, gema de ovo, caseína, peptona, leite em pó, extrato de fígado e colesterol. O tempo de cultura pode variar dependendo do meio e da espécie, variando de três semanas com alcance máximo de produção de duas semanas ou menos. Uma vez a cultura completa, os nematoides podem ser removidos do meio por centrifugação

(SHAPIRO; GAUGLER, 2002).

O desenvolvimento de técnicas de fermentação líquida para a produção em larga escala. Nesse método, o custo de produção diminui com o aumento da capacidade em aproximadamente 50×10^{12} JIs/mês. Esse método permite uma produção de steirnermatódeos em fermentadores de 80 mil litros. Recentes inovações na fermentação dos nematoides e nos processos de formulações do meio resultam na melhoria da qualidade e produtividade dos nematoides (FRIEDMAN, 1990).

A produção atual de *S. carpocapsae* em cultura líquida apresenta uma média de $2,5 \times 10^5$ JIs/g de meio. Além disso, *S. carpocapsae*, *S. riobravis*, *S. scapterisci*, *S. feltiae*, *S. glaseri*, *H. bacteriophora* e *H. megidis* têm sido produzidos em culturas líquidas em larga escala (GREWAL; NARDO; AGUILLERA, 2001).

Tachibana et al. (1996) patentearam o meio para *S. kushidai* contendo amido solúvel, glucose, peptona, extrato de levedura e óleo de milho, demonstrando que a adição de colesterol aumentou a virulência desse nematoide. O meio de cultura líquida para a produção de 1×10^{12} JIs de *S. carpocapsae* custa US\$ 0,8, representando 6,4% dos US\$ 12,38 total do custo de produção (SHAPIRO; GAUGLER, 2002).

A cultura monoxénica em meio líquido em fermentador tem sido o principal alvo na produção em escala comercial para os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*. Entretanto apesar dos aspectos positivos deste sistema que incluem a facilidade de "scale-up" e de "down-stream", a segurança, o controle e a flexibilidade os rendimentos continuaram a serem insatisfatórios (NEVES; ALVES; AGUILLERA, 1998). E pensando-se em uma alternativa com base no conhecimento das propriedades físicas (tamanho, forma e densidade), componentes da fase sólida (nematoide), foi desenvolvido um trabalho de cooperação entre o Centro de Investigação de Recursos Naturais (CIRN) da União dos Açores e o Centro de Engenharia Química (CEQ) da União Minho, um fermentador do tipo "airlift" que consiste na circulação do líquido onde a concentração de fêmeas é elevada permitindo o aumento da taxa de acasalamento com os machos circulantes pelo fermentador, isto pode ser expresso num fator reprodutivo (FR = concentração final/concentração inicial) superior a realidade é que há ainda questões por resolver com grande impacto nos rendimentos finais (NEVES, ALVES; AGUILLERA, 1998).

A título de exemplo, refira-se apenas o processo de “recovery” (retoma do ciclo de desenvolvimento) do estado infectante, porém este processo requer importância, pois reside na influência que exerce sobre a dinâmica populacional, a duração do processo fermentativo e, obviamente sobre o rendimento final. Acontece que a percentagem de “recovery” em cultura *in vitro* é muito baixa, e muito pouco se sabe acerca dos fatores que desencadeiam todo este processo (PACE, 1986; FRIEDMAN et al., 1989). Em grande escala de produção, o uso do meio sólido torna o processo laborioso e vulnerável a contaminações, sendo mais difícil de ser monitorado.

Nas últimas décadas, o progresso bastante significativo na produção de nematoides entomopatogênicos, especialmente "*in vitro*", tem permitido companhias produzirem nematoides eficientes, a custos reduzidos, e dentre os métodos de produção *in vitro* destacam-se os processos da esponja (meio sólido) e de fermentação (meio líquido) os quais podem permitir elevados rendimentos do nematoide (LEITE et al., 2011). Entretanto ao utilizar a esponja para a produção de NEPs, esta, não é biodegradável e, para a comercialização do nematoide, deve ser removida. Portanto, para fins comerciais, a produção de nematoides em meio líquido é mais prática e econômica. O nematoide pode ser colhido sem a necessidade de ser previamente extraído da esponja, e todos os componentes do meio de cultura são biodegradáveis (LEITE et al., 2011).

A produção *in vivo* é uma técnica simples, mas cujo custo de produção pode ser elevado e não permite uma economia de escala. O número de juvenis obtidos depende da suscetibilidade do hospedeiro e também da espécie de nematoide multiplicada (MOLINA; LÓPEZ, 2001).

O inseto mais comumente utilizado em laboratório são as larvas de *Galleria mellonella*, (Lepidoptera: Pyralidae) conhecida como traça-dos-favos. Esta possui alta suscetibilidade à maioria dos nematoides, é de fácil criação pode ser produzida em grande escala e apresenta disponibilidade comercial (BARBOSA, 2005). Muitos pesquisadores (DUTKY; THOMPSON; CANTWEL, 1964; LINDEGREN; VALERO, MACKAY, 1993; FLANDERS; MILLER; SHIELDS, 1996) descrevem métodos para infecção e coleta de nematoides. Esse processo atinge produções entre $0,5 \times 10^5$ e 4×10^5 JIs/lagarta, dependendo da espécie do nematoide entre 100.000 e 300.000 JIs por larva infectada (POINAR, 1990; GREWAL; NARDO; AGUILLERA 2001).

A produção de nematoides *in vivo* é uma indústria artesanal com baixo volume de produção, assim devido ao capital limitado ou à tecnificação da cultura *in*

vitro, fazem necessárias estratégias para a criação de nematoides em insetos hospedeiros. A produção massal *in vivo* depende da avaliação de uma elevada segurança, excepcional suscetibilidade e baixo preço para a criação dos hospedeiros. Embora larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) sejam substancialmente baratas (BLINOVA; IVANOVA, 1987), com raras exceções, *G. mellonella* é a melhor escolha de hospedeiro, apresentando-se como o mais suscetível a várias espécies de nematoides.

Gaugler; Han (2002) relatam que o custo de produção de NEPs *in vivo* foi de menos de um centavo de dólar por lagarta de *G. mellonella* produzindo mais que 1×10^5 JIs, com capacidade de até $3,5 \times 10^5$ JIs/lagarta. Assim, mais de 25 mil lagartas de *G. mellonella* são necessárias para tratar um hectare no padrão de $2,5 \times 10^9$ nematoide por hectare.

Os métodos de produção de NEPs sobre insetos hospedeiros são descritos por vários autores (DUTKY; THOMPSON; CANTWEL, 1964; FLANDERS; MILLER; SHIELDS, 1996; KAYA; STOCK, 1997; LINDEGREN; VALERO; MACKEY, 1993; POINAR, 1979; WOODRING; KAYA, 1988). Todas essas referências descrevem, com alguma variação, um sistema baseado na armadilha de White (WHITE, 1927), a característica da migração natural dos JIs após a emergência do cadáver do hospedeiro.

A produção *in vivo*, baseada na adaptação de Dutky et al. (1964) para armadilha de White, é apropriada para a produção em laboratório e realização de experimentos, sendo ineficiente na produção em larga escala (GAUGLER, 2002). A técnica modificada por Woodring; Kaya (1988) consiste da adição da suspensão de NEPs, cerca de 200 JIs/mL e 1 mL de água destilada, colocada em placas de petri de 9 cm de diâmetro, contendo ao fundo duas folhas de papel filtro. Posteriormente, são colocadas dez lagartas de *G. mellonella*, mantidas em câmara climatizada (B.O.D.) à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $70 \pm 10\%$. Após 5 a 7 dias, os cadáveres das lagartas são transferidos para armadilha de White e os JIs do nematoide coletados diariamente a partir do início da emergência, com reposição de água, com auxílio de uma pisseta.

A suspensão de JIs, posteriormente, deve ser armazenada em geladeira ou câmara climatizada. A técnica armadilha de White, tem como característica a migração natural dos JIs após a emergência do cadáver do hospedeiro (SHAPIRO et al., 2001). Essa armadilha consiste de uma placa na qual os cadáveres são circundados por água, contida em uma placa mais larga ou bandeja. O disco central contendo cadáveres

prove de um substrato úmido para os nematoides se moverem, por exemplo, uma placa de Petri invertida com papel de filtro ou gesso de Paris. A progênie de JIs emerge e migra para a água onde posteriormente é realizada a coleta (SHAPIRO; GAUGLER, 2002). Por razões comerciais, nematoides coletados são concentrados para formulação (DUTKY et al., 1964), sendo obtidos por decantação, levando a períodos muito longos o processos de decantação ser prejudiciais devido a provação de oxigênio (BURMAN; PYE, 1980), este processo pode ser acelerado por filtração a vácuo (LINDEGREN; VALERO; MACKKEY, 1993) e centrifugação (KAYA; STOCK, 1997).

Para a formulação, os NEPs (produzidos *in vivo* ou *in vitro*) podem ser estocados em tanques aerados por mais de três meses (GEORGIS; DUNLOP; GREWAL, 1995), podem ser armazenados em água, esponja, gel, ou em outros substratos inertes, com temperaturas variando de 4°C a 16°C, por 1 a 3 meses. Cada nematoide possui tempo e temperatura ótimos de armazenamento (GREWAL, 2002). A primeira técnica operacional para a produção em massa de nematoides entomopatogênicos ocorreu nos Estados Unidos, com a utilização da espécie *S. carpocapsae*, esta técnica baseia-se no parasitismo de um inseto, *G. mellonella*, pelo nematoide (DUTKY; THOMPSON; CANTWEL, 1964).

4.3.1 Isolamentos de bactérias simbióticas

Nematoides entomopatogênicos apresentam o tipo de simbiose bastante específica: os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são colonizados, exclusivamente, por bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente (WINTER et al., 2012). Essas bactérias simbióticas além de produzirem toxinas para matar os insetos, também produzem antibióticos, que lhes permitem crescer no inseto, livres de outras bactérias e fungos. As bactérias também sintetizam diversas enzimas extracelulares, pigmentos com ou sem bioluminescência e inclusões cristalinas que são de interesse biotecnológico (VOSS et al., 2009). Ambos *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* pertencem à família Enterobacteriaceae Ewing, Farm e Brenner, 1980, dentro da subdivisão da gama de Proteobacteria (BRENNER; FARMER, 2005).

Na multiplicação *in vitro* de nematoides a produção de isolinhas e produção de inoculantes comerciais, são realizadas pela adição das bactérias ao meio de desenvolvimento dos NEPs, servindo de alimento para estes. Para estudos genéticos e

biotecnológicos e para produção *in vitro* de NEPs, as bactérias podem ser isoladas partindo-se de um único JI ou de um grupo de JIs (VOSS et al., 2009).

As bactérias *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. exibem uma fase de variação que afeta as interações com as espécies de nematoide *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* spp. (AKHURST, 1980; AKHURST, 1982). A fase I é realizada naturalmente dentro do juvenil infectivo, proporcionando melhores condições para a reprodução do nematoide no interior do inseto hospedeiro, nesta fase as bactérias produzem uma variedade de antibióticos que inibem a proliferação de outros microorganismos dentro do cadáver do inseto, limitando assim a concorrência por nutrientes (AKHURST, 1982), assim os nematoides se alimentam do inseto e geram subprodutos metabólicos mais adequados para a utilização na reprodução e crescimento quando comparados com os produzidos pelas células na fase II (AKHURST, 1980; AKHURST, 1982). A ocorrência desse fenômeno em bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos sugere fortemente que ela seja um fator significativo na interação nematoide-bactéria por insetos. No entanto, a função na variação de fases nestas bactérias é incerta porque não existe nenhum papel óbvio para a fase II. Há uma preferência das bactérias em realizar a fase I, mas não da fase II, sob *in vivo* as condições dos nematoides envolvidos nestas simbioses sugere que o nematoide é o nicho ecológico para a fase I, mas não necessariamente para fase II (AKHURST, 1980).

As bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* apresentam diferença de conversão fenotípica entre fase I e a fase II. Esta conversão esta atribuída a inversão do material genômico, que afeta a morfologia, motricidade e atividade enzimática (BOEMARE, 2002; GIVAUDAN et al., 1995; SMIGIELSKI; AKHURST; BOEMARE, 1994). Diversas características presentes na fase I como a bioluminescência, motilidade ou a produção de enzimas extracelulares não existem ou se manifestam atenuadamente na fase II (AKHURST, 1980; BOEMARE et al., 1997).

As bactérias na fase I são transportadas de maneira natural pelas formas infectivas (BOEMARE, 2002; SMIGIELSKI; AKHURST; BOEMARE, 1994), na fase II não há capacidade de sustentar-se no crescimento e reprodução dos nematoides a nível de laboratório (AKHURST, 1980; FORST; CLARKE, 2002) devido a esta fase estar relacionado com uma possível forma de resistência da bactéria sobreviver fora do nematoide (SMIGIELSKI; AKHURST; BOEMARE, 1994). Em bactérias do gênero *Xenorhabdus* ocorre dimorfismo denomina como fase I ou primaria, e a fase II denominada

de secundária. Ambas as fases apresentam características morfofisiológicas: na fase I produzem antibióticos (MCINERNEY et al., 1991) absorvendo corantes e desenvolvendo inclusões celulares (KAYA ; GLAUGLER, 1993). Distingue-se das demais na fase II em sua capacidade de suportar a propagação *in vitro* de nematoides (BEDDING; BUTLER, 1994).

A bactéria do gênero *Photorhabdus* apresenta também duas fases distintas chamadas fase I e fase II. As duas fases tem várias diferenças de expressão celular. A fase I ocorre em nematoides em estágios infecciosos, enquanto a fase II ocorre após um crescimento onde é sustentado *in vitro*. A fase I de *Photorhabdus* produz uma protease extracelular, lipase extracelular, substâncias antibióticas e cristais de proteínas intracelulares, enquanto que na fase II, não se produzem estas substâncias. A fase I apresenta a característica notável da bioluminescência. Os cristais de proteínas intracelulares são expressos como resultado dos genes CIPA, *cipB* e que estão presentes no genoma. A fase II não expressam a CIPA ou *luminescens* gene *cipB* (WILLIAMSON; KAYA, 2003).

4.3.2 Manutenção de NEPs pela obtenção de isolinhas

Uma das formas de conservação de NEPs é a produção de isolinhas, pois tem como princípio manter populações de NEPs geneticamente homogêneas, com a menor possibilidade de riscos de alterações de características pelo manuseio e multiplicação. Os isolados de NEPs constituem uma população que pode conter variantes, sujeitas a uma seleção inadvertida, por multiplicações sucessivas ou por alterações ao longo do tempo por adaptação às condições de laboratórios (HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993; WANG; GREWAL, 2002).

Os procedimentos da manutenção de isolinhas baseiam-se em provocar cruzamentos entre NEPs irmãos, e posteriormente são diferenciados conforme o gênero do nematoide, porque o gênero *Heterorhabditis* tem a sua primeira geração de fêmeas hermafroditas, diferenciando-se em machos e fêmeas apenas a partir da segunda geração, enquanto *Steinernema* tem JI anfimítico, levando ao cruzamento de macho e fêmea desde a primeira geração (BAI et al., 2005).

Para obtenção de linhas endogâmicas em *Heterorhabditis* pode-se realizar o isolamento tanto *in vivo* como *in vitro* (BAI et al., 2005). *In vivo*: o procedimento

consiste em infectar o inseto suscetível com apenas um juvenil infectivo do isolado selvagem, coletar os novos JIs produzido de cada cadáver de inseto e reinfetar outros insetos sucessivamente, sempre inoculando apenas um JI por inseto. Com apenas um juvenil torna-se difícil a infecção, diante disto há necessidade de usar vários insetos para garantir que a larva seja infectada. Em torno de passagens por insetos e possível obter-se em torno de 95% de homozigose (BAI et al., 2005). *In vitro*: consiste em colocar um JI esterilizado superficialmente e inoculado em Meio de Crescimento de Nematóide (NGM), inoculando previamente com sua bactéria simbiótica *Photorhabdus* para alimentar o nematóide. Após 72 horas, transferem-se juvenis do quarto estágio ou fêmea virgem, individualmente, para nova placa com meio de cultura. Como são hermafroditas, esses indivíduos se reproduzirão por autofecundação. Recomenda-se repetir essa multiplicação por, pelo menos, sete vezes (GLAZER et al., 1991).

Para obtenção de isolinhas com espécies de *Steinernema* sp., o método consiste na inoculação a partir de um adulto macho e de uma fêmea virgem em meio de cultura, e promover o cruzamento entre os irmãos nas progênes seguintes, como nos procedimentos descritos acima para cruzamentos de *Heterorhabditis in vitro*. A caracterização das isolinhas obtidas com base na homozigose com características recessivas podem se manifestar levando a fenótipos diferenciados. Diante disso devem ser conduzidas diversas linhas de uma mesma população selvagem simultaneamente para então pôder selecionar características de interesse para o controle biológico, como o de sobrevivência em condições adversas (temperatura, raios ultravioleta e dessecação), capacidade infectivas, capacidade de multiplicação e virulência (SHAPIRO-ILAN; GLAZER; SEGAL, 1996).

Uma preocupação na produção de NEPs é a deterioração da linhagem. Quando isolado da natureza é produzido em grande escala e até mesmo criado em laboratório, o agente biológico pode perder características benéficas devido a processos genéticos, como deriva e consanguinidade ou seleção inadvertida (HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993). A redução da qualidade em caracteres como, virulência, tolerância ambiental ou capacidade reprodutiva, é decorrente de repetidas criações (SHAPIRO-ILAN; GLAZER; SEGAL, 1996; STUART; GAUGLER, 1996). A introdução de material genético selvagem (GAUGLER; HAN, 2002; GAUGLER et al., 2000) e a criopreservação de culturas, são métodos utilizados para minimizar estes efeitos (CURRAN; BUTLER, 1992).

4.4 Formulação e armazenamento de NEPs

As formulações à base de nematoides entomopatogênicos incluem diversos fatores, entre eles, a manutenção, a qualidade, a estabilidade de armazenagem, facilidade de transporte, uso e extensão na duração de sobrevivência do nematoide após aplicação. Embora o conceito geral de formulações de nematoides seja semelhante às formulações tradicionais de pesticidas, o desenvolvimento de produtos a base destes agentes apresentam grandes desafios, requisitos como a elevada demanda de oxigênio, umidade, sensibilidade a temperaturas extremas, e comportamento de juvenis infectantes que pode limitar a escolha das formulações (GREWAL, 2002).

Os juvenis de nematoides entomopatogênicos podem ser armazenados durante alguns meses em camadas rasas de água em frascos aerados em temperatura ambiente, no entanto, eles são difíceis de ser manuseados devido à presença de água livre. Algumas formulações foram desenvolvidas para melhorar o armazenamento comercial dos nematoides em que a água livre é absorvida pelo material inerte (NICKLE, 1991).

Os nematoides entomopatogênicos são geralmente formulados em substratos não líquidos ou semi-líquidos logo após serem produzidos (GREWAL, 2002). Entretanto, mesmo com novas formulações desenvolvidas os NEPs podem sofrer a influência na sua qualidade de vida, devido a elevada demanda de oxigênio que contribui para redução de reservas energéticas estocadas em juvenis (GREWAL, 1998), e ainda a ocorrência da sensibilidade que algumas espécies de nematoides apresentam a baixas temperaturas, suscetibilidade a contaminação por microrganismos e toxicidade de agentes antimicrobianos (GREWAL, 2002).

As formas infectivas (JIs) devem alcançar com sucesso o inseto-alvo diante disso é necessário definir uma formulação que permita aplicação rápida, e que apresente boa conservação, e que estes nematoides mantenham-se preservados em armazenamento sem que percam a sua viabilidade (NICKLE, 1991).

Os Neps são usualmente formulados em materiais inertes em sólido ou pastoso, pouco depois de serem preparados (GREWAL, 2002). Algumas formulações são apresentadas em função da dinâmica proporcionada ao nematoide, portanto existem formulações: à base de nematoides em atividade; os que reduzem a mobilidade dos nematoides; e os que colocam os nematoides em anidrobiose (BARBOSA, 2005).

As formulações a base de nematoide em atividade compreendem a utilização de substratos, como a esponja e a vermiculita, estes proporcionam os nematoides a mover-se livremente no interior ou sobre o substrato (GREWAL, 2002). Formulações à base de esponja de poliéster-poliuretano são amplamente utilizados para armazenar e transportar pequenas quantidades de nematoides em indústria caseira dos EUA que atende principalmente aos mercados do gramado casa e jardim. Utiliza-se a aplicação em suspensão aquosa de nematoides em placa com esponja, e usualmente com 500-1000 JIs/cm² de área superficial e podem ser estocados de um a três meses nas temperaturas de 5°C a 10°C (GREWAL, 2002). As formulações à base de vermiculita são misturadas e homogeneizadas junto à suspensão aquosa de nematoides e são colocados em sacos de polietileno e posteriormente acrescentados em tanques de pulverização. A vermiculita é considerada um produto mais concentrado comparado coma esponja, pois promove uma longa estabilidade de estocagem e aplicação mais conveniente (GREWAL, 2002).

Os materiais que reduzem a mobilidade dos nematoides são chamados de “carregadores”, pois imobilizam os JIs, muitas vezes dessecando-os parcialmente, condições estas que acabam por reduzir ainda mais o metabolismo dos nematoides e fazendo que os JIs sobrevivam mais a estresses ambientais. Exemplo de tais formulações incluem alginato, argila, carvão ativado e géis de poliacrilamida são concentrados líquidos que contém inibidores metabólicos (GEORGIS, 1990). As folhas finas de alginato de cálcio são distribuídas por telas de plástico, que têm sido utilizados para prender o nematoide (GEORGIS, 1990). Para a aplicação do nematoide e para que ele seja libertado a partir da matriz de gel de alginato, é necessário realizar o dissolvimento em água com o auxílio de citrato de sódio (GEORGIS, 1990). Formulações com a espécie *S. carpocapsae* a base de alginato foram os primeiros a possuir temperatura ambiente, prazo de validade e levou ao aumento da aceitabilidade de nematoides em alto valor e com nichos de mercado, no entanto devido às demoradas etapas de extração e à disposição problemática de grande número de telas de plástico e recipiente, acabou tornando-se uma formulação inadequada para aplicação em larga escala (GREWAL, 1998). Outra formulação em que o nematoide é misturado em um gel de fluido viscoso ou cola, estes utilizados para reduzir a atividade do nematoide tem sido relatada (GEORGIS, 1990), embora o gel de fluido seja de fácil manuseio no momento da aplicação, os nematoides obtiveram um curto tempo de vida de prateleira quando comparado com aqueles

armazenados em géis de alginato e, por conseguinte, a utilização deste produto foi suspensa (GEORGIS, 1990).

As formulações que induzem os NEPs a sofrerem parcial anidrobiose (quiescência anidrobiótica) são formulações a base de géis, pó e grânulos (WOMERSELY, 1990). As formulações constituídas de nematoides misturados sobre poliacrilamida anidra (gel) promovem ao nematoide pouco dessecação e sobrevivência á temperaturas extremas (BEDDING; BUTLER, 1994), e quando o nematoide é misturado com argila obtém uma parcial dessecação (BEDDING, 1988). A maioria dos produtos a base de NEPs promovem dessecação dos nematoides devido à adição de produtos absorventes, entretanto melhorias nas formulações em pó têm sido desenvolvidas a fim de permitir que os nematoides heterorhabditídeos e steinernematídeos sejam armazenados á temperaturas extremas (GREWAL, 1998).

A utilização de grânulos permite o acesso de oxigênio para os nematoides durante o armazenamento. Em temperaturas ótimas, nematoides entram em estágio parcial de anidrobiose, devido à remoção lenta da água do corpo para a formulação. A indução parcial de anidrobiose é usualmente evidente de quatro a sete dias, reduzindo de três a quatro vezes o consumo de oxigênio de nematoides (GREWAL, 2000). As formulações a base de grânulos dispersivos em água (WG), consiste em misturas de vários tipos de sílica, argilas, celulose, lignina e amido (GEORGIS et al., 1995; SILVER; DUNLOP; GROVE, 1995), já as formulações por meio de grânulos secos, são aqueles onde os nematoides são misturados em farinha de trigo e encapsulados (CAPINEIRA; HIBBARD, 1987), onde previne a migração e a redução do risco de contaminação, porém esta é uma técnica que resulta em uma baixa sobrevivência dos nematoides quando armazenados (CONNICK; NICKLE; VINYARD, 1993).

4.4.1 Fatores que afetam a produção, formulação e armazenamento

Alguns fatores interferem na produção de NEPs, entre eles estão: à escolha do inseto hospedeiro, suscetibilidade, concentração, deterioração de linhagens. Na formulação e armazenamento fatores abióticos como a temperatura, aeração, umidade e o substrato (GREWAL, 2002; BARBOSA, 2005).

A produção *in vivo* depende muito do hospedeiro e da espécie do nematoide. A criação de NEPs em hospedeiros naturais apresenta uma melhor qualidade,

por que o nematoide consegue adaptar-se ao hospedeiro, mas pode perder a eficácia quando aplicado no controle do inseto-alvo em condições de campo (ABU HATAB; GAUGLER, 2001; ABU HATAB et al., 1998; STUART et al., 1997).

O fator suscetibilidade é importante na escolha do hospedeiro. Algumas espécies de insetos cerambicídeos produzem nematoides duas vezes mais do que em larvas de *G. mellonella*, entretanto, a manutenção da criação dos cerambicídeos é difícil, tem alto custo e apresenta baixa infecção (BLINOVA; IVANOVA, 1987). Existem somente dois nematoides que não são produzidos em *G. mellonella*, *Steinernema kushidai* (KAYA; STOCK, 1997; MAMYIA, 1989), que é criado em larvas de besouros da família Scarabaeidae e com nematoides entomopatogênicos *Steinernema scapterisci* sp. n. multiplicados em paquinha *Scapteriscus* sp. (Orthoptera: Gryllotalpidae) (GREWAL; CONVERSE; GEORGIS, 1999; PACE, 1986). As larvas de *G. mellonella* têm sido o hospedeiro mais utilizado, este hospedeiro apresenta alta suscetibilidade e alto espectro de nematoides, proporcionando comercialmente uma produção em grande escala, entretanto outros insetos hospedeiros também podem ser utilizados como a Lagartas-das-maçãs *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) (Lepidoptera: Noctuidae), a traça *Amyelois transitella*, (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae), a falsa medideira *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), a Lagarta-rosada-do-algodão *Pectinophora gossypiella* (Saund, 1844) (Lepidoptera: Gelechiidae), a traça *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), a Lagarta-da-espiga do milho *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) a Mariposa-cigana *Limntria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) o Grilo-doméstico *Acheta domesticus* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Gryllidae) e *T. molitor* (BLINOVA; IVANOVA, 1987; CABANILLAS; RAULSTON, 1994; ELAWAD et al., 2001; GREWAL; CONVERSE; GEORGIS, 1999; LINDEGREN et al., 1979; SHAPIRO; POINAR JUNIOR; LINDEGREN, 1985). *T. molitor* apresenta custo superior comparado com lagartas de *G. mellonella* (BLINOVA; IVANOVA, 1987). Um ciclo de vida curto dentro do hospedeiro pode afetar o custo, permitindo ciclos de produção mais rápidos; recentemente, *S. abbasi* produziu aproximadamente um número equivalente à metade do tempo quando comparado com outros NEPs (3,5 dias) (ELAWAD et al., 2001).

As produções *in vivo* são dependentes da concentração de nematoides (BOFF et al., 2000; ZERVOS; JOHNSON; WEBSTER, 1991). Concentrações muito baixas resultam em baixa mortalidade do hospedeiro e concentrações muito altas

resultam em falhas na infecção devido à competição com invasões secundárias (WOODRING; KAYA, 1988). A otimização da densidade inicial de nematoide dentro do hospedeiro, por exemplo, 100 JIs de *H. bacteriophora* ou *S. carpocapsae* por lagarta de *G. mellonella*, maximiza a sobrevivência e a fecundidade (SELVAN; CAMPBELL; GAUGLER, 1993).

Shamseldean e Atwa (2001) indicaram que diferenças de suscetibilidade entre lagartas de *G. mellonella*, a lagarta da folha do arroz *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera: Noctuidae) e o gafanhoto-do-deserto *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera: Acrididae) devem-se, principalmente, ao nível de resistência contra a taxa de invasão dos nematoides *S. glaseri*, *S. riobravis*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *H. bacteriophora*, *Steinernema* sp. e *Heterorhabditis* spp., mais do que os mecanismos de defesa contra a invasão do nematoide. Em adição, diferenças de produção de JIs foram devido a diferenças entre o tamanho do hospedeiro, comprimento e reservas alimentares. A redução da eficiência da produção também está relacionada com a necessidade de remoção de insetos vivos ou mal infectada, quando promovidos por altas concentrações, devida os nematoides começarem a competir entre si, com invasões secundárias e acabar por não obterem sucesso na infecção do hospedeiro (BOFF et al., 2000; ZERVOS et al., 1991; WOODRING; KAYA, 1988).

Os fatores abióticos, como a temperatura da criação afeta tanto a produção quanto a duração do ciclo de vida. A temperatura próxima do ideal seria aquela relacionada com o clima de origem do nematoide (GREWAL et al., 1994; MOLYNEUX, 1986). As temperaturas ideais já foram determinadas para criação e também o tempo de emergência em *G. mellonella* para 12 espécies e isolados de nematoides, e foi observado que as temperaturas ótimas variam de 18°C a 28°C (GREWAL et al., 1994). A aeração adequada também é um fator imprescindível para o desenvolvimento dos NEPs (BURMAN; PYE, 1980; FRIEDMAN, 1990).

O teor de umidade é outro componente essencial para a produção *in vivo*. Altos teores de umidade devem ser mantidos durante o período de produção. No método de armadilha de White, o substrato deve oferecer umidade constante para se evitar a dessecação do cadáver, a fim de garantir a emergência de JIs, entretanto deve-se evitar o excesso de umidade para não interferir na troca de oxigênio (SHAPIRO; GAUGLER, 2002).

Outra preocupação na produção de NEPs é a deterioração da linhagem. Quando isolado da natureza e produzido em grande escala e até mesmo criado em laboratório, o agente biológico pode perder características benéficas tais como, virulência, tolerância ambiental ou capacidade reprodutiva, devido a processos genéticos como deriva consanguinidade ou seleção inadvertida (HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993).

O nematoide, quando é submetido a estresse promovido seja pela temperatura extrema, privação de oxigênio ou tensão de cisalhamento, pode sofrer influência na sua qualidade provocando a redução no prazo de validade do agente formulado. Os NEPs também são considerados sensíveis ao stress provocados por fermentadores agitadores, pois estes podem afetar a reprodução do nematoide (FRIEDMAN, 1990).

As reservas energéticas que são armazenadas pelos nematoides, como os lipídios constituem cerca de 60% do peso seco de juvenis infectivos considerada como a maior reserva de energia (SELVAN et al., 1993). A quantidade de lipídios varia de acordo com a espécie de nematoides e lotes de produção (GREWAL; GEORGIS, 1998), e ainda o nematoide pode sofrer perda de energia devido a influência ocasionada pelo tipo e pela quantidade de componentes, como os anti-espumantes e pela temperatura e oxigênio dissolvidos durante a fermentação (GREWAL, 2000).

No armazenamento fatores incluindo temperatura, disponibilidade de oxigênio e atividade do nematoide também podem influenciar na taxa de utilização de lipídios afetando, portanto, a sobrevivência (GREWAL; GEORGIS, 1998).

A temperatura é o fator mais importante que afeta a sobrevivência do nematoide na formulação. Cada espécie tem uma temperatura de armazenamento ideal, que é bem abaixo da temperatura ótima para a atividade e reprodução da espécie, refletindo nas condições climáticas de origem. A temperatura ideal para a indução bem-sucedida de anidrobiose também difere com espécies de nematoides. A maioria das espécies pode suportar algum nível de dessecação à sua temperatura ótima de reprodução, mas a dessecação diretamente em temperaturas extremas pode ser letal (GREWAL, 1998). Por exemplo, o armazenamento de *S. riobrave* a 5°C imediatamente após a formulação em grânulos dispersíveis em água, resultou em 100% de mortalidade dentro de 2-3 semanas, quando comparado com os resultados inferiores da mortalidade (20%) na temperatura de 25°C (GREWAL, 1998). A dessecação esta correlacionada com a acumulação de trealose,

durante o pré-acondicionamento ao frio. A acumulação de trealose devido a baixa temperatura parece ser comum entre nematoides entomopatogênicos (OGURA; NAKASHIMA, 1997; QIU; BEDDING, 1999; JAGDALE; GREWAL, 2003) este acúmulo, pode ser um componente da estratégia sobrevivência durante o estresse ambiental (JAGDALE; GREWAL, 2003; GREWAL et al., 2003).

A demonstração da longevidade de juvenis desidratados de *S. carpocapsae* em grânulos dispersíveis em água, foi prorrogado por três meses, em comparação com aqueles armazenados em água a 25°C, enquanto que a longevidade dos juvenis dessecados de *S. riobrave* foi prorrogada apenas por um mês. Essas diferenças na sobrevivência na dessecação podem estar relacionadas com as diferenças na taxa de perda de água por parte dos juvenis infectantes (GREWAL, 1998). A diferença na perda de água entre espécies de *Steinernema* spp. está relacionada á diferenças na estrutura da cutícula (KONDO; ISHIBASHI, 1988), apesar da indução de anidrobiose parcial, os nematoides exigem alta umidade para sobreviver nas formulações. A extensão da longevidade dos juvenis através de anidrobioses é metabolicamente caro. Isto se torna evidente quando a longevidade de nematoides dessecados e não dessecados é comparado á baixas temperaturas.

Na temperatura a 5°C, a longevidade de juvenis dessecados de *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *S. riobrave* em grânulos dispersíveis em água foi menor do que na água (GREWAL, 2000b). Durante a dessecação, o aumento da taxa metabólica do nematoide é acentuada nas primeiras 24h, em seguida, diminui lentamente para um nível abaixo da taxa metabólica normal dentro de 4-7 dias (GREWAL, 2000) fazendo com que glicogênio e as reservas lipídicas sejam convertidos em trealose (WOMERSELY, 1990; SOLOMON et al., 1999), assim após re-hidratação, a trealose é utilizada quer como uma fonte de energia ou convertido de volta para glicogênio. Nematoides entomopatogênicos parecem usar dois métodos diferentes de estratégias de sobrevivência à dessecação: evasão por dessecação e a tolerância, isto gera uma hipótese que pode estar relacionados às estratégias particulares de forrageamento de cada nematoide (GREWAL; JAGDALE, 2001).

O outro fator que também pode interferir na produção de NEPs é a contaminação microbiana, que é considerada um problema significativo em formulações de nematoides com alto teor de umidade. A contaminação microbiana pode esgotar o oxigênio disponível, reduzir dispensabilidade de formulações, causar o entupimento dos

bicos de pulverização, e ainda reduzir a aceitabilidade do produto. Embora os agentes antimicrobianos possam ser utilizados para inibir o crescimento microbiano, estes devem ser cuidadosamente selecionados, pois podem reduzir a sobrevivência de nematoides nas formulações (GREWAL, 2002).

Mesmo sabendo que todas as formulações a base de NEPs necessitam de refrigeração durante a armazenagem e também no transporte, isto gera um alto custo para empresas fornecedoras (GREWAL, 2002), assim as formulações que proporcionem ao nematoide um ambiente de anidrobiose, torna-se um meio importante de alcançar a estabilidade de armazenamento de nematoides entomopatogênicos (GREWAL, 2000).

CAPÍTULO I – “Análise filogenética de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e florestais em diferentes áreas do Brasil”

Revista: Journal of Nematology

Análise filogenética de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e florestais em diferentes áreas do Brasil

Resumo: A identificação de nematoides entomopatogênicos (NEPs) em solos é importante para o relato de espécies da mesofauna e para validar o potencial destes organismos para o controle biológico. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar espécies de NEPs coletadas em áreas de culturas florestais, anuais e frutíferas no Brasil. Assim, amostras de solo foram coletadas e cinco lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) colocadas em cada uma. Os cadáveres das lagartas foram isolados em armadilha de White para a emergência de juvenis infectivos dos NEPs que foram identificados por técnica do código de barras DNA, a partir do sequenciamento da região D2/D3 do 28S (rDNA). As sequências da população FCA 07 foram idênticas com similaridade de 100% às de *Heterorhabditis amazonensis*, enquanto que FCA 01, FCA 04, FCA 06, FCA 08, FCA 15 e FCA 16 foram idênticas entre si e também a sequência de *Metarhabditis rainai* (gi 158821902); e às das FCA 02, FCA 03 e FCA 05 idênticas entre si e à sequência de *Oscheius tipulae* (gi 158821905); as populações FCA 09, FCA 10, FCA 11, FCA 12, FCA 13 e FCA 14 apresentaram sequências com alta similaridade genética (99-100%) com as de *Steinernema rarum* (gi 16269584). Quatro grupos de nematoides entomopatogênicos foram formados, sendo *H. amazonensis*, *S. rarum*, *M. rainai* e *O. tipulae* identificadas.

Palavras-chave: 28S rDNA, caracterização molecular, culturas agrícolas, levantamento, sequenciamento.

Phylogenetic analysis of entomopathogenic nematodes in farm land and forest in different areas in Brazil

Abstract: Identification of entomopathogenic nematodes (EPNs) in soils is important for reporting mesofauna species and to validate the potential of these organisms for biological control. The objective of this study was to isolate and identify species of EPNs collected in areas of forestry, annual and fruit crops in Brazil. The soil samples were collected five larvae of *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) placed in each. The corpses of caterpillars were isolated in trap White for the emergence of infective juveniles of EPNs that were identified by DNA technique, starting from the sequencing of the region D2 / D3 28S (rDNA). The sequences of the population FCA 07 were identical with similarity to 100% of *Heterorhabditis amazonensis*, to the FCA 01 FCA 04 FCA 06, FCA 08, FCA 15 and FCA 16 with each other and identical to the sequence of *Metarhabditis rainai* (gi 158821902); of FCA 02 and FCA 03 and FCA 05 with each other and identical to the sequence of *Oscheius tipulae* (gi 158821905); populations FCA 09 FCA 10 FCA 11 FCA 12 FCA 13 FCA 13 and FCA 14 had sequences with high genetic similarity (99-100%) with the *Steinernema rarum* (gi 16269584). Four groups of entomopathogenic nematodes *H. amazonensis*, *S. rarum*, *M. rainai* and *O. tipulae* identified.

Key words: 28S rDNA, crop raising, entomopathogenic nematode, molecular characterization.

INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) têm ampla distribuição geográfica e capacidade de adaptação e sobrevivência a estresses ambientais como mudanças na tensão osmótica, temperatura e dessecação do solo (Glazer; Salame, 2000). Possuem capacidade matar rapidamente o inseto hospedeiro, devido à associação mutualística com bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (Poinar; Grewal, 2012). A família Steinernematidae apresenta dois gêneros, *Steinernema*, com 151 espécies e *Neosteinernema*, com uma espécie, Heterorhabditidae um gênero, *Heterorhabditis*, com 71 espécies (Adams; Nguyen, 2002; NCBI, 2011).

Os juvenis de terceiro estágio (juvenis infectantes) de NEPs, livres no solo e responsáveis pela infecção do inseto hospedeiro, tem uma bactéria específica no tubo digestivo. Esses microorganismos penetram no corpo do hospedeiro, atingem o hemocelo e liberam a bactéria que leva o inseto a morte, normalmente, entre 24 e 48 horas (Ciche; Ensign, 2003).

Os NEPs são isolados de hospedeiros ou do solo. *Steinernema riobrave* (Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994) foi isolada de pupas da lagarta-da-espiga-do-milho *Helicoverpa zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera: Noctuidae) e da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera fugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivo de milho no México e Estados Unidos da América (EUA) (Raulston et al., 1990). *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955), *Steinernema scapterisci* (Nguyen; Smart 1990), *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) e *Heterorhabditis argentinensis* n. sp. foram isoladas de 310 amostras de solo de 14 regiões dos Pampas na Argentina (Stock; Kaya, 1996).

Steinernema feltiae, *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* e *Heterorhabditis indica* (Poinar, Karunakar & David, 1992) são os nematoides entomopatogênicos com maior distribuição

mundial e encontrados em 30, 25, 24 e 23 países, respectivamente (Poinar et al., 1992). *S. feltiae* e *S. carpocapsae* têm sido relatados, frequentemente, em países de clima temperado e *H. bacteriophora* e *H. indica* em países tropicais e subtropicais (Burnell; Stock, 2000; Hominick, 2002).

No Brasil, o primeiro NEPs registrado foi *Neoaplectana glaseri* Steiner, 1929 (sinônimo júnior de *Steinernema glaseri*) em ovo do bicudo-da-cana-de-açúcar *Migdolus fryanulus* (Westwood) em cana-de-açúcar na Usina Amália em Santa Rosa de Viterbo, Estado de São Paulo (Pizano et al., 1985). *Heterorhabditis (Rhabditis) hambletoni* (Pereira, 1937) foi relatado parasitando broca-da-raiz do algodoeiro *Eutinobothrus brasiliensis* (Pereira, 1937); *Heterorhabditis* sp. em citros no Estado de São Paulo (Paiva et al., 2003) e *Heterorhabditis baujardi* (Phan; Subbotin e Nguyen; Moens, 2003) no Estado de Rondônia (Phan et al., 2003; Valle et al., 2005). *Heterorhabditis amazonensis* (Andaló, 2006) no Estado do Amazonas (Andaló et al., 2006) e *Steinernema brasilense* (Nguyen, 2010) no Estado do Mato Grosso (Nguyen et al., 2010), ambas em amostras de solos.

Os nematoides *H. amazonensis*, *H. indica*, *Oscheios tipulae*, *Oscheios myriophila*, *Metarhabditis rainai*, *S. brasilense*, *Steinernema diaprepesi*, *S. glaseri* e *Steinernema rarum* (Lam; Webster, 1971) foram relatadas em áreas agrícolas e vegetação nativa em diferentes regiões brasileiras (Rosa et al., 2013).

Dessa forma o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar espécies de NEPs coletadas em áreas de culturas florestais, anuais e frutíferas no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo foram coletadas em áreas agrícolas em Barretos, Botucatu, Garça, São Manoel no estado de São Paulo e Palotina no estado do Paraná no período de 2010 a 2013 para isolamento de NEPs.

Trinta e sete amostras foram coletadas em áreas com culturas anuais (soja (*Glycine max* (L.) Merrill), milho (*Zea mays*), aveia (*Avena sativa* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) e arroz irrigado (*Oryza sativa* L.); 20 em áreas com espécies florestais (angico (*Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg.), canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.), mogno africano (*Khaya Ivorensis*), mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla*), seringueira (*Hevea brasiliensis* L.), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), cedro vermelho odorata (*Cedrela odorata* L.), cedro indiano (*Acrocarpus Fraxinifolius*), neem (*Azadirachta indica*), feijó (*Cordia ecalyculata* Vell), guanandi (*Calophyllum brasiliense*) e coração de nego (*Poecilanthe parviflora*) e 97 em áreas com frutíferas (lichia (*Litchi chinensis*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), mexerica (*Citrus reticulata*), pêssigo (*Prunus persica*), pêssigo liso (*Prunus* sp.), goiaba (*Psidium guajava* L. 1753), manga (*Mangifera indica* L.), laranja (*Citrus sinensis* (L.), citros (*Citrus* sp.), framboesa silvestre (*Rubus idaeus*), banana (*Musa* spp.) e café (*Coffea arabica* L.). Além disso, quatro amostras foram obtidas em áreas de mata, uma de pastagem e 42 de solo preparado, totalizando 201 amostras.

Uma amostra do perfil do solo de 0 a 25 cm de profundidade foi retirada de cada ponto de amostragem por área e colocada em saco de polietileno de dois litros de capacidade, etiquetadas, armazenadas em isopor e encaminhado ao Laboratório de Nematologia Agrícola, UNESP/FCA, Botucatu, SP. As coordenadas geográficas de cada amostra foram obtidas com aparelho de GPS Garmin Etrex Vista H 2.8.

No laboratório cada amostra de solo foi acondicionada em frasco de vidro de 250 ml contendo cinco lagartas de quinto ínstar de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). Esses frascos foram fechados e mantidos invertidos na ausência de luz com temperatura ambiente $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Lagartas de *G. mellonella* mortas, após três a sete dias, ou com sintomas de infecção por nematoides foram retiradas dos frascos lavadas

com água destilada e transferidas para armadilhas (White, 1927). Os JIs obtidos foram inoculados em novas lagartas para a multiplicação do isolado, após a emergência dos JIs estes foram coletados em tubo de microcentrifuga com 1,5 ml de solução salina 1M (1,825g de NaCl diluído em 31,25 ml de água destilada) e congelados para extração do DNA e identificação dos NEPs

O DNA genômico de três indivíduos dos isolados de NEPs foi extraído pelo método de Proteinase-K (HLB: Holterman Lysis Buffer) (Holterman et al., 2006). Um total de 25 μ l de solução de lise denominada HLB (Holterman Lysis Buffer)- (proteínase K 800 μ g/ml, β -mercaptoetanol 1% (v/v), NaCl 0,2M e Tris HCl 0,2M pH 8) foi diluído em 25 μ l de água milli-Q totalizando 50 μ l em tubo de microcentrífuga (0,2 ml). Uma gota dessa solução (5 μ l) foi colocada sobre uma lâmina de vidro, onde os nematoides foram seccionados individualmente em três partes e colocados no mesmo tubo de microcentrífuga (0,2 ml). O restante da solução (45 μ l) foi utilizado para a limpeza da lâmina e adicionado ao tubo de microcentrífuga com o nematoide seccionado. As amostras foram levadas a termociclador, incubadas a 65°C por 2 h, a 99°C por cinco minutos e mantidas à -20°C após o resfriamento (Consoli et al., 2012). Os primers universais D2A (5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') e D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') foram utilizados para se amplificar a expansão D2/D3 do 28S rDNA através da PCR (Al-Banna et al., 2004).

Um total de 12,5 μ l de Gotaq Hot Start (Promega, São Paulo, Brasil), com os reagentes necessários para a reação: 5 U/ μ l Taq, 100 μ M de cada NTP e 25 mM MgCl₂, 9,5 μ l de Nuclease Free Water (Promega), 1 μ l e cada primer [10 mM] e 1 μ l de DNA genômico de cada população representativa da espécie alvo e não alvo, totalizando 25 μ l por reação foi adicionado a um tubo de microcentrífuga. Essa mistura foi levada ao termociclador a 94°C por sete minutos; seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos,

55°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos e 72°C por 10 minutos (Mráček et al., 2006). Cinco microlitros do produto da PCR foram utilizados para eletroforese em tampão TAE 1X (Sambrook et al., 1989) em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,02 mg/ml), visualizados e fotografados em transiluminador de luz UV. O resultado da amplificação foi comparado com o marcador de peso molecular VIII. Os fragmentos amplificados da expansão D2/D3 do 28S rDNA foram sequenciados com o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) (Oliveira et al., 2009).

Uma mistura contendo 2µl de reagente Big Dye, 3,2 mmol do primer para o sentido anverso ou para o sentido reverso, 3,0 µl do produto amplificado contendo aproximadamente 400 ng de DNA e 2,0 ml de água foi preparada para o produto final de reação de PCR. A reação para sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems®) com nova purificação do produto amplificado por precipitação com isopropanol em microtubos. As amostras foram desnaturadas a 95°C por três minutos e a eletroforese realizada em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas para identificação de polimorfismo de nucleotídeos com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor. As sequências consenso das populações de NEPs foram comparadas às de outras espécies de nematoides do banco de dados (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov) para a identificação de similaridade genética.

Para a análise filogenética os alinhamentos múltiplos entre as sequências da região D2/D3 dos diferentes isolados foram editados manualmente com o programa BioEdit Sequence Alignment, quando as colunas filogeneticamente não informativas foram excluídas das análises. As análises filogenéticas foram feitas com o programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013) com modelo original de substituição de Hasegawa-Kishino-Yano e as

de bootstrap a partir de 1000 repetições. *Caenorhabditis elegans* (Brenner, 1974), foi selecionada como grupo externo (Wood, 1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação da expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA das populações de NEPs produziu fragmentos de 590 pares de bases (pb), cujas sequências foram depositadas no GenBank com os códigos de acesso KRO11843 a KRO 11858 (Fig. 1).

As sequências da expansão D2/D3 do gene 28S (rDNA) da FCA 07 foram idênticas do isolado *Heterorhabditis amazonensis* do GenBank (número de acesso gi158939138), com similaridade de 100%. As sequências das populações FCA 01, FCA 04, FCA 06, FCA 08, FCA 15 e FCA 16 foram idênticas à de *Metarhabditis rainai* do GenBank (número de acesso gi158821902).

As sequências das populações FCA 02, FCA 03 e FCA 05 foram idênticas a de *Oscheius tipulae* acesso gi 158821905. As populações FCA 09, FCA 10, FCA 11, FCA 12, FCA 13 e FCA 14 apresentaram alta similaridade genética (99-100%) com a de *Steinernema rarum* (acesso gi 16269584). As populações FCA 09, FCA 11 e FCA 12 foram semelhantes entre si, mas diferiram em 3 pb daquelas das FCA 10, FCA 13 e FCA 14.

A árvore filogenética (Fig. 1) foi gerada a partir do alinhamento das 48 sequências da expansão D2/D3 de NEPs (incluindo *Caenorhabditis elegans*, utilizado como grupo externo) mostrou a formação de quatro grupos distintos, *H. amazonensis* (FCA 07), *S. rarum* (FCA 09, FCA 10, FCA 11, FCA 12, FCA 13 e FCA 14), *M. rainai* (FCA 01, FCA 04, FCA 06, FCA 08, FCA 15 e FCA 16) e *O. tipulae* (FCA 02, FCA 03 e FCA 05), confirmando os resultados da identificação molecular.

Os NEPs foram encontrados em dezesseis amostras das 201 coletadas nos estados de

São Paulo e Paraná, correspondendo a 8% de amostras positivas (Fig. 2). Vinte pontos amostrados (35%) em áreas florestais mostraram sete positivas (FCA 04, FCA 05, FCA 06, FCA 07, FCA 08, FCA 10 e FCA 15). *Heterorhabditis amazonensis* foi encontrado em solo argiloso em cultivo florestal de *P. parviflora* em Garça, SP e *S. rarum* em solo argiloso com *Eucalyptus* sp. em Botucatu, SP. Espécies de nematoides de outras famílias, exceto Steinernematidae e Heterorhabditidae, como *M. rainai* foram detectados em solos argilosos em culturas de *A. fraxinifolius*, *C. fissilis*, *C. brasiliense* e *C. ecalyculata* Vell. O nematoide *O. tipulae* foi coletado em solo cultivado com *A. indica*.

Dos 37 pontos amostrados em culturas anuais, três apresentaram nematoides, (8%) com *S. rarum* (FCA 11) detectado em solo arenoso em arroz irrigado em Botucatu, SP e *M. rainai* (FCA 16) e *O. tipulae* (FCA 03) em solos argilosos com soja no município de Palotina, PR.

Entre as frutíferas, de 97 amostras coletadas, seis foram positivas para nematoides (6%) *Steinernema rarum* foi encontrada em solos arenosos cultivados com framboesa silvestre (FCA 12), citros (FCA 13) e manga (FCA 14) em São Manoel, SP. Este nematoide foi encontrado, também, em solos argilosos cultivados com citros, em Botucatu, SP. *M. rainai* (FCA 01) e *O. tipulae* (FCA 02) foram detectados em solos argilosos com citros no município de Botucatu, SP (Tab. 1).

No presente estudo *H. amazonensis* foi encontrado em solo argiloso em cultivo florestal de *P. parviflora* (coração de nego) em Garça, SP. *H. amazonensis*, considerado nativo do Brasil, foi relatado pela primeira vez na cidade de Benjamin Constant, Amazonas em solos de florestas (Andaló et al., 2006) e em solos de florestas no Rio Grande do Sul, (Negrisoli et al., 2010). Esses relatos em áreas florestais mostram a adaptação desse nematoide a altas concentrações de matéria orgânica, decomposição de folhas e umidade, embora também tenha sido isolada e identificada em culturas anuais e perenes (Rosa et al., 2013).

A detecção de *S. rarum* em solo arenoso em cultivo de framboesa silvestre, manga e arroz e em solos argilosos com cultivos de citros e eucalipto confirma a diversidade de habitat desse nematoide (Rosa et al., 2013). Essa espécie foi detectada pela primeira vez em cultivo de oliveira em Rio Cuarto na Província de Córdoba, Argentina (Doucet et al., 2001) e áreas de cultivo de nozes nos estados do Mississippi e Louisiana, EUA, (Nguyen et al., 2006). No Brasil, foi detectada em solos cultivados com tabaco, trigo, milho, soja e em vegetação nativa no Estado do Rio Grande do Sul (Negrison et al., 2010; Rosa et al., 2013). *Steinernema rarum* mostrou tolerância à dessecação e intolerância ao congelamento (Shapiro-Ian et al., 2014), características que podem estar relacionadas à sua adaptação a solos brasileiros.

Oscheius tipulae, detectado em amostras de solos, pode parasitar insetos e foi encontrado associado às larvas de díptero *Tipula paludosa* (Meigen, 1830) (Tipulidae: Diptera) (Baile et al., 2008) e em área de cana-de-açúcar no município de Rio Verde, Goiás (Rosa et al., 2013). Amostras desse nematoide podem ser facilmente isoladas de solos em diferentes regiões do mundo possibilitando estudos genéticos de suas populações e microevolução (Félix, 2008). O gênero *Oscheius* (família Rhabditidae) inclui representantes de vida livre e parasitas de vertebrados e invertebrados (Parkison et al., 2004), como *Oscheios chongmingensis* (Zhang, 2008), considerado entomopatogênica facultativa (Jarošová et al., 2015).

A detecção de *M. rainai* em solos cultivados com frutíferas, culturas anuais e em áreas florestais mostra sua diversidade de habitat. Essa espécie foi relatada em amostras de solo em cultivo de soja em Araras, SP (Tomazini et al., 2013) e em diferentes regiões brasileiras (Rosa et al., 2013). Outras espécies de *Metarhabditis*, como *Metarhabditis blumi* (Sudhaus, 1974) são consideradas entomopatogênicas e associadas às bactérias *Alcaligenes faecalis* (Castellani; Chalmers 1919) *Flavobacterium* sp. (Bernardet & Grimont, 1989) e

Providencia vermicola (Somvanshi et al., 2006) que causaram a morte de lagartas de *G. mellonella* (Park et al., 2011). Outros gêneros, além de *Heterorhabditis* e *Steinernema*, apresentam capacidade de se alimentar de insetos e, mesmo, levá-los à morte (Tomazini et al., 2013). Os rhabditídeos são, normalmente, bacteriófagos encontrados em cadáveres de insetos (Stock et al., 2005), entretanto, *M. rainai* foi descrito a partir de espécimes no intestino de cupins em New Orleans, LA, EUA (isolado LKC20) (Carta; Osbrink, 2005).

O conhecimento da biodiversidade, variabilidade morfológica, molecular e principalmente da patogenicidade de nematoides a insetos são importantes para programas de controle biológico. A comunidade de nematoides parasitas de insetos da mesofauna foi composta por espécies entomopatogênicas das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, como *S. rarum* e *H. amazonensis*, e por outros rhabditídeos como *M. rainai* e *O. tipulae*.

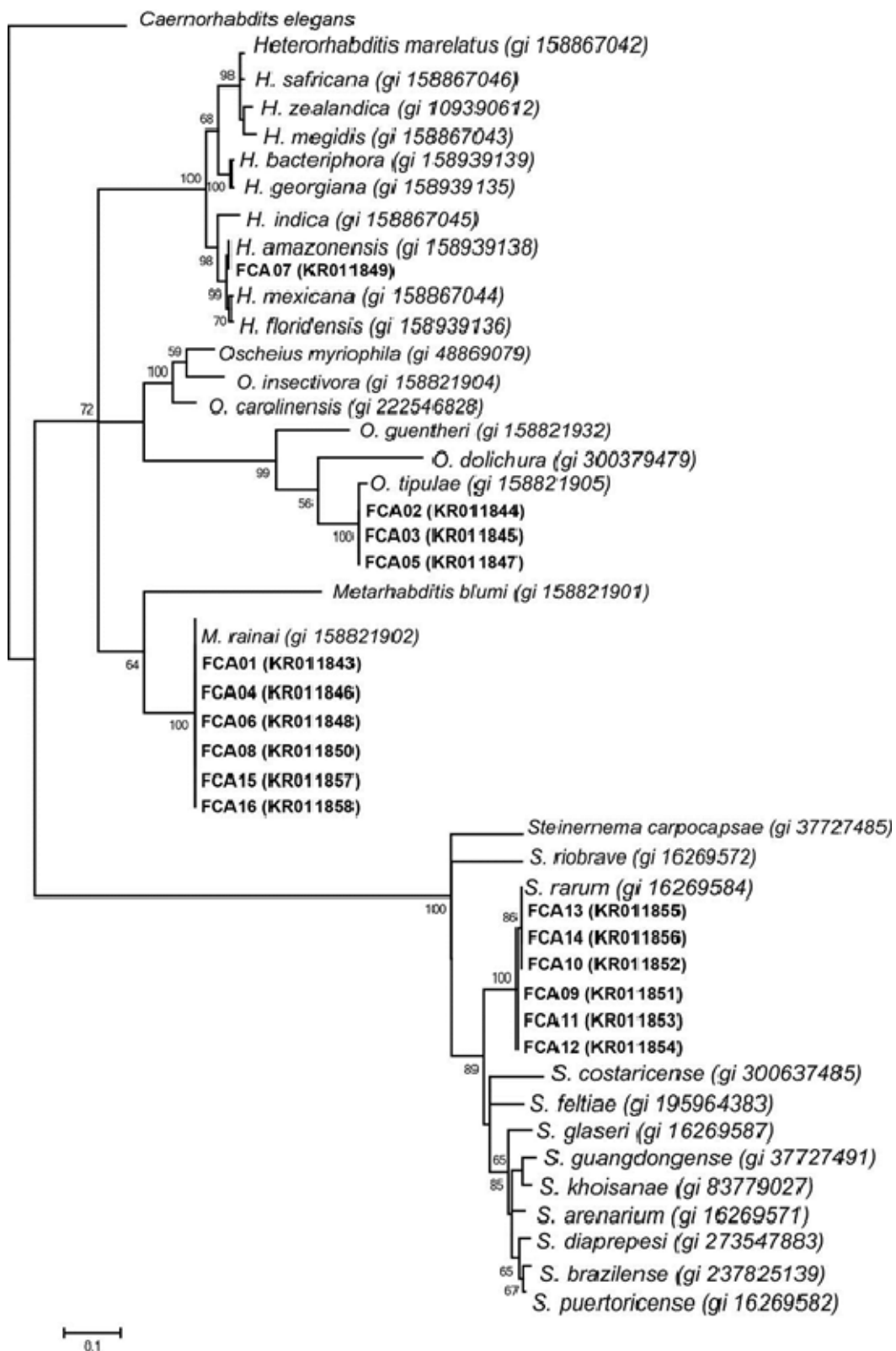


Figura 1. Árvore filogenética mostrando a relação entre os isolados de nematoides entomopatogênicos detectados no estudo e sua similariedade com populações obtidas no

GenBank baseado nas sequências da expansão D2/D3 da região 28S do rDNA.
Caenorhabditis elegans foi utilizado como *outgroup*.

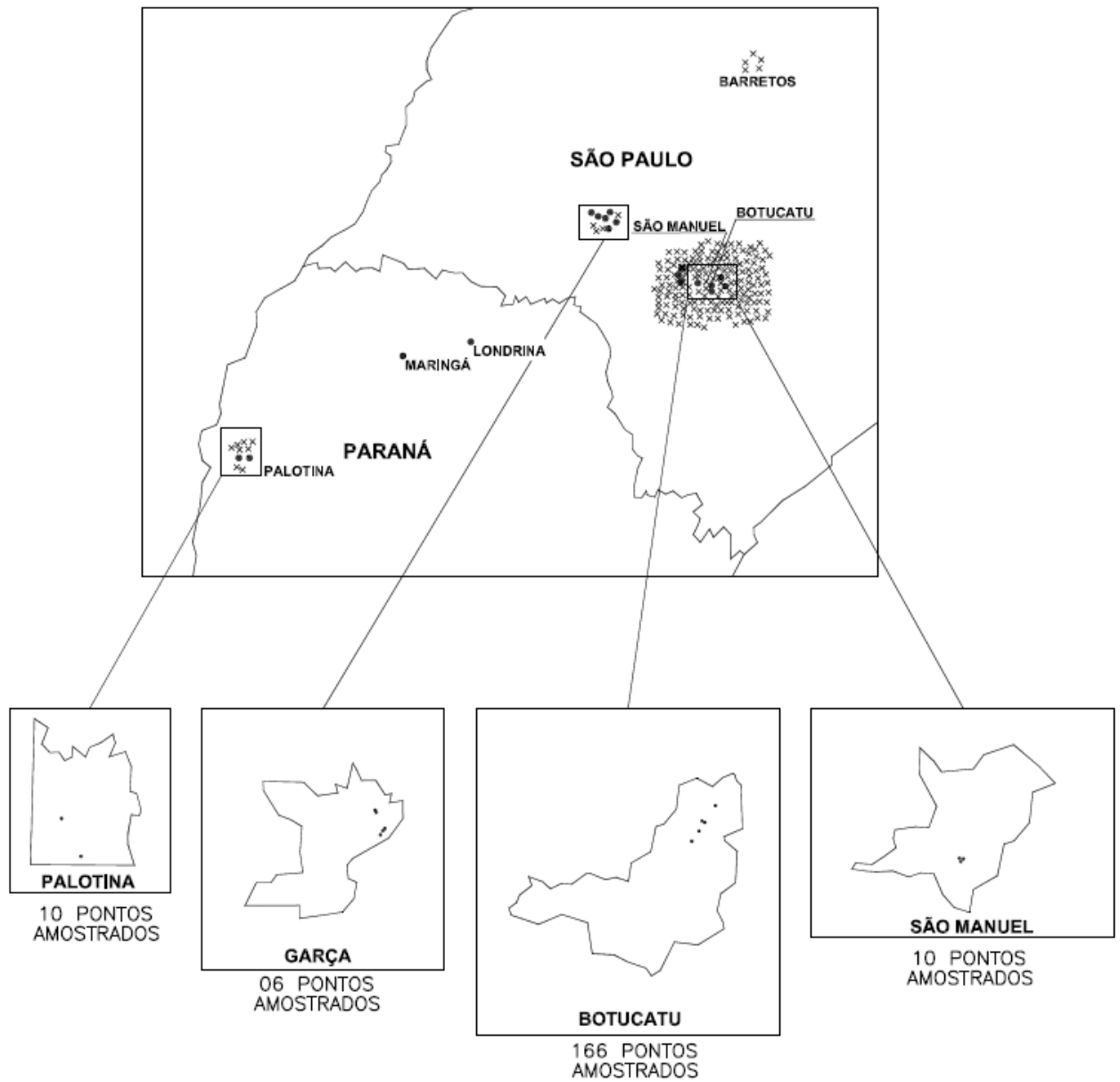


Figura 2. Áreas amostradas para a detecção de nematoides entomopatogênicos nos estados de São Paulo e Paraná, de 2010 a 2013, Brasil.

Tabela 1. Código (Cod.), espécies, local de coleta (Local), tipo de solo (Solo), cultura, coordenadas geográficas (coordenadas) e época de coleta (Época) de nematoides entomopatogênicos (NEPs) em áreas com plantas anuais, florestais e frutíferas de 2010 a 2013. Brasil

Cód.	Espécie	Local	Solo	Cultura	Coordenadas	Época
FCA01	<i>M. rainai</i>	Bo (SP)	Arg	Citros	S773173;W7484343	Out./2011
FCA02	<i>O. tipulae</i>	Bo (SP)	Arg	Citros	S773250;W7484319	Out./2011
FCA03	<i>O. tipulae</i>	Pa (PR)	Arg	Soja	S4172381;W3521906	Jan./2013
FCA04	<i>M. rainai</i>	Ga (SP)	Arg	Ced Ind	S763062;W77469943	Jan./2013
FCA05	<i>O. tipulae</i>	Ga (SP)	Arg	Neem	S640610;W7544268	Jan./2013
FCA06	<i>M. rainai</i>	Ga (SP)	Arg	Ced Odo	S640581;W7544259	Jan./2013
FCA07	<i>H. amazonensis</i>	Ga (SP)	Arg	Cor Negro	S640551;W7544214	Jan./2013
FCA08	<i>M. rainai</i>	Ga (SP)	Arg	Guanandi	S640467;W7544384	Jan./2013
FCA09	<i>S. rarum</i>	Bo (SP)	Arg	Citros	S766468;W7474631	Set./2012
FCA10	<i>S. rarum</i>	Bo (SP)	Arg	Eucalipto	S764574;W7472130	Set./2012
FCA11	<i>S. rarum</i>	Bo (SP)	Are	A. irrigado	S766897;W7474367	Set./2012
FCA12	<i>S. rarum</i>	SM (SP)	Are	Framb Silv	S749498;W7479197	Out./2012
FCA13	<i>S. rarum</i>	SM (SP)	Are	Citros	S749477;W7479125	Out./2012
FCA14	<i>S. rarum</i>	SM (SP)	Are	Manga	S749436;W7479022	Out./2012
FCA15	<i>M. rainai</i>	Ga (SP)	Arg	Feijó	S640534;W7544537	Jan./2013
FCA16	<i>M. rainai</i>	Pa (PR)	Arg	Soja	S4211166;W3491260	Jan./2013

Gênero; *Metarhabditis*, *M. Oscheius*, *O. Heterorhabditis*, *H. Steinernema* S., Local, Botucatu (Bo), Palotina (Pa), Garça (Ga), São Manoel (SM), Tipo de solo, Argiloso (Arg), Arenoso (Are), Outubro (Out), Janeiro (Jan), Setembro (Set), Cultura, Arroz (A), Cedro indiano (Ced Ind), Cedro vermelho odorata (Ced Odo), Coração de Negro (Cor Negro), Framboesa silvestre (Fram Silv), Soja (So).

REFERÊNCIAS

- Andaló, V., Nguyen, K. B., Moino Jr., A. 2006. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology* 8:853-867.
- Al-Banna, L., Ploeg, A. T., Williamson, V. M., Kaloshian, I. 2004. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *Journal of Nematology* 36:142-146.
- Adams, B. J., Nguyen, K. B. 2002. Taxonomy and systematics. Pp. 1-33. In: Gaugler, R. (Ed). *Entomopathogenic Nematology*. UK, Wallingford: CABI Publishing.
- Baille, D., Barriere, A., Felix, M. A. 2008. *Oscheius tipulae*, a widespread hermaphroditic soil nematode, displays a higher genetic diversity and geographical structure than *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Ecology* 17:1523-1534.
- Burnell, A. M., and Stock, S. P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema*, and their bacterial symbionts. Lethal pathogens of insects. *Nematology* 2:31-42.
- Carta, L. K., Osbrink, W. 2005. *Rhabditis rainai* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) associated with the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Nematology* 7:863-879.
- Ciche, T. A., Ensign, J. C. 2003. For the insect pathogen, *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out?. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1890–1897.
- Consoli, E. A., Oliveira, S. A., Harakava, R., Oliveira, C. M. G. 2012. Desenvolvimento de diagnóstico molecular para a identificação de *Pratylenchus jaehni*. *Nematologia Brasileira* 36:62-70.

Doucet, A. M. M., Bertolotti, M. A.; Cagnolo, S. R., Doucet, M. E., Giayetto, A. L. 2001. Consideraciones acerca de nematodos entomófagos (Mermithidae, Heterorhabditidae, Steinernematidae) de la provincia de Córdoba. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias Tomo 66:75-85.

Félix, M. A. 2008. Rna interference in nematode and the chance that favored Sydney Brenner. *Journal of Biology* 7:1-34.

Glazer, I., and Salame, L. 2000. Osmotic survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Biological Control* 18:251-257.

Hominick, W. M., 2002. Biogeography. Pp. 115–14. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Holterman, M., Wurff, A. V. D., Elsen, S. D. V., Megen, H. V., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., Helder, J. 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematode and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular Biology and Evolution* 23:1792-1800.

Jarosová, A., Puza, V., Zurovcová, M. 2015. The complete mitochondrial genome of the facultative entomopathogenic nematode *Oscheius chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae) *Mitochondrial DNA* 11:1-2 (doi:10.3109/19 401736.2015.1007288).

Mráček, Z., Nguyen, K. B., Tailler, P., Boamare, N., Chen, S. 2006. *Steinernema sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, east Tibetan Mts., China. *Journal of Invertebrate Pathology* 93:157-169.

Nguyen, K. B., Shapiro, D. L., Fuxa, J.R., Wood, B.W., Bertolotti, M.A., Adams, B. J. 2006. Taxonomic and biological characterization of *Steinernema rarum* found in the Southeastern United States. *Journal of Nematology* 38:28-40.

Nguyen, B. K., Ginarte, C. M. A., Leite, L. G., Santos, J. M., Harakava, R. 2010. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 103:8-20.

Negrisoni, C. R. C. B., Garcia, M., Dolinski, C., Negrisoni Jr, A. S., Bernardi, D., Santos, F. J. 2010. Survey of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in Rio Grande do Sul, State, Brazil. *Nematologia Brasileira* 34:189-197.

Oliveira, C. M. G., Machado, A. C. Z., Kubo, R. K., Harakava, R. 2009. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. *Nematologia Brasileira* 33:218-225.

Paiva, P. E. B., Garcia, J. F., Aguilera, M. M. 2003. Ocorrência de nematoides entomopatogênico, *Heterorhabditis* Poinar, 1976, em áreas de citros no estado de São Paulo. In: Simpósio de Controle Biológico, Anais, São Pedro 8:93.

Park, H. W., Kim, Y. O., Ha, J. S., Youn, S. H., Kim, H. H., Bilgrami, A. L., Shin, C. S. 2011. Effects of associated bacteria on the pathogenicity and reproduction of the insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida). *Canadian Society of Microbiologists* 57:750-8.

Poinar, G. O., Grewal, P. S. 2012. History of entomopathogenic nematology. *Journal of Nematology* 44:153-161.

- Poinar JR, G. O., Karunakar, G. K., David, H. 1992. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida: Nematoda) from India: Separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. *Fundamental and Applied Nematology* 15:467-472.
- Pizano, M. A., Aguilera, M. M., Monteiro, A. R., Ferroy, L. C. C. B., 1985. Incidência de *Neoaplectana glaseri* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) parasitando ovo de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Col: Cerambycidae). *Reunião da Sociedade Brasileira de Nematologia* 9:1.
- Parkinson, J., Mitreva, M., Whitton, C., Thomson, M., Daub, J., Martin, J., Schmid, R., Hall, N., Barrel, B., Wasterston, R.H., McCarter, J.P., Blaxter, M.L. 2004. A transcriptomic analysis of the phylum nematode. *National of Library Medicine* 36:1259-1267.
- Pereira, C. 1937. *Rhabditis hambletoni* n. sp. nematoide aparentemente semiparasito da “broca do algodoeiro” (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Arquivos do Instituto Biológico* 8:215-230.
- Phan, K. L., Subbotin, S. A., Nguyen, N. C., Moens, M. 2003. *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology* 5:367-382.
- Raulston, J. R., Westbrook, J. K., Loera, J., Pair, S. D., Lingren, P. D., Rummel, D. 1990. Population occurrence of corn earworm *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) populations on corn in the Lower Rio Grande Valley, Uvalde, and Lubbock, Texas. *Southwest. Environ. Entomol* 19:274-280.
- Rosa, J. M. O., Silva, N. R., Turin, A. C., Pietrobon, T. C., Harakava, R., Leite, L. G., Oliveira, C. M. G. 2013. Caracterização de isolados brasileiros de nematoides

entomopatogênicos. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 31, 2013; Cuiabá, MT. Cd-Rom...2013.

Shapiro-Ilan, D. I., Brown, I., Lewis, E. E. 2014. Freezing and desiccation tolerance in entomopathogenic nematodes: Diversity and correlation of traits. *Journal of Nematology* 46:27–34.

Stock, S. P., Kaya, H. K. 1996. A multivariate analysis of morphometric characters of *Heterorhabditis* species (Nemata: Heterorhabditidae) and the role of morphometrics in the taxonomy of species of the genus. *Journal of Parasitology* 82:806-813.

Stock, S. P., Caicedo, A. M., Calatayud, P. A. 2005. *Rhabditis (Oscheius) colombiana* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a necronemic associate of the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) from the Cauca Valley, Colombia. *Nematology* 7: 363-373.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Composition of the electrophoresis buffer. Pp. 66-67. In Ford, N., Nolan, C., Ferguson, M., and Ockler, M. (eds). *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.

Tomazini, D. M., Aguilera, M. M., Rodrigues, R. C. D., Bessi, R., Harakava, R., Oliveira, C. M. G. 2013. Análises biométrica e molecular de isolado brasileiro de *Rhabditis rainai* (Nematoda: Rhabditida). *Nematologia Brasileira* 37:1-2.

NCBI, 2011. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Valle, E. E., Dolinski, C., Souza, R. M., Samuels, R. I. 2005. Evaluation of selection methods for tolerance to high temperatures using *Heterorhabditis baujardi* (Nematoda: Rhabditidae). *Nematologia Brasileira* 2:199-205.

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

Wood, W. B. 1988. Embryology. In: The nematode *Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory: W.B. Wood, ed. 17:215-24.

CAPÍTULO II – “Desenvolvimento de *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabtidae) em diferentes temperaturas”

Revista: Journal of Invertebrate Pathology

Desenvolvimento de *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) em diferentes temperaturas

RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) do gênero *Heterorhabditis* podem controlar insetos pragas. No entanto a temperatura pode afetar processos metabólicos, como a taxa de reservas (lipídios, proteínas e carboidratos), assim comprometendo a capacidade de infecção, desenvolvimento e reprodução desses nematoides no hospedeiro. O objetivo foi avaliar o período de mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) após a infecção de *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24; o período da emergência e a quantidade de JIs multiplicados durante o período de 30 dias em cinco temperaturas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos com oito repetições, totalizando 80 parcelas. A inoculação do nematoide foi realizada em papel filtro (100 JI/ml) em placa de Petri, em seguida, uma lagarta de *G. mellonella* foi liberada. Essas placas foram acondicionadas em BOD nas temperaturas de 14, 18, 22, 26 e 30°C, escuro. Após a mortalidade das lagartas de *G. mellonella*, armadilhas de White foram montadas com os cadáveres e o período para a emergência dos nematoides foi registrado diariamente. O número de juvenis emergidos foi obtido por 30 dias, após o início da emergência dos nematoides. As temperaturas de 26°C e 30°C proporcionaram o menor período de tempo (três dias) para a mortalidade de lagartas de *G. mellonella*. O menor período de tempo para a emergência de JIs foi encontrado na temperatura 30°C, (9,4 dias). O número de JIs emergidos a 26°C (229.563) foi superior as demais temperaturas estudadas, mas sem diferença significativa quando comparado aos JIs emergidos na temperatura de 30°C (127.157). A temperatura de 22°C (223.886) não diferiu significativamente da menor temperatura de 18°C onde se obteve o menor número de JIs emergidos (11.813).

Palavras chave: emergência, *Galleria mellonella*, *Heterorhabditis*, mortalidade, multiplicação, produção *in vivo*.

Development *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) at diferente temperatures

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) of the genus *Heterorhabditis* can control insect pests. However the temperature can affect metabolic processes, such as the rate of reserves (lipids, proteins and carbohydrates), thus compromising the ability of infection, development and reproduction of these nematodes in the host. The objective was to evaluate the larvae mortality period of *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) after infection of *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24; the emergency period, and the amount of IJs multiplied over the 30 day period at five temperatures. The experimental design was completely randomized with 10 treatments with eight replications, totaling 80 plots. The inoculation with nematodes was done on filter paper (100 IJ / ml) in a Petri dish, and then a larvae *G. mellonella* was released. These plates were placed in BOD at temperatures of 14, 18, 22, 26 and 30°C, the dark. After the death of larvae *G. mellonella*, White traps were mounted with the dead caterpillars and the time for the emergence of nematodes was recorded daily. The number of emerged juveniles were obtained daily 30 days after the beginning of the emergence of nematodes. Temperatures of 26°C and 30°C shortest period of time (three days) for the crawler mortality *G. mellonella*. The shortest duration for emergency IJs was found at temperature 30°C (9.4 days). The number of IJs emerged 26°C (229.563) was higher than other temperatures studied, but no significant difference when compared to IJs emerged at a temperature of 30°C (127.157). The temperature of 22°C (223.886) did not differ significantly from the lower temperature of 18°C this that got the fewest emerged IJs (11.813).

Key-words: emergency, *Galleria mellonella*, *Heterorhabditis*, mortality, multiplication, in vivo production.

1. Introdução

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) do gênero *Heterorhabditis* Poinar (Rhabditida: Heterorhabditidae) vivem no solo e são patógenos letais de insetos pragas (Grewal et al., 2005; Campos-Herrera et al., 2012). Estes agentes têm sido amplamente utilizados no controle biológico de pragas em diferentes sistemas de produção agrícola com potencial de ocasionar morte rápida do hospedeiro (Poinar; Grewal, 2012).

O juvenil infectante (JI) vive livremente no solo em busca de um hospedeiro suscetível. O JI pode penetrar no inseto através da boca, ânus e espiráculos e algumas espécies podem penetrar via tegumento liberando bactérias mutualísticas na hemocele (Lewis et al., 2006). Após a penetração no inseto hospedeiro, os nematoides liberam sua bactéria simbiote dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente, em seu intestino, a qual, em combinação com toxinas produzidas pelos nematoides, matam o hospedeiro entre 24 a 48 horas e passam duas ou três gerações dentro de cadáveres do inseto (Chaston; Goodrih-Blair, 2010; Adams; Nguyen, 2002) e posteriormente emergem como JI a procura de novos hospedeiros

Os JIs fora do cadáver do inseto utilizam de diferentes estratégias para localizar o hospedeiro (Ramos-Rodriguez et al., 2007) e de acordo com o seu comportamento (Lewis et al., 2006), podem ser classificados como “emboscada” para espécies de *Steinernema* spp. que locomovem-se pouco no ambiente e aguardam a passagem do hospedeiro exibindo o comportamento de nictação, enquanto, *Heterorhabditis* spp. classificados como “busca”, são atraídos por subprodutos das atividades metabólicas do hospedeiro, por meio da liberação de substâncias voláteis liberados pelos insetos (Lewis et al., 2006).

Espécies de nematoides entomopatogênicos produzidas e vendidas comercialmente (Kaya et al., 2006; Koppenhöfer et al., 2007) para o controle biológico de insetos, passam pelo menos uma fase de vida no solo, sendo seguros para vertebrados e ao meio ambiente e produzidos *in vivo* e *in vitro* (Grewal et al., 2005). A produção desses microorganismos é de aproximadamente, 0,5 a 4 x 10⁵ juvenis infectantes (JI)/larva de inseto e de 6 x 10⁵ a 1 x 10⁶ JI/g de meio artificial (Moino Junior, 2011), mas a produção *in vivo* pode variar com o tipo e tamanho de hospedeiro (Ehlers, 2003).

A produção *in vitro* pode utilizar meio de cultura monoaxênica (meio sólido) em meio líquido e em fermentadores, o principal alvo na produção em escala comercial para as espécies dos gêneros de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Del Valle et al., 2008).

O sucesso de NEPs no controle de pragas agrícolas induz o aumento do número de estudos, especialmente na otimização de condições para infecção e desenvolvimento desses organismos (Waal et al., 2010). As estratégias de sobrevivência de NEPs em condições adversas são pouco conhecidas, mas podem estar relacionadas à permanência do nematoide no solo em estado quiescente, migração; evitando condições adversas ou a permanência no cadáver dos insetos por períodos longos (Glazer, 2002), uma vez que os NEPs podem abrigar-se no cadáver, quando expostos a condições ambientais adversas (Wang et al., 2014).

Diferentes espécies e isolados de NEPs apresentam requisitos térmicos distintos, podendo ter a sobrevivência, reprodução, desenvolvimento e virulência afetados quando expostos a temperaturas extremas (Minas et al., 2011). A temperatura afeta, principalmente, a taxa de utilização de reservas (lipídios, proteínas e carboidratos), (Dunphy; Webster, 1986). Temperaturas superiores a 30°C e inferiores a 15°C podem comprometer o aproveitamento máximo no controle biológico e a capacidade de infecção e persistência dos NEPs no solo (Kaya, 1990).

O impacto da temperatura e substrato de produção *in vivo* são parâmetros que influenciam no período de persistência dos nematoides, na liberação no campo em programas de controle biológico, necessita ser estudados, para melhorar o processo de produção em laboratório e a sobrevivência dos JIs no meio ambiente (Brown; Gaugler, 1997; Wang et al., 2014).

Assim, estudos que abordam o comportamento de NEPs em cadáveres em respostas fisiológicas ao tipo de ambiente aplicado e a sensibilidade à baixa ou a alta temperatura durante o desenvolvimento em cadáveres torna-se necessário. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o período de mortalidade de lagartas de *G. mellonella* após a infecção de *H. amazonensis* e o período da emergência e a quantidade de JIs multiplicados durante o período de 30 dias em diferentes temperaturas.

2. Material e métodos

2.1. Multiplicação do isolado

A espécie de NEPs foi obtida da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos do Banco de Nematoides Entomopatógenos “Oldemar Cardim Abreu” do Instituto Biológico (Goulart et al., 2003).

Os nematoides foram multiplicados em lagartas de quinto instar de *G. mellonella*,

criada em temperatura de 30°C com dieta à base de favo e cera de abelha sem luminosidade. Foram utilizadas cinco lagartas por placas de Petri de $\varnothing=9$ cm com duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5 mL de suspensão com 500 juvenil/placa, disponibilizando 100 juvenil/lagarta para cada espécie separadamente. Essas placas foram lacradas com papel filme PVC e acondicionadas em BOD com temperatura a 25°C (Woodring; Kaya, 1988). Após três dias, as lagartas mortas foram transferidas para armadilha de White (White, 1927) e armazenadas em BOD a 25°C por um período de três a 15 dias. Os JIs que abandonaram os cadáveres foram recolhidos com água destilada, filtrados e decantados para a retirada dos corpos gordurosos dos insetos e quantificados em placas de contagem.

Os tratamentos consistiram do nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 inoculado em *G. mellonella* e uma testemunha (sem nematoide) nas temperaturas de 14, 18, 22, 26 e 30°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 tratamentos e oito repetições, totalizando 80 parcelas. Cada parcela teve uma placa de Petri ($\varnothing=5$ cm) com papel filtro umedecido com 1,5 mL de suspensão contendo 100JI/repetição. As placas da testemunha foram umedecidas com 1,5 mL de água destilada e armazenadas nas temperaturas estudadas. Uma lagarta de *G. mellonella* (quarto ao quinto ínstar) foi pesada (0,10g) e colocada por placa.

A mortalidade de *G. mellonella*, o número de dias de emergência dos JIs e o de JI emergido por *G. mellonella* após 30 dias (taxa de multiplicação) foram avaliados a cada 24 horas. As lagartas de *G. mellonella* mortas foram individualizadas em armadilhas de White (White, 1927) e acondicionadas nas mesmas temperaturas para a avaliação da emergência dos JIs. As suspensões com JIs foram recolhidas no primeiro dia de emergência e as mesmas quantificadas diariamente até 30 dias. Os JIs produzidos foram quantificados com Siracusa graduada, sob microscópio estereoscópio. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) (Holander; Wolfe, 1973) e pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa computacional de estatística BioEstat. versão 5.3.

3. Resultados

3.1. Mortalidade de *G. mellonella*

Houve 100% mortalidade em todas as temperaturas, mas nem todas apresentaram emergência de JIs. Na temperatura de 14°C não houve emergência de JIs, a 18°C e 26°C houve 40% de lagartas com emergência de JIs, a 22°C, 60% e a 30°C, 80%.

O menor período para a mortalidade de lagartas de *G. mellonella* infectadas por *H. amazonensis* foi às temperaturas de 26°C e 30°C, três dias. E a 14°C e 18°C maior período para mortalidade, oito e sete dias ($P=0,001$). A 22°C, a mortalidade teve ocorrência cinco dias após a infecção não diferindo significativamente das demais temperaturas (Tabela 1).

3.2. Multiplicação dos juvenis infectantes (JIs)

A emergência de *H. amazonensis* IBCB 24 em lagartas de *G. mellonella* diferiu entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p<0,05$); (ANOVA, $F_{3;18}=4,3068$; $P<0,05$), que demonstrou uma variabilidade de 50% entre os tratamentos.

O número de JIs emergidos nas temperaturas de 26°C e 30°C não apresentaram diferenças (229.563 e 127.157), assim como as temperaturas de 18°C e 22°C (11.815 e 223.886). Os maiores números de JIs emergidos foram encontrados em lagartas armazenadas nas temperaturas de 22°C, 26°C e 30°C. Não houve emergência de JIs na temperatura de 14°C (Figura 1).

Na presente pesquisa todas as lagartas exibiram sintomas típicos de morte devido à infecção por *Heterorhabditis*, especialmente a vermelhidão da cutícula característica causada pelas bactérias simbióticas do gênero *Photorhabdus* (Boemare, 2002).

4. Discussão

O estudo do comportamento de nematoides entomopatogenicos em diferentes temperaturas deve ser realizado, pois é reconhecido que a temperatura é um fator importante no ciclo de vida destes agentes (Griffin, 1993). Temperaturas podem variar e ter efeitos sobre a viabilidade dos JIs e sua capacidade de se reproduzir, estes efeitos são observados principalmente em temperaturas extremas 0 e 40°C, que são letais (Rohde et al, 2010;. Susurluk; Ehlers, 2008; Morton; Garcia-del -Pino, 2009). Segundo Koppenhöfer e Kaya (1999), temperaturas entre 20°C e 35°C são adequadas para a patogenicidade, infecciosidade e reprodução de nematoides entomopatogênicos.

A temperatura de 14°C, provavelmente seja crítica para o desenvolvimento dos JIs, devido às lagartas apresentarem um maior período de tempo para mortalidade (oito dias) e sem emergência de JIs ao longo de 30 dias. O nematoide *H. amazonensis* é uma espécie que se adapta em temperaturas entre 25 a 27°C (Andaló et al., 2006), portanto houve a infecção pelo nematoide, mais não o seu desenvolvimento no cadáver hospedeiro.

Morton e Garcia-del-Pino (2009) e Saunders e Webster (1999) relatam que em temperaturas abaixo de 15°C a taxa de infecção por NEPs não é considerada boa, enquanto em temperaturas entre 15 e 35°C a infectividade é ideal. Morton e Garcia-del-Pino (2009) citam que para algumas espécies de Heterorhabditidae, as temperaturas de 25°C e ou 30°C são considerados ótimos para o desenvolvimento. A espécie *H. amazonensis* IBCB 24 apresentou a maior infecciosidade a 30°C, com 80% de mortalidade. Yul et al. (2002) observaram que a *Steinernema carpocapsae* foi patogênico a lagartas de *G. mellonella* a 13, 18, 24, 30, e 35°C, com a mortalidade mais elevada a 24°C, com o tempo letal sendo diretamente proporcional ao aumento da temperatura.

Hussaini et al. (2005) observaram um relação direta entre o tempo e a temperatura letal e verificaram que entre 25°C e 32°C, juvenis de *S. carpocapsae* causaram 100% de mortalidade em lagartas de *G. mellonella* e *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Lepidoptera: Noctuidae) a 8°C não houve infecção e 18°C houve uma mortalidade baixa.

Embora cada temperatura possa afetar o percentual de infecção de hospedeiros pelos juvenis infectivos, também pode induzir um impacto diferente sobre o ciclo de vida dentro do hospedeiro (Boff et al, 2001; Susurluk, 2008). O maior período de tempo para a emergência de *H. amazonensis* IBCB 24 foi a 18°C, quando comparado com o período de tempo da temperatura de 30°C. Morton e Garcia-del-Pino (2009) afirmam que a primeira emergência dos nematoides a 20°C ocorre após 20 dias em temperaturas mais baixa, e após 45 dias após a infecção nas temperaturas mais altas, no entanto, embora o aparecimento dos juvenis de *H. amazonensis* tenha sido mais tarde, a 18°C, o número de juvenis recuperados são maiores nas temperaturas de 26°C indicando que esta é a temperatura ótima e favorável para a reprodução e recuperação de JIs, embora não houve diferença com o número de juvenis recuperados a 22 e 30°C. Sáenze e Lopez, (2011), citam que 25°C indica ser uma ótima temperatura para o desenvolvimento de NEPs. Isso é consistente com os resultados de *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1975) e *Steinernema rarum* (Koppenhöfer; Kaya, 1999; Morton; Garcia-del-Pino 2009).

A inconsistência de resultados em relação à temperatura, para diferentes espécies de

Heterorhabditis demonstram que uma única temperatura não pode ser atribuída ao gênero, e que a infectividade de espécies de nematoides pode também depender do tamanho da lagarta, da profundidade do hospedeiro no substrato e do comportamento de busca dos JIs (Boff et al., 2001; Susurluk; Ehlers, 2008). Adams e Nguyen (2002) confirmam o fato de que o ciclo de vida e o número de gerações de um nematoide depender da disponibilidade de alimento e do tamanho de hospedeiro.

A emergência dos JIs nas temperaturas 18, 22, 26 e 30°C caíram drasticamente no décimo dia de emergência. Quando há um longo período de incubação de cadáveres de insetos, há uma redução da emergência de JIs (Koppenhöfer et al., 1995). Segundo Kaya e Stock (1997), a obtenção de adultos de primeira ou segunda geração de heterorhabditis, é realizada de 3 a 4 dias após a infecção para a primeira geração, de 6 a 9 dias para a segunda geração e 15 ou mais para a terceira geração. *H. amazonensis* apresentou um ciclo longo, possivelmente com três gerações, mesmo com um número menor de JIs emergidos a 18°C, a emergência estendeu-se mais que 15 dias chegando aos 30 dias ainda com JIs emergindo dos cadáveres.

Os ciclos de vida de diferentes isolados dependem também da quantidade de inóculo empregado, sendo que lagartas inoculadas com concentração baixa 25JIs/lagarta é uma concentração alta 200 JIs/lagarta apresentam um ciclo de vida longo e curto, respectivamente, resposta possivelmente influenciada pela quantidade de recurso nutricional oferecido pelo hospedeiro (Acevedo et al., 2005). Fato explicado pela intermediária concentração inoculada na presente pesquisa, 100 JIs/lagarta, o que proporciona uma baixa competição entre os juvenis para a infecção e com o ciclo relativamente longo.

Segundo Molina e Lopez (2002) a produção máxima diária de cada espécie de nematoide por hospedeiro apresenta características particulares, a exemplo as produções elevadas de JIs de *H. baujardi* LPP7 com menores doses aplicadas em lagartas de *G. mellonella* (Dolinski et al., 2007). *H. megidis* Poinar, Jackson & Klein, 1987, isolado NLH-E 87.3, teve maior produção de JIs em lagartas de *G. mellonella* na dose de 300 JIs por lagarta e decresceu nas maiores (Boff et al., 2002). No entanto, produções semelhantes foram obtidas com doses entre 20 e 500 JIs em *G. mellonella* para *H. bacteriophora* isolado Oswego, reforçando a importância de se conhecer a melhor dose de infecção para as diferentes espécies de NEPs (Flanders et al., 1996). A

amplitude da temperatura para o aproveitamento máximo das potencialidades dos

nematoides é relativamente estreita, principalmente na capacidade de infecção e persistências no solo que são comprometidas acima de 30°C e abaixo de 15°C (Kaya, 1990). Esse trabalho colabora com informações importantes sobre o comportamento de *H. amazonensis*, com o conhecimento do seu comportamento nas diferentes temperaturas. As temperaturas de 26°C e 30°C neste experimento foram as melhores para a infecção, emergência e multiplicação em lagartas de *G. mellonella*. É provável que a característica climática do biótipo onde um isolado se encontra tem um impacto essencial em sua temperatura ideal de infecciosidade (Mráček et al., 1997; Hazir et al., 2001).

Referências

- Acevedo, M. J. P., Moino Junir, A., Cavalcante, R. S., Dolinski, C., Carvalho, F. A. 2005. Patogenicidade, multiplicação e biologia de isolados nativos de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) provenientes de Lavras, MG. *Nematologia Brasileira*. 29, 25-30.
- Adams, B.J., Nguyen, K. B. 2002. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. New Jersey: Rutgers University. 1-28.
- Andaló, V., Nguyen, K. B., Moino Jr. 2006 *Heterorhabditis amazonensis* n. sp (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology*. 8, 853-867.
- Boff, M. I. C., Van Tol, R. H. W. M., Smits, P. H. 2002. Behavioural response of *Heterorhabditis megidis* towards plant roots and insect lagartae. *Bio control*. 47, 67-8.
- Boff, M. I. C., Smits, P.H. 2001. Effects of density, age and host cues on the dispersal of *Heterorhabditis megidis*. *Biocontrol Science Technology*. 11, 505-514.
- Brown, I. M., Gaugler, R. 1997. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematode. *Nematologica*. 43, 363-375.
- Campos-Herrera, R., El-Borarai, F. E., Duncan, L. W. 2012. Wide interguild relationships among entomopathogenic and free-living nematodes in soil as measured by real time Qpcr. *Journal of Invertebrate Pathology*. 111, 126–135.
- Chaston, J., Goodrich-Blair, H. 2010. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34,41-58.
- Del Valle, E. E, Dolinski, C., Souza, R. M. 2008. Dispersal of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied to the soil as infected host cadavers. *International Journal of Pest Management*. 54, 115-122.
- Dolinski, C., Del Valle, E.E., Burla, R.S, Machado, I.R. 2007. Biological traits of two native brazilian entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematol Brasileira*. 31, 180-185.

- Dunphy, G.B., Webster, J. M. 1986. Temperature effects on the growth and virulence of *Steinernema feltiae* strains and *Heterorhabditis heliothidis*. *Journal Nematol.* 18, 270-272.
- Ehlers, R. U. 2003. Biocontrol nematodes. In: Hokkanen HMT, Hajek AE (eds) *Environmental impacts of microbial insecticides*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 177–220.
- Flanders, K.L., Miller, J.M., Shields, E. J. 1996. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* Oswego (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *Journal of Economic Entomology.* 89, 373-380.
- Goulart, R. M.; Tavares, F. M.; Leite, L. G.; Machado, L. A.; Batista Filho, A.; Almeida, J. E. M. 2003. Formação de um banco de nematoides entomopatogênicos no Instituto Biológico, SP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Resumos... São Pedro, 83.
- Glazer, I. 2002. Survival biology. 205-220p. In Gaugler R (ed) *Entomopathogenic nematology*. Wallingford, CABI Publishing UK, 400p.
- Grewal, P. S., Ehlers, R.U., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), 2005. *Nematodes as Biocontrol Agents*. CABI, New York, NY.
- Griffin, C. T. 1993. Temperature responses of entomopathogenic nematodes: implication for the success of biological control programmers. In: BEDDING, R., AKHURST, R. and KAYA, H. (Eds) *Nematodes and the biological control of insect pests*. EastMelbourne Victoria 3002. 115-126.
- Hazir, S., Stock, S. P., Kaya, H. K., Koppenhöfer, A. M., Keskin, N. 2001. Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *J Invertebr Pathol.* 77, 243-250.
- Hussaini, S. S., Shakeela, V., Dar, M. H. 2005. Influence of temperature on infectivity of entomopathogenic nematodes against black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel and greater wax moth, *Galleria mellonella* (Linnaeus) larvae. *J Biol Control.* 19, 51-57.
- Hollander, M., Wolfe, D. A. 1973. *Nonparametric statistical methods*. Chichester & New York, USA, John Wiley & Sons, 503p.
- Kaya, H. K., Stock, S. P. 1997. Techniques in insect nematology, in: L.A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in insect pathology*, Academic Press, San Diego, CA. 281–324.
- Koppenhofer, A.M., Kaya, H.K., Taormino, S. P., 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 193–199.
- Koppenhofer, A.M., Kaya, H.K., 1999. Ecological characterization of *Steinernema rarum*. *J. Invertebr. Pathol.* 73, 120–128.

- Koppenhöfer, A.M., Grewal, P.S., Fuzy, E.M., 2007. Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into four white grub species. *J. Invertebr. Pathol.* 35, 128–139.
- Kaya, H.K., 1990. Soil ecology. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. 93–116.
- Kaya, H. K., Aguilera, M. M., Alumai, A., Choo, H.Y., de la Torre, M., Fodor, A., Ganguly, S., Hazir, S., Lakatos, T., Pye, A., Wilson, M., Yamanaka, S., Yang, H., Ehlers, R.-U., 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biol. Control.* 38, 134–155.
- Lewis, E. E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., Peters, A., 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biol. Control.* 38, 66–79.
- Moino Jr, A. Preservação da viabilidade e infectividade de nematoides entomopatogênicos em condições de armazenamento comercial. 2011. 12º SICONBIOL, Simpósio de Controle Biológico “Mudanças climáticas e sustentabilidade: quebra de paradigmas”. 21p.
- Molina, J.P., López, J. C. 2002. Desplazamiento y parasitismo de los entomonematodos *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) y *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) hacia frutos infestados con la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología.* 28, 63-69.
- Minas, R.S., Burla, R.S., Machado, I.R., Robaina, R.R., Dolinski, C.M., Souza, R.M. Influência da concentração do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis baujardi* LPP7 na mortalidade de pupas de *Ceratitis Capitata*. 2011. Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, Iniciação científica, Campos de Goytacazes, Rio de Janeiro.
- Morton, A., Garcia-Del-Pino, F. 2009. Ecological characterization of entomopathogenic nematodos isolated in stone fruit orchard soils of Mediterranean areas, *J. Invert. Pathol.* 102, 203-213.
- Mrac̆ek, Z., Bec̆var̆, S., R̆ezac̆, P., Kindlmann, P., Webster, J.M., 1997. Canadian Steinernematid (Nematoda) isolates and their infectivity, under cold conditions, to greater wax moth (*Galleria mellonella*) larvae. *Biol. Control.* 8, 160–164.
- Poinar, G. O., Grewal, P. S. 2012. History of entomopathogenic nematology. *Journal of Nematology.* 44, 153-161.
- Rohde, C., Moino Jr. A., Silva, M.A.T., Carvalho, F. D., Ferreira, C. S. 2010. Influence of soil temperature and moisture on the infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against lagartae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology.* 39, 608-611.

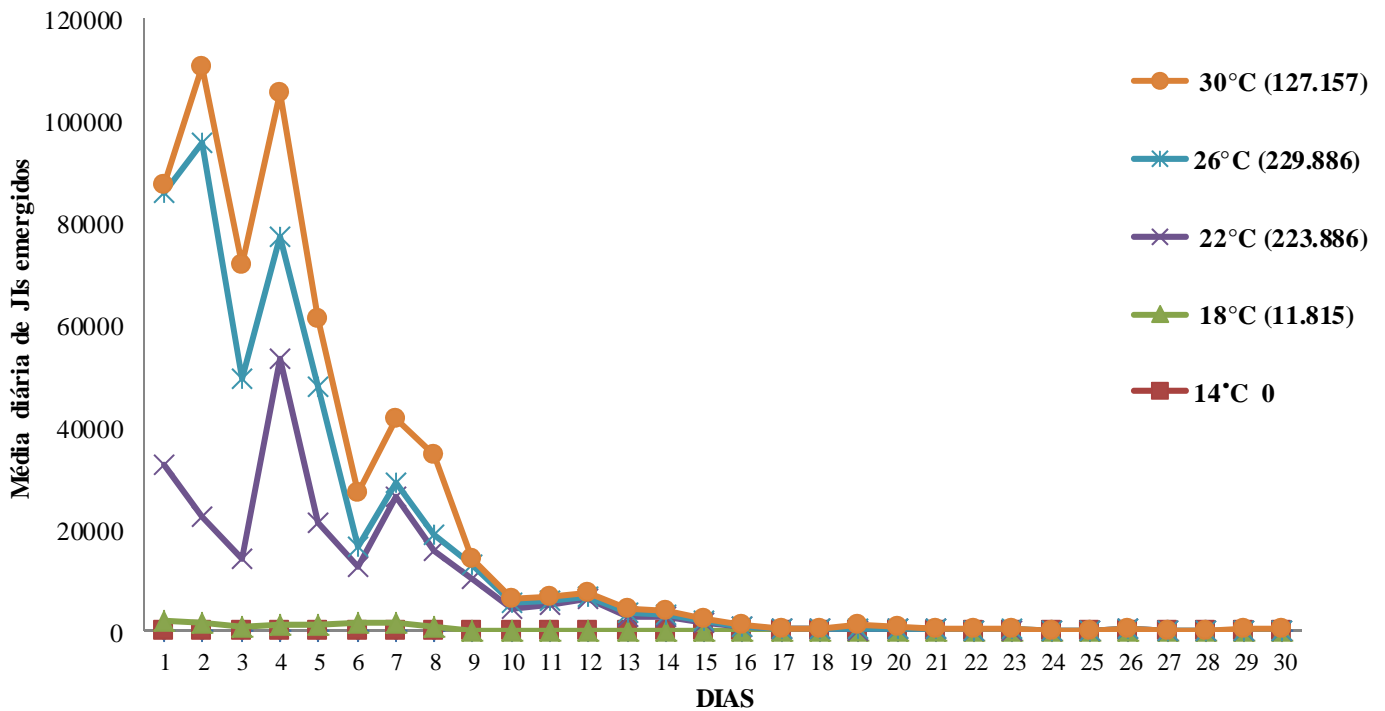
- Ramos-Rodríguez, O., Campbell, J. F., Ramaswamy, S. B. 2007. Efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* against the stored-product insect pests *Tribolium castaneum* and *Plodia interpunctella*. *Biol. Control*. 40, 15–21.
- Susurluck, A., Ehlers, R. U. 2008. Field persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophaga* in different crop. *Biocontrol*. 53, 627-641.
- Saunders, J. E., Webster, J. M. 1999. Temperature Effects on *Heterorhabditis megidis* and *Steinernema carpocapsae* infectivity to *Galleria mellonella*. *Journal of Nematology*. 31, 299-304.
- Sáenze, A., López, J. C. 2011. Ciclo de vida y patogenicidad de un aislamiento nativo de *Heterorhabditis* sp., (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 37, 43-47.
- Wang, X., Wang, H., Feng, Q. Z., Cui, X. Y., Liu, R. Y., Sun, Y. B., Li, G. C., Song, D. M., Liu, W., Ruan, W. B., Harvey, J. 2014. Desiccation and cold storage of *Galleria mellonella* cadavers and effects on *in vivo* production of *Steinernema carpocapsae*. *Pest Manag Sci*. 70, 895–904.
- Waal J.Y., Malan, A.P., Levings, J., Addison, M. F. 2010. Key elements in the successful control of diapausing codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in wooden fruit bins with a South African isolate of *Heterorhabditis zealandica* (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Biocontrol Sci Technol*. 20, 489–502.
- Woodring, J. L., and Kaya, H. K. 1988. “*Steinernematid* and *Heterorhabditid* Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques.” Southern Cooperative Series Bulletin 331, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AR.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode lagartae from cultures. *Science*. 66, 302-303.
- Yul, C., Wonn, L., Sook, Y., Myeong, L., Thi, H. 2002. Effects of temperature and nematodes concentration on pathogenicity and reproduction of entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Pocheon strain (Nematode: Steinernematidae). *Korean J Appl Entomol* 41: 269-277.

Tabela 1

Período de mortalidade (dias) de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) após infecção por *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 e período para emergência (dias) de juvenis infectivos em diferentes temperaturas.

T °C	Mortalidade (dias)	Emergência (dias)
14	8,0 [6,8-8,0] b	---
18	7,0 [5,0-7,2] b	24,7 ± 2,8 c (4)
22	5,0 [5,0-8,0] ab	15,7 ± 4,2 b (6)
26	3,0 [3,0-5,0] a	12,0 ± 0,0 bc (4)
30	3,0 [3,0-4,0] a	9,4 ± 2,8 a (8)
P	0,001	<0,001

* Médias seguidas de mesma letra minúscula por coluna não diferem pelo teste de Kruskal Wallis ($P > 0,05$).



Tukey: ($p < 0,05$); (ANOVA, $F_{3,18}=4,3068$; $P < 0,05$)

Figura 1. Média diária de juvenis infectivos (JIs) de *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 emergidos por lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) em cinco temperaturas durante 30 dias.

CAPÍTULO III – “Influência da temperatura na sobrevivência de nematoides entomopatogênicos”

Revista: Journal of Invertebrate Pathology

Influência da temperatura na sobrevivência de nematoides entomopatogênicos

RESUMO

Nematoides entomopatogênicos são utilizados no controle biológico de insetos, entretanto fatores abióticos como a temperatura podem influenciar na sobrevivência de juvenis infectantes quando armazenados. Com isso o objetivo foi avaliar a influência da temperatura na sobrevivência de juvenis infectantes (JIs) de três espécies de nematoides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae* IBCB 02, *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 e *Steinernema feltiae* IBCB 47 durante o período de três meses de armazenamento. As populações de cada espécie de NEPs foram acondicionadas em recipientes de polietileno transparente de 500 mL e a concentração utilizada de cada população foi ajustada para 100JI/ml/espécie. Após a inoculação, os recipientes foram armazenados em BOD em temperaturas de 14, 18, 22, 26 e 30°C. A sobrevivência dos juvenis foi verificada aos 5, 10, 15, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI), com a retirada de 1 mL da suspensão para a contagem de juvenis vivos e mortos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 30 tratamentos e quatro repetições totalizando 120 parcelas por espécie de NEPs. Os resultados demonstram que as temperaturas de 18 e 22°C foram ideais para a sobrevivência de *S. carpocapsae* IBCB 02, as temperaturas de 18, 22 e 26°C para as populações de *H. amazonensis* IBCB 24 e 14, 18 e 22°C, para *S. feltiae* IBCB 47 permitindo a manutenção da população até 90 dias de armazenamento.

Palavras chave: armazenamento, *Heterorhabditidae*, *Steinernematidae*, viabilidade.

Temperature influence on nematodes survival entomopathogenic

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes are used in the biological control of insects, however, abiotic factors such as temperature may influence the survival of infective juveniles when stored. With that the objective was to evaluate the influence of temperature on survival of infective juveniles (IJs) of three species of entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* IBCB 02, *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 and *Steinernema feltiae* IBCB 47, during three months of storage. The populations of each class of EPNs were placed in polyethylene containers of 500 mL and the concentration used for each population was adjusted to 100 IJ /ml/ species. After inoculation, the containers were stored in BOD at temperatures of 14, 18, 22, 26 and 30°C. The survival of juveniles has been verified to the 5, 10, 15, 30, 60 and 90 days after inoculation (DAI), with the removal of 1 ml suspension for live juvenile counts and dead. The results demonstrate that the temperatures of 18 and 22°C considered optimal for the survival of *S. carpocapsae* IBCB 02, temperatures of 18, 22 and 26°C for populations of *H. amazonensis* IBCB 24 and 14, 18 and 22°C to *S. feltiae* IBCB 47 allowing the maintenance of the population up to 90 days of storage

Keywords: *Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*, storage, viability.

1. Introdução

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Heterorhabditis* Poinar e *Steinernema* Travassos são considerados ótimos agentes de controle biológico de pragas (Ali; Wharton, 2013). Os juvenis de terceiro estágio (infectantes) não se alimentam e carregam bactérias mutualísticas específicas no intestino. Quando penetra no inseto, libera essas bactérias na hemocele, ocasionando a morte do inseto num período entre 24-48 horas. Esse se alimenta da bactéria e do tecido hospedeiro. Reproduzem-se por duas a três gerações, o juvenil emerge dos cadáveres a procura de novos hospedeiros (Poinar; Grewal, 2012).

Nematoides entomopatogênicos apresentam o tipo de simbiose bastante específica: os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são colonizados, exclusivamente, por bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente (Winter et al., 2012). Essas bactérias mutualísticas além de produzirem toxinas para matar os insetos, também produzem antibióticos, que lhes permitem crescerem no inseto, livres de outras bactérias e fungos.

Os NEPs apresentam dois tipos de movimentos, o do tipo “emboscada” permitindo-os que alcancem outros substratos ou hospedeiros mediante os movimentos sincronizados e ondulatórios do corpo o do tipo “busca”, que buscam o hospedeiro ativamente no solo, se orientando por meio de fatores químico-atraentes, ou seja, por substâncias voláteis liberadas pelos insetos (Kruitbos et al., 2010).

As estratégias de sobrevivência dos NEPs em condições adversas são pouco conhecidas, podendo estar relacionadas com a permanência do nematoide no solo em estado quiescente, sem gasto energético, ou a sua permanência no cadáver dos insetos por períodos extensos (Glazer, 2002). Os juvenis infectantes dependem unicamente de reservas armazenadas para o seu provisionamento energético. Portanto, a conservação de energia é um fator vital para prolongar a sobrevivência dos JIs (Qiu et al., 2000).

Muitos são os fatores que podem afetar diretamente ou indiretamente a sobrevivência dos nematoides, entre eles estão; a umidade, tipo de solo, predação e a temperatura (Mason; Hominick, 1995). Cada espécie de NEPs em particularidade apresenta exigências térmicas a qual mais adapta-se para o seu desenvolvimento (Choo et al., 2002). A amplitude da temperatura que permite o aproveitamento máximo das potencialidades dos NEPs como agentes de controle biológico são consideradas relativamente estreitas. A sua capacidade de infecção e persistência no solo são comprometidas por temperaturas

superiores a 30°C e inferiores a 15°C (Kaya, 1990). A preferência térmica de nematoides dos gêneros *Steinernema* em campo encontram-se entre 3 a 14°C, e para *Heterorhabditis* entre 10 e 16°C (Molineux, 1985). As temperaturas acima de 30°C e temperaturas abaixo de 0°C podem afetar negativamente a persistência dos NEPs, isto pode variar entre as diferentes espécies de NEPs e regiões de origem (Smits, 1996). Entretanto quase todas as espécies de NEPs são ativas em temperaturas ambientes (25°C ±2).

Armazenamento de nematoides do gênero *Steinernema* se preservam em temperaturas entre 8° e 15°C, sobrevivendo de oito a nove meses, enquanto as espécies do gênero *Heterorhabditis*, sobre as mesmas condições, sobrevivem de três a quatro meses (Kaya; Stock, 1997).

Estudos sobre os parâmetros que influenciam o período de persistência dos nematoides tornam-se importantes para sua liberação no campo em programas de controle biológico, pois o conhecimento serve para garantir a sobrevivência dos juvenis infectantes no meio ambiente (Brown; Gaugler, 1997).

A sobrevivência de NEPs em condições de laboratório tem sido muito discutida, devido a ocorrência das altas taxas de mortalidade em pouco tempo de armazenamento. A baixa sobrevivência em armazenamento em temperatura ambiente é um dos principais fatores que impede estes agentes de realizar o potencial como bioinseticidas (Grewal, 2002). Assim o objetivo foi avaliar a influência da temperatura na sobrevivência de JIs de três espécies de nematoides entomopatogênicos durante o período de armazenamento.

2. Material e métodos

As espécies de nematoides entomopatogênicos utilizadas foram *Steinernema carpocapsae* IBCB 02, *Steinernema feltiae* IBCB 47 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 obtidos da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos depositados no Banco de Nematoides Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” do Instituto Biológico, em Campinas, SP (Goulart et al., 2003). A multiplicação dos nematoides foi realizada no Laboratório de Nematologia, Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP-Botucatu, SP.

Os nematoides foram multiplicados com *Galleria mellonella* criada em temperatura de 30°C com dieta à base de favo e cera de abelha e fotoperíodo de 12 horas. Os isolados dos NEPs foram multiplicados com cinco lagartas de *G. mellonella*, de terceiro ao quinto ínstar, em placas de Petri (Ø =9 cm) com duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5 mL de suspensão com 500 JI/placa, disponibilizando 100JI/lagarta. Essas placas foram

lacradas com papel filme PVC e acondicionadas em estufa incubadora tipo BOD com temperatura de 25°C (Woodring; Kaya 1988). Após três dias, as lagartas mortas foram transferidas para armadilha de White (White, 1927) e armazenadas em BOD a 25°C por três a 15 dias. Os JIs que abandonaram os cadáveres foram recolhidos com água destilada, filtrados e decantados para a retirada dos corpos gordurosos dos insetos e quantificados em placas de contagem.

As suspensões das espécies de nematoides foram ajustadas em uma concentração de 100 JI/mL separadamente. Foram individualizadas em recipientes de polietileno transparentes com tampa e com capacidade de 500 ml, e de acordo com os tratamentos e repetições foram inoculados 1mL de suspensão, totalizando um volume de 100 mL de suspensão em cada repetição. As suspensões foram submetidas às temperaturas de 14, 18, 22, 26 e 30°C, em câmara climatizada do tipo BOD sem luminosidade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 30 tratamentos e quatro repetições totalizando 120 parcelas por espécie de NEPs. As avaliações foram feitas aos 5, 10, 15, 30, 60 e 90 dias após a inoculação. A cada avaliação uma alíquota de 1 mL da suspensão de cada repetição foi retirada e vertida em placa de Siracusa graduada para a quantificação de nematoides vivos e mortos. Os nematoides que não apresentavam nenhum tipo de movimento foram induzidos à movimentação com auxílio de alfinete entomológico comum. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas e analisadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa computacional de estatística BioEstat. versão 5.3.

3. Resultado

A sobrevivência dos JIs de *S. carpocasae* IBCB 02 manteve-se até ao 15 (DAI) nas temperaturas de 14, 18 e 22°C (Tabela 1). Na temperatura de 14°C, a sobrevivência dos JIs foi reduzida aos 30 dias (60,5), com queda drástica a partir dos 60 dias de armazenamento (16,5 e 0). Os JIs armazenados a 22°C apresentaram queda na sobrevivência a partir dos 60 dias (53,2 e 5,2) e aos 26 e 30°C a sobrevivência dos JIs foi mantida apenas aos cinco dias de armazenamento decrescendo no 10 e 15 (DAI) (79,7 e 76,5), respectivamente, embora com sobrevivência reativamente alta. Aos 30 dias não foram observados JIs vivos.

As temperaturas consideradas favoráveis para a sobrevivência dos JIs de *H. amazonensis* IBCB 24 foram as de 18, 22 e 26°C (87,2, 81,5 e 47,2), permitindo a manutenção da população até 90 dias. A alta sobrevivência dos JIs a 14°C, foi verificada

apenas aos cinco dias de armazenamento (98,2) com queda no 10 dia (29,5) com a total perda da sobrevivência ao 15 dia.

Aos 26°C, a sobrevivência da população dos JIs foi baixa (47,2) comparada com as demais temperaturas e sem a oscilação no número de JIs vivos em todas as épocas estudadas até aos 90 dias de armazenamento. Aos 30°C, a queda de sobrevivência dos JIs ocorreu a partir dos 30, 60 e 90 dias (52,5, 5,0 e 0), respectivamente (Tabela 1). As temperaturas de 18 e 22°C (87,2 e 81,5) foram consideradas favoráveis para a sobrevivência dos juvenis infectantes de *H. amazonensis* IBCB 24, permitindo a manutenção da população até 90 dias.

A sobrevivência dos JIs de *S. feltiae* IBCB 47 foram mantidas ao longo de 90 dias nas temperaturas de 14, 18 e 22°C (90,7, 92,7 e 73,2) respectivamente. Aos 26°C a sobrevivência dos juvenis começou a decrescer a partir do 10 e 30 dia, com perda acentuada a partir de 60 dias. Nos JIs armazenados a 30°C a queda da sobrevivência começou a partir do 15 dia de armazenamento (41,2) e aos 30 dias (3,2) e aos 60 dias com perda total de sobrevivência. *S. feltiae* apresentou melhores condições de sobrevivência nas temperaturas de 14°C e 18°C, entretanto, mesmo com uma redução da sobrevivência dos JIs a 22°C, esta temperatura pode ser considerada adequada para a manutenção da população deste nematoide em armazenamento (Tabela 1).

4. Discussão

Nematoides entomopatogênicos, em condições de laboratório, apresentam altas taxas de mortalidade em pouco tempo de armazenamento. A baixa sobrevivência em temperatura ambiente é um dos principais fatores limitantes do seu potencial bioinseticida (Grewal, 2002).

De modo geral, algumas espécies de *Steinernema* são mais tolerantes às baixas temperaturas as espécies de *Heterorhabditis* podem ser conservadas em geladeira comum, em temperaturas que podem variar entre 10 a 18°C, por um período de dois a três meses, ou ainda serem armazenados em meio líquido (recipientes contendo água destilada), em meio sólido (esponja e vermiculita) (Barbosa-Negrisoni et al., 2009) ou em frascos de cultura com água destilada em curtos períodos de tempo sem a presença de oxigênio (Kaya; Stock, 1997).

Na presente pesquisa, as populações dos JIs das diferentes espécies de NEPs foram armazenadas em suspensão em água destilada sem oxigenação, e no decorrer de 90 dias de

armazenamento os juvenis de *S. carpocapsae* IBCB 02 apresentaram taxa de sobrevivência de 41,2 JIs vivos a 18°C, e de 5,2 JIs a 22°C. Os juvenis de *H. amazonensis* IBCB 24 apresentaram taxa de sobrevivência de 87,20, 81,50 e 47,20 em 18, 22 e 26°C, respectivamente, e os juvenis de *S. feltiae* IBCB 47 mantiveram-se vivos nas temperaturas de 14, 18 e 22°C com taxas de sobrevivência de 90,7, 92,7 e 73,20, respectivamente. Qiu e Bedding (2000), ao avaliarem a taxa de sobrevivência de JIs de *S. carpocapsae* em armazenamento, verificaram que em condições de aeração as taxas de sobrevivência dos JIs diminuíram gradativamente nas seis primeiras semanas (91%), na sétima semana (78%) e na oitava semana (55%), e quando os JIs foram incubados em condições anaeróbicas, estes se tornaram inativos em 16 horas; porém, conseguiram voltar à atividade quando submetidos à oxigenação caso não fossem ultrapassados sete dias sem oxigênio.

O NEP *S. carpocapsae* pode tolerar temperaturas de congelamento de -4°C (Lewis; Shapiro-Ilan (2002), e em 5°C, esta espécie sobrevive por maior tempo que os demais nematoides em água, ficando quiescente e conservando energia (Grewal, 2000). Isto pode ser observado quando a população de *S. carpocapsae* IBCB 02 foi armazenada na menor temperatura (14°C) obtendo perda drástica da sobrevivência, com apenas 16,50% JIs vivos aos 60 dias de armazenamento. Em temperaturas mais elevadas (26 e 30°C) (0,5 e 0), a perda de sobrevivência foi observada aos 30 dias de armazenamento.

Acevedo et al. (2006), ao avaliarem a porcentagem de sobrevivência de três espécies de *Steinernema* e três espécies de *Heterorhabditis* em relação temperatura, concentração e período de armazenamento, verificaram que *S. carpocapsae*, *S. glaseri* e *S. arenarium* obtiveram alta taxa de sobrevivência (87 e 95%) nas temperaturas de 8 e 20°C, e a 20 e 24°C, houve alta sobrevivência 78% a 92% para as espécies *H. bacteriophora*, *H. bacteriophora* HP88 e *H. baujardi* LPP7. Jagdale et al. (2007), ao avaliarem o efeito do armazenamento de *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *S. riobrave* a frio a 5°C e a quente 35°C, verificaram a sobrevivência das espécies em ambas temperaturas. Andaló et al. (2006), ao estudarem a influência da aeração na sobrevivência de *S. carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 em água destilada durante 180 dias, verificaram que as maiores viabilidades foram em condições de armazenamento com aeração 93,2% aos 30 dias e 44,6% em 180 dias para a espécie *S. carpocapsae*, e 91,4% em 30 dias e 36,9% aos 180 dias para *Heterorhabditis* sp. JMP4. Mukuka et al. (2010), ao estudarem 18 estirpes puras de *Heterorhabditis* para a sua resposta a alta temperatura, verificaram que *H. indica* foi a mais tolerante, seguido por *H. bacteriophora* e *H. megidis*. A elevada variabilidade na

tolerância entre as cepas fornecem excelente base para futuros cruzamentos seletivos com o objetivo de aprimorar tolerância ao calor.

Um dos entraves para o armazenamento é quando os NEPs são armazenados em suspensão aquosa, e ao decantarem e ficarem aglomerados no fundo dos recipientes, com esta agregação que se forma, acabam deixando os nematoides em uma situação de estresse com ambiente de baixo teor de oxigênio, situação que pode acelerar a perda de reservas energéticas, como lipídios (Gaugler; Han, 2002). A agregação está associada à diminuição da temperatura ocorrendo à formação de rosetas em espécies do gênero *Heterorhabditis*, não sendo observadas para o gênero *Steinernema* (Kaya; Stock, 1997; Westerman, 1999).

Os JIs de *H. amazonensis* IBCB 24 apresentaram este comportamento de agregação quando armazenado em 18 e 22°C, com o aumento do número de nematoides agregados a 14°C, e a sobrevivência ao longo de 90 dias dos JIs deste nematoide foram mantidas a 18, 22 e 26°C, aos 14°C a sobrevivência dos JIs foi mantida somente nos cinco primeiros dias, com queda drástica a partir dos 10 dias de armazenamento. As espécies do gênero *Heterorhabditis* apresentam baixa tolerância a temperaturas menores (Barbosa-Negrisoni et al., 2009), porém, *H. amazonensis* considerada uma espécie nativa do Brasil, podendo sobreviver em temperaturas que variam de 25 a 40°C (Andaló et al., 2011). No presente estudo a temperatura de 26°C manteve a sobrevivência dos JIs ao longo de 90 dias, com alta taxa de sobrevivência a 30°C em 30 dias de armazenamento. Andaló et al. (2011) ao avaliarem a porcentagem de lipídios de *S. carpocapsae*, *S. riobravensis*, *Heterorhabditis* sp. JPM4, *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. armazenados em diferentes temperaturas, verificaram que todos os nematoides apresentaram redução ao longo do tempo. Os nematoides mantiveram as taxas de lipídios por maior tempo nas temperaturas de 8, 16 e 20°C já em 24 e 28°C a porcentagem dos lipídios diminuiu rapidamente.

O diferencial de alguns nematoides está associado aos lipídios, à quantidade de trealose acumulada por diferentes nematoides que pode variar de acordo com a temperatura e conferir vantagens específicas de determinadas espécies (Jagdale; Grewal, 2003). Alguns JIs comportam-se de forma inativa na água, a fim de economizar energia, e essa capacidade também pode variar de espécie para espécie. Alguns estudos têm demonstrado que a porcentagem de JIs inativos em água é maior para *S. carpocapsae*, *S. glaseri* do que para *H. bacteriophora* (Lewis et al., 1995; Griffin, 2004).

Os JIs de *S. feltiae* IBCB 47, espécie de clima temperado, mantiveram a sobrevivência a 14, 18, e 22°C. Os nematoides do gênero *Steinernema*, quando submetidos

a temperaturas de armazenamentos entre 8 a 20°C indiferente da concentração empregada, apresentaram uma alta sobrevivência dos juvenis prolongando a sobrevivência até três meses. Dessa forma, a longevidade dos steinernematídeos a baixas temperaturas pode ser mais dependente da sua tolerância ao frio do que à quantidade de reservas energéticas (Grewal, 2000). Cagnolo et al. (2008) ao avaliarem a capacidade de sobrevivência de *S. rarum* após o armazenamento a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e a $5 \pm 1^\circ\text{C}$, verificaram alta sobrevivência (95%) a 23°C.

As espécies de *Steinernema* podem ser armazenadas de 4 a 15°C por cerca de seis a nove meses, enquanto os *Heterorhabditis*, por três a quatro meses, nesse mesmo intervalo de temperatura (Glazer, 2002), porém no armazenamento em temperaturas extremas a sobrevivência pode ser afetada limitando a mobilidade e infectividade dos juvenis (Glazer, 2002). Fato este que pode ser observado quando a população de *S. carpocapsae* IBCB 02 e a de *S. feltiae* IBCB 47 foram armazenados a 30°C, temperatura considerada extrema para as exigências térmica destas espécies com queda drástica de sobrevivência aos 30 dias para ambas as espécies. *S. feltiae*, é uma espécie adaptada a temperaturas mais frias, e a sua infecções pode ocorrer na faixa de 8 a 30°C, e sua reprodução entre 10 e 25°C (Grewal et al., 1994).

Grewal (2000) explica que esta pequena longevidade apresentada por *S. feltiae* em 25°C pode ser devida à baixa sobrevivência em temperaturas altas, pois esta é uma espécie de região temperada, e possivelmente existe uma grande variação mesmo dentro do mesmo gênero, sendo necessário adequar às condições ideais para cada isolado de nematoide. Wright (1992) relatou que *S. feltiae* foi capaz de se desenvolver em 10°C, e as demais espécies: *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora*, *H. sealandica* e *H. megidis* não conseguiram desenvolver-se em tal temperatura baixa. Ali e Wharton (2013), ao estudarem a tolerância ao frio de juvenis de *S. feltiae* e *H. bacteriophora*, quando submetidos ao congelamento rápido, detectaram que estes nematoides foram moderadamente tolerantes ao congelamento, com uma temperatura letal de 5°C, e relataram que a sobrevivência é significativamente melhorada por congelação lenta durante a noite a 1°C, com uma diminuição da temperatura letal inferior de 14°C. Isto pode indicar que estes nematoides são capazes de desidratação tipo crioprotector.

A amplitude da temperatura que permite o aproveitamento máximo das potencialidades dos NEPs como agentes de controle biológico são consideradas relativamente estreitas, a sua capacidade de infecção e persistência no solo são

comprometidas por temperaturas superiores a 30°C e inferiores a 15°C (Kaya, 1990).

A qualidade dos produtos de controle biológico baseado em nematoides entomopatogênicos pode ser severamente danificada devido à exposição à alta temperatura superando 40°C (Mukuka et al., 2010).

Portanto, o conhecimento da temperatura e os parâmetros que influenciam um curto ou longo período de persistência dos nematoides é um aspecto importante tanto para garantir a sobrevivência dos juvenis infectivos em armazenamento, como também para liberação desses organismos no campo em programas de controle biológico.

Sendo assim as temperaturas ideais para a sobrevivência dos JIs de *S. capocapsae* IBCB 02, *H. amazonensis* IBCB 24 e *S. feltiae* IBCB 47 são 18 e 22°C em três meses de armazenamento. A sobrevivência dos JIs de *H. amazonensis* IBCB 24 foi inalterada a 26 e as populações de JIs de *S. feltiae* IBCB 47 foram mantidas nas temperaturas de 14 e 22°C, em três meses de armazenamento.

Referências

- Acevedo, J. P. M., Moino Junior, A., Cavalcante, R. S., Anadaló, V., Mendonça, L. A. 2006. Efecto de temperatura, concentración y tempo de almacenamiento em la supervivência de nematodos entomopatogéno. *Revista Colombiana de Entomologia*. 32, p.24-30.
- Ali, F., Wharton, D. A. 2013. Cold tolerance abilities of two entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Cryobiology*. 66, 24–29.
- Andaló, V., Cavalcanti, R., Molina, J. P., Moino, A., Magalhaes, F. H. L. 2006. Influência da aeração no armazenamento de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida) em condições de laboratório. *Nematologia Brasileira*. 30, 45-50.
- Andaló, V., Moino Junior, A., Maximiniano, C., Campos, V. P., Mendonça, L. 2011. Influence of temperature and duration of storage on the lipid reserves of entomopathogenic nematodes. *Revista Colombiana de Entomologia*. 37, 203-209.
- Barbosa-Negrisoni, C. R. C., Garcia, M. S., Dolinski, C. M., Negrisoni-Junior, A. S., Bernardi, D., Nava, D. E. 2009. Efficiency of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul, Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102, 6-13.
- Brown, I. M., Gaugler, R. 1997. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematode. *Nematologica*. 43, 363-375.

- Cagnolo, S., Campos, V. B. 2008. Effect of storage temperature on survival and infectivity of *Steinernema rarum* (OLI strain) (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 98, 114–115.
- Choo, H.Y., Lee, D.W., Yoon, H.S., Lee, S.M, Hang, D.T. 2002. Effects of temperature and nematode concentration on pathogenicity and reproduction of entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Pocheon strain (Nematoda: Steinernematidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 41, 269-277.
- Gaugler, R., Han, R. 2002. Production technology. In: Gaugler, R. *Entomopathogenic nematology*. CAB International. 289p.
- Glazer, I. 2002. Survival biology. In: Gaugler, R. (ed). *Entomopathogenic Nematology*: CABI, New York, 169-188.
- Goulart, R. M., Tavares, F. M., Leite, L. G., Machado, L. A., Batista Filho, A., Almeida, J. E. M. Formação de um banco de nematoides entomopatogênicos no Instituto Biológico, SP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro, Resumos... São Pedro, 2003. 83p.
- Grewal, P. S. 2000. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *International Journal for Parasitology*. 30, 995-1000.
- Grewal, P. S. 2002. Formulation and application technology. In: Gaygler, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. Rutgers University, New Jersey. 1-28.
- Grewal, P.S., Selvan, S., Gaugler, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19, 245-253.
- Griffin, T.C., Downes, M. J. 1994. Recognition of low temperature active isolates of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Nematologica*. 40, 106–115.
- Hennebem. T. J., Forlow, J. L., Burke, R., Lindegren. J. E. 1996. Temperature effects on infection and mortality of *Pecrinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae by two entomopathogenic nematode species. *Environ. Entomol.* 3, 179- 183.
- Jagdale, G. B., Grewal, P. S. 2003. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: Trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. *International. Journal for Parasitology*. 33, 145-152.
- Jagdale, G. B., Grewal, P. S. 2007. Storage temperature influences desiccation and ultra violet radiation tolerance of entomopathogenic nematodes. *Journal of Thermal Biology*. 32, 20–27.
- Kaya, H. K. 1990. Soil ecology. En: *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Gaugler, R. and Kaya, H. K. (eds).

- Kaya, H., Stock, P. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L. Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, 281-324.
- Kruitbos, L. M., Heritage, S., Hapca, S., Wilson, M.J., 2010. The influence of habitat quality on the foraging strategies of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis megidis*. Parasitology 137, 303–309.
- Lewis, E. E., Selvan, S., Campbell, J. F., Gaugler, R. 1995. Changes in foraging behavior during the infective stages of entomopathogenic nematodes. Parasitology. 110, 583-590.
- Lewis, E. E., Shapiro-Ilan, D. 2002. Host cadavers protect entomopathogenic nematodes during freezing. Journal Invertebrate Pathology. 81, 25-32.
- Mason, J.M., Hominick, W. M. 1995. The effect of temperature on infection, development and reproduction of *Heterorhabditis*. Journal of Helminthology. 69, 337-345.
- Molineux, A. C. 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp and *Steinernema* spp (Nematoda: Rhabditida) at varies temperatures and their subsequent infectivity for insects. Review Nematology. 8, 165-387.
- Molyneux, A.S. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* (= *Neoaplectana*) spp.: temperature, and aspects of behavior and infectivity. 1986. Exp. Parasitology. 62, 169-180.
- Mukuka, J., Strauch, O., Waeyenberge, L., Viaene, N., Moens, M., Ehlers, R. 2010. Heat tolerance among different strains of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. BioControl. 55, 423–434.
- Poinar, G. O., Grewal, P. S. 2012. History of entomopathogenic nematology. Journal of Nematology. 44, 153-161.
- Qiu, L., Bedding, R. A. 2000. Energy metabolism and survival of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under oxygen-deficient conditions. Journal of Nematology. 32, 271-280.
- Qiu, L., Lacey, M. J., Bedding, R. A. 2000. Permeability of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* to glycerol during osmotic dehydration and its effect on biochemical adaptation and energy metabolism. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 125, 411-419.
- Smits, P. H. 1996. Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. Biocontrol Science and Technology. 6, 379-387.
- Westerman, P. R. 1999. Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20°C and effects on efficacy. Journal Invertebrate Pathology. 73, 206-213.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science. 66, 302-303.

- Winter, C. E. et al. Nematoides entomopatogênicos. Laboratório de Biologia Molecular de Nematoides, Departamento de Parasitologia –ICB-USP, São Paulo, p.1-39, 2012. Disponível em: [http:// www.icb.usp.br/~cewinter/](http://www.icb.usp.br/~cewinter/)
- Woodring, L., Kaya, H. K. 1988. *Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques*. Southern Cooperative Series Bull. 331. Arkansas agric. Exp. Statn., Fayetteville, AR, USA. 30p.
- Wright, P. J. 1992. Cool temperature reproduction of *Steinernematid* and *Heterorhabditid* nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 60, 148-151.

Tabela 1.

Efeito de cinco temperaturas na sobrevivência (%) de *Steinernema carpocapsae* IBCB 02, *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 e *Steinernema feltiae* IBCB 47 após 5, 10, 15, 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI)

<i>Steinernema carpocapsae</i> IBCB 02						
TEMPERATURA	DIAS					
	5	10	15	30	60	90
14	98,2 aA	96,7 aA	89,7 aA	60,5 bB	16,5 cC	0,0 bD
18	99,5 aA	97,0 aA	93,7 aA	91,0 aA	89,2 aA	41,2 aB
22	99,5 aA	92,7 aA	86,2 aA	81,5 aA	53,2 bB	5,2 bC
26	98,0 aA	76,0 bB	70,7 bB	0,5 cC	0,0 dC	0,0 bC
30	96,0 aA	79,7 bB	76,5 bB	0,0 cC	0,0 dC	0,0 bC
P temperatura < 0,001 P dias < 0,001 P interação < 0,001						
CV(%)=17,86						
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> IBCB 24						
TEMPERATURA	DIAS					
	5	10	15	30	60	90
14	98,2 aA	29,5cB	0,0 cC	0,0 cC	0,0 cC	0,0 cC
18	98,2 aA	92,0 aA	90,7 aA	82,5 aA	90,7 aA	87,2 aA
22	98,0 aA	95,2 aA	95,2 aA	96,7 aA	93,2 aA	81,5 aA
26	47,2 bA	47,2 bA	47,2 bA	47,2 bA	47,2 bA	47,2 bA
30	89,2 aA	92,5 aA	88,2 aA	52,5 bB	5,0 cC	0,0 cC
P temperatura < 0,001 P dias < 0,001 P interação < 0,001						
CV(%)=30,11						
<i>Steinernema feltiae</i> IBCB 47						
TEMPERATURA	DIAS					
	5	10	15	30	60	90
14	94,5 aA	96,0 aA	80,0 aA	77,7 aA	86,0 aA	90,7 aA
18	99,5 aA	85,5 aA	82,0 aA	88,0 aA	87,0 aA	92,7 aA
22	98,7 aA	83,0 aA	88,2 aA	86,2 aA	83,7 aA	73,2 bA
26	100,0 aA	76,7 aB	67,0 aB	51,5 bC	8,7 bD	0,0 cD
30	93,2 aA	93,2 aA	41,2 bB	3,2 cC	0,0 bC	0,0 cC
P temperatura < 0,001 P dias < 0,001 P interação < 0,001						
CV(%)=16,20						

* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ($P > 0,05$).

CAPÍTULO IV – “Influência do substrato e da luminosidade na infecção de nematoides entomopatogênicos em *Galleria mellonella*”

Revista: Nematropica

INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO E LUMINOSIDADE NA INFECÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são utilizados em diversos países como alternativas eficientes para o controle de pragas. Diante disso, o emprego de novas técnicas de produção e preservação torna-se importante para que progressos da tecnologia de formulação e exploração de bioinseticidas sejam alcançados. O objetivo foi avaliar a influência da luminosidade e do substrato na capacidade de infecção de juvenis dos isolados IBCB 06 *Steinernema brazilense*, IBCB 02 *S. carpocapsae*, IBCB 47 *S. feltiae* e IBCB 24 *Heterorhabditis amazonensis* em lagartas de *Galleria mellonella*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 16 tratamentos e oito repetições totalizando 128 parcelas. Os isolados foram inoculados na concentração de 400 juvenis infectantes/mL em areia esterilizada e em papel filtro ambos em placas de Petri. Após a inoculação foram liberadas quatro lagartas de *G. mellonella*. Para tratamento com (ausência de luz) as placas de Petri foram embrulhadas em papel alumínio e o tratamento (com luminosidade) as placas de Petri foram vedadas com papel filme transparentes tipo PVC, posteriormente foram armazenadas em BOD a 26°C. As taxas de infecções dos JIs de *S. carpocapsae* IBCB 02 foram semelhantes, em todos os tratamentos. As maiores taxas de infecção foram encontradas nos tratamentos areia/luz (95,5 JIs/lagarta) e areia/escuro (68,2 JIs/lagarta) para *S. brazilense* IBCB 06, areia/luz (186,0 JIs/lagarta) para *H. amazonensis* IBCB 24 e para *S. feltiae* IBCB 47 os tratamentos areia/escuro (176,8/JIs/lagarta) e areia/luz (160,8/JIs/lagarta).

Palavras chave: Juvenil infectante, produção *in vivo*, penetração, viabilidade.

SUBSTRATE INFLUENCE AND LUMINOSITY IN THE INFECTION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) of *Steinernema* and *Heterorhabditis* genera are used in several countries as efficient alternatives for pest control. In view of this, the use of new production and preservation techniques it is important to progress the development of technology and biopesticides exploration be achieved. The objective was to evaluate the influence of light and substrate on juvenile infection capacity of isolated IBCB 06 *Steinernema brazilense*, IBCB 02 *S. carpocapsae*, IBCB 47 *S. feltiae* and IBCB 24 *Heterorhabditis amazonensis* in larvae of *Galleria mellonella*. The experimental design was completely randomized with 16 treatments and eight repetitions totaling 128 plots. The isolates were inoculated at the concentration of 400 infective juveniles/mL in sterilized sand, both in filter paper in Petri dishes. After inoculation were released four larvae *G. mellonella*. For treatment (absence of light) the Petri dishes were wrapped in aluminum foil and the treatment (with light) the Petri dishes were sealed with paper transparent film like PVC were subsequently stored in BOD at 26°C. The rates of infections IJs *S. carpocapsae* IBCB 02 were similar in all treatments. The highest rates of infection were found in treatments sand/light (95.5 IJs/larvae) and sand/dark (68.2 IJs/larvae) for *S. brazilense* IBCB 06, sand/light (186.0 IJs/larvae) *H. amazonensis* IBCB 24 and *S. feltiae* IBCB 47 treatments sand/dark (176.8/ IJs/larvae) and sand/light (160.8 / IJs/larvae).

Key words: infective juvenile, production *in vivo* penetration, viability.

INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são largamente utilizados para o controle biológico de pragas (Leite, 2006). Estes dois gêneros são capazes de ocasionar a morte rápida do hospedeiro devido à associação simbiótica com bactérias do gênero *Xenorhabdus* Thomas & Poinar, 1979 e *Photorhabdus* Louise & Kuhl, 1983 (Poinar; Grewal, 2012).

De maneira geral, os NEPs possuem seis estádios de desenvolvimento (ovo, juvenil de primeiro estágio (J1), J2, J3, J4 e adulto) (Lewis *et al.*, 2006). O juvenil de terceiro estágio (infectante) não se alimenta e carrega suas bactérias mutualísticas específicas no intestino, e quando penetra no inseto, libera bactérias simbióticas dentro da hemocele matando o inseto dentro de 24-48 horas. Os nematoides se alimentam da bactéria e tecido hospedeiro, e reproduzem-se por duas a três gerações e emerge dos cadáveres como juvenil infectivo a procura de novos hospedeiros (Dowds; Peters, 2002; Poinar, 1990).

Os NEPs se destacam dos demais agentes de controle microbiano devido ao seu comportamento de busca pelo hospedeiro, sendo este comportamento dependente da espécie de nematoide (Ramos-Rodríguez *et al.*, 2007). De acordo com as estratégias de busca pelo hospedeiro, os NEPs podem ser classificados como “emboscada” e o outro tipo como “busca” o primeiro exibem o comportamento de nictação, onde suspendem o corpo sustentando-o sobre a ponta da cauda (Lewis *et al.*, 2006) e as espécies *S. carpocapsae* Weiser, 1955 e *S. scapterisci* Nguyen e Smart, 1990 são exemplos de NEPs que fazem nictação (Lewis *et al.*, 1992). O segundo tipo buscam o hospedeiro ativamente no ambiente, respondendo aos seus voláteis e deslocando-se até localizá-lo (Ishibashi; Kondo, 1990), *H. bacteriophora* Poinar, 1976 e *S. glaseri* Steiner, 1929 são nematoides com estratégia de “busca”. *S. feltiae* Filipjev, 1934 podem combinar as duas estratégias de

comportamento (Grewal *et al.*, 1994). No ambiente, todavia, uma baixa mobilidade dos NEPs no solo pode favorecer a exposição a fatores bióticos e abióticos desfavoráveis. A radiação solar, tipo de solo e a temperatura e umidade, assim, podem levar a redução na probabilidade de encontrarem o inseto-alvo e nele se reproduzirem (Portillo-Aguilar *et al.*, 1999) (Mason; Hominick, 1995).

Para serem utilizados como agentes do biocontrole e aplicação a campo, esses nematoides precisam ser multiplicados em larga escala (Dias *et al.*, 2008). A produção de NEPs pode ser em *in vitro* que é realizada em meio de cultura (sólido ou líquido) e em fermentadores, os quais tem sido o principal alvo na produção em escala comercial para os gêneros de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Neves *et al.*, 1998). E podem ser produzidos *in vivo* que são comumente realizadas em larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). A média de produção nesse hospedeiro é de 30.000 a 50.000 JIs (Poinar, 1979), podendo chegar até 200.000 JIs por larva (Dutky *et al.*, 1964), entretanto a produção pode variar em função da escolha e do tamanho de hospedeiro.

A sobrevivência destes agentes em condições de laboratório tem sido muito discutida, devido à ocorrência e altas taxas de mortalidade (Grewal, 2002). Vários métodos *in vivo* são necessários para o isolamento inicial e a produção de novos nematoides, espécies ou isolados, necessitando de uma padronização que minimize a variabilidade entre os métodos (Lindgren *et al.*, 1993). Portanto o conhecimento adequado dos parâmetros de inoculação de nematoides entomopatogênicos é fundamental para diminuir perdas indesejáveis de nematoides, com isto favorecer o aumento da taxa de infecção e multiplicação de juvenis infectantes. Diante disto o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da luminosidade e do substrato na capacidade de infecção de juvenis dos isolados IBCB 06 *Steinernema brazilense* IBCB 02 *Steinernema carpocapsae* IBCB 47

Steinernema feltiae e IBCB 24 *Heterorhabditis amazonensis* em lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies de nematoides entomopatogênicos utilizados foram *Steinernema carpocapsae* isolado IBCB 02, *Steinernema feltiae* IBCB 47, *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 e *Steinernema brazilense* IBCB 06 obtidos da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos, depositados no Banco de Nematoides Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” do Instituto Biológico, em Campinas, SP (Goulart *et al.*, 2003).

Multiplicação do isolados: os nematoides foram multiplicados em lagartas de quinto estágio de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), mantidas em temperatura de 30°C com dieta à base de favo e cera de abelha, sem luminosidade. Foram utilizadas cinco lagartas por placas de Petri de $\varnothing = 9$ cm com duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5mL de suspensão com 500 juvenil/placa, disponibilizando 100 juvenil/lagarta para cada espécie separadamente. Essas placas foram lacradas com papel filme PVC e acondicionadas em BOD com temperatura a 25°C (Woodring; Kaya, 1988). Após três dias, as lagartas mortas foram transferidas para armadilha de White (White, 1927) e armazenadas em BOD a 25°C por três a 15 dias. Os JIs que emergiram dos cadáveres foram recolhidos com água destilada, filtrados e decantados para a retirada dos corpos gordurosos dos insetos e quantificados em placas de contagem.

Os tratamentos constituíram de papel filtro/escuro e papel filtro/luz; areia/escuro e areia/luz. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 4x4 totalizando 16 tratamentos com oito repetições, totalizando 128 parcelas.

O tratamento substrato-areia teve cada parcela constituída por uma placa de Petri ($\varnothing = 9$ cm) com 100g de areia fina esterilizada e umedecida com 10% de água destilada.

Quatro lagartas de *G. mellonella* (quarto ao quinto instar) foram acondicionadas por armadilha metálica preparadas com telas de aço (Malha 35 Mesh) e enterradas na areia com 1,5 mL contendo 400JIs/parcela, inoculados nos respectivos tratamentos. Após a inoculação, as placas foram vedadas com papel filme PVC.

O tratamento substrato-papel filtro teve cada parcela constituída por uma placa de Petri (\varnothing =9 cm de diâmetro) com papel filtro umedecido com 1,5 mL de suspensão para cada espécie de NEPs separadamente contendo 400 JI/mL. Após a inoculação, quatro lagartas de *G. mellonella* (quarto ao quinto instar) foram liberadas por placa de Petri vedadas com papel filme PVC. Essas placas foram embrulhadas em papel alumínio (tratamento com ausência de luz) e as demais vedadas com papel filme transparente tipo PVC (tratamento com luminosidade). Todas as placas foram armazenadas em BOD à 26°C. As avaliações foram realizadas três dias após a mortalidade, as lagartas de *G. mellonella* foram transferidas para placas de Petri (\varnothing = 5 cm), dessecadas e o número de adultos (J3) infectados no interior das mesmas quantificadas em microscópio estereoscópio 40x. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas e analisadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa computacional de estatística BioEstat versão 5.3 (Ayeres *et al.*, 2007).

RESULTADOS

As taxas de infecções dos JIs de *S. carpocapsae* IBCB 02 foram semelhantes, variando de 3,8 a 10,6 JIs/lagarta, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1). *S. brazilense* IBCB 06 obteve as maiores taxas de infecção nos tratamentos areia/luz e areia/escuro 95,5 e 68,2 JIs/ lagarta, respectivamente, ambas sem diferenças, diferindo dos demais tratamentos.

Os JIs de *H. amazonensis* IBCB 24 apresentaram as maiores taxas de infecções no tratamento areia/luz com 186,0 JIs/ lagarta quando comparado aos demais tratamentos areia/escuro 86,0 JIs/ lagarta diferindo dos tratamentos papel filtro/luz 35,8 JIs/ lagarta e papel filtro/escuro 47,1 JIs/lagarta respectivamente que não apresentaram diferenças significativas.

As taxas de infecção de JIs de *S. feltiae* IBCB 47 foram maiores nos tratamentos com areia/escuro 176,8 JIs/lagarta e areia/luz 160,8 JIs/lagarta diferindo significativamente dos tratamentos papel filtro/luz 127,8 JIs/ lagarta e papel filtro/escuro 122,6 JIs/ lagarta. As taxas de infecção de adultos de JIs de *S. feltiae* IBCB 47 em todos os tratamentos foram superiores as das demais espécies de NEPs (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Um problema enfrentado em relação à produção *in vivo* é a falta de padronização nas técnicas utilizadas (Molina *et al.* 2004). Para uma alta produção de JIs de boa qualidade e alta infectividade, faz-se necessário conhecer a quantidade ideal de JIs para infectar o hospedeiro sem que haja competição intra-específica (Boff *et al.*, 2000). Outro ponto importante é a quantidade de material disponível no cadáver para o melhor desenvolvimento dos nematoides, que está relacionada com o tamanho das lagartas.

No presente estudo, ao tentar melhorar as técnicas de inoculação, o substrato areia apresentou-se como o mais adequado para a infecção dos juvenis, facilitando a inoculação desses nematoides em lagartas de *G. mellonella*, que os insetos podem ser enterrados dentro dos recipientes contribuindo para sua preservação, dispensando a transferência dos JIs e lagartas para outros recipientes. O JI ao penetrarem na lagarta e posteriormente completar o seu ciclo, emergir do cadáver em busca de outro hospedeiro, diminuindo o gasto energético, pois terá maior facilidade para o deslocamento quando comparado com o substrato papel filtro. Vários fatores podem estar envolvidos no processo de deslocamento

de JIs. Esses fatores podem ser ambientais como umidade, composição e granulometria do solo, temperatura, presença ou não de hospedeiro, liberação de substâncias de sinalização pelas plantas atacadas entre outros; e também próprios do nematoide como idade e reserva de energia (Fitters; Griffin, 2006). Barretos (2013) cita que o tipo de substrato na inoculação pode influenciar nas taxas de infecções por juvenis, uma vez que a eficiência da aplicação de NEPs em areia e em solo em condições de laboratório é considerada a melhor devido à aproximação das condições em que habitam diferentes espécies de nematoides.

O outro fator estudado nesse experimento foi a influência da luminosidade, o que pode ser observado nos tratamentos areia/luz para todos os isolados, a presença de luz contribuiu para que os nematoides tendessem a aprofundar-se na areia mais rápido em busca do hospedeiro facilitando a penetração dos juvenis, a exemplo os isolados IBCB 24 *H. amazonensis* e IBCB 06 *S. brazilense* obtiveram as maiores taxas de infecção quando inoculado em areia/luz. Portanto além da patogenicidade e virulência, é importante conhecer a capacidade de busca, pois quanto maior a eficiência, maior a chance de encontro com o hospedeiro (Alves *et al.*, 2009).

Algumas estratégias usadas pelos nematoides entomopatogênicos para sobreviver em condições adversas (dessecação, anidrobiose, congelamento, radiação ultravioleta, doenças e predação) são pouco conhecidas, podendo estar relacionadas com a permanência do nematoide no solo em estado quiescente, a migração, evitando as condições adversas e a permanência no cadáver dos insetos por períodos extensos (Glazer, 2002).

Vários são os casos de sucesso na mortalidade de diferentes insetos quando inoculado em areia ou em solo, a exemplo o nematoide *S. brazilense* quando inoculado em areia fina pode promover a mortalidade de 100% de lagartas de *G. mellonella* até 60 dias (Barretos, 2013). *S. carpocapsae* quando inoculado em solo infestado pela Broca-da-ervamate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825), (Hymenoptera, Ichneumonidae) pode promover a

mortalidade até 78,1% quando submetido a maior concentração de juvenis infectantes (Alves *et al.*, 2009).

Os isolados 12 e 15 de NEPs da família Heterhabbitidae inoculados em solo, submetidos ao teste de patogenicidade em pré-pupas de *Spodoptera frugiperda* apresentaram maior taxa de mortalidade (100%), comparado ao teste com lagartas de último ínstar quando inoculados em papel filtro em placas de Petri (Salvadori, 2011). *H. marelatus* e *S. carpocapsae* quando inoculados no solo causam 100% de mortalidade em *Cydia latiferranea*, na dose de 500 JI/larva (Bruck; Walton, 2007). *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* foram altamente infectivos para *Synanthedon bibionipennis* (Boisduval, 1869) (Lepidoptera: Sesiidae) em condições de laboratório com mortalidade de 96%-94%, respectivamente, entretanto a campo obtiveram menores taxas de mortalidade 51% e 33% respectivamente (Bruck *et al.*, 2008). Ao testar a patogenicidade de *S. carpocapsae* ao cupim *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae), dados demonstraram que os soldados são mais suscetíveis Os soldados são mais suscetíveis que os operários a *S. carpocapsae* em placas de Petri, e os operários são mais suscetíveis comparados com os soldados em colônias artificiais (Rosa, 2007). McCoy *et al.* (2002) obtiveram bons resultados com *Steinernema riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994 no controle de larvas do curculionídeo *Diaprepes abbreviatus* L., 1758, (Coleoptera: Curculionidae) porém altas doses do nematoide foram requeridas. Shapiro-Ilan; McCoy (2000) também conseguiram bons resultados no controle dessa praga sob condições de campo, independentemente do modo de produção do entomopatógeno. Rohde *et al.* (2012) verificaram que *Heterorhabditis* sp. e *S. carpocapsae* foram eficientes no controle de larvas da Mosca-das-frutas *Ceratitidis capitata* (Wiedemann, 1824), (Diptera: Tephritidae) quando aplicados na superfície do solo, com mortalidade variando entre 26 e 74% respectivamente. Portanto, a busca por técnicas padronizadas de produção *in vivo* ainda são

muito pertinentes (Flanders *et al.*, 1996) e os resultados desta pesquisa tornam-se uma alternativa para a produção *in vivo*, que busca o melhoramento das técnicas atuais. Diante disso, a compreensão do comportamento dos NEPs pode levar a uma maior eficiência na utilização destes agentes, ajudando a definir o desempenho desses organismos contra o inseto pragas (Andaló *et al.*, 2012).

Portanto conclui-se que as taxas de infecções dos JIs de *S. carpocapsae* IBCB 02 foram semelhantes, em todos os tratamentos. As maiores taxas de infecção foram encontradas nos tratamentos areia/luz e areia/escuro 68,2 e 95,5 JIs/lagarta para *S. brazilense* IBCB 06, areia/luz 186,0 JIs/lagarta para *H. amazonensis* IBCB 24 e para *S. feltiae* IBCB 47 os tratamentos areia/escuro 176,8 JIs/lagarta e areia/luz 160,8 JIs/lagarta.

LITERAURA CITADA

- Alves, V.S., Alves, L.F.A., Quadros, J.C., Leite, L.G. 2009. Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) ao nematoide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). Arq. Inst. Biol. 76: 479-482.
- Andaló, V., Santos V., Moreira, G. F., Moreira, C., Freire, M., Moino Jr, A. 2012. Movement of *Heterorhabditis amazonensis* and *Steinernema arenarium* in search of corn fall armyworm larvae in artificial conditions. Sci. Agric. 69:226-230.
- Ayeres, M., Ayeres, D. L., Santos, A. A. S. 2007. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas. 364 p.
- Barreto, A. F. Preservação de *Steinernema brazilense* e *Heterorhabditis indica* (Nemata: Rhabditida) em diferentes condições de temperatura e teores de umidade em solo. 2013. Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios.
- Boff, M. I. C. 2000. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E87.3 in *Galleria mellonella*. Nematology. 2:303-308.
- Bruck, D. J., Edwards, D. L., Donahue, K. M. 2008. Susceptibility of the strawberry crown moth (Lepidoptera: Sesiidae) to entomopathogenic nematodes. J Econ Entomol. 101:251-5.

- Bruck, D.J., Walton, V. M. 2007. Susceptibility of the filbertworm (*Cydia latiferreana*, Lepidoptera: Tortricidae) and filbert weevil (*Curculio occidentalis*, Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic nematodes. *J. Inver. Pathol.* 96:93-96.
- Dias, P. V. C., Dolinski, C., Molina, J. P. A. 2008. Influência da dose de juvenis infectantes e da massa de larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) na produção *in vivo* de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Nematologia Brasileira.* 32:6p.
- Dowds, B.C.A., Peters, A., 2002. Virulence mechanisms. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI, New York, NY.79–98p.
- Dutky, S. R., Thompson, J.V., Cantwell, G. G. A. 1964. Technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology.* 6:417-422.
- Fitters, P. F. L., Griffin, C. T. 2006. Survival, starvation, and activity in *Heterorhabditis megidis* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Biological Control*, San Diego. 37:82-88.
- Flanders, K. L., Miller, J. M., Shields, E. J. 1996. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* Oswego (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *Journal of Economic Entomology.* 89: 373- 380.
- Glazer, I. 2002. Survival Biology. In: Gaugler, R. (ed.) *Entomopathogenic Nematology.* 169-187p.
- Goulart, R. M., Tavares, F. M., Leite, L. G., Machado, L. A., Batista Filho, A., Almeida, J. E. M. 2003. Formação de um banco de nematoides entomopatogênicos no Instituto Biológico, SP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro, Resumos... São Pedro, 2003. 83p.
- Grewal, P. S., Lewis, E. E., Gaugler, R., Campbell, J. F. 1994. Host find behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology.* 108: 207-215.
- Grewal, P.S. 2002. Formulation and application technology. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 265–287p.
- Ishibashi, N., Kondo, E. 1990. Behaviour of infective juveniles. In: Gaugler, R., Kaya, H. K. (eds). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press Inc.; Boca Raton, FL. 139-150p.
- Leite, L.G., Tavares, F.M., Ginarte, C.M.A., Carregari, L.C., Batista Filho, A. 2006. Nematoides entomopatogênicos no controle de pragas. In: Pinto, A.S.; Nava, D.E.; Rossi, M. M., Malerbo-Souza, D.T. (Org.). 2006. *Controle Biológico de Pragas: na prática*. Piracicaba: CP 2. 45-53p.
- Lewis, E. E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., Peters, A. 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control.* 38: 66–79.

- Lewis, E. E., Gaugler, R., Harrison, R. 1992. Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*.105:109-115.
- Lindgren, J.E., Valero, K.A., Mackey, B.E. 1993. Simple “*in vivo*” production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. *J. Nematol.* 25: 193-197.
- Mason, J.M., Hominick, W. M. 1995. The effect of temperature on infection, development and reproduction of *Heterorhabditis*. *Journal of Helminthology.* 69, 337-345.
- McCoy, C.W., Stuart, R. J., Duncan, L.W., Nguyen, K. 2002. Field efficacy of two commercial preparations of entomopathogenic nematodes against larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in alfisol type soil. *Florida Entomologist.* 85:537–544.
- Molina, J. P. A., Moino Junior, A., Cavalcanti, R. S. 2004. Produção in vivo de nematoides entomopatogênicos em diferentes hospedeiros. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 71: 347-354.
- Neves, J. M., Teixeira, J. A., Simões, N. Mota, M. 1998. Produção de nematodos entomopatogênicos *Steinernema* spp. em fermentador airlift não convencional: Avaliação da Eficácia. *Biotec' 98*, 216p.
- Poinar Junior, G. O. 1979. *Nematodes for biological control of insects.* 277 p.
- Poinar Junior, G. O. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler R, Kaya HK, editors. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, CRC Press. 23-61p.
- Poinar, G. O., Grewal, P. S. 2012. History of entomopathogenic nematology. *Journal of Nematology.* 44, 153-161.
- Portillo-Aguilar, C., Villani, M. G, Tauber, M. J, Tauber, C. A, Nyrop JP. 1999. Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. *Environ. Entomol.* 28: 1021–1035.
- Ramos-Rodríguez, R. O., Campbell, J.F., Ramaswamy, S.B., 2007. Efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* against the stored-product insect pests *Tribolium Castaneum* and *Plodia Interpunctella*. *Biol. Control.* 40:15–21.
- Rohde, C., Moino Junior, A., Carvalho, F. D., Silva, M. A. T. 2012. Selection of entomopathogenic nematodes for the controlo the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Revista Brasileira de Ciência Agrária.* 7: 797-802.
- Rosa, J.M.O., Wilcken, S.R.S., Aguilera, M.M., Leite, L.G. 2007. Suscetibilidade de *Conitermes cumulans* (Kollar, 1832) a isolados de nematoides entomopatogênicos. *Nematologia Brasileira Piracicaba.* 31: 210-221.
- Salvadori, J.M. Caracterização da atogenicidade de nematoides entomopatogênicos e de bactérias associadas para o controle biológico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. 140p. Tese (Biologia Celular e Molecular).

- Shapiro, D. I., and McCoy, C. W. 2000. Susceptibility of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) larva to different rates of entomopathogenic nematodes in the greenhouse. Fla. Entomol. 83:1–9.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode lagartae from cultures. Science. 66:302-303.
- Woodring, L., Kaya, H. K. 1988. *Steinernematid and heterorhabditis nematodes: a handbook of techniques*. Southern Cooperative Series Bull. 331. Arkansas agric. Exp. Statn., Fayetteville, AR, USA. 30p.

Tabela 1. Infecção (%) de juvenis infectantes (J3) dos isolados *Steinernema carpocapsae* IBCB 02, *Steinernema brazilense* IBCB 06, *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 e *Steinernema feltiae* IBCB 47 em lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) em diferentes substratos.

Tratamentos	<i>S. carpocapsae</i>	<i>S. brazilense</i>	<i>H. amazonensis</i>	<i>S. feltiae</i>
	IBCB02	IBCB06	IBCB24	IBCB47
Papel filtro/ escuro	7,1 a	32,8 b	47,1 c	122,6 b
Papel filtro/ luz	10,6 a	37,2 b	35,8 c	127,8 b
Areia/ escuro	3,8 a	68,2 a	86,0 b	176,8 a
Areia / luz	9,5 a	95,5 a	186,0 a	160,8 a
CV = 51,15%	P tratamento	P isolado		
	< 0,001	< 0,001		

* Médias seguidas de mesma letra minúscula por coluna não diferem pelo Teste de Scott-Knott ($P > 0,05$).

CAPÍTULO V – “Preservação de *Steinernema brazilense* e *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) armazenados em diferentes substratos”

Revista: Biological Control

Preservação de *Steinernema brazilense* e *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) armazenados em diferentes substratos

RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são considerados ótimos agentes para o controle biológico de pragas. A baixa sobrevivência desses organismos em condições de laboratório compromete a eficiência no campo. A preservação destes nematoides em substratos conservantes pode auxiliar na manutenção da viabilidade prolongando a sobrevivência em condições de armazenamento. Com o objetivo de avaliar o uso de diferentes substratos para prolongar a sobrevivência de duas espécies de NEPs em cadáveres de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) durante o período de armazenamento, dois experimentos foram realizados. O delineamento experimental do primeiro experimento foi inteiramente casualizado com 14 tratamentos e com cinco repetições, totalizando 175 parcelas. Cadáveres de lagartas de *G. mellonella* foram infectadas com 200JIs/ml pelas espécies *Steinernema brazilense* IBCB 06 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 e acondicionadas aos substratos; vermiculita expandida Dimy[®], perlite expandida Schumacher[®], espuma fenólica Green-up[®], gel Forth[®] 2g e 3g, e *G. mellonella* em pote. As testemunhas constituíram de 7000JI/ml/espécie (testemunha). No segundo experimento as mesmas espécies de NEPs foram utilizadas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e com dez repetições totalizando 150 parcelas. As lagartas de *G. mellonella* foram infectadas com 200JIs/ml/espécie. Após a morte, os cadáveres foram acondicionados ao substrato; vermiculita expandida Dimy[®] e as suspensões foram inoculadas sobre o substrato vermiculita (5000JIs/ml) e a testemunha foi constituída de suspensão de (5000JIs/ml). Todos os tratamentos foram armazenados em BOD a 25°C, e as avaliações realizadas após 20, 30, 60, 120 e 180 dias, para ambos os experimentos, com a contagem de juvenis infectantes vivos e mortos. Os melhores substratos para o armazenamento dos JIs de *S. brazilense* IBCB 06 ao longo de 120 dias foi à espuma fenólica com 85,8% e a vermiculita com 78,0% de sobrevivência dos JIs. Após 180 de armazenamento a espuma fenólica proporcionou 48,8% de sobrevivência dos JIs. Para os JIs de *H. amazonensis*, a vermiculita permitiu a sobrevivência de 86,8% ao longo de 120 dias de armazenamento. No segundo experimento, os JIs de *H. amazonensis* apresentaram 62,7% de sobrevivência e *S.*

brazilense 5,5%. A sobrevivência foi nula quando as suspensões dos JIs de ambas as espécies foram inoculados diretamente no substrato vermiculita.

Palavras chave: armazenamento, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, substrato, sobrevivência.

Preservation *Steinernema brazilense* and *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) stored in different substrates

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (ENPs) of *Steinernema* and *Heterorhabditis* genera are considered optimal agents for biological control of pests. The low survival of these organisms in laboratory conditions compromises the efficiency in the field. The preservation of these nematodes in preservatives substrates may aid in maintaining viability of prolonging their survival on storage conditions. In order to evaluate the use of different substrates to prolong the survival of two species of EPNs in corpses for *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) during the storage period, two experiments were performed. The experimental design of first experiment was completely randomized with 14 treatments and five repetitions, totaling 175 plots. Dead larvae of *G. mellonella* were infected with the species 200 IJs/mL of *Steinernema brazilense* IBCB 06 and *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 and secured to substrates; expanded vermiculite Dimy®, perlite expanded Schumacher®, phenolic foam Green-up®, gel Forth® 2g and 3g and *G. mellonella* in pot. The witnesses consisted of 7000IJ/ml/ species (control). In the second experiment the same species of EPNs were used. The experimental design was completely randomized with five treatments and ten repetitions totaling 150 plots. The larvae of *G. mellonella* were infected with 200 IJs/mL/species. After death, the bodies were placed to the substrate; expanded vermiculite Dimy® and suspensions were inoculated on vermiculite (5000 IJs/ml) was established and the control suspension (5000IJs/mL). All treatments were stored in a chamber at 25°C, and evaluations conducted after 20, 30, 60, 120 and 180 days for both experiments with live and dead juveniles count. The best substrates for the storage the IJs *S. brazilense* IBCB 06 over 120 days was the phenolic foam with vermiculite 85.8% and 78.0% survival of the IJs. After 180 storage phenolic foam provided 48.8% survival of IJs. To IJs of *H. amazonensis*, vermiculite allowed the survival of 86.8% over 120 days storage. In the second experiment, the IJs of *H. amazonensis* presented 62.7% survival and *S. brazilense* 5.5%. Survival was zero when the suspension of IJs of both species were inoculated directly on vermiculite substrate.

Keywords: storage, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, substrate survival.

1. Introdução

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* Travassos e *Heterorhabditis* Poinar são considerados importantes agentes de controle biológico de pragas (Campos-Herrera *et al.*, 2012). A sua associação mutualística com as bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* Thomas & Poinar, e *Photorhabdus* Louis & Kuhl, respectivamente, causam a morte rápida do inseto hospedeiro (Dolinski *et al.*, 2010).

O juvenil infectivo de NEP, vive livremente no solo em busca de um hospedeiro suscetível. Uma vez infectando um inseto hospedeiro, os nematoides liberam sua bactéria mutualística, a qual, em combinação com toxinas produzidas pelos nematoides, matam o inseto hospedeiro em 24 a 48 horas, estes passam duas gerações dentro do inseto e após o esgotamento do alimento, os JIs emergem do cadáver em busca de novos hospedeiros (Chaston; Goodrih-Blair, 2010; Adams; Nguyen, 2002).

As estratégias usadas pelos NEPs para sobreviver em condições adversas (dessecação, congelamento, radiação ultravioleta, doenças e predação) são pouco conhecidas, podendo estar relacionadas com o processo de quiescência, migração ou permanência no cadáver dos insetos por períodos extensos, temperatura exigida de cada espécie (Westerman, 1999), e a umidade, que quando baixa, favorece o processo de anidrobiose que incidi negativamente na infectividade dos nematoides (Molina; Lopez, 2001).

Desde que a utilização de NEPs entrou em uso comercial para o controle biológico de pragas de insetos, o problema da curta vida de prateleira tem inibido a expansão na sua utilização, entretanto os progressos das novas tecnologias de formulações de NEPs foram significativos nos últimos 15 anos e, diversas espécies de NEPs são estudadas para produção massal e utilizadas em programas de controle biológico de pragas (Hussein; Abdel-Aty, 2012).

Os JIs de NEPs podem ser armazenados durante alguns meses em camadas rasas de água em frascos aerados em temperatura ambiente, mas é difícil de serem manuseado devido estarem em suspensão (Nickle, 1991). Porém podem ser armazenados em diferentes substratos, como carvão ativado, alginato, vermiculita, argila, e ainda podem ser multiplicados *in vitro* utilizando esponja porosa como substrato (Kaya; Stock, 1997).

Quando produzidos, os nematoides podem ser fornecidos de uma forma ativa em esponja ou em líquidos, mas geralmente eles são formulados de forma sólida e inerte como, por exemplo, em argilas e em vermiculita, em que os nematoides são parcialmente

desidratados (Bedding, 1988; Grewal, 2000). Recentemente foi desenvolvida uma nova formulação de cadáveres armazenados em fita e estes apresentam potencial para uso em aplicação de NEPs (Shapiro-Ilan *et al.*, 2010).

As formulações são alternativas para aumentarem a eficiência dos JIs, alguns NEPs apresentam a capacidade de entrar em anidrobiose parcial (quiescência), assim, esta característica foi pesquisada, e permitiu o desenvolvimento de formulações com maior tempo de armazenamento, a exemplo, o pó molhável e os grânulos solúveis em água (Grewal, 2002). Além disso, os insetos cadáveres também podem ser envolvidos por talco ou amido, esse procedimento confere ao inseto cadáver que será adicionado ao solo, uma maior rigidez e durabilidade (Shapiro-Ilan *et al.*, 2001). Assim, muitos métodos têm sido desenvolvidos para o armazenamento comercial dos nematoides, em que a água livre é absorvida pelo material inerte como a esponja ou outros compostos porosos como géis higroscópicos (Grewal, 2002).

As formulações à base de esponjas de poliéter-poliuretano são largamente utilizadas para estocar e transportar pequenas quantidades de nematoides produzidos por pequena indústria (mercados de gramado e jardim). Esta é feita pela aplicação em suspensão aquosa de nematoides em placa com esponja, usualmente com 500-1000 JIs/cm² de área superficial. Nematoides no interior de esponjas podem ser armazenadas de um a três meses de 5°C a 10°C. Normalmente de 5 a 25 x 10⁶ JIs são aplicadas sobre placas com esponjas e colocadas em sacos plásticos. Essa formulação não é conveniente para grandes aplicações devido à drástica mudança do método e da necessidade de grande quantidade de esponjas (Grewal, 2002).

A precária armazenagem e sobrevivência durante a pós-aplicação são os maiores obstáculos para a expansão no uso de NEPs como bioinseticida. As formulações à base de vermiculita se mostram melhor que à esponja, pelo fato do produto ser mais concentrado com longa estabilidade de armazenamento, apresentando uma maior aplicabilidade (Grewal, 2002). A vermiculita é utilizada sobre suspensão aquosa dos nematoides, a mistura é homogeneizada e colocada em sacos de polietileno, acrescentada em tanques de pulverização (Grewal, 2002) e as formulações a base de vermiculita reduzem a mobilidade dos nematoides, assim diminuindo perdas com as reservas energéticas estocadas de juvenis.

Estudos que influenciam a sobrevivência dos NEPs é um aspecto importante para sua liberação no campo, a fim de manter a qualidade do inóculo (Brown; Gaugler, 1996). O

uso de substratos conservantes pode auxiliar na manutenção da viabilidade desses nematoides, prolongando a sua sobrevivência. Desta forma, o objetivo foi avaliar o uso de diferentes substratos para prolongar a sobrevivência de juvenis em cadáveres infectados por duas espécies de NEPs durante o período de armazenamento.

2. Material e métodos

Os isolados de nematoides entomopatogênicos utilizados foram as espécies *Steinernema brazilense* IBCB 6 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 obtidos da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos depositados no Banco de Nematoides Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu,” do Instituto Biológico, em Campinas, SP (Goulart *et al.*, 2003). Os isolados foram mantidos em frascos de plástico de 1L em BOD em temperatura de 18°C em suspensão aquosa.

2.1 Multiplicações dos isolados

Os nematoides foram multiplicados em lagartas de quinto ínstar de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), criada em temperatura de 30°C com dieta à base de favo e cera de abelha sem luminosidade. Foram utilizadas cinco lagartas por placas de Petri de $\varnothing=9$ cm com duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5 mL de suspensão com 500 juvenil/placa, disponibilizando 100 juvenil/lagarta para cada espécie separadamente. Essas placas foram lacradas com papel filme PVC e acondicionadas em BOD com temperatura a 25°C (Woodring; Kaya, 1988). Após três dias, as lagartas mortas foram transferidas para armadilha de White (White, 1927) e armazenadas em BOD a 25°C por três a 15 dias. Os JIs que abandonaram os cadáveres foram recolhidos com água destilada, filtrados e decantados para a retirada dos corpos gordurosos dos insetos e quantificados em placas de contagem.

Primeiro experimento: as suspensões dos NEPs/espécie foram quantificadas e calibradas a 2 ml contendo 200 juvenil/ml e foram inoculadas em placas de Petri de $\varnothing=9$ cm revestidas com duas folhas de papel filtro contendo duas lagartas de *G. mellonella*. Após três dias da mortalidade, dois cadáveres das lagartas foram transferidos e acondicionados em cada tratamento. Os substratos e as testemunhas foram colocados em recipientes de polietileno com tampa com capacidade de 200 ml. As tampas foram perfuradas para promover a oxigenação no interior do recipiente.

Os tratamentos foram constituídos de 3g e 2g de gel para plantio Forth[®], 15g de vermiculita Dimy[®], 7g de perlite expandida Schumacher[®], espuma fenólica para germinação Green-up[®] e cadáver de *G. mellonella* em pote. A espuma fenólica foi lavada em água corrente e posteriormente esterilizada e secada em estufa a 45°C durante três dias. Após a secagem foram cortadas em cubo com 4,0 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura, posteriormente os cadáveres das lagartas foram acondicionados no interior da esponja. Foi adicionada água esterilizada para a manutenção da umidade, com saturação de 40% (peso/volume) em todos os tratamentos. As testemunhas compreenderam de dois cadáveres de *G. mellonella* acondicionados em recipientes de polietileno, sendo borrifados 3 ml de água destilada para a manutenção da umidade e as suspensões em água na concentração de 7000/JIs/ml da espécie em estudo, totalizando um volume de 40ml.

Após a liberação dos cadáveres das lagartas de *G. mellonella* e padronização das suspensões, todos os recipientes foram acondicionados em bandejas de polietileno simples, forradas com papel toalha umedecidos, e armazenados em BOD a 25°C. Assim, foram considerados sete tratamentos, com cinco repetições para cada dia de avaliação, totalizando 175 parcelas para cada espécie de NEPs. A obtenção da suspensão dos nematoides recuperados dos substratos foi realizada de acordo com cada tratamento. Para a obtenção das suspensões dos JIs mantidos em espuma fenólica, foram utilizadas peneiras de 80 mesh e 500 mesh, colocando-a a espuma dentro da peneira de 80 e espremendo manualmente, adicionando água para auxiliar na extração dos juvenis. Assim, os pedaços dos substratos ficaram retidos na peneira maior e os nematoides retidos na peneira menor, de onde os mesmos foram coletados. Para a obtenção da suspensão dos JIs mantidos nos substratos vermiculita, perlite e géis, foram utilizados peneira de 60 mesh sobre a peneira de 500 mesh, com a lavagem do substrato com água esterilizada. A avaliação do cadáver de *G. mellonella* em pote foi realizada com a retirada do cadáver, do interior do recipiente e adicionada água esterilizada para a retirada dos juvenis, o conteúdo foi vertido em peneira de 60 mesh e recolhidos em peneira de 500 mesh.

Todas as suspensões foram recolhidas no próprio recipiente de preservação. As avaliações foram realizadas aos 20, 30, 60, 120 e 180 dias após a liberação dos cadáveres no interior dos recipientes. A sobrevivência dos JIs foi verificada através das suspensões obtidas de cada tratamento, quantificados o número de JIs vivos e mortos, com a indução do movimento do juvenil com auxílio de alfinete entomológico.

Após definir o melhor substrato para a preservação dos cadáveres de lagartas de *G. mellonella* infectados pelas espécies de NEPs no primeiro experimento, um segundo experimento foi realizado, para a comprovação dos dados. A vermiculita foi utilizada, por ser considerada economicamente viável e de manuseio prático, quando comparado à espuma fenólica.

Segundo experimento: as suspensões de *S. brazilense* IBCB 06 e *H. amazonensis* IBCB 24 foram quantificadas e calibradas a 2 ml contendo 200 juvenil/ml e foram inoculadas em placas de Petri de ($\varnothing=9$) revestidas com duas folhas de papel filtro contendo duas lagartas de *G. mellonella*. Após três dias da mortalidade, dois cadáveres das lagartas foram transferidos e acondicionados em cada tratamento. Utilizou-se de 15g de vermiculita e dois cadáveres de lagartas de *G. mellonella* para o tratamento do cadáver em vermiculita e para o tratamento suspensão de NEPs em vermiculita foram inoculados 5000/JIs/ml da espécie em teste sobre 15g de vermiculita, totalizando um volume de 40 ml. As testemunhas foram constituídas de suspensões com concentração de 5000/JIs/ml que totalizavam um volume de 40 ml. Os substratos e as testemunhas foram colocados em recipientes de polietileno com tampa com capacidade de 200 ml. As tampas foram furadas para promover a oxigenação no interior do recipiente.

Para isso foram considerados cinco tratamentos, com dez repetições para cada dia de avaliação, totalizando 150 parcelas para cada espécie de NEPs. Os tratamentos foram umedecidos com água esterilizada mantendo-se o substrato com saturação de 40% (peso/volume). Após a liberação dos cadáveres das lagartas de *G. mellonella* e padronização das suspensões todos os recipientes foram acondicionados em bandejas de polietileno simples, forradas com papel toalha úmidecidos e posteriormente armazenados em BOD a 25°C. Para a obtenção da suspensão dos JIs mantidos nos substratos vermiculita, foram utilizados peneira de 60 mesh sobre a peneira de 500 mesh, e foi realizada a lavagem do substrato em água esterilizada.

Todas as suspensões foram recolhidas no próprio recipiente de preservação. As avaliações foram realizadas aos 20, 30, 60, 120 e 180 dias. A sobrevivência dos JIs foi verificada através das suspensões obtidas de cada tratamento, contabilizando o número de JIs vivos e mortos, com a indução do movimento do juvenil com auxílio de alfinete entomológico. Após a coleta dos dados, os resultados das médias foram comparadas e analisadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa computacional de estatística BioEstat versão 5.3 (Ayeres *et al.*, 2007).

3. Resultados

Primeiro experimento: A sobrevivência dos JIs de *S. brasiliense* variou de 99,6 a 95,4% sem diferenças estatísticas, diferindo apenas dos tratamentos suspensão em pote e *G. mellonella* em pote aos 20 dias de armazenamento. Os tratamentos *G. mellonella* em perlite, suspensão JIs em pote e *G. mellonella* em pote aos 30, 60 e 90 dias apresentaram as taxas de sobrevivência dos JIs inferiores aos demais tratamentos (Tabela 1). Aos 120 dias os tratamentos *G. mellonella* em perlite e *G. mellonella* em pote não permitiram a sobrevivência dos JIs. A maior sobrevivência obtida em cadáveres de *G. mellonella* armazenados em espuma fenólica (85,8%), vermiculita (78,0%), seguido do gel 3g (52,0%), gel 2g (49,8%) e suspensão em pote (23,0%). Aos 180 dias apenas a espuma fenólica permitiu a sobrevivência dos JIs com 48,8% de sobrevivência (Tabela 1).

A sobrevivência dos JIs de *H. amazonensis* aos 20 dias variou de 82,8 a 97,6% diferindo estatisticamente da menor taxa de sobrevivência obtida pelo tratamento *G. mellonella* em gel 2g (65,0%). Aos 30 dias, as menores taxas de sobrevivências dos JIs foram encontradas nos tratamentos *G. mellonella* em perlite (46,6%) e *G. mellonella* em gel 2g (62,2%). Aos 60 dias, houve decréscimo na taxa sobrevivência dos JIs exceto para o tratamento *G. mellonella* em vermiculita e espuma fenólica, entretanto com diferenças estatísticas entre os tratamentos. Aos 120 dias não foi observado à sobrevivência no tratamento *G. mellonella* em perlite, o tratamento *G. mellonella* em espuma fenólica apresentou a segunda maior taxa de sobrevivência (53,2%). Aos 180 dias, foram observadas baixas taxas de sobrevivência, exceto para o tratamento *G. mellonella* em vermiculita que apresentou altas taxas de sobrevivência dos JIs em todos os períodos de avaliações, 20 dias (97,6%), 30 dias (94,0%), 60 dias (91,6%), 120 dias (86,8%) e 180 dias (70,6%) (Tabela 1).

Segundo experimento: Os JIs de *S. brasiliense* e de *H. amazonensis* inoculados em vermiculita não sobreviveram após 20 dias da inoculação (Tabela 2). Os JIs de *S. brasiliense* em suspensão em pote e *G. mellonella* em vermiculita demonstraram diferenças na sobrevivência até aos 60 dias de armazenamento, diferindo estatisticamente a partir do tratamento suspensão em pote aos 120 dias (32,9%) e aos 180 dias de (35,5%). Os JIs de *H. amazonensis* mantiveram-se vivos (62,7%) ao longo de 180 dias, mostrando diferença significativa quando comparado ao tratamento suspensão em pote (3,8%) (Tabela 2).

4. Discussão

Os métodos de armazenamento e formulações de nematoides entomopatogênicos devem satisfazer dois critérios principais, um é a sobrevivência máxima dos JIs e o outro a conservação máxima da sua infecciosidade (Grewal, 2002).

Na presente pesquisa os dois melhores substratos que mantiveram os JIs preservados ao longo de 180 dias de armazenamento foram à espuma fenólica e a vermiculita expandida. A espuma fenólica serve como suporte físico para retenção do meio de cultura e para a reprodução do nematoide, e a vermiculita é um substrato inerte e apresenta retenção de água proporcionando umidade propícia para o armazenamento dos cadáveres infectados, e ambos (vermiculita e cadáver inseto hospedeiro) podem ser aplicados juntamente (Hussaini *et al.*, 2002; Del Valle *et al.*, 2008). Leite *et al.* (2011) ao estudarem o armazenamento de *S. feltiae* IBCB 47 em esponja, observaram que este substrato permitiu a produção desta espécie com rendimentos superiores a 200.000 JIs/mL. Andaló *et al.* (2010), ao avaliarem diferentes substratos na sobrevivência de NEPs, verificaram a maior sobrevivência dos JIs de *S. carpocasae* All (57,5%) e *Heterorhabditis* sp. JPM4 (55,6%) em espuma e a menor sobrevivência em esponja fenólica, 11% e 11,6%, respectivamente ao longo de 180 dias. A baixa sobrevivência após 180 dias, também foi verificada na presente pesquisa, no tratamento espuma fenólica para os JIs de *S. brazilense* e *H. amazonensis* de 48,8% e de 6,6%, respectivamente. Entretanto ambos aos 120 dias apresentaram altas taxas de sobrevivência. Grewal (2002) cita que a formulação a base de vermiculita apresenta significativa melhora sobre a esponja, dados que podem ser comprovados, quando *S. brazilense* e *H. amazonensis* foram armazenados em vermiculita no presente estudo.

Os substratos compostos porosos como os géis higroscópicos ajudam no armazenamento comercial dos nematoides em que a água livre é absorvida pelo material inerte (Nickle, 1991), estas apresentam aplicabilidade e capacidade de aumentar a persistência dos nematoides, devido a redução no metabolismo e imobilização, acompanhada ou não por refrigeração do produto ou dessecação parcial dos JIs (Georgis *et al.* 1995). *S. brazilense* quando mantidos em *G. mellonella* em gel 3g e 2g apresentou queda na sobrevivência a partir dos 120 dias, 52,0% e 49,8% respectivamente. *H. amazonensis*, mesmo apresentando baixa taxa de sobrevivência, manteve a sobrevivência dos JIs, 3,40 e 3,20%, respectivamente.

A adição de perlite (rocha vítrea de origem vulcânica) no substrato de crescimento ou o uso de perlite isoladamente como substrato podem afetar negativamente a eficiência dos NEPs (Tomalak *et al.*, 2005). As pontas agudas das partículas de perlite causam injúrias e matam os JIs que estejam em movimento (Jagdale *et al.*, 2004). Isto pode ser observado no tratamento *G. mellonella* em perlite, que manteve os JIs vivos apenas aos 20 dias, com queda na sobrevivência a partir dos 30 dias.

A sobrevivência dos JIs de *S. carpocasae* e *H. amazonensis* foi confirmada no segundo experimento. As suspensões dos JIs aplicados diretamente sobre a vermiculita não permitiu a sobrevivência dos JIs. Segundo Ansari *et al.* (2009) verificaram que ao colocar cadáveres infectados no solo em vez de aplicar diretamente os nematoides entomopatogênicos sobre a superfície do solo evita-se a dessecação e inativação pelos raios ultravioletas. A taxa de sobrevivência dos JIs de *S. carpocasae* aos 120 e 180 dias do tratamento suspensão em pote foi superior a 25,5%, diferindo estatisticamente do tratamento *G. mellonella* em vermiculita 5,5%. Segundo Wright e Perry (2002) os NEPs quando armazenados em água, utilizam as suas reservas de forma diferente, alterando o seu comportamento e locomoção adotando uma postura imóvel, que são formas de diminuir seu gasto de energia e superação a condições de estresse.

Aos 120 e 180 dias de armazenamento, os cadáveres de *G. mellonella* em vermiculita se desintegraram, e os JIs ficaram concentrados no material de decomposição da lagarta, o que pode ter permitido a sobrevivência dos JIs.

Diante disto, o presente estudo demonstra a importância da utilização de substratos no armazenamento de cadáveres infectados de *G. mellonella* com NEPs, sendo a vermiculita uma alternativa viável que possibilita o fácil manuseio e a fácil aplicação por tratar-se de um material inerte.

Portanto conclui-se que os melhores substratos para a sobrevivência dos JIs de *S. brazilense* e *H. amazonensis*, foram a vermiculita e a esponja fenólica, ao longo dos 120 de armazenamento.

Referências

- Adams, B.J., Nguyen, K. B. 2002. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.). Entomopathogenic nematology. New Jersey: Rutgers University. p.1-28.
- Andaló, V., Cavalcanti, R. S., Molina, J. P., Moino Junior, A. 2010. Substrates for storing entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Sci. Agri.* **67**, p.342-347.

- Ansari, M. A., Hussain, M. A., Moens, M. 2009. Formulation and application of entomopathogenic nematode-infected cadavers for control of *Hoplia philanthus* in turfgrass. *Pest Manag Sci.* **65**, p.367–374.
- Ayeres, M., Ayeres, D. L., Santos, A. A. S. 2007. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas. 364 p.
- Bedding, R. A. 1988. Storage of entomopathogenic nematodes. Patent no. WO88/08668.
- Brown, I.M., Gaugler, R., 1996. Cold tolerance of steinernematid and heterorhabditid nematodes. *J. Therm. Biol.* **21**, p.115–121.
- Campos-Herrera, R., Barbercheck, M., Hoy, C.W., Stock, S.P., 2012. Entomopathogenic nematodes as a model system for advancing the frontiers of ecology. *J. Nematol.* **44**, p. 162-176.
- Chaston, J., Goodrich-Blair, H., 2010. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, p.41-58.
- Del Valle, E. E, Dolinski, C., Barreto, E. L. S., Souza, R. M., Samuels, R. I. 2008. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology.* **18**, p.33-41.
- Dolinski, C., Pinto, C. C. S., Robaina, R. R., Bellini, L. L. 2010. Efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade de *Heterorhabditis baujardi* 'LPP7' (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Nematologia Brasileira.* **34**, p.123-128.
- Georgis R., Dunlop, D. B., Grewal, P. S. 1995. Formulation of entomopathogenic nematodes. Pp. 197–205 In: F. R. Hall, and J. W. Barry, eds. Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery. Washington, DC: American Chemical Society. pp. 197–205.
- Goulart, R. M.; Tavares, F. M.; Leite, L. G.; Machado, L. A.; Batista Filho, A.; Almeida, J. E. M. Formação de um banco de nematoides entomopatogênicos no Instituto Biológico, SP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro, Resumos... São Pedro, 2003. 83p.
- Grewal, P. S. 2000. Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Management Science.* **56**, p.401 – 406.
- Grewal, P. S. 2002. Formulation and application technology. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. ed.). Wallingford: CABI Publishing. p.265–287.
- Hussaini, S.S., Singh, S.P., Parthasarathy, R. and Shakeela, V. 2002. *In vitro* production of entomopathogenic nematodes in different artificial media. *Indian Journal of Nematology.* **32**, p.44-46.

- Hussein, M. A., Abdel-Aty, M. A. 2012. Formulation of two native entomopathogenic nematodes at room temperature. *JBiopest.* **5**, p.23-27.
- Jagdale, G.B., Mildred, L.C., Grewal, P.S., Lindquist, R. K. 2004. Application rate and timing, potting medium, and host plant effects on the efficacy of *Steinernema feltiae* against the fungus gnat, *Bradysia coprophila*, in floriculture. *Biological Control.* **29**, p.296-305.
- Kaya, H.K., Stock, P. Techniques in insect nematology. 1997. In: LACEY, L. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. New York: Academic Press. **6**, p.281-324.
- Leite, L. G., Schimidt, F. S., Dellacqua, R., Pietrobon, T. C., Marraschi, R. 2011. Avanços na produção “*in vitro*” de nematoides entomopatogênicos. 12º SICONBIOL, Simpósio de Controle Biológico “Mudanças climáticas e sustentabilidade: quebra de paradigmas”, 51p.
- Molina, A. J. P., López, N. J. C. 2001. Producción in vivo de três entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. *Rev. Colomb. Entomol.* **27**, p.73-78.
- Nickle, W.R. Manual of agricultural nematology. New York: Marcel Dekker, 1991.
- Shapiro-Ilan, D. I., Gaugler, R. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* **28**: 137–146.
- Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., Behle, R. W., McGuire, M. R. 2001. Formulation of entomopathogenic nematode-infected-cadavers. *Journal of Invertebrate Pathology.* **78**, p.17–23.
- Shapiro-Ilan, D. I., Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G. and Tedders, W. L. 2010. Effects of a novel entomopathogenic nematode-infected host formulation on cadaver integrity, nematode yield, and suppression of *Diaprepes abbreviatus* and *Aethina tumida*. *Journal of Invertebrate Pathology.* **103**: 103–108.
- Tomalak M, Piggott, S., Jagdale, G. B. 2005. Glasshouse applications. In: P. S. Grewal, Ehlers, R.-U., and Shapiro-Ilan, D. I., eds. Nematodes as biological control agents. Wallingford: CABI Publishing. pp. 147–166.
- Westerman, P.R. 1999. Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20° C and effects on efficacy. *Journal of Invertebrate Pathology.* **73**, p.206- 213.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science.* **66**, p.302-303.
- Woodring, L., Kaya, H. K. 1988. *Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques*. Southern Cooperative Series Bull. 331. Arkansas agric. Exp. Statn., Fayetteville, AR, USA. 30p.

Wright, D.J., Perry, R. N. 2002. Physiology and biochemistry. In: Gaugler, R., ed. Entomopathogenic nematology. CAB International, Wallingford, UK. p.145-168.

Tabela 1

Efeito de diferentes substratos na sobrevivência (%) de *Steinernema brazilense* IBCB 06 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 aos 20, 30, 60, 120 e 180 dias após inoculação (DAI).

<i>Steinernema brazilense</i> IBCB 06					
SUBSTRATO	DIAS AVALIAÇÃO				
	20	30	60	120	180
<i>G. mellonella</i> /Perlite	99,40 aA	30,80 cB	3,0 cC	0 cC	0 bC
<i>G. mellonella</i> /Gel 3g	99,60 aA	98,40 aA	91,40 aA	52,00 bB	0 bC
<i>G. mellonella</i> /Esp. Fen.	98,20 aA	98,20 aA	92,40 aA	85,80 aA	48,80 aB
<i>G. mellonella</i> /Gel 2g	95,40 aA	89,20 aA	84,40 aA	49,80 bB	0bC
<i>G.mellonella</i> /Vermiculita	97,40 aA	96,40 aA	89,40 aA	78,00 aA	0 bB
Suspensão(JIs)/Pote	62,60 bA	57,20 bA	35,00 bB	23,60 cB	0 bC
<i>G. mellonella</i> /Pote	20,00 cA	3,80 dA	0,40 cA	0,0 cA	0 bA
CV (%) = 35,10					
P tratamento < 0,001 P dia < 0,001 P interação<0,001					

<i>Heterorhabditis amazonensis</i> IBCB 24					
SUBSTRATO	DIAS AVALIAÇÃO				
	20	30	60	120	180
<i>G.mellonella</i> / Vermiculita	97,60 aA	94,00 aA	91,60 aA	86,80 aA	70,60 aA
<i>G. mellonella</i> / Pote	92,60 aA	85,00 aA	25,20 dB	27,00 cB	10,60 bB
Suspensão(JIs)/Pote	94,20 aA	88,00 aA	27,40 dB	26,20 cB	4,20 cB
<i>G. mellonella</i> /Gel 3g	87,60 aA	82,00 aA	47,20 cB	7,60 eC	3,40 cC
<i>G. mellonella</i> /Perlite	86,00 aA	46,60 cB	38,00 cB	0,0 fC	0,0 dC
<i>G. mellonella</i> /Esp. Fen.	82,80 aA	82,20 aA	71,40 bA	53,20 bB	6,60 cC
<i>G. mellonella</i> /Gel 2g	65,00 bA	62,20 bA	22,60 dB	16,80 dB	3,20 cB
CV (%) = 35,24					
P tratamento < 0,001 P dia < 0,001 P interação<0,001					

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ($P > 0,05$)

Tabela 2

Sobrevivência (%) de *Steinernema brazilense* IBCB 06 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB 24 aos 20, 30, 60, 120 e 180 dias após inoculação (DAI) em diferentes substratos

<i>Steinernema brazilense</i> IBCB 06					
SUBSTRATO	DIAS AVALIAÇÃO				
	20	30	60	120	180
<i>G. mellonella</i> /vermiculita	90,40 aA	86,10 aA	73,80 aA	10,00 bB	5,50 bB
Suspensão de JIs/Pote	37,20 bA	34,55 bA	34,00 bA	32,90 aA	25,50 aA
Suspensão de JIs/Vermiculita	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA
CV (%) = 78,64					
P tratamento < 0,001 P dia < 0,001 P interação<0,001					

<i>Heterorhabditis amazonensis</i> IBCB 24					
SUBSTRATO	DIAS AVALIAÇÃO				
	20	30	60	120	180
<i>G. mellonella</i> /Vermiculita	92,00 aA	81,10 aA	81,00 aA	79,80 aA	62,70 aA
Suspensão de JIs/Pote	50,50 bA	49,30 bA	47,10 bA	31,70 bA	3,80 bB
Suspensão de JIs/Vermiculita	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA
CV (%) = 69,92					
P tratamento < 0,001 P dia < 0,001 P interação<0,001					

* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott (P>0,05)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de nematoides entomopatogênicos em sistema de manejo de pragas no Brasil vem crescendo, devido ao interesse por meios alternativos ao controle químico e com isto há um crescimento no setor científico e comercial. Portanto, o conhecimento da biodiversidade, variabilidade morfológica, molecular, principalmente da patogenicidade de nematoides a insetos pragas são importantes para a utilização em programas de controle biológico. Na presente pesquisa a comunidade de nematoides parasitas de insetos da mesofauna foi composta por espécies entomopatogênicas das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, como *Steinernema rarum* e *Heterorhabditis amazonensis* e por outros rhabditídeos como *Metarhabditis rainai* e *Oscheis tipulae*.

O estudo do desenvolvimento, temperatura, tipo de substrato e os parâmetros que influenciam o período de persistência dos nematoides é um aspecto importante tanto para garantir a sobrevivência dos juvenis infectantes em armazenamento, como também para liberação destes organismos no campo. Este trabalho colabora com informações importantes sobre o comportamento de *H. amazonensis*, com o conhecimento das exigências térmicas nas diferentes temperaturas. As temperaturas de 26°C e 30°C foram as melhores para a infecção, emergência e multiplicação em lagartas de *G. mellonella*.

A busca por técnicas padronizadas de produção *in vivo* ainda são muito pertinentes e os resultados desta pesquisa torna-se uma alternativa para a produção *in vivo*, que busca o melhoramento das técnicas atuais, que positivamente traz melhorias no sistema de inoculação, melhorando e aumentando as taxas de infecções por JIs, citando como exemplo os JIs quando foram inoculados em areia com luminosidade.

Neste trabalho observam-se diversos fatores que podem influenciar no armazenamento de NEPs, como a temperatura, luminosidade e o tipo de substrato o que pode ocasionar variações nas condições de sobrevivência para cada espécie. Os resultados obtidos demonstram a importância da presença de oxigênio para a sobrevivência de nematoides e o conhecimento das melhores temperaturas em que os nematoides se comportaram durante o armazenamento em suspensão e em diferentes substratos, fator importante para a manutenção da sobrevivência dos JIs. O exemplo de sucesso nesta pesquisa foi o uso da vermiculita como substrato de armazenamento para cadáveres infectados, uma alternativa viável que possibilita o fácil manuseio e que pode ser aplicada na agricultura, por tratar-se de um material inerte.

6. CONCLUSÕES

-As sequências da população FCA 07 foram idênticas com similaridade de 100% às de *Heterorhabditis amazonensis*, às das FCA 01, FCA 04, FCA 06, FCA 08, FCA 15 e FCA 16 idênticas entre si e à sequência de *Metarhabditis rainai* (gi 158821902); e às das FCA 02, FCA 03 e FCA 05 idênticas entre si e à sequência de *Oscheius tipulae* (gi 158821905) enquanto que as populações FCA 09, FCA 10, FCA 11, FCA 12, FCA 13 e FCA 14 apresentaram sequências com alta similaridade genética (99-100%) com as de *Steinernema rarum* (gi 16269584) e as FCA 09, FCA 11 e FCA 12, semelhantes entre si, diferiram em 3 pb das populações FCA 10, FCA 13 e FCA 14. Quatro grupos de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis*, *Steinernema*, *Metarhabditis* e *Oscheius* foram formados, sendo *Heterorhabditis amazonensis*, *Steinernema rarum*, *Metarhabditis rainai* e *Oscheius tipulae* identificadas.

- As temperaturas de 26°C e 30°C proporcionaram o menor período de tempo (três dias) para a mortalidade de lagartas de *G. mellonella* por *H. amazonensis* IBCB 24. O menor período de tempo para a emergência de JIs foram encontradas na temperatura 30°C, (9,4 dias). O número de JIs produzidos a 26°C (229.563) foi superior a todas as temperaturas estudadas, mas sem diferença estatística quando comparado aos JIs produzidos na temperatura de 30°C, (127.157). A temperatura de 22°C (223.886) não diferiu estatisticamente da menor temperatura de 18°C, esta que produziu o menor número de JIs (11.813).

- As temperaturas ideais para a sobrevivência dos JIs de *S. carpocapsae* IBCB 02, *H. amazonensis* IBCB 24 e *S. feltiae* IBCB 47 são 18 e 22°C em três meses de armazenamento. A sobrevivência dos JIs de *H. amazonensis* IBCB 24 foi inalterada a 26 e as populações de JIs de *S. feltiae* IBCB 47 foram mantidas nas temperaturas de 14 e 22°C, em três meses de armazenamento.

- As maiores taxas de infecção foram encontradas nos tratamentos areia/luz (95,5 JIs/lagarta) e areia/escuro (68,2 JIs/lagarta) para *S. brazilense* IBCB 06, areia/luz (186,0 JIs/lagarta) para *H. amazonensis* IBCB 24 e para *S. feltiae* IBCB 47 os tratamentos areia/escuro (176,8/JIs/lagarta) e areia/luz (160,8/JIs/lagarta). As taxas de infecções dos JIs de *S. carpocapsae* IBCB02 foram semelhantes, em todos os tratamentos.

- A espuma fenólica e a vermiculita foram considerada os melhores substratos para a sobrevivência dos JIs de *S. brazilense* IBCB 06 (85,8% e 78,0%) respectivamente e de *H. amazonensis* IBCB 24 (53,20% e 86,8%) ao longo de 120 dias de armazenamento. As suspensões dos JIs aplicados diretamente sobre a vermiculita não permitiu a sobrevivência dos JIs.

7. REFERÊNCIAS

ABU HATAB, M.; GAUGLER, R. Diet composition and lipids of *in vitro* – produced *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 20, p. 1-7, 2001.

ABU HATAB, M.; GAUGLER, R.; EHLERS, R. Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids. **Journal Parasitology**, Lawrence, v. 84, n. 2, p. 215-221, 1998.

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and Systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**, Cambridge, New York, CABI Publishing, 2002, p. 1-33.

AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematode *Neoplectna* and *Heterorhabditis*. **Journal General Microbiology**, Tokyo, n.121, p.303-309, 1980.

AKHURST, R. J. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families *Heterorhabditidae* and *Steinernematidae*. **Journal of General Microbiology**, Tokyo, v. 128, p. 3061-306, 1982.

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. Science. Garland Publishing, (3 ed); London, 1994, p.1255-1294.

ALMENARA, D. P. et al. Nematoides Entomopatogênicos. In: INCTEM (org.) **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. INCTEM: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Brasília, Cap.16, 2012, p. 1-40.

ALVES, V. S. et al. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos à cochonilha da raiz do cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 67-73, 2009a.

ALVES, V. S. et al. Testes em condições para o controle de *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera, Pseudococcidae) em cafeeiro com nematoides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida, Heterorhabditidae). **Revista Brasileira da Entomologia**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 139-143, 2009b.

ANDALÓ, V. et al. Seleção de isolados de fungos e nematoides entomopatogênicos pra a cochonilha-da- raiz- do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 181-187, 2004.

ANDALÓ, V.; NGUYEN, K.; MOINO JUNIOR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, Leiden, v.8, n.6, p. 853-867, 2006.

ANJU, K. M. et al. Purification and identification of an antibacterial protein from the symbiotic bacteria associated with novel entomopathogenic nematode, *Rhabditis* (*Oscheius*) sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 31, n.1, p. 621-632, 2015.

BAI, C., et al. Stabilization of beneficial traits in *Heterorhabditis bacteriophora* through creation of inbred lines. **Biological Control**, San Diego, v. 32, p. 220-227, 2005.

BAILLE, D.; BARRIERI, A.; FELIX, M. A. *Oscheius tipulae*, a widespread hermaphroditic soil nematode, displays a higher genetic diversity and geographical structure than *Caenorhabditis elegans*. **Molecular Ecology**, v. 17, n.6, Chichester, p. 1523-1534, 2008.

BARBOSA, C. R. C. **Técnicas de produção *in vivo* de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae em *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e hospedeiros alternativos.** 2005. 91f. Tese (Doutorado) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

- BATISTA, E. S. et al. Nematoides entomopatogênicos infectam ovos e adultos cigarrinhas-das-pastagens?. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 3, p. 475-478, 2011.
- BATISTA, E. S. P. et al. Screening of entomopathogenic nematode to control *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Revista Colombiana Entomologica**, Bogotá, v. 37, n. 2, p. p.198-202, 2011.
- BEDDING, R. A. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. **Nematologica**, Leiden, v. 27, n.1, p. 190-114, 1981.
- BEDDING, R. A.; BUTLER, K. L. Method for storage of insecticidal nematodes. **World Patent**, London, n. WO 94/05150, 1994.
- BEDDING, R. A. Storage of insecticidal nematodes. **International World Patent**, London, n. WO 88/08668., 1988.
- BEDDING, R. A. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp.. **Annals Applied Biology**, West Sussex, v. 104, n.1, p. 117-120, 1984.
- BLINOVA, S. L.; IVANOVA, E. S. Culturing the nematode-bacterial complex of *Neoplectana carpocapsae* in insects. In: SONIN MD (Ed.). **Helminths of insects**, Publishing, New Delhi, 1987. p. 22-26.
- BOEMARE, N. Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. Boca Rota: CAB International 2002 (ed. R. Gaugler) p. 311-326, 2002.
- BOEMARE, N. E. et al. A Synopsis on and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. **Symbiosis**, Luxembourg, v. 22, p. 21-45, 1997.
- BOEMARE, N. E.; AKHURTS, R. J. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Entrobacteriaceae). **Journal of General Microbiology**, Australia, n. 134, p. 751-761, 1988.

BOFF, M. I. C. et al. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E87.3 in *Galleria mellonella*. **Nematology**, Leiden, v. 2, n.3, p. 303-308, 2000.

BORTOLUZZI, L. **Avaliação do potencial de nematoides entomopatogênicos no controle da broca-da-bananeira *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824)**. 2009. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Candido Rondon, 2009.

BRENNER, D. J.; FARMER, J. J. Order XIII. "*Enterobacteriales*", In: BERGEY'S, B. D. J.; BRENNER, N. R.; KRIEG, J. T. **Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, Part Staley, (Eds.). Springer, p. 587-850, ISBN 978-0387-24144-9, New York, USA, 2005.

BURMAN, M.; PYE, A. E. *Neoaplectana carpocapse*: respiration of infective juveniles. **Nematologica**, Leiden, v. 26, n.2, p. 214-219, 1980.

BURNELL, A. M., STOCK, S. P. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts - lethal pathogens of insects. **Nematology**, Belgium, v. 2, n.1, p.31 – 42, 2000.

CABANILLAS, H. E.; RAULSTON, J. R. Pathogenicity of *Steinernema riobraviss* against corn earworm, *Helicoverpa zea* (Boddie). **Fundamental Applied Nematology**, Leiden, v. 17, n.3, p. 219-223, 1994.

CAGNOLO, S. R.; WALTER, R. A. Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasite *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, Tucuman, p. 69, n. 1-2, p. 141-145, 2010.

CAPINERA, J. I.; HIBBARD, B. E. Bait formulations of chemical and microbial insecticides for suppression of crop feeding grasshoppers. **Journal of Agricultural Entomology**, Pleasant, v. 4, n.4, p. 337-344, 1987.

CARDOSO, D. O. **Potencial e caracterização do isolado de nematoide entomopatogênico LPP35 como agente no controle de formas imaturas de *Aedes aegypti***. 2014. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Centro de Ciências e

Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2014.

CARTA, L. K.; OSBRINK, W. *Rhabditis rainai* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) associated with the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). **Nematology**, v. 7, n.6, New Orleans, p.863-879, 2005.

CHAMBERS, U., et al. Control of overwintering filbertworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae with *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 103, n.2, p. 416-422, 2010.

CHASTON, J.; GOODRICH-BLAIR, H. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v.34, n.1, 34, p. 41-58, 2010.

CONNICK, W. J.; NICKLE, W. R.; VINYARD, B. J. “Pesta”: new granular formulations for *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Nematology**, Estados Unidos, v. 25, n.2, p. 198-203, 1993.

CURRAN, J. C. G.; BUTLER, K. Routine cryopreservation of isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis* species. **Journal of Nematology**, Austrália, v. 24, n.2, p. 269-270, 1992.

DE LEY, P. 2006. **A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny**. California, USA. In: WormBook (org) The *C. elegans* Research Community. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_quicktourdiversity/quicktourdiversity.html em 28/03/2015 página mantida pela Wormbook.

DEL VALLE, E. E. Avaliação de Metodologias de Seleção para Tolerância a Elevadas Temperaturas em *Heterorhabditis baujardi* (Nematoda: Rhabditida). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, n. 29, n.2, p. 207-214, 2005.

DOLINSKI, C. et al. Efeito de Substratos com diferentes classes texturais na mobilidade de *Heterorhabditis baujardi* ‘LPP7’ (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, n. 2, p. 123-128, 2010.

DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWELL, G. G. A. Technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal of Insect Pathology**, San Diego, v. 6, n. 4, p. 417-422, 1964.

EHLERS, R. U. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 56, p. 623-633, 2001.

ELAWAD, S. A.; GOWEN, S. R.; HAGUE, N. G. M. Progeny production of *Steinernema abbasi* in lepidopterous larvae. **Internarcional Journal of Pest Manage**, Oxford, v. 47, n.1, p. 17-21, 2001.

ELLERS-KIRK, C. D. et al. Potential of entomopathogenic nematodes for biological control of *Acalymma vittatum* (Coleoptera: Chrysomelidae) in cucumbers grown in conventional and organic soil management systems. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 93, n. 3, p. 602-612, 2000.

FÉLIX, M. A. Rna interference in nematode and the chance that favored Sydney Brenner. **Journal of Biology**, Paris, v. 7, 34.1-35.5, 2008.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematoides entomopatogênicos. In: **ALVES, S.B. (Coord.), Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba, FEALQ, 1998, p. 541-569.

FERRAZ, L. C. C. B., et al. Utilização de nematoides para o controle de pragas agrícolas e urbanas. In: **ALVES, S.B.; LOPES, R.B. Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008, p. 171-202.

FIGUEROA, W. Biocontrol of the banana root borer weevil, *Cosmopolites sordidus* (Germar) with *Steinernematidae* nematodes. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, Rio Piedras, v. 74, n. 1, p. 15 -19, 1990.

FINNEGAN, M., et al. Effect of salt and temperature stresses on survival and infectivity of *Heterorhabditis* spp. infective juveniles. **Nematology**, Leiden, v. 1, n. 1, p. 69-78, 1999.

FLANDERS, K. L., MILLER, J. M., SHIELDS, E. J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* Oswego (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential

biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. **Journal of Economic Entomology**, v. 89, p. 373-380, 1996.

FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. In: GAUGLER, R., editor. **Entomopathogenic Nematology**, CABI Publishing, New York, NY, p. 57-77, 2002.

FRIEDMAN, M. J. Commercial production and development. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 153-172, 1990.

FRIEDMAN, M. J.; LANGSTON, S. L.; POLLIT, S. Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. **Publication, US International Patent WO89/04602. 1989.**

GAUGLER, R. et al. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 17, p. 100-109, 2000.

GAUGLER, R. **Formulation and application technology**. CABI Publishing, New Jersey, 2002, 388p.

GAUGLER, R.; HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. New Jersey, CAB International, 2002, p.289.

GAZIT, Y.; ROSSLER, Y.; GLASER, I. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of *Mediterranean fly* (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science Technology**, Oxford, v. 10, n.2, p. 157-164, 2000.

GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, 1990, p.173-191.

GEORGIS, R.; DUNLOP, D. B.; GREWAL, P. S. Formulation of entomopathogenic nematodes. In: HALL, F.R.; BARRY, J.W. (Ed.). **Biorational pest control agents: formulation and delivery**. Bethesda, Maryland: American Chemical Society, 1995, p. 197-205.

GIVAUDAN, A. et al. Swarming and Swimming changes concomitant with phases variation in *Xenorhabdus nematophilus*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, n. 61, n. 4, p. 1408-1413, 1995.

GLAZER, I. Survival Biology. In: GAUGLER, R. (ed.) **Entomopathogenic Nematology**, CAB International, New York, 2002, p. 169-187.

GLAZER, I.; GALPER, S.; SHARON, E. Virulence of the nematode (*steinernematids* and *Heterorhabditis*) - bacteria *Xenorhabdus* spp.) complex to the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Israel, v. 57, n.1, p. 94-100, 1991.

GLAZER, I.; SALAME, L. Osmotic survival of the entomopathogenic *Steinernema carpocapsae*. **Biological Control**, San Diego, v. 18, n. 3, p. 251-257, 2000.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long term storage of entomopathogenic nematode (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 995-1000, 2000.

GREWAL, P. S.; GEORGIS, S. Entomopathogenic Nematodes. In: HALL, F. R.; MENN, J. **Methods in Biotechnology: Biopesticides: use and Delivery**. eds. p. 271-299. Humana Press. Totowa, New Jersey, 1998.

GREWAL, P. S. et al. Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, Cambridge, v. 108, n.2, p. 207-215, 1994.

GREWAL, P. S. et al. Parasitism of molluscs by nematodes: types of associations and evolutionary trends. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 35, n. 2, p. 146-156, 2003.

GREWAL, P. S. Formulations of entomopathogenic nematodes for storage and application. **Japanese Journal of Nematology**, Ohio, v. 28, p. 68-74, 1998.

GREWAL, P. S.; JAGDALE, G. B. Biology and management of foliar nematodes. **The Hosta Journal**, Bolton, v.32, p. 64-66, 2001.

- GREWAL, P. S.; NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, M. Entomopathogenic nematode: Potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 191-205, 2001.
- GREWAL, P. S.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment and reproduction. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 19, n.4, 245-253, 1994.
- GREWAL, P.S.; CONVERSE, V.; GEORGIS, R. Influence of production and bioassay methods on infectivity of two ambush forages (Nematoda: Steinernematidae). **Journal Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 73, n.1 p. 40-44, 1999.
- GREWAL, P. S. Formulation and application technology. In: Entomopathogenic Nematology (Gaugler, R. ed.). Wallingford: CABI Publishing. p.265–287, 2002.
- HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. Ed. **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing: New York, 2002, p. 115-143.
- HOPPER, K. R.; ROUSH, R. T.; POWELL, W. Management of genetics of biological control introductions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 38, p. 27-51, 1993.
- HUSSEIN, M. A.; ABDEL-ATY, M. A. Formulation of two native entomopathogenic nematodes at room temperature. **Journal Biopest**, (Supplementary), Tamilnadu, v. 5, p. 23-27, 2012.
- JAGDALE, G. B.; GREWAL, P. S. Acclimation of entomopathogenic nematode to novel temperature: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 145-152, 2003.
- JAROSOVÁ, A.; PUZA, V.; ZUROVCOVÁ, M. The complete mitochondrial genome of the facultative entomopathogenic nematode *Oscheius chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). **Mitochondrial DNA**, London, v. 11, p. 1-2, 2015.
- KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 38, p. 181-206, 1993.

KAYA, H. K. Susceptibility of early larval stages of *Pseudalletia unipuncia* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 46, n.1, p. 58-62, 1985.

KAYA, H. K., STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Manual of Techniques in Insect Pathology**, Academic Press, San Diego, CA, p. 281–324, 1997.

KONDO, E.; ISHIBASHI, N. Histological and SEM on the invasion and succeeding growth of entomogenous nematode, *Steinernema feltiae* (str. DD-136), in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 23, n.1, p. 88-96, 1988.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. **Journal of Economic Entomologic**, Oxford, v.91, n.3, p.624-630, 1998.

KURTZ, B. et al. Assessment of establishment and persistence of entomopathogenic nematodes for biological control of western corn rootworm. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, n. 6, p. 420–425, 2007.

LEITE, L. G. et al. Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus levis* e *Leucothyreus sp.* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 40-48, 2012.

LEITE, L. G. et al. Nematoides entomopatogênicos: potencial de uso como bioinseticida no Brasil. In: **XXV Congresso Brasileiro de Nematologia, Resumos**. Piracicaba, ESALQ, p. 45-48, 2005.

LEITE, L. G. Nematoides entomopatogênicos. **Boletim Técnico do Instituto Biológico: Controle biológico de insetos e ácaros**. São Paulo, n. 15, p. 42-51, 2006.

LEITE, L. G., et al. Alternativa de controle: Bicudo-da-cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* **Revista Cultivar**, Goiás, v.1, p. 30 - 33, 2006a.

LEITE, L. G., et al. Instituto biológico. 12° Sincobiol. In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO: MUDANÇAS CLIMÁTICAS E SUSTENTABILIDADE: QUEBRANDO PARADIGMAS**, São Paulo, 2011, p. 51.

LEITE, L. G., et al. Nematoides entomopatogênicos no controle de pragas. In: PINTO, A.S. et al. (Org.). **Controle Biológico de Pragas na Prática**. CP 2, Piracicaba, 2006b, p. 45-53.

LEITE, L. G., et al. Pathogenicity of *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema* spp. (Nemata: Rhabditida), in different dosages, against the citrus root weevil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM OF INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8., 2002, Foz do Iguaçu, **Program and Abstracts...** Foz do Iguaçu: 2002. p. 55

LEWIS, E. E. Behavioural ecology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**, New York: CABI Publishing, 2002, p. 205-223.

LEWIS, E. E. et al. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 38, n.1, p. 66-79, 2006.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) in host volatile cues. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 71, n.4, p. 765-769, 1993.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. **Parasitology**, New Brunswick, v. 105, p. 309-319, 1992.

LINDEGREN, J. E. et al. Propagation and storage of *Neoapectana carpocapsae* Weiser using *Amyelois transitella* (Walker) adults. Estados Unidos, **Advances in Agriculture**, v. 3, n.1, p. 1-5, 1979.

LINDEGREN, J. E.; VALERO, K. A.; MACKAY, B. E. Simple “*in vivo*” production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. **Journal Nematology**, Marceline, v. 25, n.2, p. 193-197, 1993.

LINDEGREN, J. E.; WONG, T. T.; MCINNIS, D. O. Response of *Mediterranean fruit fly* (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in field tests in Hawaii. **Environmental Entomology**, Cary, v. 19, p. 383– 386, 1990.

MAMIYA, Y. Comparison of infectivity of *Steinernema kushidai* (Nematoda: Steinernematidae) and other steinernematid and heterorhabditid nematodes for three different insects. **Applied Entomology Zoology**, Tokyo, v. 24, n.1, p. 302-308, 1989.

MCINERNEY, B. B. et al. Biological active metabolites from *Xenorhabdus* spp. **Journal Natural Production**, Washington, v. 54, n.3 p. 774-784, 1991.

MOLINA, J. P.; LÓPEZ, J. C. Producción *in vivo* de três entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 27, n.1-2, p. 73-78, 2001.

MOLYNEUX, A. S. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* (= *Neoaplectana*) spp.:m temperature, and aspects of behavior and infectivity. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 62, n.2, p.169-180, 1986.

NEGRISOLI, B. C. R. C. et al. Evaluation of efficacy of 18 strains of entomopathogenic nematodes (Rhabditida) against *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae) under laboratory conditions. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 134, n.3, p. 295–298, 2013.

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

NEVES, P. J.; ALVES, S. B.; AGUILLERA, M. M. Produção de nematoides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, Cap.29, p. 889-905,1998.

NGUYEN, K. B. et al. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 103, n.1, p. 8 – 20, 2010.

- NICKLE, W. R. **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991.
- OGURA, N.; NAKASHIMA, T. Cold tolerance and acclimation of infective juveniles of *Steinernema kushidai* (Nematoda: Steinernematidae) **Nematologia**, Leiden, v. 43, n.1 p. 107-115, 1997.
- PACE, W. G. Liquid culture of nematodes. **International Patent, No WO86/01074**. 1986.
- PAIVA, P. E. B.; GARCIA, J. F.; AGUILLERA, M. M. Ocorrência de nematoides entomopatogênico, *Heterorhabditis* Poinar, 1976, em área de citros no estado de São Paulo. In: **SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO**: São Pedro, v. 8, 2003. **Anais...**2003.
- PARK, H. W. et al. Effects of associated bacteria on the pathogenicity and reproduction of the insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida). **Canadian Journal of Microbiologists**, Ottawa, v. 57, n.9, p. 750-8, 2011.
- PARKINSON, J. et al. A transcriptomic analysis of the phylum nematode. **National of Library Medicine**, Bethesda, v. 36, n.12, p. 1259-1267, 2004.
- PARON, M. J. F. O., et al. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae) a *Phyllophaga triticophaga*. In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO**, São Pedro: v. 8, 2003, **Anais...** 2003. p. 93.
- PARRA, J. R. P. et al. Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. In: PARRA, J. R. P. et al. (eds.), **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Editora Manole, 2002, p. 125-142.
- PEREIRA, C. *Rhabditis hambletoni* n.sp. nematoide aparentemente semi-parasito da broca do algodoeiro. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 8, p. 125-135. 1937.
- PHAN, K. L. et al. *Heterorhabditis baujardi* n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. **Nematology**, Leiden, v. 5, n. 3, p. 367-382, 2003.

- PIZANO, M. A. et al. Incidência de *Neoplectana glaseri* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) parasitando ovo de *Migdolus fryanus* Weswood, 1863) (Coleoptera: Cerambycidae). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 9, p. 9-10, 1985.
- POINAR JR, G. O.; KARUNAKAR, G. K.; DAVID, H. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida, Nematoda) from India: Separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. **Fundamental and applied Nematology**, Paris, v. 15, n. 5, p. 467-471, 1992.
- POINAR JUNIOR, G. O. **Nematodes for biological control of insects**, Boca Raton: CRC Press, 1979, 277p.
- POINAR JUNIOR, G. O. Taxonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*, p. 23-61. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K.(eds.), **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton, CRC Press, 1990, 365 p.
- POINAR, G. O.; GREWAL, P. S. History of entomopathogenic nematology. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 44, n.2, p. 153-161, 2012.
- QIU, L.; BEDDING, R. A. Low temperature induced cryoprotectant synthesis by the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae*: biological significance and mechanisms involved. **Cryo-Letters**, Lewes, v. 20, n.6, p. 393-400, 1999.
- RAMOS-RODRIGUEZ, O.; CAMPBELL, J. F.; RAMASWAMY, S. B. Efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* against the stored-product insect pests *Tribolium Castaneum* and *Plodia Interpunctella*. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 40, n.1, p. 15-21, 2007.
- RAULSTON, J. R. et al. Temporal occurrence of corn earworm *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) populations on corn in the Lower Rio Grande Valley, Uvalde and Lubbock Texas, Southwest. **Enviromental Entomology**, Cary, v.19, n.2, p274-280, 1994.
- ROHDE, C., et al. Selection of entomopathogenic nematodes for the controlo of the fruit fly *Ceratitits capitata* (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Ciência Agraria**, Recife, v. 7, p. 797-802, 2012.

ROSA, J. M. O. et al. Suscetibilidade de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) a Isolados de nematoides Entomopatogênicos. **Nematologia brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 3, 2007.

ROSA, J. M. O., et al. Caracterização de isolados brasileiros de nematoides entomopatogênicos. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA**, v. 31, 2013; Cuiabá, 2013. CD-ROM.

ROSALES, L. C.; SUÁREZ, Z. Nematodos entomopatógenos como posibles agentes de control del gorgojo negro del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae). **Boletín Entomología Venezolana**, Venezuela, v. 13 p. 123- 140, 1998.

SCHMITT, A. T.; GOWEN, S. R.; HAGUE, N. G. M. Baiting technique for the control of *Cosmopolites sordidus* Germar by *Steinernema carpocapsae*. **Nematropica**, Flórida, v. 22, n. 2 p. 159-163, 1992.

SCHROEDER, W. J. Suppression of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) adult emergence with soil application of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 73, n. 4, p. 680-683, 1990.

SELVAN, S.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Density-density effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. **Journal of Invertebrate of Pathology**, Maryland Heights, v. 62, n.3, p. 278-284, 1993.

SHAPIRO, D. I.; GAUGLER, R. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, Byron, v. 28, p. 137-146, 2002.

SHAPIRO, D. I.; MCCOY, C. W. Susceptibility of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) larva to different rates of entomopathogenic nematodes in the greenhouse. **Florida Entomology**, Gainesville, v. 83, n.1, p. 1-9, 2000.

SHAPIRO, D. I. et al. Formulation of entomopathogenic nematodes-infected cadavers. **Journal Invert. Path**, Maryland Heighths, v. 78, n.1, p. 17-23, 2001.

SHAPIRO, M.; POINAR JUNIOR, G. O.; LINDEGREN, J. E. Suitability of *Lymantria dispar* (Lepidoptea: Lymantriidae) as a host for the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal Economic Entomology**, Cary, v. 78, n.2, p. 342-345, 1985.

SHAPIRO-ILAN, D.; GLAZER, I.; SEGAL, D. Trait stability and fitness of the heat tolerant entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* IS5 strain. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 6, n.2, p. 238-244, 1996.

SILVA, A. C. et al. Efeito de nematoides entomopatogênicos na mortalidade da mosca-do mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, e do gorgulho-da-goiaba, *Conothachelus psidii*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 34, n.1, p. 31-40, 2010.

SILVER, S. C.; DUNLOP, D. B.; GROVE, D. I. Granular formulation of biological entities with improved storage stability. **Int. patent**. No. WO 95/0507, 1995..

SIMI, L. D. **Controle de *Sphenophorus levis* e *Conotrachelus humeropictus* pelo uso combinado de nematoide e fungos entomopatogênicos**. 2014. 107f. Tese (Doutorado em Agronomia-Proteção de Plantas)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2014.

SMIGIELSKI, A.; AKHURST, R. J.; BOEMARE, N. E. Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*: difference in respiratory activity and membrane energization. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.1, p. 120-125, 1994.

SOLOMON, A.; PAPERNA, I.; GLAZER, I. Desiccation survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*: induction of anhydrobiosis. **Nematology**, Leiden, v. 1, n.1, p. 61-68, 1999.

STOCK, S. P.; CAICEDO, A. M.; CALATAYUD, P. A. *Rhabditis (Oscheius) colombiana* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a necronemic associate of the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) from the Cauca Valley, Colombia. **Nematology**, Leiden, v. 7, n.3, p. 363-373, 2005.

STOCK, S. P.; KAYA, H. K. A multivariate analyses of morphometric characters of *Heterorhabditis* species (Nemata: Heterorhabditidae) and the role of morphometrics in taxonomy of species of the genus. **Journal of Parasitology**, Lincoln, v.82, n. 5, p. 806-813, 1996.

STUART, R. J., et al. (1997) Differential susceptibility of *Dysmicoccus vacinni* (Homoptera: Pseudococcidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 90, n. 4, p. 925-932, 1997.

STUART, R. J.; GAUGLER, R. Genetic adaptation and founder effect in laboratory populations of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*. **Canadian Journal Zoology**, Ottawa, v. 74, n.1, p. 164-170, 1996.

TACHIBANA, M., et al. Larvicidal activity of the symbiotic bacterium *Xenorhabdus japonicus* from the entomopathogenic nematode *Steinernema kushidai* against *Anomala cuprea* (Coleoptera:Scarabacidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v .68, n.2, p. 152-159, 1996.

TAVARES, F. M. **Avaliação de nematoides entomopatogênicos no controle de *Bradysia mabiusi* (Diptera:Sciaridae)**. 2010. 58f. Tese (Doutorado em Agronomia-Proteção de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências agrônômicas, Botucatu, 2010.

TAVARES, F. M., et al. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae), em laboratório e casa-de-vegetação. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2007.

TAVARES, F. M., et al. Pathogenicity of *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema* spp. (Nematoda:Rhabditida) against larvae of *Bradysia* sp. (Diptera: Sciaridae). In: LATIN AMERICAN SYMPOSIUM ON ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND NEMATODES. 2003, Campos dos Goytacazes, **Proceedings Campos dos Goytacazes**, 2003, 28p.

TOEPFER, S., et al. Screening of entomopathogenic nematodes for virulence against the invasive western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Europe. **Bulletion of Entomological Research**, Cambridge, v. 95, n. 5, 2005.

TOMAZINI, D. M., et al. Análises biométrica e molecular de isolado brasileiro de *Rhabditis rainai* (Nematoda: Rhabditida). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 37, n.1-2, p. 1-8, 2013.

VAN DRIESCHE, R. G.; BELLOWS Jr, T. S. Biological control. **Chapman and Hall**, New York, 1996, 539 p.

VAN GUNDY, S. D. Ecology of *Meloidogyne* spp. emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Carolina, State University Graphics, 1985, p. 177-182.

VIEUX, A. P.; MALAN, P. D. An Overview of the Vine Mealybug (*Planococcus ficus*) in South African Vineyards and the Use of Entomopathogenic Nematodes as Potential Biocontrol Agent South African. **Journal of Enology and Viticulture**, Siebeldingen, v. 34, n.1, p. 108-118, 2013.

VOSS, M., et al. **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 44 p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 119). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do119.pdf. Acesso em 28/06.2015.

WANG, X.; GREWAL, P. S. Rapid genetic deterioration of environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 23, n.1, p. 71-78, 2002.

WESTERMAN, P. R. Aggregation of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insect at 9 and 20 C and effects on efficacy. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 73, n. 2, p. 206-213, 1999.

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

WILLIAMSON, R.; KAYA, K. H. Sequence of a symbiont. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 11p. 1294 – 1295, 2003.

WINTER, C. E., et al. Nematoides entomopatogênicos. Laboratório de Biologia Molecular de Nematoides, **Departamento de Parasitologia** –ICB-USP, São Paulo, p.1-39, 2012. Disponível em: [http:// www.icb.usp.br/~cewinter/](http://www.icb.usp.br/~cewinter/). Acesso em: 28/06.2015.

WOMERSELY, C. Z. Dehydration survival and anhydrobiotic potential. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton: CRC, 1990, p. 117-137.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. *Steinernematid* and *Heterorhabditid* nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. **Southern Cooperative Series Bulletin. Agricultural Experiment Station**. Fayetteville, Arkansas, v. 331, p. 1–17, 1988.

YANG, X. et al. Evaluation of entomopathogenic nematodes for control of the beetle, *Luperomorpha suturalis* Chen (Col., Chrysomelidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 127, n. 7, p. 377-382, 2003.

ZERVOS, S.; JOHNSON, S. C.; WEBSTER, J. M. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditidae) in *Galleria mellonella*. **Canadian Journal Zoology**, Ottawa, v. 69, n.5, p. 1261-1264, 1991.