

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/08/2020.

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

F224l

Faria, Luana Viana

Levantamento de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e patogenicidade de *Steinernema puertoricense* a *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) / Luana Viana Faria.
-- Botucatu, 2020
56p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientadora: Silvia Renata Siciliano Wilcken

1. Fitossanidade. 2. Controle biológico. 3. Entomologia. 4.
Nematoides entomopatogênicos. 5. Pragas florestais. I. Título.

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 Agrônomicas 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 constou 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 verificado 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 infants (JIs) 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 JIs. 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 JIs 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 JIs 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 *Neoaplectana glaseri* (Steiner, 1929) *Heterorhabditis* (*Rhabditis*) *hambletoni* (Pereira, 1937), *Heterorhabditis baujardi* (Phan; Subbotin; Nguyen; Moens, 2003), *Steinernema diaprepesi*, *Steinernema rarum*, *Heterorhabditis indica*, *Metarhabditis rainai* e *Osccheios tipulae* (Lam & Webster, 1971), ambas relatadas em áreas agrícolas e vegetação nativa em diferentes regiões brasileiras (ROSA et al., 2013)

Mais recentemente, o gênero *Osccheius* (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, *Osccheius* 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 *Osccheius* 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.

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 (JEGGER 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 *Goniapterus 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.; ČEPULYTĖ-RAKAUSKIENĖ, T. C. Turlings Unraveling the intraguild competition between *Osccheius* 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.; BELLOWES 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 Agronômicas 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 scavenges and entomopathogenic nematodes: wich is *Oscheius chongmingenses*? **Journal of invertebrate Pathology**, New York, v. 167, p. 107245, 2019.