

LUANA VIANA FARIA

**LEVANTAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM ÁREAS
AGRÍCOLAS E PATOGENICIDADE DE *Steinernema puertoricense* A *Gonipterus
platensis* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

Botucatu

2020

LUANA VIANA FARIA

**LEVANTAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM ÁREAS
AGRÍCOLAS E PATOGENICIDADE DE *Steinernema puertoricense* A *Gonipterus
platensis* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia: Proteção de plantas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken

Botucatu

2020

F224I	<p>Faria, Luana Viana</p> <p>Levantamento de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e patogenicidade de <i>Steinernema puertoricense</i> a <i>Gonipterus platensis</i> (Coleoptera: Curculionidae) / Luana Viana Faria.</p> <p>-- Botucatu, 2020</p> <p>56p. : il., tabs.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu</p> <p>Orientadora: Sílvia Renata Siciliano Wilcken</p> <p>1. Fitossanidade. 2. Controle biológico. 3. Entomologia. 4. Nematoides entomopatogênicos. 5. Pragas florestais. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: LEVANTAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS E PATOGENICIDADE DE *Steinernema puertoricense* A *Gonipterus platensis* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE).

AUTORA: LUANA VIANA FARIA

ORIENTADORA: SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN

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

Prof.ª Dr.ª SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu - UNESP

Pesquisador Dr. LUÍS GARRIGÓS LEITE
Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico de São Paulo

Pesquisadora Dr.ª MARIA JOSÉ DE MARCHI GARCIA
Descentralização e Desenvolvimento / APTA - Polo Regional Centro Oeste - Bauru

Botucatu, 14 de fevereiro de 2020

*Aos meus amados pais,
Silvânia e Luciano,
e meu grande incentivador, meu irmão Luan,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, o senhor de todas as coisas, por me guiar e dar forças em todos os momentos. Aos meus queridos pais pelo apoio incondicional, toda ajuda e incentivo mesmo à distância.

Ao meu irmão Luan por toda ajuda, principalmente nos momentos difíceis.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pelo suporte para realização do trabalho e pela oportunidade de estudo.

À Prof^a. Dra. Sílvia Renata Siciliano Wilcken, pela orientação, pela oportunidade de trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade, pelas conversas, pelos conselhos e pela confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e aos CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio à presente pesquisa.

Aos professores do curso de Pós-graduação Agronomia - Proteção de Plantas pelos ensinamentos transmitidos.

A banca examinadora Dr. Luís Garrigós Leite e Dr^a Maria José de Marchi Garcia, por terem aceitado o convite.

Aos meus amigos de Alegre, ES, que mesmo à distância sempre me apoiaram.

Aos meus colegas do Laboratório de Nematologia Agrícola da Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP - Botucatu-SP; Aixelhe, Júlio, Vanessa Gomes, Breno, Vanessa Carvalho, Eunice e Murilo Fonseca, do Laboratório de Pragas Florestais.

Às minhas colegas de apartamento Andressa Dalla Côt e Júlia Assirati, pela companhia, pelos desabafos, conselhos e apoio.

E às amigas que fiz em Botucatu Amanda Gilabel e Laryssa Bernardes.

A todos que, diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação e contribuíram para que eu chegasse onde estou, meu muito obrigada.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, ou que seus sonhos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém (...) Quem acredita, sempre alcança!”.

Renato Russo

RESUMO

Atualmente, o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) no controle biológico de pragas vem ganhando destaque no agronegócio brasileiro. Fatores abióticos como temperatura, tipos de solos, substratos e diversidade de culturas em que sobrevivem influenciam diretamente a sobrevivência de juvenis infectantes (JIs) em condições de armazenamento e a campo. Visto sua importância e diversidade nos solos brasileiros, no presente trabalho, os principais objetivos constaram de isolar e identificar espécies de NEPs coletadas em diversas áreas no Brasil, a fim de encontrar espécies com potencial de patogenicidade à pragas agrícolas. Para tal, duas metodologias de recuperação dos nematoides foram utilizadas; a primeira metodologia consistiu de retirar amostras do perfil do solo coletadas em campo a cerca de 20 cm de profundidade e levá-las para condições de laboratório, onde lagartas de *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* foram colocadas individualizadas neste solo e armazenados a temperatura de 25°C por sete dias avaliando-se diariamente a mortalidade dos insetos em busca de infectividade por nematoides. A segunda metodologia consistiu em levar armadilhas confeccionadas em metal de trama fina 8x8 cm com fases de pré-pupas dos mesmos insetos utilizados na metodologia anterior, separados em armadilhas distintas e enterradas a 20 cm de profundidade e deixadas no solo por sete dias. Após este período, as mesmas foram retiradas e levadas para o laboratório. Em ambas as metodologias, os insetos mortos foram lavados com uma solução de hipoclorito a 0,5% e posteriormente com água destilada. Em seguida foram colocados individualizados em armadilhas White (1927) para confirmação da mortalidade por nematoides. A suspensão recolhida foi armazenada em B.O.D a 18°C para posterior identificação por meio de análise de DNA. Após a coleta de dados, as espécies foram identificadas como *Steinernema puertoricense*, *Pristionchus* sp., *Pristionchus pacificus* e *Oscheius myriophila*. Após identificadas, *S. puertoricense* foi utilizado para teste de patogenicidade em pré-pupas de *Gonipterus platensis* a fim de buscar um novo potencial método de controle para a praga. Quatro concentrações distintas de juvenis infectivos foram testadas, 50; 100; 200 e 400 JIs. Este estudo constou de 10 repetições para cada tratamento e água destilada utilizada como testemunha. Pré-pupas de *G. platensis* foram individualizadas em recipientes de plástico (10ml) com areia autoclavada (4g) e inoculadas com as concentrações de JIs de *S. puertoricense*. Após inoculação, decorridos oito dias, foi verificada a mortalidade das pré-pupas e os insetos mortos foram colocados individualizados em armadilhas White para a saída dos juvenis infectivos. As concentrações acima de 100 JIs foram mais eficientes na mortalidade das pré-pupas de *G. platensis*. O delineamento estatístico utilizado foi o teste de Dunn ao nível de 5% de probabilidade.

Palavras-chave: Controle biológico. Diversidade. Molecular. Pragas florestais.

ABSTRACT

Currently, the use of entomopathogenic nematodes (NEPs) in biological pest control has been gaining prominence in Brazilian agribusiness. Abiotic factors such as temperature, soil types, substrates and crop diversity in which they survive directly influence the survival of juvenile infective juveniles (JIJs) in storage and field conditions. Given its importance and diversity in Brazilian soils, in the present work, the main objectives were to isolate and identify species of NEPs collected in different areas in Brazil in order to find species with potential for pathogenicity to agricultural pests. For that, two nematode recovery methodologies were used; the first methodology consisted of taking samples of the soil profile collected in the field at about 20 cm depth and taking them to laboratory conditions, where caterpillars of *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* and *Diatraea saccharalis* were placed individually in this soil and stored at temperature 25 ° C for seven days, insects mortality in search of nematode infectivity daily. The second methodology consisted of taking traps made of 8x8 cm thin-woven metal with pre-pupal phases of the same insects used in the previous methodology, separated into separate traps and buried 20 cm deep and left in the soil for seven days. After this period, they were removed and taken to the laboratory. In both methodologies, the dead insects were washed with a 0.5% hypochlorite solution and then with distilled water and placed individually in White traps (1927) to confirm nematode mortality. The collected suspension was stored in B.O.D at 18 ° C for later identification by means of DNA analysis. After data collection, the species were identified as *Steinernema puertoricense*, *Pristionchus* sp., *Pristionchus pacificus* and *Oscheius myriophila*. After being identified, *S. puertoricense* was used to test pathogenicity in *Gonipterus platensis* pre-pupae in order to search for a new potential control method for the pest that afflicts Brazilian forest crops. Four different concentrations of juvenile infective were tested, 50; 100; 200 and 400 JIJs. This study consisted of 10 repetitions for each treatment and distilled water used as a control. Pre-pupae of *G. platensis* were individualized in plastic containers (10ml) with autoclaved sand (4g) and inoculated with the concentrations of JIJs of *S. puertoricense*. After inoculation, after eight days, the mortality of the pre-pupae was verified and the dead insects were placed individually in White traps for the exit of the infective juveniles. Concentrations above 100 JIJs were more efficient in the mortality of *G. platensis* pre-pupae. The statistical design used was the Dunn test at the level of 5% probability.

Keywords: Biological control. Diversity. Molecular. Forest pests.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 1 – LEVANTAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM ÁREAS AGRÍCOLAS E COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE AMOSTRAGEM	20
1.1 INTRODUÇÃO.....	22
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
1.2.1 Metodologia 1: metodologia padrão de coleta de solo.....	23
1.2.2 Metodologia 2: Armadilhas com insetos isca inseridos diretamente no campo.....	24
1.2.3 Identificação molecular das espécies.....	25
1.3 RESULTADOS.....	26
1.4 DISCUSSÃO.....	31
1.5 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 2 – PATOGENICIDADE DE <i>Steinernema puertoricense</i> A <i>Gonipterus platensis</i> (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)	42
2.1 INTRODUÇÃO.....	44
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.2.1 Multiplicação e identificação do isolado.....	45
2.2.2 Multiplicação do nematoide.....	46
2.2.3 Teste de patogenicidade.....	46
2.3 RESULTADOS.....	47
2.4 DISCUSSÃO.....	49
2.5 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS	55

INTRODUÇÃO GERAL

O sucesso dos nematoides entomopatogênicos como agentes de controle biológico no manejo de insetos pragas na agricultura tem sido eficaz (YUKSEL et al., 2018 ; YUKSEL; CANHILAL, 2018; MAJÍĆ et al., 2019), particularmente àquelas pragas agrícolas que possuem ao menos uma fase do ciclo de vida no solo (CAMPOS-HERRERA, 2015).

Uma grande vantagem dos nematoides entomopatogênicos como agentes de controle biológico é a capacidade que possuem de detectar seu hospedeiro via anfídeos ou órgãos sensoriais, à medida que se movem ativamente em direção ao hospedeiro-alvo, ocultando-se em habitats enigmáticos, como no solo, onde larvas de insetos também podem se esconder em casulos, ou pupas (EMELIANOFF et al., 2008; SHAHID et al., 2012). A obtenção desses nematoides é feita basicamente por meio de isolamentos realizados a partir de insetos infectados ou amostras de solo (HOMINICK, 2002).

É de suma importância conhecer a biodiversidade do local bem como a variabilidade morfológica pré-existente, molecular e sobretudo a patogenicidade desses nematoides a insetos pragas de programas de controle biológico. A identificação das populações de NEPS, adaptada às condições climáticas e ambientais em diferentes áreas, é fundamental para o controle sustentável de pragas em programas de manejo integrado pragas em áreas agrícolas do Brasil (DE BRIDA, et al., 2017).

As espécies de nematoides podem ser identificadas de diferentes formas, a caracterização molecular com base no sequenciamento da subunidade de rDNA (28S) tem se mostrado uma ferramenta eficiente para esse fim (THANWISAI et al. 2012; KARABORKLUA et. al., 2015; CIMEN et. al., 2016; DE BRIDA, et al., 2017), pois a baixa variação morfológica e características semelhantes nesse grupo dificultam a identificação (DOLINSK et al., 2008).

Em regiões em que essa diversidade ainda não foi explorada, faz se necessário o início de estudos básicos, principalmente relativos a amostragens, isolamento, identificação taxonômica, biologia, ecologia, testes de patogenicidade, produção in vivo e in vitro, formulação e incorporação de espécies nativas em programas de MIP, como uma nova ferramenta contra pragas de importância econômica (MOLINA ACEVEDO et al., 2005).

Os nematoides entomopatogênicos estão distribuídos por todo o globo, com diferentes espécies e grupos de acordo com as regiões geográficas (TARASCO et al. 2015; TUMIALIS et al. 2016). Os NEPs estão agrupados em três gêneros, *Steinernema*, *Heterorhabditis* e *Neosteinernema*, associados a bactérias simbiotes, na qual o gênero *Steinernema* está usualmente associado a bactérias do gênero *Xenorhabdus* e *Heterorhabditis* a bactérias do gênero *Photorhabdus* (POINAR, 1990; BOEMARE et al., 1993).

Em muitos países, informações a respeito da interação dos NEPS com suas bactérias simbióticas ainda são escassas, inclusive no Brasil. Atualmente duas espécies já foram consideradas nativas no Brasil, *Heterorhabditis amazonensis* (ANDALÓ et al., 2006) e *Steinernema braziliense* por Nguyen et al. (2010), entretanto, várias outras já foram relatadas em nossos solos como *Neoplectana glaseri* (Steiner, 1929) *Heterorhabditis* (*Rhabditis*) *hambletoni* (Pereira, 1937), *Heterorhabditis baujardi* (Phan; Subbotin; Nguyen; Moens, 2003), *Steinernema diaprepesi*, *Steinernema rarum*, *Heterorhabditis indica*, *Metarhabditis rainai* e *Oscheios tipulae* (Lam & Webster, 1971), ambas relatadas em áreas agrícolas e vegetação nativa em diferentes regiões brasileiras (ROSA et al., 2013)

Mais recentemente, o gênero *Oscheius* (Sudhaus, 1976) também foi considerado como organismo entomopatogênico, pois espécies desse gênero normalmente estão associadas a bactérias entomopatogênicas, no entanto, não carregam as mesmas dentro de seu corpo, como em *Steinernema* e *Heterorhabditis*, mas em sua superfície corporal. Quando as bactérias estão presentes, *Oscheius* spp. é capaz de infectar e matar diferentes espécies de insetos (TORRES-BARRAGAN et al., 2011). Atualmente poucos são os estudos demonstrando a efetiva contribuição de *Oscheius* spp. dentro do controle biológico, uma vez que a maioria das espécies deste gênero possui hábito de parasita facultativo (YE et al., 2011).

Em meio ao número crescente de novas espécies de nematoides entomopatogênicos descritas, há incerteza sobre o enquadramento de algumas delas nos critérios para serem consideradas nematoides entomopatogênicos e seu potencial uso em programas de controle biológico (CAMPOS-HERRERA et al., 2015; DILLMAN et al., 2012a; RAE e SOMMER, 2011). Tal fato provavelmente se deve a uma avaliação inicial incompleta sobre as características dos nematoides de marca registrada dos NEPs ao se avaliar uma nova espécie (ZANG et al. 2019).

Diante do exposto, os objetivos do trabalho consistiram em conhecer a diversidade de nematoides em diferentes localidades do Brasil e avaliar a virulência destes nematoides em fases pupais de *Gonipterus Platensis*, importante praga de cultivos florestais brasileiros.

CAPÍTULO 1 - Levantamento de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e comparação de metodologias de amostragem

Resumo

A descrição de novas espécies de nematoides entomopatogênicos (NEPs) é de fundamental importância para validar o potencial destes organismos como agentes de controle biológico no Brasil. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar espécies de NEPs coletadas em diferentes áreas do país. Duas metodologias de coleta foram testadas no presente estudo. Na metodologia 1, amostras de solo foram coletadas em campo no perfil de solo a 20 cm de profundidade, levadas para condições de laboratório e acondicionadas em recipientes (250 ml), onde lagartas de *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, e *Diatraea saccharalis* foram colocadas individualizadas neste solo e armazenados a temperatura de 25°C por sete dias avaliando-se diariamente a mortalidade. Os cadáveres dos insetos foram lavados com hipoclorito a 0,5% e posteriormente com água destilada e isolados em armadilha de White para confirmação da morte por NEPs. A metodologia 2 consistiu em levar armadilhas confeccionadas com tela de metal contendo os mesmos insetos isca, com três indivíduos em cada armadilha separadas por espécie. Três armadilhas foram enterradas no solo de cada ponto coletado para a metodologia 1, e desenterradas após sete dias. Os insetos mortos receberam o mesmo tratamento da metodologia 1. Os isolados obtidos nas duas metodologias foram inoculados novamente em fases larvais de *T. molitor* para multiplicação do isolado. As espécies foram identificadas por meio de sequenciamento molecular de DNA pela amplificação da expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA. O isolado obtido da população MOP2, foi idêntico a sequência genética de *Steinernema puertoricense* com 99.99% de similaridade, enquanto MOP5, MOP6 e MOP6S foram idênticas entre si e iguais a sequência de *Oscheius myriophila*. As sequências das populações MOP1 e MOP3 corresponderam a *Pristionchus pacificus*. Dois grupos entomopatogênicos foram formados, correspondendo à espécie *S. puertoricense* e nematoides do gênero *Oscheius*. A metodologia 2 foi mais efetiva na recuperação dos nematoides quando comparada a metodologia 1. Em relação aos insetos isca utilizados no estudo, *G. mellonella* demonstrou-se mais eficiente na captura nos nematoides com 12.5% de amostras positivas.

Palavras-chave: Controle biológico. NEPs. Molecular.

Survey of entomopathogenic nematodes in agricultural areas and comparison of sampling methodologies

Abstract

The identification of new species of entomopathogenic nematodes (NEPs) or identification of species already described has great importance to validate the potential of these organisms as biological control agents in Brazil. This research aimed to isolate and identify NEP species collected in different areas of the country; thus, two collection methodologies were tested. In methodology 1, soil samples were collected in the field at 20 cm depth, taken to nematology laboratory and stored in sterile containers (250 ml), where *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, and *Diatraea saccharalis* were placed individually on this soil and stored at 25 ° C for seven days and evaluated daily. The dead insects were isolated in White's trap to confirm their death by NEPs. In contrast, a second methodology was tested in the field, carrying traps made with 8x8 cm wire mesh containing the same bait insects, with three individuals in each trap separated by species. Three traps were buried at each point collected for methodology 1 and unearthed after seven days in the soil to recover NEPs. Dead insects were removed from the traps washed with 10% hypochlorite and distilled water and transferred to White traps. The isolates obtained in both methodologies were inoculated again in new larval phases of *T. molitor* for multiplication of the isolate. The species were identified by molecular DNA sequencing by amplifying the D2/D3 expansion of the 28S rDNA gene. The sequences of the MOP2 population were identical with 99.99% similarity to those of *Steinernema puertoricense*, while MOP5, MOP6 and MOP6S were identical to each other and equal to the sequence of *Oscheius myriophila*. The sequences of the MOP1 and MOP3 populations corresponded to *Pristionchus pacificus*. Only one group of entomopathogenic nematodes with potential for commercial use was formed, corresponding to the species *S. puertoricense*. Method 2 was more effective in recovering nematodes when compared to methodology 1. Regarding the bait insects used in this study, *G. mellonella* was the most efficient to capture nematodes with 12.5% of positive samples.

Keywords: Biological control. NEPs. Molecular.

1.1 INTRODUÇÃO

A utilização dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) como controle biológico de pragas vem sendo utilizado com sucesso em diversos países, especialmente para aquelas que possuem ao menos uma fase do ciclo no solo (LEITE et al., 2006; NEGRISOLI et al., 2010). Os NEPs possuem uma distribuição geográfica ampla e grande capacidade de sobrevivência e de adaptação a estresses ambientais, o que os torna vantajosos para o manejo integrado de pragas (MIP) (GLAZER; SALAME, 2000; DE BRIDA, 2017).

Os nematoides entomopatogênicos são capazes de causar a morte do inseto hospedeiro rapidamente, devido principalmente à associação mutualística com bactérias do gênero *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (Poinar; Grewal, 2012), que após liberadas na hemolinfa do inseto resultam em rápida mortalidade do hospedeiro em cerca de 24 a 48 horas, iniciando o processo de bioconversão do cadáver e gerando alimento aos nematoides (FERRAZ, 1998; HOMINICK, 2002; ALMENARA et al., 2012).

O nematoide entomopatogênico com maior distribuição mundial é o *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), com relatos em mais de trinta países seguido por *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976) relatado em mais de vinte e cinco países. *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) e *Heterorhabditis indica* (Poinar; Karunakar; David, 1992) também se encontram entre as espécies mais distribuídas (POINAR; KARUNAKAR; DAVID, 1992). Com frequência, *S. feltiae* e *S. carpocapsae* têm sido relatados predominantemente em países de clima temperado, enquanto *H. bacteriophora* e *H. indica* possuem relatos concentrados em países tropicais e subtropicais (BURNELLI; STOCK, 2000; HOMINICK, 2002).

Neoaplectana glaseri (Steiner, 1929) foi o primeiro nematoide entomopatogênico registrado no Brasil, encontrado em ovo de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863), popularmente conhecido como bicudo-da-cana-de-açúcar, na Usina Amália em Santa Rosa de Viterbo, Estado de São Paulo, na cultura da cana-de-açúcar (PIZANO et al., 1985).

Embora a maioria dos nematoides entomopatogênicos recuperados já identificados no campo tenham sido isolados de insetos naturalmente infectados, usualmente é mais comum recuperá-los por meio de isca com insetos suscetíveis (BEDDING; AKHURST, 1974). A larva de traça do favo, *Galleria mellonella* (L.), é a

mais utilizada para este fim, oferecendo uma produção de JIs elevada e sendo frequentemente utilizada na multiplicação da maioria das espécies de nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*. No entanto, outros insetos podem ser utilizados como alternativa para produção de juvenis, como *Tenebrio* spp. (Coleoptera: Tenebrionidae), *Spodoptera frugiperda* (Smith), (Lepidoptera: Noctuidae) e *Amyelios transitella* (Walker) (DUTKY et al., 1964; GAUGLER; HAN, 2002).

Dessa forma o objetivo deste trabalho foi conhecer a diversidade de nematoides entomopatogênicos coletados em diferentes áreas de cultivos agrícolas e florestais do Brasil para possível utilização no controle biológico de pragas. Além disso, comparar duas metodologias de captura dos nematoides presentes no solo.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo para isolamento de NEPs foram coletadas em áreas agrícolas e florestais em Botucatu e Itapetininga no estado de São Paulo, Alegre no estado do Espírito Santo, Itamarandiba em Minas Gerais e Itiquira no estado do Mato Grosso entre setembro de 2018 a julho de 2019. Totalizando 54 amostras. Destas, 36, foram coletadas em áreas de cultivo de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), seis em área de cafeeiro (*Coffea arabica* L.); seis em área de cultivo de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e outras seis em pastagem.

Cada amostragem foi realizada em área de 8 m², com seis pontos amostrados, distribuídos equidistantes a cada 2 metros. Em cada ponto foram retiradas amostras de solo de 0-25 cm de profundidade que foram levadas para o laboratório de Nematologia Agrícola (Metodologia 1). No mesmo ponto, armadilhas contendo insetos isca foram enterradas no solo (Metodologia 2). As coordenadas geográficas de cada ponto amostrado foram obtidas por meio de aparelho de GPS Garmin Etrex Vista H 2.8.

1.2.1 Metodologia 1: Metodologia padrão de coleta de solo

Amostras do perfil do solo foram retiradas de cada ponto de amostragem por área e colocadas em sacos de polietileno de um litro de capacidade para evitar a desidratação. As amostras foram devidamente etiquetadas, armazenadas em caixas de isopor e encaminhadas ao Laboratório de Nematologia Agrícola, UNESP/FCA,

Botucatu, SP. No laboratório as amostras de solo foram acondicionadas em potes de plástico de polietileno de 250 mL. Neste solo, foram inseridos nove insetos isca, sendo três lagartas de quinto ínstar de *Galleria mellonella*, três fases juvenis de *Tenebrio molitor*, e três lagartas de quinto ínstar de *Diatraea saccharalis*. Os recipientes foram fechados e mantidos a temperatura ambiente de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. A partir do terceiro dia, os insetos isca foram observados diariamente, a fim de verificar a sua mortalidade. Após sete dias, o solo e os insetos vivos foram descartados.

Larvas de *G. mellonella*, *D. saccharalis* e larvas de *T. molitor* mortos, ou com sintomas de infecção por nematoides entomopatogênicos foram retiradas dos recipientes, lavadas com hipoclorito de sódio a 0,5% e posteriormente com água destilada e devidamente transferidas para armadilhas (White, 1927). Os JIs obtidos foram inoculados em novos juvenis de *T. molitor* para a multiplicação do isolado seguindo os postulados de Koch (1877) para posterior identificação da espécie de nematoide entomopatogênico.

1.2.2 Metodologia 2: Armadilhas com insetos isca inseridos diretamente no campo

Armadilhas com tela de metal inox trama fina com dimensões de 8x8 cm foram levadas a campo com insetos nove insetos isca, três insetos de cada, separados por espécie; em cada ponto três armadilhas foram utilizadas. Nos 54 pontos amostrados foram utilizadas 162 armadilhas, 54 para cada espécie. Em cada ponto amostrado três armadilhas foram enterradas no solo, distribuídas aleatoriamente no mesmo ponto retirado para avaliação da metodologia 1, sendo uma armadilha contendo três lagartas de *G. mellonella*, e as demais com três fases juvenis de *T. molitor* e três lagartas de *D. saccharali*, buscando a recuperação de nematoides entomopatogênicos. Sete dias após inserção no solo, as iscas foram desenterradas e levadas ao Laboratório de Nematologia Agrícola, UNESP/FCA, Botucatu, SP.

Os insetos mortos foram retirados das armadilhas, lavados rapidamente com hipoclorito de sódio (0,5%) e água destilada para evitar contaminação e devidamente transferidos para armadilhas do tipo White, (1927). Os juvenis obtidos das armadilhas de White foram inoculados em fases juvenis de *T. molitor* para a multiplicação do isolado e posteriormente armazenados em BOD a 18°C para identificação das espécies.

1.2.3 Identificação molecular das espécies coletadas

Para identificação das espécies coletadas, o DNA genômico foi extraído de 50 juvenis infectantes retirados da solução coletada das armadilhas de White e colocados em 50µl de NaCl 0,85%, pelo método de extração Worm Lysis Buffer (WLB), adaptado (WILLIAMS et al., 1992; HOLTERMAN et. al., 2006). As amostras foram submetidas a PCR a 65 °C por 2 h, 99 °C por cinco minutos e armazenadas a -20 °C (CONSOLI et. al. 2012). Os iniciadores universais D2A (5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3 ') e D3B (5'TCGGAAGGAACCAGCTACT A-3') foram utilizados para amplificar o segmento de expansão D2 / D3 do 28S rDNA por PCR (AL-BANNA et. al., 2004). Um total de 12,5 µL de Gotaq Hot Start (Promega, São Paulo, Brasil), com os reagentes necessários para a reação: 5 U / µL de Taq, 100 mM de cada NTP e 25 mM de MgCl₂, 9,5 µL de água livre de nuclease (Promega), e 1 mL de cada iniciador [10 mM] e 1 mL de cDNA de cada população representativa das espécies alvo e não alvo, totalizando 25 mL por reação, foram submetidos a pCR a 94 ° C por sete minutos; seguido de 35 ciclos a 94 ° C por 60 segundos, 55 ° C por 60 segundos, 72 ° C por 60 segundos; e 72 ° C por 10 minutos (MRÁCEK et. al., 2006). Foram utilizados 5 µL de produto de PCR para eletroforese em tampão TAE (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (0,02 mg / mL), visualizado e fotografado sob luz UV. O resultado da amplificação foi comparado com o marcador de peso molecular VIII.

Os fragmentos amplificados do rDNA de expansão D2 / D3 28S foram sequenciados com o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) (OLIVEIRA et. al., 2009). Uma mistura de reagentes contendo 2 µL de Big Dye, 3,2 mmol de iniciadores sensoriais, 3,0 µL de produto amplificado contendo 400 ng de DNA e 2,0 mL de água foi preparada para o final do produto da reação de PCR. A reação para sequenciamento foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems) com posterior purificação do produto amplificado por precipitação com isopropanol. As amostras foram desnaturadas a 95 °C por três minutos e a eletroforese realizada em uma unidade Sequenciador de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

As sequências foram alinhadas e comparadas à identificação do polimorfismo de nucleotídeos com o auxílio do Programa Editor de Sequências de BioEdit Aligment. As sequências populacionais de NEPs foram comparadas com outras

espécies de nematoides no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificação com base na similaridade genética.

1.3 RESULTADOS

Todos os nematoides provenientes dos insetos isca de campo foram capazes de ocasionar a morte dos insetos em laboratório. Os nematoides foram encontrados em nove amostras de um total de 54, correspondendo a 17% de recuperação. Das nove amostras positivas para nematoides, sete (13%) foram por meio do uso de armadilhas em campo com os insetos isca (metodologia 2), sem a detecção de nematoides amostras retiradas do perfil do solo no mesmo ponto e levadas a laboratório (metodologia 1). Em apenas um ponto da coleta na cidade de Botucatu-SP, na amostra MOP6, foi possível recuperar nematoides tanto nas armadilhas de campo, como nas amostras levadas para o laboratório, e em um ponto da coleta, na cidade de Rondonópolis-MT, a detecção ocorreu somente na amostra levada para o laboratório (ISSO 1) (Tabela 1).

Todos os isolados encontrados, independente da metodologia utilizada, foram provenientes de amostragens nos estados de São Paulo e Mato Grosso, correspondendo a 17% das amostras coletadas. Nos demais pontos amostrados não houve detecção de nematoides.

A detecção de nematoides foi maior em áreas florestais que nos demais habitat amostrados. Das 36 amostras provenientes de plantios de eucalipto, oito apresentaram nematoides, correspondendo a 22%. Destes, sete foram detectados por meio de armadilhas em campo (metodologia 2), os quais foram denominados FPP2, MOP1, MOP2, MOP3, MOP5, RPP3 e RPP5. Em apenas um dos pontos os nematoides foram detectados tanto nos insetos iscas das armadilhas, como daqueles de laboratório (Metodologia 1), denominado (MOP6). Nos demais pontos; amostrados em cafeeiro, feijoeiro e pastagem; não foram detectados nematoides.

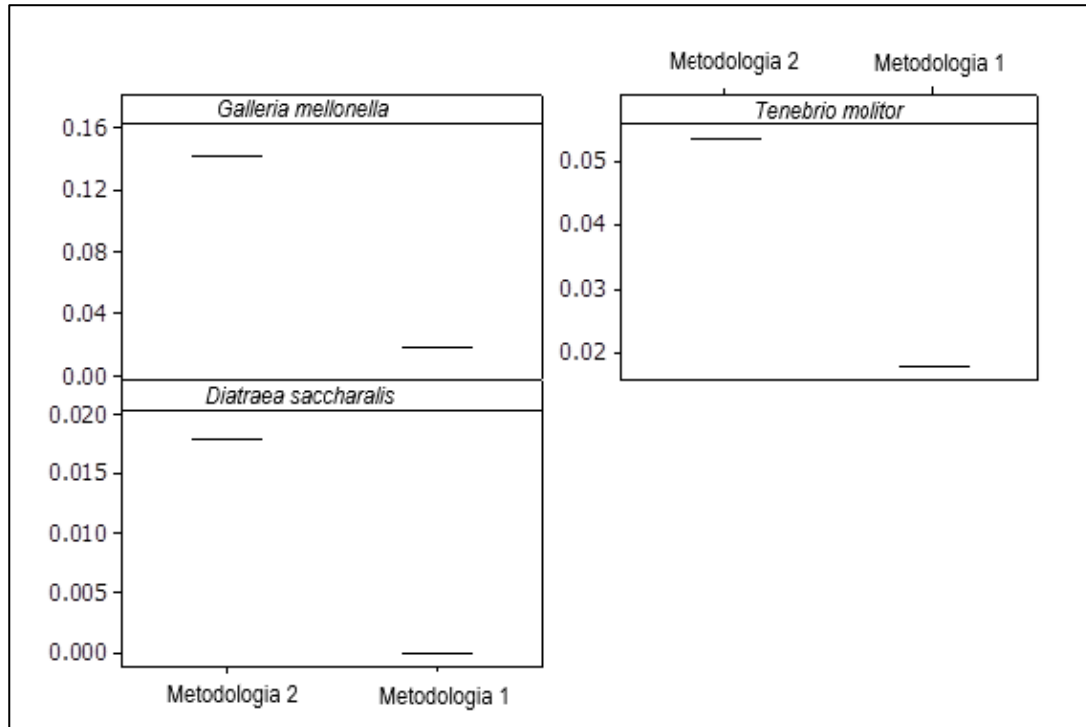
Tabela 1 - Local de amostragem, amostra positiva para nematoides, espécies de nematoides encontradas, metodologia de recuperação utilizada e cultura anuais e florestais em que foram encontradas de setembro de 2018 a julho de 2019

Local	Amostra	Espécie	Metodologia	Cultura
São Paulo	FPP2	<i>S. puertoricense</i>	2	Eucalipto
Mato Grosso	ISSO1	<i>O. myriophila</i>	1	Algodão
São Paulo	MOP1	<i>Pristionchus</i> sp.	2	Eucalipto
São Paulo	MOP2	<i>P. pacificus</i>	2	Eucalipto
São Paulo	MOP3	<i>P. pacificus</i>	2	Eucalipto
São Paulo	MOP5	<i>O. myriophila</i>	2	Eucalipto
São Paulo	MOP6	<i>O. myriophila</i>	1 e 2	Eucalipto
São Paulo	MOP6S	<i>Pristionchus</i> sp.	1	Eucalipto
São Paulo	RPP3	<i>P. pacificus</i>	2	Eucalipto
São Paulo	RPP5	<i>O. myriophila</i>	2	Eucalipto

*Gênero; Steinernema, S., Oscheius, O., Pristionchus, P.

Dentre as espécies de insetos utilizadas como iscas, *G. mellonella* foi a mais eficiente (Figura 1). Das 56 armadilhas contendo *G. mellonella*, oito foram positivas para nematoides. Apenas três das armadilhas contendo *T. molitor* detectaram nematoides, enquanto dentre aquelas com *D. saccharalis*, apenas uma capturou nematoides.

Figura 1 - Frequência de insetos isca de *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* infectados por nematoides nas duas metodologias de amostragem pelo Software estatístico Minitab 16



A amplificação da expansão D2/D3 do gene 28S do rDNA das populações de NEPs encontradas produziram fragmentos de 590 pares de bases (pb), cujas sequências foram depositadas no GenBank de [AF331903.1](#) a [KX100772.1](#) (Tabela 2).

As sequências da expansão D2/D3 do gene 28S (rDNA) da população de JIs da amostra FPP2 foram idênticas do isolado *Steinernema puertoricense* do banco de dados GenBank (gi 16269582), com 99.99% de similaridade. A espécie foi encontrada associada em armadilhas utilizadas na metodologia 2 em lagartas de *G. mellonella*.

A técnica das sequências de código de barras do DNA mostrou que o gene D2/D3 28S rDNA de expansão das populações de nematoides de ISO 1; MOP5; MOP6 e RPP5 obtiveram sequências idênticas a de *Oscheius myriophila* com número de acesso gi 48869079 de acordo com o banco de dados GenBank. As populações de MOP5 e RPP5 foram encontradas em armadilhas (metodologia 2) associados a lagartas de *G. mellonella* e *T. molitor*, RPP5 foi a única população encontrada associada a lagartas de *D. saccharalis*. As populações de ISO 1 e MOP6 foram detectadas associadas somente em lagartas de *G. mellonella*.

As populações de nematoides das amostras MOP1 e MOP6S obtiveram sequências idênticas ao gênero *Pristionchus*, enquanto que as populações de MOP2, MOP3 e RPP3 tinham a mesma sequência da espécie *Pristionchus pacificus* (Tabela 1), todas associadas a lagartas de *G. mellonella* e *T. molitor*.

O nematoide entomopatogênico *Steinernema puertoricense* foi encontrado em uma das amostras de área de plantio de eucalipto, em solo argiloso em cultivo florestal de híbrido *E. urophylls* x *E. grandis* em Botucatu, SP mediante a armadilha na amostra FPP2 em lagartas de *G. mellonella*.

Oscheius myriophila foi detectado em cultivos florestais em Botucatu, São Paulo, Brasil em solo argiloso com *Eucalyptus* sp. e em cultivo de algodão (*Gossypium* sp.) em Itiquira, Mato Grosso, Brasil, ambos locais com solo argiloso associado a lagartas de *G. mellonella*.

Todas as populações de *Pristionchus* e *Oscheius* foram encontradas em Botucatu, SP, Brasil em solos argilosos cultivados com *Eucalyptus* sp. associados a lagartas de *G. mellonella* e fases larvais de *T. molitor*.

Tabela 2 - Código (Cod.), espécies, local de coleta (Local), tipo de solo (Solo), cultura, coordenadas geográficas (Coordenadas) e época de coleta (Datas) de nematoides entomopatogênicos (NEPs) em áreas com plantas anuais e florestais de setembro de 2018 a julho de 2019 no Brasil

Cod	Espécie	Local	Solo	Cultura	Espécie de inseto colonizada	Coordenadas (S; W)	Data
<u>AF331903.1</u>	<i>S. puertoricense</i>	Bo (SP)	Are.	Eucalipto	<i>G. mellonella</i>	22°57.643; 48°30.978	03/09/2018
<u>AY602176.1</u>	<i>O. myriophila</i>	Itiq (MT)	Arg.	Algodão	<i>G. mellonella</i>	17°09'; 54°45'	06/09/2018
<u>KT188868.1</u>	<i>Pristionchus</i> sp.	Bo (SP)	Arg.	Eucalipto	<i>G. mellonella</i>	17°45.165; 042°48.046	18/10/2018
<u>KY914570.1</u>	<i>P. pacificus</i>	Bo (SP)	Arg.	Eucalipto	<i>G. mellonella</i>	23°01.555; 048°30.934	18/10/2018
<u>KY914570.1</u>	<i>P. pacificus</i>	Bo (SP)	Arg.	Eucalipto	<i>G. mellonella</i> ; <i>T. molitor</i>	23°01.548; 048°30.935	18/10/2018
<u>KX100772.1</u>	<i>O. myriophila</i>	Bo (SP)	Arg.	Eucalipto	<i>G. mellonella</i> ; <i>T. molitor</i>	23°01.555; 048°30.924	18/10/2018
<u>KX100772.1</u>	<i>O. myriophila</i>	Bo (SP)	Arg.	Eucalipto	<i>G. mellonella</i> ; <i>T. molitor</i>	23°01.559; 048°30.927	18/10/2018
<u>KT188868.1</u>	<i>Pristionchus</i> sp.	Bo (SP)	Arg.	Eucalipto	<i>G. mellonella</i> ; <i>T. molitor</i>	23°01.559; 048°30.927	18/10/2018
<u>KY914570.1</u>	<i>P. pacificus</i>	Bo (SP)	Arg.	Eucalipto	<i>G. mellonella</i>	22°59.862'; 048°30.000'	29/10/2018
<u>KX100772.1</u>	<i>O. myriophila</i>	Bo (SP)	Arg.	Eucalipto	<i>G. mellonella</i> ; <i>T. molitor</i> ; <i>D. saccharalis</i>	22°59.851; 048°29.991	29/10/2018

*Gênero; *Steinernema*, *S.*, *Oscheius*, *O.*, *Pristionchus*, *P.*, Local, Botucatu (Bo), Itiquira (Itiq), Tipo de solo, argiloso (Arg.), Arenoso (Are.), Espécie de inseto; *Galleria*, *G.*, *Tenebrio*, *T.*, *Diatraea*, *D.*

1.4 DISCUSSÃO

Levantamentos nematológicos por meio do uso de iscas vivas, são úteis para detectar espécies entomopatogênicas das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, bem como outros rhabditídeos. A técnica molecular utilizada na identificação foi adequada para identificar os isolados de nematoides, possibilitando o conhecimento de sua biodiversidade e contribuindo para a detecção de novos isolados que possam ser utilizados em programas de controle biológico de pragas de insetos.

A análise dos resultados evidencia que a metodologia de amostragem 2 foi mais eficiente quando comparada a metodologia 1 para captura dos nematoides, resultado encontrado possivelmente pela capacidade dos nematoides captarem estímulos no ambiente ou liberados por insetos por meio de órgãos cuticulares e órgãos internos (VAN TOL et al., 2001; JONES, 2002; RASMANN et al., 2005). Produtos de excreção e gradiente de temperatura (DOLINSKI, 2006) dos insetos das armadilhas também podem ter colaborado para o direcionamento dos nematoides.

Os nematoides entomopatogênicos exibem comportamentos ativos de busca de hospedeiros e mostram uma preferência por voláteis vivos de hospedeiros de insetos e até odores individuais associados, respondendo de uma maneira específica em cada espécie (DILLMAN et al., 2012b). Além disso, NEPs e outros nematoides parasitas, utilizam uma variedade de pistas específicas em cada espécie, incluindo temperatura (CASTELLETTO et al., 2014), tátil, mecânicas (LEWIS et al., 1992) e pistas quimio sensoriais (CHAISSON e HALLEM, 2012; DILLMAN et al., 2012) para localizar e infectar os hospedeiros adequados, o que pode vir a favorecer o maior número de pontos positivos para os nematoides na metodologia 2, também consequentemente pela maior área de contato dos insetos isca com o solo local, a medida que, na metodologia 1, a área de contato se torna menor pela quantidade de solo retirada ser restrita a 250 ml de solo, o que indica que a metodologia é menos eficiente na recuperação dos nematoides quando comparado a amostras de campo.

O nematoide entomopatogênico *Steinernema puertoricense* foi encontrado associado a lagartas de *G. mellonella* infectadas pelos JIs em solo arenoso assim como a primeira vez em que a espécie foi descrita em Porto Rico por Román e Figueiroa (1994) também em solo arenoso isolado e coletado de areia de Coqueiro (*Cocus nucífera*) atraído por iscas vivas de *G. mellonella* assim como no presente estudo.

O nematoide *S. puertoricense* foi encontrado vivendo livremente no solo na região de Botucatu- SP, que possui condições favoráveis ao seu desenvolvimento, visto que foi postulada como possivelmente a primeira espécie do gênero *Steinernema* descrita das ilhas do Caribe adaptada a um ambiente quente e úmido, assim como demais espécies do grupo *glaseri* que possuem preferências por regiões subtropicais ou tropicais (NGUYEN; HUNT, 2007), presentes na região em que a espécie foi encontrada em Botucatu no estado de São Paulo .

O Instituto Biológico de São Paulo vem avaliando agentes entomopatogênicos buscando o controle biológico de pragas importantes para a agricultura, *S. puertoricense* (Roman & Figueroa) (1995) (IBCB-n6), e *Heterorhabditis indica* (Poinar, Karunakar & David) (1992) (IBCB-n5) vem demonstrando-se promissores no controle a campo de gorgulho da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), larvas da broca do rizoma da cana-de-açúcar, *Migdolus fryanus* (Coleoptera: Cerambycidae), e potenciais no controle de larvas de besouros escarabeídeos. O que pode ser um indicativo de sua eficiência em larvas do coleóptero *G. platensis*.

Entretanto, demais gêneros, além de *Heterorhabditis* e *Steinernema*, são capazes de se alimentar e matar insetos, podendo comportar-se como parasitas facultativos, como o nematoide *Oscheius myriophila* detectado em amostras de solo (TORRES-BARRAGAN et al., 2011; TOMAZINI et. al. 2013), encontrado associado a lagartas de *G. mellonella* e *T. molitor* em armadilhas de metal de trama fina enterradas no solo. Ye et al. (2010) e Al-Zaidawi et al. (2019) também verificaram o potencial do gênero *Oscheius* de infectar e matar *Tenebrio molitor* e *Galleria mellonella*, respectivamente.

Oscheius spp. pode ser facilmente isolado de amostras de solo em diferentes regiões do mundo possibilitando estudos genéticos de suas populações e microevolução (FÉLIX, 2008). Segundo Parkison et. al (2004), o gênero *Oscheius* (família Rhabditidae) incluem representantes de vida livre e parasitas de vertebrados e invertebrados, e são parasitas facultativos, entomopatogênicos apesar de também se alimentarem de outras fontes (YE et al., 2011). Nematoides da família Rhabditidae são geralmente bacteriófagos, encontrados em cadáveres de insetos (STOCK et. al., 2005), tem uma ampla disponibilidade de fontes de alimento portanto, o que pode estar relacionado as populações mais constantes no solo, demonstrando a facilidade de encontrá-los em relação as demais espécies relatadas no presente estudo.

Tradicionalmente, o gênero *Oscheius* é dividido no grupo "*Insectivora*" que contém possíveis patógenos de insetos e o grupo "*Dolichura*" composto principalmente por espécies de vida livre. Algumas publicações recentes sugeriram que o gênero é polifilético, com o grupo "*Insectivora*" próximo à família Heterorhabditidae (Zhang et al., 2008 , 2012) e, atualmente, as relações dentro do gênero não são claras (JARASOVÀ et. al., 2014). Segundo Lephoto et. al (2015), frequentemente espécies do gênero estão associadas a bactérias endossimbiontes do gênero *Serratia* sp. que são patogênicas a insetos, o que pode explicar a eventual mortalidade das lagartas de *G. mellonella* em campo por nematoides deste gênero (DILLMAN et al. 2012a).

Recentemente, nematoides do gênero *Oscheius* (Rhabditida: Rhabditidae) vem sendo apontados como agentes de biocontrole, no entanto os estudos desenvolvidos com nematoides facultativos em campo evidenciando seu papel como potencial agente de controle biológico ainda são escassos (TORRES-BARRAGAN et al., 2011).

Para *Pristionchus pacificus*, outro nematoide encontrado parasitando lagartas de *G. mellonella*, encontra-se geralmente associado a besouros e é utilizado como um sistema modelo em biologia evolutiva. Por possuir estilo de vida necromenico, pode representar uma pré-adaptação para o parasitismo (DIETERICH, et. al. 2008), o que pode explicar a reprodução nas armadilhas com *G. mellonella* presentes no solo.

Como as armadilhas ficaram expostas por sete dias no solo, *O. myriophila* e *Pristionchus* sp. podem ter estado presentes nas amostras beneficiando-se do cadáver dos insetos por morte eventual que não seja atribuída essencialmente a NEPs, visto que nematoides bacterívoros de vida livre podem competir com os nematoides entomopatogênicos pelos cadáveres de insetos ricos em recursos no ambiente do solo (CAMPOS-HERRERA et al., 2012 , CAMPOS-HERRERA et al., 2015 , DUNCAN et al., 2003 , DUNCAN et al., 2007), o que sugere que as próximas amostragens a campo tenham períodos menores de exposição das armadilhas no solo, como quatro dias.

A ausência de nematoides entomopatogênicos em áreas com pastagem, café e feijoeiro, sugere condições inadequadas para a sobrevivência dos nematoides, principalmente em relação a pastagem, na qual encontrava-se em período de escassez de chuvas no momento da amostragem, com conseqüentemente baixa umidade, o que pode desfavorecer a presença de NEPs (WRIGHT, 1992 ; GAUGLER; KAYA, 1990; EHLERS; PETERS, 1996). No entanto, a não detecção de

nematoides na cultura do feijoeiro foi inesperada, visto que a mesma estava sob ampla camada de palhada natural, e encontrava-se no período de chuvas na região, o que favorece a manutenção da umidade e temperatura do solo, fatores cruciais para sobrevivência nematoides entomopatogênicos e mobilidade no solo (KAYA, 1990; KOPPENHOFER et al. 1995; PERES et al. 2003). O número de amostras de solo coletados em pastagem foi reduzido, podendo dificultar a detecção dos NEPs no presente estudo.

A área de cafeeiro amostrada apresentava o solo descoberto de palhada ou de vegetação, o que pode ter interferido na presença dos nematoides, visto que, a locomoção e persistência dos nematoides entomopatogênicos é maior quando as taxas de matéria orgânica no solo são superiores a 75% (GREWAL et. al, 2001).

Esse resultado também pode indicar a necessidade de um número maior de amostras colhidas em diferentes profundidades do solo quando ausência de vegetação e matéria orgânica, uma vez que, Li et. al. (2016) e Kary et. al. (2009) verificaram que o habitat das espécies e o tipo de solo afetam diretamente a recuperação de nematoides entomopatogênicos.

O levantamento nematológico é de suma importância principalmente para identificação de espécies com potencial de controle biológico já descritas e utilizadas em demais países em programas de controle biológico de pragas e que ainda não foram catalogadas no Brasil.

1.5 CONCLUSÃO

A população de nematoides parasitas de insetos da mesofauna estudada foi constituída por espécies entomopatogênicas da família Steinernematidae, como *Steinernema puertoricense*, e por outros rhabditídeos como *Oscheius myriophila*, além de nematoides do gênero *Pristionchus* sp.

Em relação as espécies utilizadas no presente estudo, *Galleria mellonella* foi mais eficiente na recuperação de nematoides em relação as demais espécies utilizadas.

No que se refere as metodologias utilizadas, as armadilhas levadas diretamente ao campo foram mais eficientes.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. Pp. 1-33. In: Gaugler, R. (Ed). **Entomopathogenic Nematology**, UK, Wallingford: CABI Publishing. 2002.
- AL-BANNA, L. *et al.* Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. **Journal of Nematology**, Orlando, v. 36, 142- 146, 2004.
- AL-ZAIDAWI, J. B.; KARIMI, J.; MOGHADAM, E. M. Molecular characterizations of the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Oscheius myriophilus* from Iraq. **Egypt J Biol Pest Control**, v. 29, n. 38, 2019.
- ALMENARA, D. P. *et al.* **Nematoides Entomopatogênicos**. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, INCTEM, v. 16, p. 1-40, 2012.
- BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. C. *et al.* 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**, New York, v. 102, p. 6-13, 2009.
- BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. C. *et al.* Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) to control Brazilian apple leafroller *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae). **Crop Protection**, v. 29, p. 1274-1279, 2010.
- BEDDING, R.A.; AKHURST, R.J. Use of the nematode *Deladenus siricidicola* in the biological control of *Sirex noctilio* in Australia. **Journal of Australian Entomological Society**, Brisbane, v.13, n.2, p. 129-135, 1974.
- BURNELL, A. M.; STOCK, S. P. *Heterorhabditis*, *Steinernema*, and their bacterial symbionts. Lethal pathogens of insects. **Nematology**, Orlando v. 2, p. 31-42, 2000.
- CAMPOS-HERRERA, R. *et al.* Vegetation drives assemblages of entomopathogenic nematodes and other soil organisms: evidence from the Algarve, Portugal, **Soil Biol. Biochem**, Elmsford, v. 128, p. 150-163, 2019.
- CAMPOS-HERRERA, R.; EL-BORAI, F. E.; DUNCAN, L. W. Wide interguild relationships among entomopathogenic and free-living nematodes in soil as measured by real time Qpcr. **J. Inverteb. Pathol.**, New York, v. 111, p. 126-135, 2012.
- CAMPOS-HERRERA, R. *et al.* Turlings Unraveling the intraguild competition between *Oscheius* spp. nematodes and entomopathogenic nematodes: implications for their natural distribution in Swiss agricultural soils. **J. Inverteb. Pathol.**, New York, v. 132, p. 216-227, 2015.
- CASTELLETTO, M. L. *et al.* Diverse host-seeking behaviors of skin-penetrating nematodes. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, p.1004305, 2014.
- CARDOSO, R. *et al.* Effect the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) isolate Santa Rosa on the biological parameters of

engorged nymphs of *Amblyomma jennenses* (Acari: Ixodidae). **Arquivo Instituto Biológico**, v. 80, n. 2, p. 237-241, 2013.

CHAISSON, K. E. HALLEM, E. A. Chemosensory behaviors of parasites. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 28 p. 427-436, 2012.

CONSOLI, E. A. *et al.* Desenvolvimento de diagnóstico molecular para a identificação de *Pratylenchus jaehni*. **Nematologia Brasileira**, v. 36, p. 62–70, 2012.

DE BRIDA, A. L. *et al.* Entomopathogenic nematodes in agricultural areas in Brazil. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 45254, 2017.

DIETERICH, C. *et al.* The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism. **Nature genetics**, New York, v. 40, n. 10, p. 1193-1198, 2008.

DIETERICH, C. *et al.* Pristionchus.org: a genome-centric database of the nematode satellite species *Pristionchus pacificus*. **Nucleic Acids**, London, v. 35, p. 498-502, 2007.

DILLMAN, A. R. *et al.* An entomopathogenic nematode by any other name. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, p. 1002527, 2012.

DILLMAN, A. R. *et al.* Olfaction shapes host–parasite interactions in parasitic nematodes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 109, p. 2324-2333, 2012.

DILLMAN, A. R. An entomopathogenic nematode by any other name. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 3, e1002527, 2012.

DOLINSKI, C.; KAMITANI, F. L.; MACHADO, I. R.; WINTER, C. E. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, V. 103, n. 2, p.150-159, March. 2008.

DOLINSKI, C.; VALE, E. E. DEL; STUART, R. J. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. **Biological Control**, San Diego, v. 38, p. 422-427, 2006.

DOLINSKI, C.; MOINO Jr, A. Utilização de nematoides entomopatogênicos nativos ou exóticos: O perigo das introduções. **Nematologia brasileira**, v. 30, n.2, p. 139-149, 2006.

DOLINSKI, C. Nematoides como agentes do controle biológico de insetos. In: OLIVEIRA FILHOS, E. C.; MONNERAT, R. G. (Ed.) **Fundamentos para regulação de semioquímicos inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Embrapa, v. 4, p. 73-101, 2006.

DOLINSKI, C. Tecnologia de produção e formulação de nematoides entomopatogênicos. In: OLIVEIRA FILHOS, E. C., MONNERAT, R.G. (Ed.) **Fundamentos para regulação de semioquímicos inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**, Planaltina, p. 197-218, 2006.

DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWE, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal of Insect Pathology**, New York, v. 6, n. 4, p. 417-422, 1964.

EHLERS, R. U.; PETERS, A. **Entomopathogenic nematodes in biological control**: feasibility, perspectives and possible risks. In: Hokkanen HMT, Lynch JM (eds) *Biological control: benefits and risks*. Cambridge University Press, Cambridge. v. p. 114-136, 1996.

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

FERRAZ, L. C. C. B. Nematoides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, p. 541-569, 1998.

GENBANK. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 10 de maio de 2020.

GAUGLER, R.; KAYA, H. K. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Reissued 2018 by CRC press, Boca Raton. 1990.

GAUGLER, R.; HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University, p. 289-310, 2002.

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

GREWAL, P. S.; NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, M. M. Entomopathogenic Nematodes: Potential For Exploration and Use in South America. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p.191-205, jun. 2001.

GREWAL, P. S. Formulation and application technology. In: Gaygler, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. **Rutgers University**, New Jersey, p. 1-28, 2002.

HOLTERMAN, M. *et al.* Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematode and accelerated evolution toward crown clades. **Mol Biol Evol**, Chicago, v. 23, p. 1792-1800, 2006.

HOMINICK, W. M. A. P.; REID, D. A.; BRISCOE, B. R. Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p. 317-331, 1996.

HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**, New Jersey: Rutgers University, p. 115-143, 2002.

JAROSOVÁ, A.; PUZA, V.; ZUROVCOVÁ, M. The complete mitochondrial genome of the facultative entomopathogenic nematode *Oscheius chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). **Mitochondrial DNA**, v. 11, p. 1-2, 2015.

JONES, J. Nematode sense organs. In: LEE, D. L. **The biology os nematodes**, New York, p. 369-387, 2002.

KARY, N. E. *et al.* A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the north-west of Iran. **Nematology**, v. 11, p. 107–116, 2009.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes in biological control. **CRC Press**, Boca Raton, p. 93-116, 1990.

KOPPENHOFER, A. M.; KAYA, H. K.; TAORMINO, S. P. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 65, p. 193-199, 1995.

LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; AMBRÓS, C. M.; TAVÁRES, F. M. O uso de nematoides entomopatogênicos no controle de pragas da cana-de-açúcar. In: PINTO, A. S. Controle de pragas da cana-de-açúcar. 1 ed. Sertãozinho, **BIOCONTROL**, Dordrecht, 64 p. 2006.

LEITE, L. G. *et al.* Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Rev. Agric**, Alagoas, v. 78, p. 139-148, 2002.

LEPHOTO, T. E.; GRAY, V. M. Genome sequencing and annotation of *Serratia* sp. strain TEL. **Genomics Data**, v. 6, p. 54-56, 2015.

LEPHOTO, T. E.; FEATHERSTON, J.; GRAY, V. M. Draft whole-genome sequence of *Serratia* sp. strain TEL, associated with *Oscheius* sp. TEL-2014 (nematoda: rhabditidae) isolated from a grassland in South Africa. **Genome Announc.**, v. 3, n. 4, 2015.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Entomopathogenic nematode host finding – response to host contact cues by cruise and ambush foragers. **Parasitology**, v. 105, p. 309-315, 1992.

LEWIS, E. E.; HAZIR, S.; HODSON, A.; GULCU, B. Trophic Relationships of Entomopathogenic Nematodes in Agricultural Habitats, Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests. **Springer**, Cham, p. 139-163, 2015.

LI, X.; LIU, Q.; LEWIS, E.; TARASCO, E. Activity changes of antioxidant and detoxifying enzymes in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae infected by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Parasitol Research**, Berlin, v. 115, p. 1–10, 2016.

MOLINA ACEVEDO, J. P. *et al.* Amostragem e Avaliação de Técnicas para Isolamento de Nematoides Entomopatogênicos Nativos Obtidos em Lavras, Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 17-23, 2005.

MATTHIAS HERRMANN, W. E. *et al.* The Nematode *Pristionchus pacificus* (Nematoda: Diplogastridae) Is Associated with the Oriental Beetle *Exomala*

orientalis (Coleoptera: Scarabaeidae) in Japan. **Zoological Science**, Tokyo, v. 24, n. 9, p. 883-889, 2007.

MRÁČEK, Z. *et al.* *Sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, east Tibetan Mts., China. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 93, p. 157-169, 2006.

NEGRISOLI. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) to control Brazilian apple leafroller *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae). **Crop Protection**, v. 29, p. 1274-1279, 2010.

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

NGUYEN, K. B.; HUNT, D. J. Entomopathogenic nematodes; Systematics, Phylogeny and bacterial symbionts. **Nematology Monographs and perspectives**. v. 5, 816p., 2007.

NGUYEN, K. B. *et al.* Taxonomic and biological characterization of *Steinernema rarum* found in the Southeastern United States. **Journal of Nematology**, Orlando, v. 38, p. 28-40, 2006.

NGUYEN, KHUONG B. *et al.* *Steinernema brazilense* n. sp (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**. San Diego: Academic Press Inc. Elsevier B. V., v. 103, n. 1, p. 8-20, 2010.

OLIVEIRA, C. M. G. *et al.* Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. **Nematologia Brasileira**, v. 33, p. 218–225, 2009.

PARKINSON, J. *et al.* A transcriptomic analysis of the phylum nematode. **National of Library Medicine**, Bethesda, v. 36, p. 1259- 1267, 2004.

PERES, E. E.; LEWIS, E. E.; SHAPIRO-ILAN, D. Impact of the host cadaver on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) under desiccating conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 82, p. 111-118, 2003.

PIZANO, M. A.; AGUILERA, M. M.; MONTEIRO, A. R.; FERROY, L. C. C. B. Incidência de *Neoaplectana glaseri* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) parasitando ovo de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Col: Cerambycidae). **Reunião da Sociedade Brasileira de Nematologia**, v. 9, n. 1, 1985.

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

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**, v. 15, p. 467-472, 1992.

- RASMANN, S. *et al.* Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**, London, v. 434, p. 732-737, 2005.
- RÖDELSPERGER, C. *et al.* Characterization of Genetic Diversity in the Nematode *Pristionchus pacificus* from Population-Scale Resequencing Data. **Genetics**, Austin, v. 196, p. 1153–1165, 2014.
- ROMÁN, J.; FIGUEROA, W. *Steinernema puertoricensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), um novo nematoide entomopatogênico de Porto Rico. **Revista de Agricultura da Universidade de Porto Rico**, v. 78, n.3, p.167-175, 1994.
- RUDEL, D.; RIEBESELL, M.; SOMMER, R. J. Gonadogenesis in *Pristionchus pacificus* and organ evolution: development, adult morphology and cell/cell interactions in the hermaphrodite gonad. **Developmental Biology**, Orlando, v. 277, p. 200-221, 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Composition of the electrophoresis buffer In Molecular cloning, a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, p. 66–67, 1989.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; BROWN, I.; LEWIS, E. E. Freezing and desiccation tolerance in entomopathogenic nematodes: Diversity and correlation of traits. **Journal of Nematology**, Orlando, v. 46, p. 27-34, 2014.
- SOMMER, R. J.; CARTA, L. K.; KIM, S. Y.; STERNBERG, P. W. Morphological, genetic and molecular description of *Pristionchus pacificus* sp. n. (Nematoda, Diplogastriidae). **Fund Appl Nematol**, v. 19, p.511-521, 1996.
- STOCK, S. P.; KAYA, H. K. 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**, Tokyo, v. 82, p. 806-813, 1996.
- 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**, v. 7, p. 363-373, 2005.
- TOMAZINI, D. M. *et al.* Análises biométrica e molecular de isolado brasileiro de *Rhabditisrainai* (Nematoda: Rhabditida). **Nematologia Brasileira**, v. 37, p. 1-2, 2013.
- TORRES-BARRAGAN, A.; SUAZOB, A.; BUHLERC, W. G.; CARDOZA, Y. J. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. **Biological Control**, San Diego, v. 59, n. 2, p. 123–129, 2011.
- VAN TOL, R. W. M. *et al.* Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. **Ecology Letters**, v. 4, p. 292-294, 2001.
- VOSS, M.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI JÚNIOR, A. S.; BARBOSA- NEGRISOLI, C. R. Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de

nematoides entomopatogênicos. **Embrapa Trigo - Documentos Online**, Passo Fundo, v. 119, 44 p., 2009.

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

WRIGHT, P. J. Cool temperature reproduction of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 60, p. 148-151, 1992.

YE, A.; TORRES-BARRAGAN, A.; CARDOZA, Y. J. *Oscheius carolinensis* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a potential entomopathogenic nematode from vermi compost. **Nematology**, v. 12, n. 1, p. 121-13, 2011.

YE, W.; TORRES-BARRAGAN, A.; CARDOZA, Y. J. *Oscheius carolinensis* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a potential entomopathogenic nematode from vermicompost. **Nematology**, v. 12, n. 1, p. 121-135, 2010.

CAPÍTULO 2- Patogenicidade de *Steinernema puertoricense* a *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae)

Resumo

O setor brasileiro de base florestal é considerado um dos mais desenvolvidos e competitivos do mundo. Segundo IBGE (2018), o país possui cerca de 9,85 milhões de hectares de florestas plantadas, onde 75,2% correspondem ao eucalipto, concentradas principalmente nas regiões Sul e Sudeste, que correspondem a 36,1% e 25,4% do valor total de produção respectivamente. No entanto, o gorgulho do eucalipto, praga que tem ocorrido em surtos distribuída por quase todas as regiões, tem ocasionado perdas nas principais regiões produtoras. *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) é um inseto desfolhador com origem na Austrália e encontra-se presente no país a mais de 30 anos ocasionando danos. O manejo da praga é realizado com a utilização de agentes de controle biológico, destacando-se o parasitoide de ovos *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) e o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. No entanto, alguns surtos não são facilmente controlados. Desta forma, visando manter o nível populacional da praga abaixo do limiar de dano, o presente trabalho visou avaliar a patogenicidade de *Steinernema puertoricense* (Rhabditida: Steinernematidae) no controle do *G. platensis*. Para tal, foram quatro níveis populacionais de *S. puertoricense* (0; 50; 100; 200 e 400 JIs infectivos por parcela). Cada tratamento constou de 10 repetições, com parcelas constituídas de uma fase larval de *G. platensis* em cada copo com areia esterilizada com cerca de 5 cm de altura. Decorridos oito dias da inoculação, a mortalidade das ninfas foi avaliada. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa Sirvar. Foi possível observar que os tratamentos a partir de 100 JIs causaram mortalidades superiores a 80%, enquanto a menor concentração obteve valores próximos a 10%. As maiores concentrações causaram cerca de 90% de mortalidade, demonstrando-se promissoras no controle de *G. platensis*.

Palavras-Chave: Controle biológico. Eucalipto. Nematoides entomopatogênicos.

Pathogenicity of *Steinernema puertoricense* in *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae)

Abstract

The Brazilian forest-based sector is considered the most developed and competitive in the world. According to IBGE (2018), the country has about 9.85 million hectares of planted forests, where 75.2% correspond to eucalyptus, concentrated mainly in the South and Southeast, which correspond to 36.1% and 25.4% of the total production value respectively. However, an outbreak pest spread throughout almost all regions known as eucalyptus weevil has caused losses in the main producing regions. *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) is a leafless insect originating in Australia and has been present in the country for over 30 years causing damage. Pest management is performed using biological control agents, especially the egg parasitoid *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. However, some outbreaks are not easily controlled. Thus, aiming to keep the pest population level below the damage threshold, the objective of the present work was to evaluate the pathogenicity of entomopathogenic nematodes to control *G. platensis*. For this, four distinct concentrations were tested, 50; 100; 200 and 400 infectious JIs by repetition of *Steinernema puertoricense* (Rhabditida: Steinernematidae), respectively. Each repetition was equivalent to one treatment, consisting of 10 repetitions each and distilled water as a witness. After inoculation, after eight days, the mortality of the nymphs was evaluated at each repetition. Data were analyzed by Tukey test at 5% probability by Sirvar software. It was observed that the treatments from 100 JIs caused mortality higher than 80%, while the lowest concentration obtained values close to 10%. Higher concentrations caused about 90% mortality, showing promise for controlling *G. platensis*.

Keywords: Biological control. Eucalyptus. Entomopathogenic nematodes.

2.1 INTRODUÇÃO

Gonipterus (Coleoptera: Curculionidae) é originário da Austrália, atualmente distribuído por quase todas as regiões produtoras de eucalipto no mundo. A principal espécie é *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae), conhecido como gorgulho-do-eucalipto. Atualmente, um agravamento dos problemas com *Gonipterus* sp. vem sendo observado em diversas regiões produtoras de eucalipto no mundo (REIS et al., 2012; MAPONDERA et al., 2012).

Gonipterus platensis é uma das principais pragas causadoras de perdas na cultura do eucalipto no Brasil e com maior área de ocorrência (SOUZA et al., 2016). Foi registrada pela primeira vez em 1979 na região de Curitiba como *Gonipterus scutellatus* (FREITAS, 1979) e hoje encontra-se distribuída pelos Estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Espírito Santo (WILCKEN; OLIVEIRA, 2015).

As injúrias na planta são causadas pela alimentação de adultos e lagartas, sendo essas responsáveis pelas desfolhas mais severas. Tais desfolhas podem levar ao superbrotamento do ponteiro, deixando-o com aspecto envassourado, podendo ocorrer bifurcação e entortamento do fuste e, em casos mais severos, a morte da árvore (TOOKE, 1955; EPPO, 2005; SOUZA et al., 2016).

Quando as larvas chegam a fase de pré-pupa, elas cessam a alimentação e saem das copas das árvores para o solo, penetrando no mesmo. Ao atingirem o solo, as pré-pupas constroem uma pequena câmara pupal com formato ovalado constituída de grãos de solo e cimentadas com uma substância líquida excretada pela parte apical do abdome (TOOKE, 1955; FREITAS, 1979). Dentro dessas câmaras pupais o inseto passa pelas fases de pré-pupa e pupa, emergindo cerca de 31 dias em novos adultos (OLIVEIRA, 2006).

Ambas as espécies de *Gonipterus* presentes no Brasil foram devidamente controladas pelo parasitoide *Anaphes nitens* (Girault) (Hymenoptera: Mymaridae) até o final de 2012, quando ressurgiu como praga na região sul do Estado de São Paulo e vem se disseminando pela região central e pelo Paraná (SOUZA et al., 2016). Desta forma, novos agentes para o controle biológico têm sido avaliados de forma a minimizar as perdas causadas pela praga.

Os nematoides entomopatogênicos pertencentes à ordem Rhabditida vem ganhando destaque no controle de pragas agrícolas de solo. Embora sejam

conhecidas mais de 30 famílias de nematoides associados com insetos (VAN DRIESCHE; BELLOWS JR, 1996), as famílias mais conhecidas no controle de pragas são *Steinernematidae* e *Heterorhabditidae* (DOLINSKI, 2006), sendo os gêneros *Steinernema* (Família: Steinernematidae) e *Heterorhabditis* (Família: Heterorhabditidae) os mais utilizados como agentes de controle de pragas (ADAMS et al., 2006), devido sua capacidade de infectar, proliferar e matar insetos de diferentes ordens por meio de suas bactérias simbiotes que se multiplicam e colonizam o hospedeiro rapidamente com a produção de metabolitos, causando septicemia e morte do inseto em 24 e 72 h (POINAR, 1990; DOLINSKI, 2006; HAZIR et al., 2003; POPIEL; HOMINICK, 1992).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a patogenicidade de *Steinernema puertoricense* em fases de pré-pupa de *Gonipterus platensis*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Multiplicação e Identificação do isolado

Os JIs coletados em campo de eucalipto foram multiplicados em fase larval de *Tenebrio molitor* e identificados utilizando análise de DNA. Para isso, o DNA genômico foi extraído de 50 juvenis retirados da solução coletada das armadilhas de White e colocados em 50µl de NaCl 0,85%, pelo método de extração Worm Lysis Buffer (WLB), adaptado (WILLIAMS et al., 1992; HOLTERMAN et. al., 2006). As amostras foram submetidas a PCR a 65 ° C por 2 h, 99 ° C por cinco minutos e armazenadas a -20 ° C (CONSOLI et. al. 2012). Os iniciadores universais D2A (5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3 ') e D3B (5'TCGGAAGGAACCAGCTACT A-3') foram utilizados para amplificar o segmento de expansão D2 / D3 do 28S rDNA por PCR (AL-BANNA et. al., 2004). Um total de 12,5 µL de Gotaq Hot Start (Promega, São Paulo, Brasil), com os reagentes necessários para a reação: 5 U / µL de Taq, 100 mM de cada NTP e 25 mM de MgCl₂, 9,5 µL de água livre de nuclease (Promega), e 1 mL de cada iniciador [10 mM] e 1 mL de cDNA de cada população representativa das espécies alvo e não alvo, totalizando 25 mL por reação, foram submetidos a pCR a 94 ° C por sete minutos; seguido de 35 ciclos a 94 ° C por 60 segundos, 55 ° C por 60 segundos, 72 ° C por 60 segundos; e 72 ° C por 10 minutos (MRÁCEK et. al., 2006). Foram utilizados cinco µL de produto de PCR para eletroforese em tampão TAE (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) em gel de agarose a 1%, corado com brometo

de etídio (0,02 mg / mL), visualizado e fotografado sob luz UV. O resultado da amplificação foi comparado com o marcador de peso molecular VIII.

Os fragmentos amplificados do rDNA de expansão D2 / D3 28S foram sequenciados com o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) (OLIVEIRA et. al., 2009). Uma mistura de reagentes contendo 2 µL de Big Dye, 3,2 mmol de iniciadores sensoriais, 3,0 µL de produto amplificado contendo 400 ng de DNA e 2,0 mL de água foi preparada para o final do produto da reação de PCR. A reação para sequenciamento foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems) com posterior purificação do produto amplificado por precipitação com isopropanol. As amostras foram desnaturadas a 95 ° C por três minutos e a eletroforese realizada em uma unidade Sequenciador de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

As sequências foram alinhadas e comparadas à identificação do polimorfismo de nucleotídeos com o auxílio do Programa Editor de Sequências de BioEdit Aligment. As sequências populacionais de EPN foram comparadas com outras espécies de nematoides no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificação com base na similaridade genética.

2.2.2 Multiplicação do nematoide

Para multiplicação de *S. puertoricense*, juvenis infectantes foram inoculados em fases larvais de *T. molitor*, transferidas após a morte para armadilhas White (1927). Os juvenis obtidos das armadilhas foram colhidos em suspensão e armazenados em B.O.D a 18°C por no máximo três dias antes de serem utilizados.

2.2.3 Teste de patogenicidade

Fases jovens de *G. platensis* foram coletadas em florestas de eucalipto com presença de surtos da praga. Foram acondicionados em potes devidamente etiquetados e levados para condições de laboratório onde foram colocadas em mudas de eucalipto e mantidas em gaiolas com tela de voal no laboratório de controle biológico de pragas florestais na Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu-SP. Larvas penduradas nas mudas, quando estavam prontas para atingirem o solo, em estágio de pré-pupa, foram previamente individualizadas em potes descartáveis (50 ml) contendo areia autoclavada (4g). Posteriormente, juvenis infectivos de *Steinernema puertoricense* foram aplicados sobre essas fases de pré-pupa de

Gonipterus platensis em quatro concentrações diferentes de JIs (50, 100, 200 e 400 JIs por mL) para verificação da patogenicidade. Cada concentração equivaleu a um tratamento e cada um foi composto por 10 repetições. No tratamento testemunha foi aplicado água destilada sobre as pré-pupas para comparação de dados. As parcelas foram mantidas em B.O.D. ajustadas para 20°C, no escuro.

A mortalidade das pré-pupas foi verificada oito dias após inoculação dos juvenis infectivos para evitar que a avaliação antes deste período por acaso matasse as pré-pupas por ferimentos mecânicos. Pré-pupas mortas foram transferidas para armadilha do tipo White (1927).

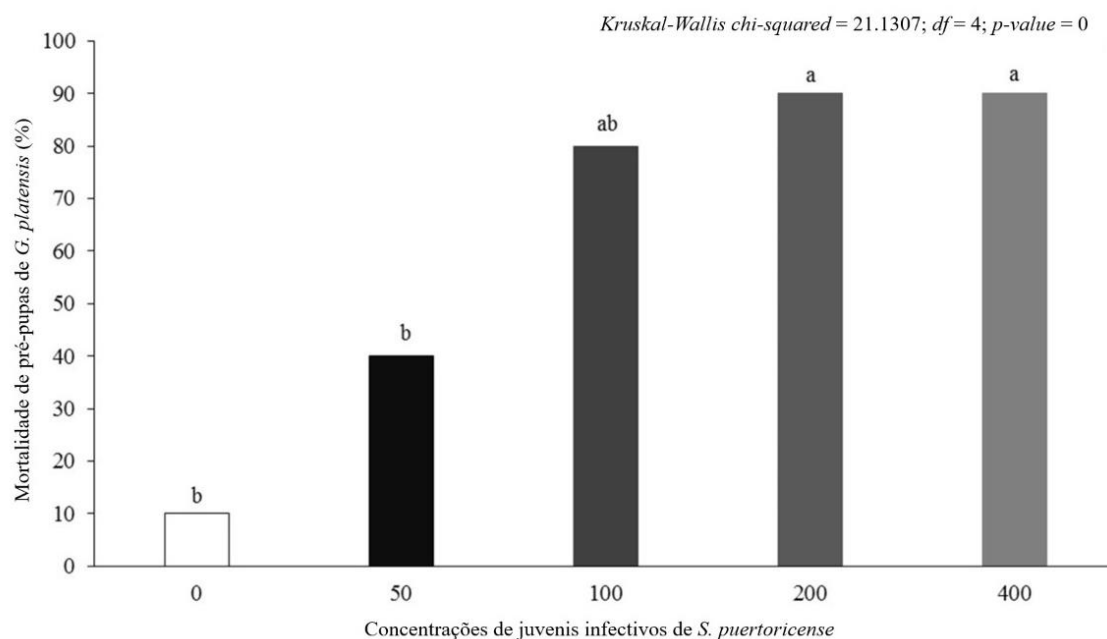
Decorridos dez dias, a suspensão da armadilha foi coletada a cada três dias por 15 dias e armazenada em B.O.D a 18°C para a contagem do número de juvenis emergidos.

2.3 RESULTADOS

Decorridos oito dias após inoculação do juvenis infectantes sobre as pré-pupas de *G. platensis*, quando as mesmas já se encontravam mortas, foi possível observar que os tratamentos com concentração de 200 e 400 JIs proporcionaram maior mortalidade das pré-pupas de *G. platensis*, com valores superiores a 80%, já o tratamento com a menor concentração de juvenis infectivos (50), notá-se redução na efetividade dos nematoides na mortalidade em relação os demais tratamentos, resultando em mortalidade de apenas 40% (Figura 1-A).

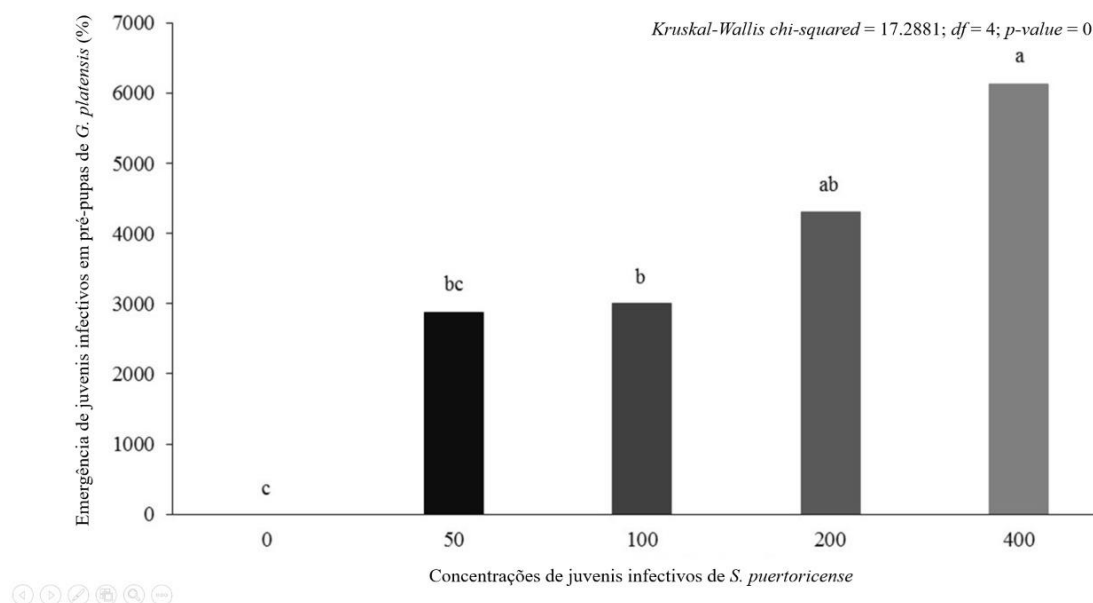
Em relação a saída de nematoides entomopatogênicos do cadáver dos insetos, foi possível verificar que a maior concentração (400JIs) mantém-se como mais eficiente também em relação a saída de JIs, provavelmente pelo maior número de JIs que entraram no corpo do inseto (figura 2- B).

Figura 1- A- Mortalidade de pré-pupas de *Gonipterus platensis* por JIs de *Steinernema puertoricense*



* Valores seguidos por mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn.

Figura 2- B- Emergência de Juvenis infectivos de *Steinernema puertoricense* em pré-pupas de *Gonipterus platensis* em diferentes concentrações



* Valores seguidos por mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunn.

2.4 DISCUSSÃO

Foi possível verificar no presente estudo que o nematoide entomopatogênico *Steinernema puertoricense* é patogênico as ninfas de *Gonipterus platensis*, demonstrando-se promissor como agente de biocontrole da praga. Entretanto, concentrações de juvenis infectivos superiores a 100 JIs, são mais indicadas para aplicação visando controle da praga.

Demais autores citam a adição de nematoides entomopatogênicos como eventuais agentes de controle de *G. platensis*, em que, observaram a patogenicidade dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* no biocontrole da fase do inseto que ocorre no solo quando o mesmo se encontra em fase de pupa, demonstrando resultados promissores para as espécies *H. amazonensis* e *S. feltiae* (HORTA et al., 2017; NICOLETTI et al., 2018).

Assim como as demais espécies do gênero *Steinernema*, *S. puertoricense* possui relação simbiótica com bactérias do gênero *Xenorhabdus*. Algumas bactérias como *Xenorhabdus nematophila* e *Xenorhabdus bovienii* produzem cetonas, amidas e compostos mais complexos como xenocumarinas (antibióticos) que podem proporcionar efeito tóxico a diversos organismos (BODE, 2009), sugerindo a atribuição da mortalidade das ninfas ao efeito antibiótico exercido pelas bactérias simbiotes.

Nota-se que com o aumento do número de juvenis infectivos aplicados sobre as pré-pupas a mortalidade das mesmas aumenta, o que sugere que ocorra pelo maior número de juvenis que penetram no corpo do inseto, o que conseqüentemente, aumenta a resistência pelos NEPs as defesas imunológicas do inseto por meio de evasão ou supressão (ALMENARA, 2012), facilitando a infecção do inseto pelos JIs e a liberação das bactérias simbiotes na hemolinfa.

No Brasil, *S. puertoricense* já possui registro como biocontrole do gorgulho da cana-de-açúcar, o que pode facilitar o processo de certificação do nematoide entomopatogênico também para o biocontrole de *G. platensis* em cultivos florestais, posto que, pertence a mesma família que *Sphenophorus levis* (Coleoptera; Curculionidae).

Em outras espécies de Coleoptera, a eficiência no uso de NEPs para o controle de várias pragas de importância agrícola já foram comprovadas, incluindo larvas de diversas espécies de gorgulhos, como exemplo o gorgulho da videira negra, o gorgulho do pecan, o *Curculio caryae* (Horn) (Coleoptera: Curculionidae), larvas do

gorgulho da raiz cítrica *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) (Shapiro-Ilan et al. 2002, 2003), e o gorgulho das frutas, *Phlyctinus callosus* (Schonherr) (Coleoptera: Curculionidae) (FERREIRA; MALAN, 2014; DLAMINI et al., 2019) todos pertencentes a mesma família do inseto estudado no presente trabalho o que confirma o potencial biocontrole da praga por entomopatógeno.

Trabalhos em campo estão sendo conduzidos voltados para o correto manejo da praga, principalmente em relação ao uso de produtos biológicos, uma vez que, atualmente o principal método de controle do gorgulho é realizado por meio do uso do parasitoide de ovos *Anaphes nitens*, visando diminuir a densidade populacional da praga e os surtos em regiões produtoras de eucalipto (JEGER et al., 2018).

No entanto, técnicas de aplicação em larga escala também precisam ser avaliadas, além de testes persistência dos JIs (ALVES et al., 2009) em cultivos florestais em períodos maiores devem ser realizados assim como técnicas de produção e formulações adequadas que facilitem e disponibilizem tais recursos para o produtor. Mesmo assim, *S. puertoricense* aplicado em suspensão aquosa demonstrou-se eficiente no controle de *G. platensis*.

2.5 CONCLUSÃO

O nematoide entomopatogênico *S. puertoricense* é patogênico a *Gonipterus platensis*, demonstrando-se um potencial agente de controle biológico. Entretanto, concentrações acima de 100 JIs são as mais indicadas para eficácia do nematoide como controle biológico da praga.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J. et al. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. **Biological Control**, San Diego, v. 37, p. 32-49, 2006.
- ALMENARA, D. P. et al. Nematoides Entomopatogênicos. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, INCTEM**, v. 16, p. 1-40, 2012.
- AL-BANNA, L. et al. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. **Journal of Nematology**, Orlando, v. 36, 142- 146, 2004.
- 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 de Entomologia**, São Paulo, v. 53, n. 1, p.139-143, 2009.

BOEMARE N. E.; AKHURST R. J.; MOURANT R. G. DNA Relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes, and a Proposal To Transfer *Xenorhabdus luminescens* to a New Genus, *Photorhabdus* gen. nov. **International journal of systematic bacteriology**. p, 249-255, 1993.

BODE, H. B. Entomopathogenic bacteria as source of secondary metabolites. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 13, p. 224-230, 2009.

BRANCO, S. *et al.* Electrophysiological and behavioural responses of the Eucalyptus weevil, *Gonipterus platensis*, to host plant volatiles. **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 92, p. 221-235, 2019.

BURNELL, A. M.; STOCK, P. Heterorhabditis, Steinernema and Their Bacterial Symbionts - Lethal Pathogens of Insects. **Nematology**, v. 1, p. 31-42, 2000.

CAMPOS-HERRERA, R.; PŮŽA, V.; JAFFUEL, G.; BLANCO-PÉREZ, R.; ČEPULYTĚ-RAKAUSKIENĖ, T. C. Turlings Unraveling the intraguild competition between *Oscheius* spp. nematodes and entomopathogenic nematodes: implications for their natural distribution in Swiss agricultural soils. **J. Inverteb. Pathol.**, v. 132, p. 216-227, 2015.

CONSOLI, E. A. *et al.* Desenvolvimento de diagnóstico molecular para a identificação de *Pratylenchus jaehni*. **Nematologia Brasileira**, São Paulo, v. 36, p. 62-70, 2012.

DLAMINI, B. E.; MALAN, A. P.; ADDISON, P. Control of the banded fruit weevil *Phlyctinus callosus* (Coleoptera: Curculionidae) using entomopathogenic nematodes. **Austral Entomology**. 2019.

DOLINSKI, C. Nematoides como agentes do controle biológico de insetos. Fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. Brasília: **EMBRAPA**, v. 1, p. 1-10, 2006.

EPPO. Data sheets on quarantine pest: *Gonipterus gibberus* and *Gonipterus scutellatus*. **Bulletin**, Paris, v. 35, n. 3, p. 368-370, 2005.

FERREIRA, T.; MALAN, A. P. Potential of entomopathogenic nematodes for the control of the BFW, *Phlyctinus callosus* (Schönherr) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Helminthology**, London, v. 88, p. 293-301, 2014.

FREITAS, S. **Contribuição ao estudo da morfologia e biologia de *Gonipterus gibberus* (Boisduval, 1835) (Coleoptera: Curculionidae) e levantamento dos danos causados por esta espécie em eucaliptos dos arredores de Curitiba**. 1979. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. 1979.

GENBANK. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 16 de maio de 2020.

HAZIR, S. *et al.* Entomopatogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turkish Journal of Biology**, v. 27, p. 181-202, 2003.

HOLTERMAN, M. *et al.* Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematode and accelerated evolution toward crown clades. **Molecular Biology Evolution**, Chicago, v. 23, p. 1792-1800, 2006.

HORTA, A. B. *et al.* Suscetibilidade de *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae) In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 15, 2017, Ribeirão Preto. **Anais**, Ribeirão Preto: SEB, a. p. 397, 2017.

JEGER, M. *et al.* Pest categorisation of the *Gonipterus scutellatus* species complex. **EFSA Journal**, v. 16, n. 1, p. e05107, 2018.

MAPONDERA, T. S.; BURGESS, T.; MATSUKI, M. OBERPRIELER, R. G. Identification and molecular phylogenetics of the cryptic species of the *Gonipterus scutellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae: Gonipterini). **Australian Journal of Entomology**, Canberra, v. 51, n. 3, p. 175-188, 2012.

MRÁČEK, Z. *et al.* *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**, New York, v. 93, p. 157-169, 2006.

NICOLETTI, G. *et al.* Suscetibility of *Gonipterus platensis* to entomopathogenic nematodes. In: FIRST IUFRO WORKING PARTY: IMPROVING FOREST HEALTH ON COMMERCIAL PLANTATIONS, 1, 2018, Punta del Este. **Book of Abstracts**, Punta del Este: IUFRO, 2018. p. 61.

OLIVEIRA, N. C. **Biologia de *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) em *Eucalyptus* spp.** em diferentes temperaturas. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 82 f. 2006.

OLIVEIRA, C. M. G. *et al.* Diagnose de Aphelenchoides fragariae e Pratylenchus spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. **Nematologia Brasileira**, São Paulo, v. 33, p. 218–225, 2009.

POINAR, G. O. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R., KAYA, H. K. (eds). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**, Boca Raton, FL. CRC Press, p. 23-61, 1990.

POPIEL, I.; HOMINICK, W. M. Nematodes as biological control agents: part II. **Advances in Parasitology**, London, v. 31, p. 381-431, 1992.

REIS, A. R. *et al.* Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: Implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 270, p. 216–222, 2012.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Composition of the electrophoresis buffer In *Molecular cloning, a laboratory manual*. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, p. 66–67, 1989.
- SHAPIRO-ILAN, D. I. *et al.* Susceptibility of the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, to entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**. New York, v. 34, p. 246–249, 2002.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; LEWIS, E. E.; SON, Y.; TEDDERS, W. L. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 83, p. 270-272, 2003.
- SOUZA, N. M. *et al.* Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba, n. 209. 2016.
- SOUZA, N. M. ***Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae)**: infestação em eucalipto, aspectos morfológicos e biológicos e controle. 2016. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.
- SOUZA, N. M. *et al.* Ressurgência de uma antiga ameaça: Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae). **Circular Técnica 209**, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Piracicaba, 2016.
- TORRES-BARRAGAN, A.; SUAZOB, A.; BUHLER, W. G.; CARDOZA, Y. J. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. **Biological Control**, San Diego, v. 59, n. 2, p. 123–129, 2011.
- TOOKE, F. G. C. **The eucalyptus snout beetle: *Gonipterus scutellatus* Gyll.** A study of its ecology and control by biological means. Pretoria: Department of Agriculture and Forestry. 282 p. 1955.
- TRIBE G. D. The present status of *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of the Eucalyptus snout beetle *Gonipterus scutellatus*, in the Western Cape Province of South Africa. **Southern African Forestry Journal**, v. 203, p.49-54, 2005.
- VAN DRIESCHE, R. G.; BELLOWS Jr, T. S. **Biological control**. Chapman and Hall, New York, 539 p. 1996.
- WILCKEN, C. F.; OLIVEIRA, N. C. Gorgulho-do-eucalipto *Gonipterus platensis* Marelli. In: VILLELA E. F.; ZUCCHI, R. A. **Pragas Introduzidas no Brasil: Insetos e Ácaros**. Piracicaba: FEALQ. p. 779-791, 2015.
- WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, Washington, v. 66, p. 302-303, 1927.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstra a importância do levantamento nematológico a nível de Brasil na procura de novas espécies entomopatogênicas com potencial de biocontrole para as pragas agrícolas e florestais.

Mais locais de coleta devem ser amostrados principalmente em zonas climáticas diferentes, buscando um maior número de habitats amostrados possível.

Os resultados apresentados nesta dissertação contribuem de maneira significativa no que se refere ao manejo integrado de *G. platensis* utilizando nematoides entomopatogênicos.

Estes resultados demonstram a grande relevância dos NEPs para o controle de pragas agrícolas e florestais. Desta forma, estudos adicionais devem ser realizados para adequação da metodologia necessária para aplicação no que se refere aos métodos, dosagens ideais e melhor época para aplicação dos NEPs em áreas mais extensas a campo.

REFERÊNCIAS

- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. B.; MOINO, A. Jr. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, v. 8, p. 853–867. 2006.
- CAMPOS-HERRERA, R. Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests; Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection. **Springer International Publishing**, Neuchâtel, Switzerland. 2015.
- CIMEN, H. *et al.* *Steinernema tophus* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Journal of Nematology**, Orlando, v. 48, p. 148-158, 2016.
- DE BRIDA, A. L. *et al.* Entomopathogenic nematodes in agricultural areas in Brazil. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 45254, 2017.
- DILLMAN, A. R. *et al.* Olfaction shapes host–parasite interactions in parasitic nematodes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 109, p. 2324-2333, 2012.
- DILLMAN, A. R. *et al.* An entomopathogenic nematode by any other name. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, p. e1002527, 2012.
- DOLINSKI, C.; KAMITANI, F. L.; MACHADO, I. R.; WINTER, C. E. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. **Mem I Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 150-159, 2008.
- EMELIANOFF, V. *et al.* A survival-reproduction trade-off in entomopathogenic nematodes mediated by their bacterial symbionts. **Evolution**, v. 62, p. 932-942, 2008.
- FREITAS, S. **Contribuição ao estudo da morfologia e biologia de *Gonipterus gibberus* (Boisduval, 1835) (Coleoptera, Curculionidae) e levantamento dos danos causados por esta espécie em eucaliptos dos arredores de Curitiba.** 1979. 95 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1979.
- HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University, p. 115-143, 2002.
- KAYA, H. K. *et al.* Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. **Biological Control**, San Diego, v. 38, p. 134-155, 2006.
- KUCHARSKA, K.; KUCHARSKA, D.; ZAJDEL, B. Bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, entomopathogenic nematodes and insects - Their role in the complex symbiont-parasite-host relationship. **Postep Mikrobiol**, v. 54, p. 154-164, 2015.
- KARABORKLUA, S. *et al.* Native entomopathogenic nematodes isolated from Turkey and their effectiveness on pine processionary moth, *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams. **Int J Pest Manage**, v. 61, p. 3-8, 2015.

MOLINA ACEVEDO, J. P. *et al.* Amostragem e Avaliação de Técnicas para Isolamento de Nematoides Entomopatogênicos Nativos Obtidos em Lavras, Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 17-23, 2005.

NGUYEN, K. B.; GINARTE, C. M. A.; LEITE, L. G.; SANTOS, J. M.; HAKAKAVA, R. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 3, p. 8–20, 2010.

OLIVEIRA, N. C. **Biologia de *Gonipterus scutellatus* (Coleoptera: Curculionidae) em *Eucalyptus* spp. em diferentes temperaturas**. 2006. 82 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

RAE, R.; SOMMER, R. J. Bugs don't make worms kill. **J. Exp. Biol.**, London, v. 214, p. 1053, 2011.

RIVERA, M. J.; RODRIGUEZ-SAONA, C.; ALBORN, H. T.; KOPPENHÖFER, A. M. Differential response of a local population of entomopathogenic nematodes to non-native herbivore induced plant volatiles (HIPV) in the laboratory and field. **J Chem Ecol**, v. 42, p. 1259-1264, 2016.

ROSA, J. M. O. *et al.* Caracterização de isolados brasileiros de nematoides entomopatogênicos. In: **Congresso Brasileiro de Nematologia**, 31, 2013; Cuiabá, MT. 2013.

SHAHID, A. A.; RAO, A. Q.; BAKHSH, A.; HUSNAIN, T. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. **Archives of Biological Science**, v. 64, p. 21- 42, 2012.

TARASCO, E. *et al.* Biodiversity of entomopathogenic nematodes in Italy. **Journal of Helminthol**, London, v. 89, p. 359–366, 2015.

THANWISAI, A. *et al.* Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and their symbiotic entomopathogenic nematodes from Thailand. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, e. 43835, 2012.

TOOKE, F. G. C. **The eucalyptus snout beetle, *Gonipterus scutellatus* Gyll. a study of its ecology and control by biological means**. Pretoria: Department of Agriculture and Forestry, 1955. 282 p.

TUMIALIS, D. *et al.* Occurrence of entomopathogenic nematodes in Polish soils. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 46, p. 1126–1129, 2016.

YE, A.; TORRES-BARRAGAN, A.; CARDOZA, Y. J. *Oscheius carolinensis* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a potential entomopathogenic nematode from vermi compost. **Nematology**, v. 12, n. 1, p. 121-13, 2011.

ZHANG, K. *et al.* Differentiating between scavengers and entomopathogenic nematodes: wick is *Oscheius chongmingenses*? **Journal of invertebrate Pathology**, New York, v. 167, p. 107245, 2019.