

JENNIFER KAWANE APARECIDA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE DIETAS PARA CRIAÇÃO DE *Galleria mellonella* L.
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) E MULTIPLICAÇÃO DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS**

Botucatu

2022

JENNIFER KAWANE APARECIDA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE DIETAS PARA CRIAÇÃO DE *Galleria mellonella* L., 1758
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) E MULTIPLICAÇÃO DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGENICOS**

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

Orientadora: Silvia Renata Siciliano
Wilcken

Botucatu

2022

S729a Souza, Jennifer Kawane Aparecida de
Avaliação de dietas para criação de *Galleria mellonella* L.
(Lepidoptera: Pyralidae) e multiplicação de
nematoides entomopatogênicos / Jennifer Kawane
Aparecida de Souza. -- , 2022
108 p. : il., tabs., fotos

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

1. Nematologia agrícola. 2. Nematoides entomopatogênicos. 3.
Galleria mellonella. 4. Manutenção de espécies. 5. Alimentação. I.
Título

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DE DIETAS PARA CRIAÇÃO DE *Galleria mellonella* L.
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) E MULTIPLICAÇÃO DE NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS

AUTORA: JENNIFER KAWANE APARECIDA DE SOUZA

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 (Participação Presencial)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu UNESP



Pesquisadora Dr.^a ADRIANA APARECIDA GABIA (Participação Presencial)
Nematologia / Promip Consultoria e Assessoria em Agronomia Ltda.



Pesquisadora Dr.^a ANDRESSA LIMA DE BRIDA (Participação Virtual)
Nematologia / CropSolutions - Pesquisa, Tecnologia e Inovação Agropecuária Ltda



Botucatu, 21 de novembro de 2022

Aos meus amados filhos

Daniel e Vitória

AGRADECIMENTOS

À Deus criador de todas as coisas, obrigada por me dizer que sou forte em meio as minhas fraquezas.

Aos meus queridos pais Sonia e José pelo apoio incondicional.

À minha amada irmã Jessica por todo empenho, animo, companheirismo e ajuda.

À o meu marido Regis Augusto, pelo apoio.

À Profa. Dra. Silvia Renata, pela orientação, ensinamentos, paciência e exemplo de professora.

Aos meus estagiários Alexandra, Amanda, Rian e Gustavo por todo empenho e auxílio

A todos os professores e funcionários da FCA.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.372166/2019-00.

“É preciso suportar duas ou três lagartas, para conhecer as borboletas”.

SAINT-EXUPÉRY, A. D. O pequeno príncipe. Tradução de G. MIRANDA. Eds. especial. ed. Cotia: Pandorga, 2020. p 69.

RESUMO

Galleria mellonella é um inseto modelo aceito em estudos de interações patógeno-hospedeiro e sobre compostos antimicrobianos. É oferecida como hospedeiro em diversos laboratórios no mundo, por sua facilidade de manuseio, aceitação de técnicas de infecção e pelo seu sistema imune inato, semelhante ao de mamíferos. Essa espécie é empregada em pesquisas relacionadas a saúde humana, animal e no desenvolvimento de técnicas e tecnologias de controle biológico de pragas. Em nematologia agrícola, as lagartas de *G. mellonella* são oferecidas aos nematoides entomopatogênicos (NEPs), como hospedeiro padrão. Embora a criação da espécie de mariposa seja considerada fácil, a nutrição desses insetos é um fator limitante, pois quando inadequada influencia diretamente nos processos de infecção, virulência e multiplicação de *Heterorhabditis* e *Steinernema* (gêneros das famílias de NEPs). Em compor uma dieta que beneficie o ciclo de vida de *G. mellonella*, estimulando a fase larval, aumentando o tamanho das lagartas e o número de adultos na população final, com uma prole saudável e bem desenvolvida, essa pesquisa tem por objetivo, estudar a resposta de indivíduos de *G. mellonella* quando submetidos a uma nova dieta artificial e verificar se as lagartas alimentadas por ela, podem comprometer, favorecer, ou não serem significantes, nos processos de infecção, virulência e multiplicação de criações de nematoides entomopatogênicos em laboratório. Para isso duas etapas foram utilizadas nesta pesquisa, a primeira corresponde as avaliações biométricas, demográficas e dos parâmetros de vida e fertilidade para as lagartas de *G. mellonella* nutridas com diferentes dietas artificiais, sendo o tratamento 1: favos secos umedecidos com solução de mel a 75%, tratamento 2: dieta composta de leite em pó integral, mel, farinha de aveia, gérmen de trigo e proteína de soja e tratamento 3: dieta padrão criada por Guerra (1973). As populações foram avaliadas por 8 gerações. Para a segunda etapa, foram verificadas as influências da alimentação das lagartas sobre os processos de infecção, virulência e multiplicação de nematoides entomopatogênicos, em que os tratamentos correspondem as lagartas da oitava geração de *G. mellonella* padronizadas em comprimento e largura para cada dieta em 6º instar, oferecidas a cinco espécies de nematoides entomopatogênicos, sendo elas: *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. amazonensis*, *Steinernema puertoricense*, *S. rarum* e *S. feltiae*. Sobre as dietas, pode-se verificar que as lagartas alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) apresentaram os melhores índices de desenvolvimento e médias positivas para grande parte dos parâmetros avaliados, enquanto a dieta correspondente ao tratamento 1 demonstrou médias negativas sobre o desenvolvimento da espécie *G. mellonella*. A dieta do tratamento 3 se mostrou nesta pesquisa uma boa opção de alimentação a lagartas da espécie, porém seu uso não é recomendado para criações com finalidade de hospedeiras a nematoides entomopatogênicos, visto que as lagartas alimentadas por essa dieta, apresentam baixa produção de juvenis infectantes. Para as avaliações da influência da alimentação das lagartas sobre os processos realizados pelos NEPs, a dieta correspondente ao tratamento 2 se apresentou favorável a infecção, virulência e multiplicação para às cinco espécies avaliadas.

Palavras-chave: criação em laboratório; *Heterorhabditis*; técnica *in vivo*; NEPs; *Steinernema*

ABSTRACT

Galleria mellonella is a model insect accepted in studies of pathogen-host interactions and on antimicrobial compounds. It is offered as a host in several laboratories around the world, for its ease of handling, acceptance of infection techniques and for its innate immune system, similar to that of mammals. This species is used in research related to human and animal health and in the development of techniques and technologies for biological pest control. In agricultural nematology, caterpillars of *G. mellonella* are offered to entomopathogenic nematodes (NEPs) as a standard host. The NEPs belong to the Heterorhabditidae and Steinernematidae families, which are able to control insect pests of annual and perennial crops in a period of 24 to 48 hours after spraying them on crops. Although the creation of the moth species is considered easy, the nutrition of these insects is a limiting factor, because when inadequate it directly influences the processes of infection, virulence and multiplication of *Heterorhabditis* and *Steinernema* (genera of the NEP families). In composing a diet that benefits the life cycle of *G. mellonella*, stimulating the larval stage, increasing the size of caterpillars and the number of adults in the final population, with a healthy and well-developed offspring, this research aims to study the response of individuals of *G. mellonella* when submitted to a new artificial diet and to verify if the caterpillars fed by it, can compromise, favor, or not be significant, in the processes of infection, virulence and multiplication of creations of entomopathogenic nematodes in the laboratory. For this, two stages were used in this research, the first corresponds to biometric, demographic and life and fertility parameters assessments for *G. mellonella* caterpillars fed with different artificial diets, being treatment 1: dry combs moistened with honey solution at 75%, treatment 2: diet composed of whole milk powder, honey, oat flour, wheat germ and soy protein and treatment 3: standard diet created by Guerra (1973). Populations were evaluated for 8 generations. For the second stage, the influences of the caterpillars' feeding on the processes of infection, virulence and multiplication of entomopathogenic nematodes were verified, in which the treatments correspond to the caterpillars of the eighth generation of *G. mellonella* standardized in length and width for each diet in 6th instar, offered to five species of entomopathogenic nematodes, namely: *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. amazonensis*, *Steinernema puertoricense*, *S. rarum* and *S. feltiae*. Regarding the diets, it can be seen that the caterpillars fed by the adapted diet showed the best development rates and positive averages for most of the parameters evaluated, while the diet corresponding to diet 1 showed negative averages on the development of the species *G. mellonella*. Diet 3 was shown in this research to be a good option for feeding caterpillars of the species, but its use is not recommended for creations with the purpose of hosting entomopathogenic nematodes, since caterpillars fed by this diet have low production of infective juveniles. For the evaluations of the influence of the caterpillars' feeding on the processes carried out by the NEPs, the diet corresponding to treatment 2 was favorable to infection, virulence and multiplication for the five species evaluated.

Keywords: creation in laboratory; *Heterorhabditis*; technique *in vivo*; ENPs; *Steinernema*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ovos de <i>G. mellonella</i>	51
Figura 2 - Dissociação e esterilização dos ovos de <i>G. mellonella</i>	52
Figura 3 - Secagem de favos de mel após esterilização em hipoclorito de sódio	53
Figura 4 - Contagem das lagartas.....	56
Figura 5 - Dietas oferecidas a <i>G. mellonella</i>	56
Figura 6 - Separação das pupas de <i>G. mellonella</i>	57
Figura 7 - Pupas de <i>G. mellonella</i>	57
Figura 8 - Dimorfismo sexual em adultos de <i>G. mellonella</i>	58
Figura 9 - Postura de ovos de <i>G. mellonella</i>	58
Figura 10 - Lagartas de <i>G. mellonella</i> e recipientes com NEPs.....	60
Figura 11 - Preparo de armadilhas de White.....	61
Figura 12 - Contagem dos JIS	62
Figura 13 - Comparação dos valores nutricionais para as dietas avaliadas	65
Figura 14 - Comparação do número de eclosões de ovos usando Box Plot.....	67
Figura 15 - Comparação do número de mortes usando Box Plot	68
Figura 16 - Comparação do número da população final usando Box Plot	69
Figura 17 - Comparação do número de fêmeas geradas por fêmeas usando Box Plot	71
Figura 18 - Comparação do índice de sobrevivência usando Box Plot.....	72
Figura 19 - Comparação da taxa de mortalidade usando Box Plot.....	73
Figura 20 - Comparação da taxa líquida de reprodução usando Box Plot	77
Figura 21 - Comparação da taxa intrínseca de crescimento usando Box Plot.....	78
Figura 22 - Comparação da taxa finita de aumento usando Box Plot	79
Figura 23 - Comparação do período de tempo necessário para a população dobrar.....	80
Figura 24 - Comparação de Virulência de <i>G. mellonella</i>	85
Figura 25 - Comparação de multiplicação de NEPS em <i>G. mellonella</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento experimental etapa I.....	50
Tabela 2 - Delineamento experimental etapa II.....	50
Tabela 3 - Dietas artificiais oferecidas aos indivíduos de <i>G. mellonella</i>	55
Tabela 4 - Tabela nutricional das dietas utilizadas no experimento	65
Tabela 5 - Médias dos parâmetros biométricos avaliados para as três dietas	66
Tabela 6 - Médias das lagartas que estenderam seu estágio larval	70
Tabela 7 - Médias dos parâmetros demográficos avaliados para as três dietas.....	71
Tabela 8 - Médias de vida e fertilidade de <i>G. mellonella</i> para as dietas avaliadas ...	74
Tabela 9 - Médias de desenvolvimento avaliados para as três dietas	77
Tabela 10 - Parâmetros métricos obtidos para as três dietas avaliadas	80
Tabela 11 - Médias de infecção de <i>G. mellonella</i>	82
Tabela 12 - Médias de virulência de nematoides entomopatogênicos.....	83
Tabela 13 - Médias de multiplicação de nematoides entomopatogênicos	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand - DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
FAIT	Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva
FCA	Faculdade de Ciências Agrônômicas
Fig.	Figura
g	Gramas
IBC	Instituto Biológico de Campinas
JIS	Juvenis Infectantes/infectivos de nematoides entomopatogênicos
L	Litros (s)
mL	Mililitro (s)
NEPs	Nematoides entomopatogênicos
PR	Paraná
Quant.	Quantidade
SP	São Paulo
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
Tab.	Tabela
UR%	Umidade relativa do ar
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
±	Variação para mais ou menos
x'	Minutos (em coordenadas geográficas)
x''	Segundos (em coordenadas geográficas)
S	Sul do Equador (em coordenadas geográficas)
W	Oeste do Equador (em coordenadas geográficas)
n°	Número
x:y	Proporção de x'' para'' y
°	Decimal
X	Vezez
Λ	Razão finita de aumento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	Nematoides entomopatogênicos	29
2.2	Ciclo de vida, simbiose e alimentação de nematoides entomopatogênico.....	31
2.3	Relação entre nematoides entomopatogênicos e hospedeiros	34
2.4	Uso de NEPs em programas de controle biológico.....	40
2.4.1	<i>Criação de nematoides entomopatogênicos in vivo</i>	<i>43</i>
2.5	A traça da cera: <i>Galleria mellonella</i>	46
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1	Etapa I – Avaliação da resposta de <i>G. mellonella</i> a nova dieta artificial..	51
3.1.1	<i>Preparação dos espécimes de <i>Galleria mellonella</i></i>	<i>51</i>
3.1.2	<i>Preparo das Dietas artificiais.....</i>	<i>52</i>
3.1.3	<i>Coleta de dados após eclosão das lagartas.....</i>	<i>56</i>
3.1.4	<i>Avaliações para a etapa.....</i>	<i>58</i>
3.2	Etapa II – Avaliação da relação entre os NEPs e as lagartas.....	59
3.2.1	<i>Inoculação das lagartas de <i>G. mellonella</i> com as espécies de NEPs.....</i>	<i>59</i>
3.3	Análise estatística	62
4	RESULTADOS	63
4.1	Estatística descritiva obtida para os parâmetros avaliados.....	63
4.2	Etapa I – Avaliação da resposta de <i>G. mellonella</i> a nova dieta artificial.....	64
4.3	Etapa II – Avaliação da relação entre os NEPs e as lagartas.....	80
4.2.1	<i>Infecção das lagartas de <i>G. mellonella</i> por nematoides entomopatogênicos</i>	<i>81</i>
4.2.2	<i>Virulência de Nematoides entomopatogênicos a lagartas de <i>G. mellonella</i>..</i>	<i>83</i>
4.2.3	<i>Multiplicação de nematoides entomopatogênicos em <i>G. mellonella</i>.....</i>	<i>85</i>
5	DISCUSSÃO	89
5.1	Avaliação da resposta de <i>G. mellonella</i> a nova dieta artificial adaptada.	89

5.2	Avaliação da relação entre os NEPs e as lagartas.....	94
6	CONCLUSÃO.....	98
	REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

A fauna do solo possui inúmeros indivíduos encarregados de diversas atividades, relacionadas a decomposição de material orgânico e manutenção do equilíbrio dos solos, sendo a principal engrenagem do ciclo de vida dos seres vivos (CORREIA, 2002). Dentre esses seres, encontramos os nematoides. Os hábitos alimentares dos nematoides são diversificados, variando de espécie para espécie (GOULART, 2007). Os nematoides de interesse para a agricultura são os nematoides parasitos de plantas, que se alimentam da estrutura radicular das plantas através da inserção de seu estilete bucal e os nematoides entomopatogênicos que causam patogenicidade e morte de insetos e outros artrópodes.

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) controlam com eficiência, inseto-pragas agrícolas e florestais, atuando em medidas de controle biológico de insetos (FUGA, FERNANDES e LOPES, 2012). Nesse grupo de nematoides encontramos as espécies pertencentes a família Steinernematidae e Heterorhabditidae. Como dito, são espécies que tem por habitat o solo, e podem ser detectadas através de levantamentos específicos realizados a campo (DOLINSKI, 2006).

Em meio a crescente das pesquisas com a utilização de NEPs como agentes de biocontrole de pragas, torna-se necessário a criação de insetos hospedeiros em laboratório, que serão oferecidos como alimentos aos NEPs. Entre os hospedeiros comumente encontrados em laboratórios temos, as lagartas do besouro tenébrio *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) e a traça-da-cera *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) (COSTA, 2006) sendo esta última a espécie padrão para a criação e manutenção de NEPs em condições laboratoriais.

No Brasil, devido às dificuldades com a criação de *G. mellonella*, alguns autores fazem o uso da espécie *T. molitor*, por sua facilidade de criação em sistemas controlados. Existem ainda alguns autores que utilizam lagartas de *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Pyralidae), encontrada com menor incidência entre os laboratórios de nematologia, mas aparecem em alguns casos

específicos de instituições que possuem a criação para outras finalidades e acabam utilizando também como hospedeiros aos NEPs (FERRAZ, 1998).

A *G. mellonella* é usada como padrão internacional em pesquisas com NEPs, a criação desta mariposa é essencial em laboratórios de pesquisas com nematoides entomopatogênicos. Porém, sua criação em laboratórios é dificultada por diversos fatores, como alterações em temperatura, exposição a luz e alimentação, além dos contaminantes e aproveitadores, a exemplo da mosca lambe-olhos — *Hippelates spp.*, Loew, 1863 (Diptera: Chloropidae), os fungos causadores de bolores dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* Micheli, 1729 (Eurotiales: Trichocomaceae), também a mariposa traça-pequena-da-cera — *Achroia grisella* Fabricius, 1754 (Lepidoptera: Pyralidae) e o parasitoide *Apanteles galleriae* Wilkinson, 1932 (Hymenoptera: Ichneumonidae: Braconidae) (ZACARIN, GOBBI e CHAUD-NETTO, 2004).

Dentre os fatores determinantes do sucesso da criação de *G. mellonella* em laboratório, o elemento nutricional é o mais importante. Como na natureza as mariposas são pragas da apicultura, e se alimentam do mel, cera e pólen produzidos e coletados por abelhas, a dieta em laboratório deve ser próxima em balanço nutricional a tais fontes de alimento, além de palatável as lagartas, garantindo o bom desenvolvimento, sobrevivência e manutenção da espécie em criações laboratoriais. A escolha e preparo de uma alimentação artificial, que possibilite a produção e manutenção de insetos, capaz de fornecer os nutrientes em níveis apropriados para o desenvolvimento da espécie, com custo considerável e de fácil preparo, representa uma das principais exigências para o êxito de criações de insetos em laboratório (PARRA, PANIZZI e HADDAD, 2012).

Na maioria dos casos, o oferecimento de dietas *in natura* pode trazer fungos e outros contaminadores para a criação, e as dietas artificiais comumente oferecidas as mariposas de *G. mellonella*, podem ser recusadas pelas lagartas, ocasionando em diminuição do número de indivíduos nas fases do ciclo de vida (ovo, larva, pupa e adultos), além de deformações que podem surgir nessas fases. Quando não se dispõe de uma dieta própria para o inseto, ou a mesma não se mostra mais eficiente em níveis nutricionais que contribuam no desenvolvimento e sobrevivência dos espécimes, é recomendado a elaboração de dietas artificiais similares a alimentação

natural do inseto (COHEN, 2015). Com base nisso, surge o questionamento: a dieta artificial empregada para alimentação de fases larvais de *G. mellonella* pode interferir no desenvolvimento desses insetos? E a alimentação oferecida às lagartas pode influenciar no desempenho e produção de nematoides entomopatogênicos em laboratório?

Como as dietas empregadas na criação de *G. mellonella*, muitas vezes se mostram insuficientes para o bom desenvolvimento, multiplicação, e ainda, um período larval curto destas mariposas, (fatores cruciais para a manutenção da espécie em laboratório) (PARRA, 2001), surge a necessidade de buscar um regime alimentar capaz de oferecer os nutrientes indispensáveis para o desenvolvimento apropriado da espécie, com possível prolongação do estágio larval, visando o oferecimento das lagartas como hospedeiras aos NEPs. Esta nova dieta, além dos fatores citados acima, não deve oferecer riscos as lagartas ou mesmo aos NEPs e seus descendentes, influenciando positivamente nos processos de infecção, virulência, reprodução e multiplicação dos NEPs.

Para tanto, essa pesquisa busca estudar a resposta de indivíduos de *G. mellonella* quando submetidos a uma nova dieta artificial adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) e avaliar se as lagartas alimentadas por tal dieta podem comprometer, não se mostrar influentes ou até mesmo, favorecer os processos de infecção, virulência e multiplicação de nematoides entomopatogênicos.

Assim admite-se para essa pesquisa a hipótese nula (H0) de que a dieta artificial adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) não é significativa para o desenvolvimento de *G. mellonella* sem escalonamento da fase larval e compromete / não é influente nos processos de infecção, virulência e multiplicação de nematoides entomopatogênicos, e as hipóteses alternativas: (H1) em que a dieta artificial adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) proporciona o melhor desenvolvimento de *G. mellonella* com escalonamento na fase larval sem interferências negativas no ciclo de vida da espécie e favorece os processos de nematoides entomopatogênicos em laboratório.

Segunda hipótese (H2) a dieta artificial adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) não é significativa para o desenvolvimento de *G. mellonella* sem escalonamento da fase larval mas favorece os processos de nematoides entomopatogênicos em laboratório; (H3) A dieta artificial adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) proporciona o melhor desenvolvimento de *G. mellonella* com escalonamento na fase larval sem interferências negativas no ciclo de vida da espécie e compromete / não é influente nos processos de infecção, virulência e multiplicação de nematoides entomopatogênicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nematoides entomopatogênicos

São chamados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) as espécies de nematoides parasitas obrigatórios de artrópodes que provocam a morte de insetos por patogenia (desenvolvimento de doenças). Na biologia, o termo entomopatógeno se refere a indivíduos que causam a morte de um segundo, através de substâncias e toxinas que possuem atividade inseticida (LEITE, 2015). Os nematoides que se enquadram nessa classificação pertencem à ordem Rhabditidae, famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae e gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (SANTOS, 2009; ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012).

Acredita-se que a origem dos nematoides entomopatogênicos tenha ocorrido durante a era Paleozoica (542 – 241 milhões de anos atrás). Nessa era, existem quatro períodos importantes a serem considerados, sendo eles, período Cambriano, com o surgimento dos artrópodes; período Ordoviciano, com o aparecimento dos primeiros peixes primitivos e invertebrados marinhos; período Siluriano, no qual o ambiente terrestre foi invadido pelos artrópodes, surgindo os primeiros insetos; e o período Devoniano, que marcou a saída dos peixes da água (LAMANA e BRANCO, 2009). Tais períodos levam a acreditar que os ancestrais dos nematoides entomopatogênicos possam ter surgido em algum momento entre o período Devoniano, evoluindo em simultâneo, em aproximadamente 375 milhões de anos atrás (POINAR JR., 1993).

De acordo com o trabalho de Poinar Jr. (1993), as famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, possuem ancestrais diferentes, mas os padrões semelhantes de infectividade, ciclo de vida e associação com um simbiote bacteriano são considerados resultado de uma convergência entre as famílias.

Segundo Poinar Jr. (1993) Heterorhabditidae provem de um ancestral marinho, halófilo, que se alimentava de bactérias de vida livre encontradas em sedimentos marinhos, possivelmente *Pellioditis marina* Bastian (1865), que migrou para o ambiente terrestre. Pode ser encontrado alto número de indivíduos desta família naturalmente em encostas de praias, sugerindo a preferência dos Heterorhabditídeos por solos arenosos e quentes.

Os registros em áreas longe do mar de indivíduos do gênero *Heterorhabditis*, mostram que possuem uma boa adaptação a baixa salinidade dos solos, embora possa existir uma preferência por solos com teores de sais mais altos. Um estudo realizado com esse gênero de nematoide, mostra que são capazes de sobreviver por um período mais longo quando armazenados em solução de ringer e em água do mar do que em água doce (POINAR e PAFF, 1985).

Os seres da família Steinernematidae não apresentam evidências de um ancestral marinho, e provavelmente evoluíram de um ancestral terrestre da linha de *Rhabditophanes* sp. Supõe-se que as famílias possuam diferenças morfológicas e comportamentais devido ao seu processo evolutivo sofrido com o tempo, onde os Heterorhabditidae possam ter maior evolução em comparação aos Steinernematidae. Alguns sinais dessa evolução seriam o hermafroditismo, o dente córneo (causando uma penetração forçada no hospedeiro), entre outras características atribuídas aos integrantes de *Heterorhabditis* (POINAR JR., 1983).

Ao se tratar de distribuição geográfica ambas as espécies são cosmopolitas, podendo ser encontradas na América, Europa, África, Ásia, Oceania com exceção da Antártida. Podem também ter distribuição relacionada as condições climáticas, encontrando em regiões de temperatura anual média de até 25 °C (regiões temperadas) maior ocorrência de nematoides do gênero *Steinernema* e em regiões de temperatura média anual superior a 25 °C (regiões tropicais e subtropicais) maior existência dos nematoides do gênero *Heterorhabditis* (POPIEL e HOMINICK, 1990; LAWRENCE, HOY e GREWAL, 2006).

Esses nematoides podem ser encontrados em solo a profundidade que pode chegar até 90 cm. Entretanto, alguns fatores ambientais podem interferir na mobilidade dos NEPs, a exemplo da umidade, a temperatura e a textura do solo. Em relação à textura, a porosidade afeta a dispersão da espécie, sendo esta proporcional ao tamanho dos poros, ou seja, quanto maiores os poros, maior é a dispersão dos nematoides no solo (KAYA e GAUGLER, 1993; KOPPENHOFER, 2007).

Como pontos em comum e importantes a serem considerados, estes nematoides apresentam efeito letal rápido, ampla gama de hospedeiros, ciclo de vida curto, afetam qualquer estágio de desenvolvimento dos hospedeiros (exceto ovos), sobrevivem por longos períodos de tempo para localizar o hospedeiro, toleram doses

elevadas de produtos fitossanitários, possuem efeito sinérgico com outras técnicas de controle, tem boa adaptabilidade a novos habitats (desde que no solo), são facilmente distribuídos, e principalmente, é específico para artrópodes e não afeta plantas ou organismos superiores (LEITE, 2015).

2.2 Ciclo de vida, simbiose e alimentação de nematoides entomopatogênicos

Os NEPs apresentam três fases no seu ciclo de vida, sendo elas: ovo, juvenis (J1 ao J3/J4) e adultos. Sendo que na fase juvenil J3, também denominada como juvenil infectante (JI), apresenta grande resistência a adversidades ambientais e é a única fase encontrada no solo. Os juvenis infectantes apresentam aberturas naturais (boca e anus) oclusos e possui duas cutículas sobrepostas, ambos garantem maior tempo de sobrevivência do juvenil, evitando a desidratação (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012).

Esses juvenis possuem ainda em seu tubo digestivo, bactérias simbiontes que tem seu crescimento e metabolismo controlado no interior do nematoide, e são essas que causarão patogenias ao hospedeiro no momento da infecção pelo nematoide. Tanto a espécie de bactérias simbiontes quanto o local de armazenamento das mesmas são específicos para cada gênero de NEPs (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012).

As espécies pertencentes a *Heterorhabditis*, começam seu processo de infecção no momento em que os juvenis infectantes ingerem as bactérias simbiontes do gênero *Photorhabdus* e as armazenam nos 2/3 iniciais do mesêntero (rodeadas por uma membrana de origem desconhecida) logo atrás da faringe (FLANDERS, MILLER e SHIELDS, 1996; GOODRICH-BLAIR e CLARKE, 2007). Armazenados os simbiontes, os Jis migram para o solo a procura de seu hospedeiro, quando o encontram, penetram em seu corpo através das aberturas naturais (cavidade oral, aberturas do sistema respiratório traqueal e/ou ânus) ou ainda forçam a penetração pelo tegumento do inseto com o auxílio de uma estrutura fixa em sua cabeça, denominada de dente córneo, que permite ao nematoide romper o tegumento do artrópode e dar início ao processo de infecção do seu alvo diretamente (FORST e CLARKE, 2002).

Para as espécies de *Steinernema* os juvenis infectantes armazenam as bactérias simbiotes, que neste caso pertencem ao gênero *Xenorhabdus*, em um divertículo intestinal especializado localizado após a faringe e saem ao solo em busca do hospedeiro, possuindo suas aberturas naturais fechadas e às duas cutículas sobrepostas, assim como *Heterorhabditis*, afim de evitar a desidratação. A infecção para estas espécies só acontece pelos orifícios naturais (ADAMS e NGUYEN, 2007; GOODRICH-BLAIR, 2007).

Segundo Zuckerman e Jansson (1984) as técnicas utilizadas pelos juvenis infectantes a procura de seus hospedeiros varia entre os NEPs, podendo acontecer pelo comportamento de emboscada (ambusher) ou de busca e procura ("cruiser"). Grande parte das espécies de *Steinernema* tem como estratégia o tipo emboscada, o qual aguardam seu alvo, e quando localizado, se equilibram apoiados em suas caudas, esperando o momento oportuno para se lançar no hospedeiro (GREWAL, LEWIS, *et al.*, 1994). Em contrapartida, grande parte dos NEPs do gênero *Heterorhabditis* realizam a estratégia de busca e procura ativa de seus hospedeiros, movendo-se pelo solo. Os nematoides com esse tipo de estratégia são menos influenciados pela disponibilidade de hospedeiros (GREWAL, LEWIS, *et al.*, 1994).

Ambos os gêneros capturam ou buscam seus hospedeiros guiados pela respiração e defecação, que geram diferentes teores de CO₂ e outras substâncias geradas pelas atividades metabólicas liberadas pelo inseto. São guiados também por plantas que quando atacadas por insetos emitem β -cariofilenos por suas raízes, estas substâncias são recebidas pelos anfídeos presentes na parte frontal do corpo dos NEPs (ZUCKERMAN e JANSSON, 1984).

Uma vez na hemocèle, os juvenis infectantes de *Heterorhabditis* liberam as bactérias através do estoma (regurgitando), e os J3 de *Steinernema*, liberam seus simbiotes através da defecação (FUGA, FERNANDES e LOPES, 2012). As bactérias uma vez na hemocèle do inseto, se propagam e matam o hospedeiro entre 24 a 72 horas em média, e a partir de metabólitos secundários, causam a septicemia do inseto, vale ressaltar que os NEPs também produzem substâncias tóxicas ao inseto independente da bactéria simbiote (GREWAL, LEWIS, *et al.*, 1994).

O corpo do inseto morto fica tomado por um ambiente líquido nutritivo composto pelas bactérias simbiotes e órgãos degradados do hospedeiro. Os nematoides

consomem esse líquido formando reservas lipídicas (ADAMS e NGUYEN, 2007). Nesse mesmo meio os NEPs se desenvolvem para juvenis de último estágio (J4) e se tornam adultos. No caso de *Heterorhabditis* ocorrem fêmeas hermafroditas na primeira geração, as fêmeas e machos aparecem na 2ª geração. Em *Steinernema* encontram-se machos e fêmeas desde a primeira geração. Na maior parte dos casos, os juvenis originados possuem a disposição considerável quantidade de alimento, sendo capazes de completar seu desenvolvimento e se tornarem adultos de segunda geração no mesmo inseto (ADAMS e NGUYEN, 2007).

Para as espécies de *Steinernema*, encontram-se adultos fêmeas e machos, os quais precisam copular para gerar descendentes. Os ovos dessas espécies são depositados no meio líquido no corpo do hospedeiro e parte fica retida no interior das genitoras até o momento da eclosão (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012). Dos juvenis eclodidos, parte se desenvolverão para o estágio juvenil infectante (J3), o qual retém a cutícula do estágio J2, como uma camada protetora que impede a desidratação durante sua migração ao solo. Outra parte, concluirá seu desenvolvimento no mesmo inseto que os genitores. Esses adultos irão copular e gerar novos ovos, entretanto com a escassez dos recursos alimentares para essa geração, os novos juvenis migram obrigatoriamente ao solo, aonde permanecerão até localizarem um novo hospedeiro (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012).

Heterorhabditis possui ciclo de vida semelhante às espécies de *Steinernema*, entretanto seus nematoides adultos da primeira geração são fêmeas hermafroditas. Essas hermafroditas possuem gônadas que produzem espermatozoides, e esses por sua vez ficam acondicionados na espermateca esperando a produção dos ovócitos. As infecções por *Heterorhabditis* são bem-sucedidas mesmo com a entrada de um único JI, devido a essa característica de hermafroditismo nos adultos da primeira geração (POINAR JR., 1990; FORST e CLARKE, 2002).

No ciclo de *Heterorhabditis*, encontramos também um fenômeno chamado Endotoquia matricida, que se refere a eclosão dos ovos no interior do corpo da genitora, e os juvenis rompem sua cutícula para se libertarem, causando sua morte (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012). Estudos com espécies de *Heterorhabditis* sugerem que a transferência das bactérias simbiotes entre a genitora e a prole ocorre a partir do intestino das mães hermafroditas. Em que os simbiotes se deslocam pelas

células intestinais da fêmea ficando à disposição dos juvenis recém-eclodidos. É possível que a endotoquia matricida garanta que os simbiossantes sejam transferidos para a prole (CICHE, KIM, *et al.*, 2008).

Durante o desenvolvimento dos nematoides entomopatogênicos, as bactérias simbiossantes possuem um papel fundamental, pois matam o inseto e permitem que o nematoide se alimente delas junto dos líquidos do cadáver, impedindo o contágio por outros microrganismos. Essas bactérias possuem extenso conjunto de genes diretamente relacionados na produção de toxinas e metabólitos secundários, capazes de garantir a patogenicidade, a identificação do nematoide e a manutenção do simbiossante (CLARKE, 2008; ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012).

A simbiosse entre bactérias e nematoides entomopatogênicos é intrínseca entre as espécies, onde os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* possuem simbiosse apenas por bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (PEREIRA, ALFAIA, *et al.*, 2019). Mas essa associação não é obrigatória para os procariotos. A relação entre *Heterorhabditis* e *Photorhabdus* é bastante restritiva, onde em determinada espécie de *Heterorhabditis* encontram-se sempre as mesmas linhagens de *Photorhabdus*, enquanto em indivíduos de *Steinernema* é possível encontrar a mesma espécie de *Xenorhabdus*, em diferentes espécies do NEP (FORST e CLARKE, 2002).

2.3 Relação entre nematoides entomopatogênicos e hospedeiros

Tem-se sistema imune, como o meio de um organismo se defender de patógenos invasores. Este sistema é formado por inúmeras células e moléculas responsáveis por reconhecer o invasor e desencadear uma resposta efetiva. Essas células destroem ou inativam o patógeno, sendo fundamentais para garantir a defesa do organismo (OLIVEIRA e KANASHIRO, 2010). O sistema neuroendócrino envolve a síntese e liberação de hormônios, que podem ser descritos como substâncias químicas que atuam como sinalizadores celulares. Esses químicos exercem funções em células específicas distantes do seu local de síntese (GARCIA, CASTRO, *et al.*, 2012).

Entre os hormônios produzidos temos os Eicosanoides. São hormônios locais que possuem curto alcance, solúveis em água, e que exercem efeitos biológicos, e se degradam também com rapidez de maneira espontânea ou enzimática. São

essenciais para sinalização da resposta imune de insetos (SHRESTHA e KIM, 2008). Os Eicosanoides são desencadeadores cruciais da fagocitose, micro-agregação, reações de nodulação e migração de células (STANLEY, 2006). A formação deste hormônio, é desencadeada pela enzima fosfolipase A₂, esta mesma enzima atua sobre a conversão de alimentos, reprodução, resposta imune e metabolismo (STANLEY, 2006).

O sistema de defesa contra infecção dos insetos inclui barreiras físicas e químicas (glândulas salivais, tegumento e trato digestivo), resposta celular (mediada pelos hemócitos), além da resposta imune inata (imunidade humoral). Esse sistema abrange a ativação do sistema profenoloxidase, fagocitose, formação de microagregados, indução de fatores antimicrobianos, encapsulação pelos hemócitos e formação de moléculas reativas de oxigênio e nitrogênio. É ainda subdividido em resposta imune celular, relativa às defesas mediadas por hemócitos, e humoral relacionada ao plasma, atuando em conjunto tornando o sistema mais eficiente na minimização, ou contenção do patógeno invasor (GARCIA, CASTRO, *et al.*, 2009; URSIC-BEDOYA, BUCHHOP e LOWENBERGER, 2009).

Os organismos invasores devem superar primeiramente as barreiras de defesa física, sendo elas: a cutícula superficial, o envólucro quitinoso da traqueia, o cibário e a membrana peritrófica no intestino médio (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007; SILVA, 2014). A armadura cibarial (encontrada em alguns insetos) forma uma barreira contra infecções, sendo uma característica importante em espécies de insetos vetores (SHELLEY, MAIA-HERZOG, *et al.*, 1997; SILVA, 2014).

O sistema imune inato, é ativado no momento em que essas barreiras de defesa são desfeitas por patógenos (SILVA, 2014). Esse sistema é formado por dois tipos de resposta imune, a humoral (conjunto de líquidos presentes no inseto) e a celular (relacionada às células de defesa). A resposta humoral é ativada pelas moléculas dos insetos capazes de detectar o invasor, que acionam os receptores da membrana celular do corpo gorduroso (SILVA, 2014), resultando em uma sinalização em cadeia, que reconhece os patógenos por diferentes vias imunológicas, como a via Toll, Imd, Jak/Stat, JNK e a via da insulina (SILVA, 2014; RIOS DIEZ, 2018). Além das proteínas da imunidade humoral (Toll, Imd e Jak/Stat), encontramos ainda nesse sistema, diversas proteases e inibidores de proteases que reconhecem e eliminam os

patógenos (HILLYER, 2016). Já a imunidade celular é composta por células que participam de técnicas de defesa relacionadas a capacidade de fagocitar, encapsular e melanizar os agentes patogênicos invasores (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007; SILVA, 2014).

A resposta imune é concentrada nas vias Toll e Imd, das quais as cascatas resultam no estímulo da expressão de genes relacionados com a imunidade (RIOS DIEZ, 2018). A via toll é ativada durante infecções por agentes bacterianos de Gram-positivo e fungos, em contrapartida, a via da imunodeficiência (Imd) está relacionada a resposta imune às bactérias Gram-negativas, alguns protozoários e vírus (PALMER e JIGGINS, 2015).

A via Jak/Stat, está ligada a imunidade e ao desenvolvimento do inseto. É ativada no momento em que as citocinas extracelulares se unem com receptores celulares, provocando uma cascata que termina na transcrição de genes antimicrobianos e nas sínteses de óxido nítrico (HILLYER, 2016).

Uma importante via da imunidade celular e da ativação do sistema em resposta ao estresse é a via JNK. Essa via indica à célula, o momento da infecção ou que existem mudanças antagônicas no ambiente (SILVERMAN, ZHOU, *et al.*, 2003).

Os hemócitos que circulam livremente na hemolinfa ou são encontrados aderidos aos tecidos, são células do sistema imune (SILVA, 2014). Essas células têm variância de 1.000 a 100.000 por mm^3 de hemolinfa, variando de acordo com o estágio de vida do inseto. Estudos sobre o sistema imune mostram que a primeira população dos hemócitos são formados na fase embrionária do mesoderma procefálica e em segundo momento no gânglio linfático (órgão hematopoiético) durante o estágio larval (TRIPLEHORN e JONNISON, 2010; SILVA, 2014).

A fagocitose é um mecanismo de defesa contra patógenos bacterianos, fúngicos, virais e protozoários. Nessa etapa o sistema reconhece, engloba e destrói os invasores no interior das células. Os plasmócitos e granulócitos são os principais hemócitos que envolvem os mecanismos de defesa (DUNN, 1986; RATCLIFFE e ROWLEY, 1979).

Quando a fagocitose não é suficiente para envolver o agente patogênico, o sistema imune dá início a encapsulação, nessa fase ocorre a diferenciação de

prohemócitos em lamelócitos, através da sinalização dos lamelócitos para os gânglios linfáticos no momento da detecção do invasor na hemolinfa (SILVA, 2014). Os lamelócitos então formam o revestimento em forma de capsula ao redor do patógeno, provocando a resposta imune celular de melanização acarretando em eliminação do patógeno (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007; SILVA, 2014).

O processo de nodulação é similar à encapsulação, sendo acionada no momento de grande invasão na hemolinfa, com um número grande de invasores, dificultando a eliminação pela fagocitose (SILVA, 2014). Os hemócitos participam ainda da coagulação da hemolinfa e na retenção e dispersão de substâncias nutritivas (RATCLIFFE e ROWLEY, 1979; GULLAN e CRASNSTON, 2007).

A quitina do intestino (anterior e posterior) proporciona a defesa mecânica contra organismos que podem ser consumidos acidentalmente. Contudo, o intestino médio é isento de quitina, sendo, a parte vulnerável do canal alimentar. É nessa região que os microrganismos patogênicos penetram na hemocele (WATERFIELD, HARES, *et al.*, 2005).

Inicialmente, os NEPs precisam romper a barreira mecânica do inseto para dar início a sua colonização. Apenas os nematoides do gênero *Heterorhabditis* podem penetrar a cutícula devido à estrutura em forma de dente único e cônico presente na parte anterior do verme forçando a entrada na hemocele. Quando a cutícula é rompida e o nematoide libera as bactérias, as mesmas começam seu processo de alimentação causando a septicemia do inseto. Após a entrada, os organismos invasores podem sofrer a ação de defesa celular pelos hemócitos e mecanismos bioquímicos fisiológicos do hospedeiro que atuam contra a invasão de patógenos (DOLINSKI, 2006).

Com a entrada do nematoide pelo tegumento (no caso de *Heterorhabditis*) ocorrem processos de coagulação e cicatrização evitando o extravasamento da hemolinfa. Inicialmente estão envolvidos nessa etapa os coagulócitos e/ou granulócitos, seguida dos plasmócitos, que participam na constituição de uma nova cutícula. Tal ocorrência não gera danos ao nematoide, e ainda pode facilitar seu estabelecimento no inseto (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012).

Após a entrada dos juvenis (J3) na hemolinfa, o sistema imunológico do hospedeiro precisa enfrentar inicialmente o nematoide, até a liberação das suas bactérias simbiotes. Em casos, a liberação ocorre até a sexta hora após a infecção para as espécies de *Steinernema* e prazo de 30 minutos para infecções com *Heterorhabditis* (LI, COWLES, *et al.*, 2009).

Na hemocele, os hemócitos presentes na hemolinfa se reúnem ao redor do NEP, criando uma cápsula denominada plasmatócito formada por camadas concêntricas de hemócitos, sendo favorecida por uma liberação de Fenol-Oxidase (PO) denominada fagocitose (JOYCE, BRACHMANN, *et al.*, 2008).

É neste momento em que o nematoide libera as bactérias e estas devem inibir as reações de defesa do sistema imune, impedindo que se forme a capsula e a ativação da PO, através da produção de toxinas, antinóticos, e metabolitos secundários, provocando a morte dos granulócitos por intervenção dos lipopolissacarídeos ou recorrendo a fontes citotóxicas (OROZCO, 2014). As bactérias simbiotes logo dão início ao processo de multiplicação nos hemócitos provocando sua ruptura, retornando a hemocele e gerando a septicemia do hospedeiro (BODE, 2009; ELEFThERIANOS, WATERFIELD, *et al.*, 2009).

No caso da simbiose *Heterorhabditis-Photorhabdus* a presença de toxinas Tc e Mcf, induzem a apoptose das células do sistema imune, controlando a resposta imunológica do inseto. Apresentam ainda a proteína efetora LopT que impede os processos fagocíticos do inseto hospedeiro (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012). Os simbiotes *Photorhabdus* spp. geram substâncias que impedem a ação da enzima fosfolipase A2 do inseto, relacionada a biossíntese de eicosanoides (KIM, JI, *et al.*, 2005; WATERFIELD, HARES, *et al.*, 2005).

A etapa seguinte ocorre durante a encapsulação, em que um grupo de células se aglomeram envolvendo e eliminando grandes estruturas como os nematoides. No início do processo, granulócitos e coagulócitos cobrem o corpo estranho e a capsula formada aumenta sua espessura se tornando escura (processo de melanização) depois os plasmócitos se depositam sobre a estrutura, inviabilizando ou anulando o invasor (HILLYER, 2016).

Os NEPs resistem ao encapsulamento e melanização por meio de três mecanismos: evasão, tolerância e supressão (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012).

A evasão corresponde a não identificação do NEP pela defesa do inseto. Já a tolerância se refere ao escape do encapsulamento através da infecção com elevado número de indivíduos, sobrecarregando o sistema imunológico, permitindo o escape. Enquanto a supressão, diz respeito às proteínas SCP (Surface Coat Proteins) presentes na cutícula dos nematoides, permitindo a deterioração da resposta imunológica do inseto (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012). Entretanto, a capacidade protetiva destas proteínas contra melanização e encapsulamento depende da susceptibilidade do hospedeiro ao nematoide e seu simbiote (GARCIA, CASTRO, *et al.*, 2012).

A hemolinfa possui a enzima PO no processo de encapsulação de patógenos invasores. Para haver uma menor proliferação dos mesmos, proteínas e polifenóis se unem na superfície dos patógenos presentes na hemolinfa. A imunidade ainda pode ser induzida através da introdução do patógeno na hemocela, ocorrendo a suscetibilidade do inseto ao patógeno, ou a tolerância do mesmo, porém essa tolerância não é repassada a sua descendência (HILLYER, 2016).

Uma vez liberada as bactérias simbiotes, o sistema imune do inseto passa a combater um tipo diferente de organismo, com táticas diferentes de escape. Os simbiotes bacterianos dispõem de duas estratégias para escapar da resposta imunológica: 1º evitar ou impedir a sua detecção, ou 2º suprimir diretamente a ativação do sistema imune (VALLET-GELY, LEMAITRE e BOCCARD, 2008). As bactérias simbiotes são capazes de escapar da ação de peptídeos antimicrobiano e da ação de fagócitos encontrados no hemocela dos insetos. As bactérias impedem a atividade dos fagócitos, impedindo ou dificultando a produção de metabólitos de ação bacteriostática, além de produzirem toxinas capazes de destruir os hemócitos ativamente (ELEFTherianos, WATERFIELD, *et al.*, 2009; DABORN, WATERFIELD, *et al.*, 2002).

A bactéria simbiote de *Heterorhabditis* multiplicam-se inicialmente no intestino médio e na hemolinfa das larvas, e tardiamente, no corpo gorduroso e outros tecidos (DABORN, WATERFIELD, *et al.*, 2001). No intestino, as células bacterianas ocupam a região entre a matriz extracelular e a lâmina basal do epitélio. Nessa cavidade, as bactérias produzem a toxina TcA (Toxin Complex A) ativada no próprio intestino e uma

metaloprotease denominada PrtA (DABORN, WATERFIELD, *et al.*, 2001; FFRENCH-CONSTANT, WATERFIELD, *et al.*, 2003).

Xenorhabdus secreta um peptídeo citotóxico denominado xenorhabdolisina (C1-Xax), que induz a lise celular nos insetos (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012). O complexo de toxinas secretadas por essa bactéria no momento de infecção inclui, ainda, a proteína Xpt, que possui atividade inseticida (SERGEANT, BAXTER, *et al.*, 2006). Estas proteínas causam a morte dos insetos quando liberadas (HERBERT e GOODRICH-BLAIR, 2007).

Ao extrair os lipopolissacarídeos (LPS) de membrana de espécies de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* DOWDS e PETERS (2002), observaram que essa substância inibe a ativação de importantes vias imunológicas dos insetos, como a cascata de profenoloxidase, que quando ativadas promovem a morte dos NEPs. Estas bactérias ainda produzem substâncias de amplo espectro de atividade biológica, sendo: antibióticos, bacteriocinas, proteases, antifúngicos, lipases e lipopolissacarídeos (BODE, 2009). A presença de tais substâncias impede a infecção do inseto morto por outras bactérias encontradas no ambiente (ALMENARA, ROSSI e WINTER, 2012).

2.4 Uso de NEPs em programas de controle biológico

Segundo Ferreira (2010) uma das vantagens dos NEPs é a biossegurança quanto à sua aplicação, pois não causam toxicidade a humanos ou plantas. Possuem também um amplo número de espécies adaptadas a diversos ambientes, favorecendo a utilização desses nematoides no controle de pragas, suportando ainda a mistura em tanque com fitossanitários, como o uso de simazina + ametrina, acetoclor e oxifluorfem com *S. carpocapse*, deltametrina e endosulfam junto de *S. feltiae*, oxifluorfem junto do nematoide *H. bacteriophora* (NEGRISOLI Jr. *et al.*, 2008), midacloprido com *H. bacteriophora* e *S. glaseri* (KOPPENHÖFER *et al.*, 2000), tiametoxam combinado com *H. bacteriophora* e *S. glaseri* (KOPPENHÖFER *et al.*, 2002), os fungicidas picoxistrobina e ciproconazole, estrobilurinas e triazolinthione em conjunto de *H. bacteriophora* (SOUZA, VENÂNCIO *et al.*, 2019) além de outros.

Até o momento no Brasil, a espécie *H. bacteriophora* é registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sob registro nº 35519, cedido a

empresa Bio Controle — Métodos de Controle de Pragas Ltda. em maio de 2019, o produto em questão é apresentado em forma de pó molhável (WP), com concentração mínima de $8,7 \times 10^5$ juvenis infectantes/g de produto (AGROFIT, 2019).

Existem diversos trabalhos que comprovam a eficiência dos NEPs como agentes de biocontrole de insetos. Esse controle pode ser feito também, junto de outros produtos fitossanitários de origem orgânica ou sintética. Em teste SABINO, ABREU, *et al.*, (2018) verificaram que a ação conjunta do nematoide *Heterorhabditis* sp. AL43 com o óleo de neem nas concentrações 4% e 500 Jis/ mL, se mostrou eficiente, apresentando a maior taxa de mortalidade (70%) e um menor tempo letal (TL), sendo promissora a utilização desse óleo com o NEPs em mistura no controle de broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae).

Alves, Alves, *et al.* (2009) concluíram em seu comunicado científico que a espécie *S. carpocapsae* se apresenta nociva a adultos da broca-da-erva-mate (*Hedypathes betulinusi*). Cardoso, De Paulo *et al.* (2019) observaram que *H. bacteriophora* apresenta potencial para o controle das cochonilhas da raiz do cafeeiro *Dysmicoccus texensis*. Simi (2014) em teste contra *Conotrachelus humeropictus* (praga do cacaueiro e cupuaçuzeiro), utilizaram a espécie *S. brasiliense* e obtiveram mortalidade de 60,0% dos insetos, e quando combinaram o NEPs com *Beauveria bassiana* atingiram 65,6% de mortalidade, mostrando que a interação destes agentes é positiva e seu uso em conjunto é viável.

Em trabalho realizado por Rocha (2017), a espécie *H. amazonensis* foi considerado promissora em testes de campo, e alcançou resultados satisfatórios de controle de *Stenoma catenifer* (broca do abacate) quando pulverizado em suspensão e também através de armadilhas com uso de inseto cadáver (insetos mortos infectados por NEPs).

Em teste de virulência de *S. carpocapsae* para o controle de *Duponchelia fovealis* o nematoide entomopatogênico se mostrou eficiente para controlar lagartas e pré-pupas da mariposa do morangueiro, as temperaturas mais elevadas (27 °C e 30 °C) favoreceram a infecção de *S. carpocapsae* em mariposas da lagarta da coroa, com concentração letal a 50% dos indivíduos ao utilizar 71 JIs e 75 JIs por inseto na fase larval e de pré-pupa, respectivamente (PIROVANI, 2016). Garcia, Raetano e

Leite (2008) verificaram 75% de mortes na fase larval de *S. frugiperda* ao aplicar 400 juvenis infectantes de *H. indica*.

Silva-Matos, Souza e Costa, (2019) avaliaram os efeitos da aplicação de *Cotesia flavipes* e *H. bacteriophora* no controle da broca-da-cana (*Diatrea saccharalis*), onde observaram que os nematoides da espécie se mostraram eficientes no controle da broca em todos os tratamentos, mas penetraram nas lagartas do parasitoide, que estavam no hospedeiro quando aplicados em conjunto e em menos de 9 dias de carência, impedindo seu desenvolvimento. Mostrando uma competição intraguildd dos dois agentes biológicos. Assim o NEP se comportou como um hiperparasitoide facultativo. Concluíram que para o uso de NEPs e *C. flavipes* é necessário um período de carência de 9 a 12 dias de intervalo entre a liberação das vespas e posterior dos NEPs.

Em relação ao complexo moscas-das-frutas, em principal *Anastrepha* spp. e *Ceratitis* spp., são suscetíveis a *S. carpocapsae*, *S. rarum*, *S. feltiae*, *S. brasiliense*, *H. bacteriophora* e *H. amazonensis* (BRIDA, WILCKEN, et al., 2018). No setor agropecuário o uso dos NEPs vem sendo aplicado para controlar o carrapato *Rhipicephalus microplus*, em bovinos utilizando *H. baujardi* apresentando 33% de controle (CARVALHO, 2008), além do controle de cupins, importantes pragas das pastagens (AMARASINGHE, 2008). Na área da saúde pública, descobriu-se também a eficiência de *H. indica* contra lagartas de *Aedes aegypti* (CARDOSO, 2014).

Além dos testes em inseto-pragas, os NEPs também vem sendo estudados como possíveis controladores de populações de nematoides parasitas de plantas. Em 1986, foi feito um experimento aplicando a espécie *S. glaseri* em populações de *Meloidogyne javanica* em tomateiros mantidos em estufas utilizando diferentes concentrações de NEPs, verificando uma significativa supressão de fitonematoides (BIRD e BIRD, 1986).

Este experimento serviu de base para DAMASCENA (2019) que testou diferentes espécies de NEPs para controle de *M. enterolobii* tendo como resultado a diminuição significativa na formação de galhas, descendentes, população e de reprodução dos nematoides parasitas de plantas, quando utilizou *S. feltiae* na concentração de 100 Juvenis Infectantes contra o fitonematoide.

Com o uso de NEPs para o controle dos insetos em culturas de interesse agrícola, o número de pesquisas com tais agentes é crescente, sendo inúmeros os trabalhos publicados e que estão sendo desenvolvidos para a verificação da aptidão de tais agentes para atuação no biocontrole de pragas. Entretanto, para suprir a necessidade de mercado e comercialização das espécies de NEPs, é necessário a multiplicação das espécies em laboratório para realização de pesquisas.

Algumas empresas internacionais são especialistas em produzir nematoides entomopatogênicos em massa, além de suas formulações, pois seu uso no exterior já é feito a alguns anos (GAUGLER, 2002), apesar de ser novidade aos produtores brasileiros. A redução do emprego de produtos fitossanitários químicos sintéticos é um importante argumento em prol do uso de NEPs no controle biológico. Entretanto, o gasto com a produção e falta de repasse de informações sobre esses agentes aos produtores e profissionais da área agrícola no Brasil, restringem o uso em culturas de alto valor comercial.

2.4.1 Criação de nematoides entomopatogênicos *in vivo*

A criação e manutenção de espécies de NEPs em laboratórios de pesquisa é essencial para obter dados completos sobre a biologia, ecologia, comportamento e outras características desses indivíduos. Os nematoides entomopatogênicos são produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Em laboratórios que mantêm as espécies de NEPs para desenvolvimento de pesquisas, grande maioria utilizam a infecção *in vivo*. Esse tipo de infecção de insetos é realizado com o oferecimento do hospedeiro saudável e vivo aos nematoides.

Essa técnica foi utilizada para as primeiras produções massais de *S. carpocapsae*, nos Estados Unidos (DUTKY, THOMPSON e CANTWELL, 1964). Porém seu uso em produções visando a comercialização seria de alto custo, não permitindo também grandes expansões, além de demandar quantidade de mão-de-obra considerável e espaço físico, pois além do espaço para a manutenção do nematoide, há necessidade de um espaço para a criação e manutenção também do inseto hospedeiro. Por ser uma técnica simples e com baixo investimento inicial, é muito utilizada na produção de NEPs com finalidade de pesquisa.

O uso da técnica *in vivo* para a criação de NEPs, apresenta baixo dispêndio de capital, tem fácil obtenção de qualidade, economia de escala, facilidade de adaptação a novas espécies de NEPs, porém a mão de obra exigida pela técnica é alta (SHAPIRO-ILAN, HAN e QIU, 2014).

Geralmente as etapas de inoculação de lagartas vivas com os NEPs seguem a ordem: coleta da suspensão contendo os JIs do nematoide, acumulo e purificação. A inoculação é feita aplicando a suspensão de nematoides (liquido contendo a espécie a ser inoculada) sobre um substrato condutor, normalmente papel filtro. Após dois a cinco dias, os insetos mortos são coletados e postos em armadilhas “White”, nessa armadilha os juvenis em fase infectante migram do cadáver para a água formando a suspensão de juvenis (WHITE, 1927).

Fatores como a virulência das gerações seguintes, a suscetibilidade dos hospedeiros, a tolerância e sobrevivência em ambiente externo são importantes para a criação desses nematoides em laboratórios. Para isso é importante também que os insetos oferecidos na técnica *in vivo* sejam saudáveis (referindo-se a suas características e a sua alimentação) e que apresentem o comportamento adequado da espécie (postura de ovos, dimorfismo sexual, fases de desenvolvimento, etc.).

Entre os hospedeiros oferecidos no Brasil, comumente encontram-se as espécies pertencentes a larva do besouro tenébrio *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) e da traça-da-cera *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) (COSTA, 2006) sendo a segunda a espécie padrão (internacional) para a criação e manutenção de NEPs em condições laboratoriais. Esse padrão é definido, pois, esta espécie de mariposa pode ser encontrada em diversos países e já é empregada em pesquisas na área de saúde, para desenvolvimento de estudos sobre patogenia e produção de fármacos. Assim, estudos com NEPs com intuito de divulgação internacional devem ser realizados usando indivíduos desta espécie. Tornando a criação dessa mariposa essencial em laboratórios de nematologia (MONTEIRO, MATOS, *et al.*, 2014; DEVI, 2018).

As lagartas da traça-da-cera apresentam rendimento de 50.000– 400.000 juvenis infectantes por lagarta em média, o que explica a sua preferência pelos laboratórios de entomopatógenos (GREWAL, DE NARDO e AGUILLERA, 2001;

ALMENARA, NEVES, *et al.*, 2010). Essa mariposa além de expressar alta vulnerabilidade a diversos nematoides entomopatogênicos proporcionando alto rendimento em JIs, devido a seu teor de lipídios serem mais altos em comparação a outras espécies de hospedeiros, possui também um tecido corporal (tegumento) maleável, facilitando a infecção e o maior tamanho das lagartas contribui para a reprodução e multiplicação. Esses fatores favorecem a infecção e proporcionam maior número de prole (GREWAL, DE NARDO e AGUILLERA, 2001; MONTEIRO, MATOS, *et al.*, 2014; DEVI, 2018).

Porém, sua criação em laboratórios é dificultada por diversos fatores, como alterações em temperatura, exposição a luz e alimentação, além dos contaminantes e aproveitadores que aparecem nas caixas de criação, a exemplo da contaminação pela mosca lambe-olhos — *Hippelates spp.*, Loew, 1863 (Diptera: Chloropidae), principalmente em dias quentes; os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* Micheli, 1729 (Eurotiales: Trichocomaceae) que contaminam a dieta artificial oferecida as lagartas; também a mariposa traça pequena da cera — *Achroia grisella* Fabricius, 1754 (Lepidoptera: Pyralidae), principalmente em casos de populações de *G. mellonella* coletadas em campo, havendo necessidade de purificação da criação; e em alguns casos também devido à coleta de mariposas a campo, alguns indivíduos podem estar parasitados por *Apanteles galleriae* Wilkinson, 1932 (Hymenoptera: Ichneumonidae: Braconidae), sendo o agente de controle natural de *G. mellonella*, ou ainda esses parasitoides podem ser levados até criação de forma direta (capturam os odores e identificam o local em que as lagartas se encontram).

A nutrição das lagartas é essencial para o bom desenvolvimento dos insetos, e um fator limitante indireto para produção dos nematoides entomopatogênicos, pois quanto maior for seu recurso nutricional, maior é a produção e desempenho dos NEPs (FLANDERS, MILLER e SHIELDS, 1996). Os lipídios proporcionam a qualidade ao meio líquido no qual os nematoides se encontram, em casos de quantidades de gorduras insuficientes, ocorre a baixa produção de juvenis infectantes de NEPs, além de prejudicar resistência e desempenho dos juvenis na infecção dos hospedeiros (HATAB, GAUGLER e EHLERS, 1998).

No geral, o inseto hospedeiro apresenta o maior custo da produção *in vivo* de nematoides entomopatogênicos, sendo a nutrição dos insetos o fator oneroso. Logo,

há necessidade de se encontrar uma dieta artificial altamente produtiva, que ofereça nutrientes necessários para o bom desenvolvimento e saúde dos hospedeiros e com baixo custo, capaz de maximizar a produção.

2.5 A traça da cera: *Galleria mellonella*

A espécie *G. mellonella* pertence à ordem Lepidoptera, situada no grupo das traças, da família Pyralidae (SCORZONI, 2013). São insetos ovíparos e holometábolos, que tem seu desenvolvimento embrionário externo ao corpo do progenitor em ovos e sofrem total metamorfose durante seu desenvolvimento (CARDOSO, PRATA, *et al.*, 2007).

G. mellonella tem uma ampla distribuição geográfica e vive naturalmente em colmeias, causando sérios problemas para a indústria apícola. Este inseto tem quatro fases de desenvolvimento: ovo, lagarta, pré-pupa/pupa e inseto adulto (ELLIS, GRAHAM e MORTENSEN, 2013; MOHAMED, ANSARI, *et al.*, 2014).

Os ovos são de coloração branca a rosa-claro, oblongos medindo 1,2 mm a 0,83 mm e levam entre 5 a 8 dias para eclodirem a 24 °C — 27 °C, e de 2 a 4 dias a 30 °C para se desenvolverem e se tornarem lagartas. A fase larval conta com 7 instares, as lagartas são branco-creme com 1 a 23 mm. Esse estágio leva de 4 a 7 semanas em temperatura de 28 °C — 32 °C. Em temperaturas inferiores a 28 °C ou com a falta de alimento, ocorre um período de repouso na fase larval, com indivíduos que podem alcançar até seis meses nessa fase, visto que a velocidade do desenvolvimento são proporcionais a temperatura e a alimentação (GUERRA, 1973; CHARRIERE e IMDORF, 1999; ELLIS, GRAHAM e MORTENSEN, 2013).

No final da fase larval (após o sétimo instar) a lagarta deixa de se alimentar. Quando ainda apresenta alguma mobilidade (durante a formação do casulo) caracteriza o estágio intermediário da pré-pupa, após a lagarta tecer seu casulo de seda muito resistente, a fase pupal (pupa) tem início. Nessa fase as pupas apresentam coloração castanha-avermelhada, medindo de 8 a 12 mm de comprimento e 2 a 4 mm de largura (BRIGHENTI, BRIGHENTI e CARVALHO, 2006). Nesse estágio, o inseto permanecerá de 1 a 8 semanas sem se alimentar (CHARRIERE e IMDORF, 1999; POWNING e DAVIDSON, 1973).

A estatura e coloração das mariposas varia dependendo da composição e quantidade de alimentos, comumente a coloração das mariposas pode ser marrom avermelhada e creme palha (ELLIS, GRAHAM e MORTENSEN, 2013; KWADHA, ONG'AMO, *et al.*, 2017). Os machos da espécie possuem média de 2 cm de envergadura, já as fêmeas são maiores que os machos, com aproximadamente 3,2 cm (BRIGHENTI, BRIGHENTI e CARVALHO, 2006).

Os machos da espécie geralmente são menores e de coloração mais clara que as fêmeas e apresentam palpos labiais arredondados. As fêmeas por sua vez, são maiores que os machos, de coloração escura, e possuem os palpos labiais pontiagudos, devido à probóscide bifurcada dando aparência de bico, por serem projetados para a frente. As mariposas machos podem fertilizar várias fêmeas (KWADHA, ONG'AMO, *et al.*, 2017).

Os adultos de *G. mellonella* sobrevivem aproximadamente uma semana. A mariposa fêmea apresenta ovipositor longo que as possibilita ovipositar em frestas e aberturas nas colmeias (BRIGHENTI, BRIGHENTI e CARVALHO, 2006). As fêmeas podem colocar entre 200-1000 ovos, em aglomerados de 50 a 150 ovos por camada. Os adultos caminham rapidamente, realizam pequenos voos e não se alimentam, por possuírem peças bucais atrofiadas (BRIGHENTI, BRIGHENTI e CARVALHO, 2006; KWADHA, ONG'AMO, *et al.*, 2017). São ativas no período noturno e vivem em média 1 a 3 semanas nessa fase (DADANT e HIJOS, 1975).

Para criações dessa espécie em laboratório, alguns cuidados são importantes e devem ser tomados, como o uso de recipientes escuros ou protegidos da luz, embora as pupas e as mariposas não se alimentem, é importante acrescentar comida no receptáculo, para evitar a fome de lagartas muito pequenas que podem aparecer antes da remoção dos ovos; extremo cuidado é necessário ao transferir os ovos pois são sensíveis podendo estourar se pressionados (PARRA, 2001).

O tamanho das lagartas de *G. mellonella* é considerado como vantajoso, pois facilita as técnicas de infecção, como inoculação do patógeno por via tópica, oral ou injetável, além disso, a espécie *G. mellonella* possui o sistema inato (SALAMITOU, RAMISSE, *et al.*, 2000).

Com o aumento do uso de lagartas de *G. mellonella* em estudos de infecção experimental, tanto na área agrícola para controle biológico de pragas (LEITE, 2015), quanto na área da saúde, por serem multifuncionais para identificar e caracterizar fatores de virulência microbianos relacionados a infecções em mamíferos (HOFFMANN, 2007), a construção de protocolos de dietas artificiais para a espécie tem sido realizada em diversos países, buscando a padronização das criações, considerando que a dieta oferecida pode influenciar diretamente no ciclo de vida e sistema imunológico da espécie. Assim, as definições de protocolos de alimentação reduzem as interferências nos resultados, possibilitando comparações (JORJÃO, OLIVEIRA, *et al.*, 2018).

Na fase larval, quando em colmeias, as lagartas se alimentam de pólen, cera, mel e peles de pupa de abelha. Com base em sua alimentação natural, o oferecimento de uma dieta artificial pobre pode causar problemas de desenvolvimento e, às vezes, a morte das lagartas (MOHAMED, ANSARI, *et al.*, 2014; COSKUN, KAYIS, *et al.*, 2006). Assim, as dietas oferecidas devem suprir as características naturais e serem livres de contaminantes, oferecendo propriedades físicas e químicas estimulantes de desenvolvimento, elementos essenciais e não essenciais nas proporções adequadas e possibilitar que o inseto complete seu desenvolvimento sem prejuízos (PARRA, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do setor de Entomologia e Nematologia da Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva — FAIT, em Itapeva, São Paulo, Brasil, sob as coordenadas geográficas 23° 57' 44.9"S 48° 53' 07.0"W.

A pesquisa foi realizada em duas etapas. A primeira etapa, constitui da avaliação da resposta de *G. mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) a dieta artificial adaptada, em que se avaliou parâmetros biométricos, demográficos, de vida e fertilidade e de desenvolvimento das mariposas *G. mellonella* quando exposta à dieta artificial citada e a outras duas dietas já utilizadas em laboratórios de nematologia. O principal propósito desta dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) nesta etapa é manter os espécimes, aumentar a duração da fase larval, aumentar o número de fêmeas e o número de ovos por fêmeas em condições de laboratório.

Para a segunda etapa, as lagartas provenientes das três dietas foram oferecidas como hospedeiras a cinco espécies de nematoides entomopatogênicos (NEPs). As espécies de NEPs selecionadas para o experimento foram: *H. bacteriophora*, *H. amazonensis*, *S. puertoricense*, *S. rarum* e *S. feltiae*, para a avaliação da relação entre as lagartas alimentadas pela nova dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) e os NEPs. O propósito desta etapa foi verificar se a alimentação das lagartas com a dieta adaptada, pode comprometer, contribuir ou ser insignificante na infecção, virulência e multiplicação dos NEPs em laboratório. Os tratamentos foram estabelecidos de acordo com a dieta a qual as lagartas foram alimentadas e as espécies de NEPs referidas. O delineamento experimental em ambas as etapas foi inteiramente casualizado – DIC em que os tratamentos estão apresentados na tabela 1 para a primeira etapa e na tabela 2 para a segunda etapa:

Tabela 1 - Delineamento experimental etapa I

Tratamentos etapa I				
Tratamentos	Dieta	N° de ovos/rep.	Repetição	Gerações
Tratamento 1	Favos secos com solução de mel a 75%	500	8	8
Tratamento 2	Dieta adaptada			
Tratamento 3	Modificada de Guerra (1973)			

Tabela 2 - Delineamento experimental etapa II

Tratamentos etapa II			
Tratamentos	Combinação	N° de lagartas/rep.	Repetição
Tratamento 1	G. mel. D1 + H.b	50	10
Tratamento 2	G. mel. D1 + H.a.		
Tratamento 3	G. mel. D1 + S.p.		
Tratamento 4	G. mel. D1 + S.r.		
Tratamento 5	G. mel. D1 + S.f.		
Tratamento 6	G. mel. D2 + H.b.		
Tratamento 7	G. mel. D2 + H.a.		
Tratamento 8	G. mel. D2 + S.p.		
Tratamento 9	G. mel. D2 + S.r.		
Tratamento 10	G. mel. D2 + S.f.		
Tratamento 11	G. mel. D3 + H.b.		
Tratamento 12	G. mel. D3 + H.a.		
Tratamento 13	G. mel. D3 + S.p.		
Tratamento 14	G. mel. D3 + S.r.		
Tratamento 15	G. mel. D3 + S.f.		

Heterorhabditis bacteriophora (H.b.)
Heterorhabditis amazonenses (H. a.)
Steinernema puertoricense (S.p.)
Steinernema rarum (S.r.)

Steinernema feltiae (S.f.)

3.1 Etapa I – Avaliação da resposta de *G. mellonella* a nova dieta artificial adaptada

3.1.1 Preparação dos espécimes de *Galleria mellonella*

Os exemplares de *G. mellonella* foram selecionados ainda em fase embrionária, obtidos de criações provenientes das instituições FCA/UNESP de Botucatu-SP, IBC — Instituto Biológico de Campinas em Campinas-SP e da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa-PR.

Os ovos recebidos foram separados cuidadosamente das superfícies de papel em que se encontravam, com uso de pincel nº2 e postos sob papel filtro em vidro relógio (fig.1) para a realização da contagem, com auxílio de microscópio estereoscópico e contador. Os mesmos foram separados em tubos de ensaio contendo 500 ovos para cada repetição dos tratamentos, ao todo foram necessários 4.000 ovos por tratamento, totalizando 12.000 ovos por geração.

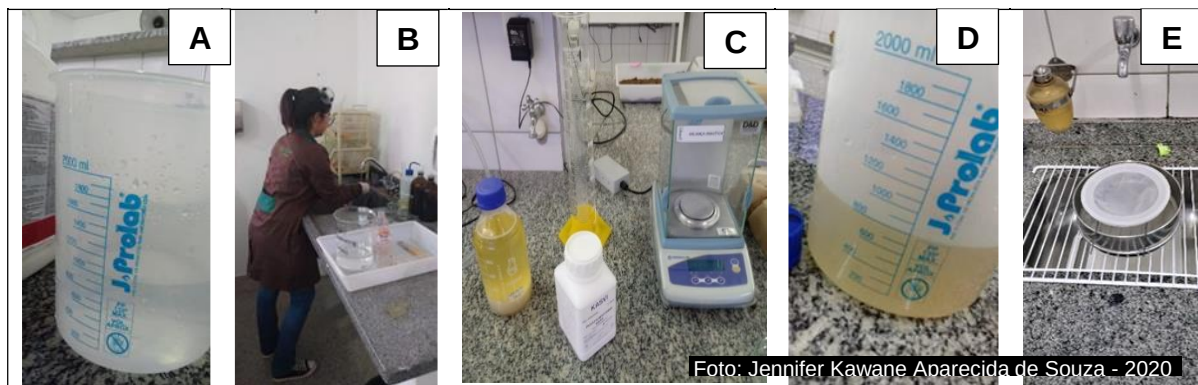
Figura 1 - Ovos de *G. mellonella* em visualização sob microscópio estereoscópico (10x)



Foto: Jennifer Kawane Aparecida de Souza - 2020

Após a contagem e separação, os ovos foram dissociados por solução de Tween 20 a 0,05% e esterilizados em frascos contendo solução de glutaraldeído a 2%. Após contato de 10 minutos, alíquotas contendo os ovos em suspensão (cerca de 20 ml) foram filtradas em papel filtro estéril e para neutralizar o agente químico foram lavadas com caldo TSB (Caldo Soja Trypticaseína) (fig.2). Esta etapa teve como objetivo esterilizar os ovos, evitando possíveis contaminações nas dietas, diminuindo assim, fontes de influência negativa sobre os testes.

Figura 2 - Dissociação e esterilização dos ovos de *G. mellonella*



A: Preparo da solução dissociante; **B:** Lavagem após solução dissociante; **C-D:** preparo do caldo TSB; **E:** Lavagem dos ovos com caldo TSB

Após a lavagem com caldo TSB, os ovos foram transferidos para superfície de placas de Petri estéreis e descartáveis individualizadas para cada repetição, e postos em câmara climatizada regulada a 25 °C (± 2) durante o dia e 23 °C (± 2) durante a noite, com umidade relativa de 60% $\pm$ 10% até o momento da montagem dos tratamentos, com fotofase de 12 horas, iniciada as 6 horas da manhã. Os ovos permaneceram na câmara até o dia seguinte.

Os potes para a criação da espécie, foram lavados com detergente neutro para vidrarias laboratoriais e esponja, após enxágue foram postos em banho imersivo de água regia (ácido clorídrico e nítrico em proporção de 3:1), onde permaneceram por 20 minutos. Após retirada do banho, foram enxaguados com água destilada por 6 vezes, com posterior autoclavagem por 15 minutos e secagem em estufa de ar forçado a 60 °C (± 5) por 12 horas, seguindo o protocolo de lavagens de vidrarias do laboratório. Os potes foram retirados da estufa e deixados para esfriar (com tampa), enquanto se preparou as dietas.

3.1.2 Preparo das Dietas artificiais

As dietas artificiais que constituíram os tratamentos (tab.3), foram definidas de acordo com as dietas já utilizadas em laboratórios para criação de *G. mellonella* no Brasil. Para o tratamento 1 (favos secos umedecido com solução de mel) utilizou favos de mel secos obtidos de apicultores da região, higienizados com solução de hipoclorito de sódio a 1%, secos em estufa de ar forçado a 30 °C (± 2) por 2 horas embrulhados em papel pardo (fig.3).

Figura 3 - Secagem de favos secos de mel após esterilização em hipoclorito de sódio



Após esse período, os favos foram divididos em porções de igual peso (37,5 g) para cada repetição e umedecidos com solução de mel a 75%, em que se utilizou 280 mL da solução para cada porção de favos. Os favos permaneceram em bandeja durante 20 minutos para melhor absorção. Após o período de absorção da solução com mel, os favos umedecidos foram postos nos potes e sobre a dieta em questão, foram depositados os ovos de *G. mellonella* sobre base de papel filtro esterilizado (evitando o contato direto entre os ovos e a dieta). Após a montagem os potes foram levados a incubadora B.O.D. sob temperatura controlada de 25 °C (± 5) e UR% de 60% ± 10 , a qual se manteve até o último dia do experimento.

O tratamento 2 é formado por uma adaptação entre os ingredientes usados na dieta artificial elaborada por Jorjão et al. (2018), baseada na dieta sugerida por de Guerra (1973) e também nas modificações feitas por Parra (1998). Essas são dietas comuns para a criação de *G. mellonella*. Os ingredientes para este tratamento foram selecionados de acordo com seus expressivos resultados sobre a palatabilidade, fornecimento de proteínas, calorias e de carboidratos, fácil preparo e facilidade na aquisição, de acordo com as três dietas bases consultadas, sendo escolhidos para a formulação dessa dieta o leite em pó integral, mel, farinha de aveia, gérmen de trigo

e proteína de soja nas proporções apresentadas na tabela 3. A dieta é preparada em bandeja com a mistura dos ingredientes secos até homogeneização e então é acrescido o mel, formando uma farofa úmida.

Após o preparo, foram pesadas porções de 400 g para cada repetição deste tratamento, sendo depositadas sob uma lâmina de cera de abelha pura alveolada recortada do tamanho do fundo do recipiente destinado à criação. Os ovos foram então depositados nos potes com uma base de papel filtro esterilizado, evitando o contato direto entre os ovos e a dieta. Após a montagem os recipientes foram levados a incubadora B.O.D. sob temperatura controlada de 25 °C (± 5) e UR% de 60% ± 10 , a qual se manteve até a última avaliação do teste.

Para o tratamento 3 (padrão) utilizou-se da modificada de Guerra (1973) como apresentado na tabela 3. Para o preparo desta dieta, é necessário derreter a cera em água destilada (aproximadamente 100 mL) e acrescentar os ingredientes secos e por último o mel e glicerina. A dieta forma uma pasta úmida que foi resfriada até a temperatura ambiente antes de ser posta nos recipientes usados para o tratamento. Após período de 35 minutos, a dieta se encontrava fria. Foi então pesada e separada em porções de 400 g, em sequência foi depositada nos potes esterilizados e sobre ela os recortes de papel filtro com os ovos de *G. mellonella*. Depois da montagem dos recipientes, os mesmos foram levados a incubadora B.O.D. sob temperatura controlada de 25 °C (± 5) e UR% de 60% ± 10 , a qual se manteve até a última avaliação do teste.

Tabela 3 - Dietas artificiais oferecidas aos indivíduos de *G. mellonella*

Tratamento 1						Tratamento 2 (Adaptada de Jorjão et al. (2018, baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998))						Tratamento 3 (modificada de Guerra, 1973)					
Ingredientes			100 g			Ingredientes			100 g			Ingredientes			100 g		
	Quant. /repet. (g)	Quant. /Trat. (g)	% Kcal	(g) Cab.	(g) Prot.		Quant. /Repet. (g)	Quant /Trat. (g)	% Kcal	(g) Cab.	(g) Prot.		Quant. /Repet. (g)	Quant. /Trat. (g)	% Kcal	(g) Cab.	(g) Prot.
Favo de mel seco	37,5	300	16	23	0	*	*	*	*	*	*	Cera de abelha	23,5	188	90	23	0
Água destilada	280	2240				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Mel	1680		304	82	0,3	Mel	200	1600	304	82	0,3	Mel	118	944	304	82	0,3
*	*	*	*	*	*	Leite em pó integral	84	672	488	50	30	Leite em pó desnatado	24,1	192,8	360	50	35
*	*	*	*	*	*	Farinha de aveia	50	400	342	54	15	Farinha de soja	40,1	320,8	430	38,4	36
*	*	*	*	*	*	Proteína de soja	34	272	300	20	52	Levedo de cerveja	47	376	48	5,3	6,4
*	*	*	*	*	*	Gérmen de trigo	50	400	380	60	23,33	Fubá	96,3	770,4	353	78,9	7,2
*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Glicerina	104	832	16	1,0	0
*	*	*	*	*	*	peso final (g)		3344				peso final (g)		3624			

(GUERRA, 1973; PARRA, 1998; JORJÃO et al., 2018).

3.1.3 Coleta de dados após eclosão das lagartas

As avaliações desta etapa foram feitas em intervalos de 15 dias, com início após a incubação das criações. Acontecendo aos 15° dia, 30° dia, 45° dia e 60° dia para cada geração. Ao décimo quinto dia após deposição dos ovos, o papel filtro que continha os embriões, foi retirado dos potes com auxílio de pinça estéril e os recortes foram visualizados em microscópio estereoscópico, a fim de verificar se haviam ainda ovos sem eclodir. Após a certificação da eclosão das lagartas, as repetições para cada tratamento foram depositadas cuidadosamente sobre bandeja branca plástica de 7,5 L, para a contagem das lagartas (fig.4), com auxílio de lupa luminária estética para mesa com aumento de 20x.

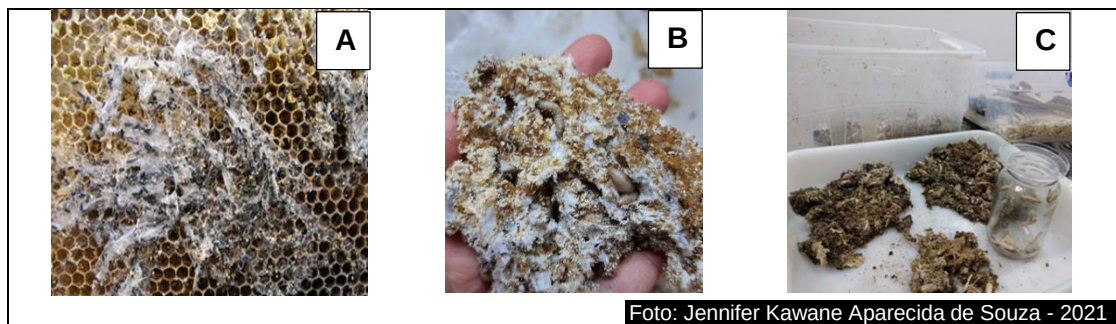
Figura 4 - Contagem das lagartas



A: Pote de criação de *G. mellonella* (dieta adaptada); **B:** Contador manual utilizado durante a contagem; **C:** Recipiente em que as lagartas foram armazenadas.

Após a contagem, as lagartas foram devolvidas aos seus recipientes junto de seu alimento (fig.5). As lagartas de *G. mellonella*, foram mensuradas quanto a seu estágio larval e quando em 6° instar do estágio larval foram mensuradas em comprimento e largura com uso de paquímetro, obtendo-se os valores médios correspondentes a tal fase larval.

Figura 5 - Dietas oferecidas a *G. mellonella*



A: Tratamento 1-Favo seco; **B:** Tratamento 2-dieta adaptada; **C:** Tratamento 3-Guerra (mod.1973).

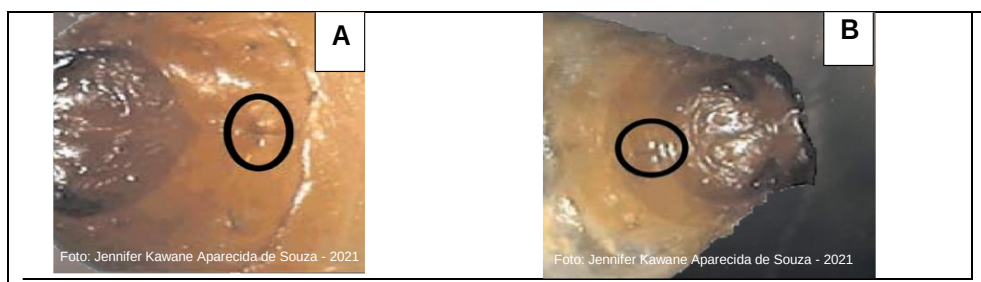
Durante as contagens também foram verificadas a presença de pupas e adultos. As pupas encontradas durante as avaliações foram retiradas da dieta (fig.6)

e postas em câmaras separadas até a emergência dos adultos. As câmaras eram individualizadas para cada tratamento e de acordo com o dimorfismo sexual (fig.7), de modo a facilitar na estimativa de machos e fêmeas para cada tratamento. As câmaras eram feitas de madeira de tamanho 90 cm por 50 cm, e as paredes de tecido voal. As caixas foram forradas com aparas de Ásper (Álamo).

Figura 6 - Separação das pupas de *G. mellonella*



Figura 7 - Pupas de *G. mellonella*

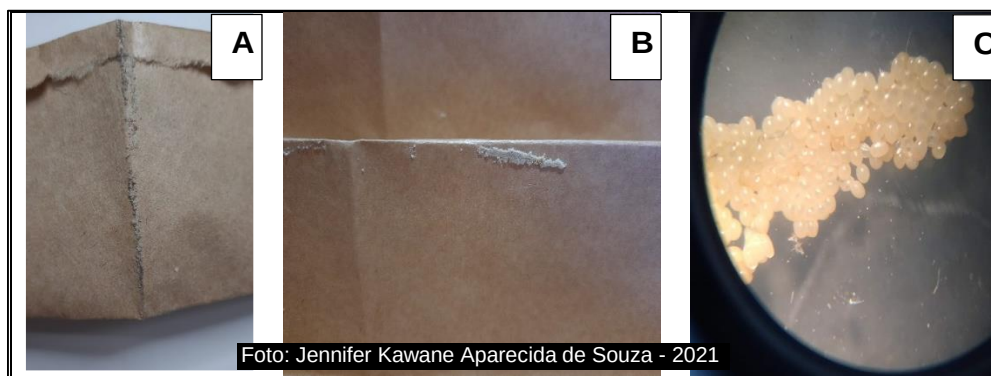


A: fêmea; **B:** macho.

Os adultos emergidos eram coletados das caixas respeitando a individualidade dos tratamentos para confirmação do gênero através das características morfológicas referentes ao tamanho entre machos e fêmeas, sendo os machos com aproximadamente 12 mm por 21 mm e as fêmeas com 18 mm por 32 mm aproximadamente (fig.8).

Figura 8 - Dimorfismo sexual em adultos de *G. mellonella***Esquerda:** macho; **Direita** fêmea de *G. mellonella*.

Após a confirmação dos sexos dos adultos, separou-se para a oviposição 4 machos e 1 fêmea para cada tratamento com 10 repetições a fim de se determinar a média de ovos por fêmea alimentada pelas dietas avaliadas. Os conjuntos de adultos foram postos em Becker de 500 mL com papel pardo em dobradura de sanfona para servir de substrato de postura, tampados com uma placa de Petri, evitando a fuga dos adultos. As casas de reprodução, foram cobertas com papel pardo e deixadas no escuro a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 5 dias, após este período os ovos foram coletados (fig. 9) e contabilizados e realizou-se a média para as fêmeas em cada tratamento durante as 8 gerações.

Figura 9 - Postura de ovos de *G. mellonella***A-B:** ovos de *G. mellonella* em papel pardo **C:** ovos de *G. mellonella* em microscópio estereoscópico 10x.

3.1.4. Avaliações para a etapa

Para avaliações dos efeitos da alimentação no desenvolvimento dos insetos, a biometria é necessária, pois mensura os parâmetros biológicos da espécie estudada.

Para este experimento os parâmetros biométricos avaliados foram, número de instares; duração do período larval (contando o número de dias desde a eclosão das lagartas até a pupação); número de lagartas residual, ou seja, o número de lagartas presentes até a conclusão do ciclo de vida; período larval residual total, contando-se o número de dias desde a eclosão das lagartas até o dia de observação dos adultos; razão sexual (RS) (calculado a partir da fórmula abaixo); e o número total de ovos por fêmea (PARRA, PANIZZI e HADDAD, 2012).

$$RS = \frac{N^{\circ}F}{(N^{\circ}F + N^{\circ}M)}$$

1 — (R_0) taxa líquida de reprodução, estimada do número esperado de descendentes fêmeas produzidas por cada fêmea durante sua vida útil:

$$R_0 = \sum (Ix \times mx)$$

2 — (T) tempo de geração, representa o intervalo de tempo entre cada geração:

$$T = \frac{\sum (Ix \times mx \times x)}{\sum (Ix \times mx)}$$

3 — (r_m) Taxa intrínseca de crescimento, relacionada com a natalidade e a mortalidade da população no período x:

$$r_m = \frac{\ln_e R_0}{T}$$

4 — (λ) Taxa finita de aumento, corresponde ao número de fêmeas adicionadas a população por fêmea por unidade de tempo:

$$\lambda = e^{r_m}$$

5 — (TD) Tempo de duplicação, tempo necessário para o inseto duplicar a população inicial:

$$Dt = \frac{\ln(2)}{r_m}$$

3.2 Etapa II – Avaliação da relação entre os NEPs e as lagartas alimentadas pela nova dieta adaptada

3.2.1 Inoculação das lagartas de *G. mellonella* com as espécies de NEPs

Após a determinação do tamanho médio das lagartas de 6º instar para cada dieta avaliada, as lagartas da oitava geração foram selecionadas seguindo o padrão (média) de seus tratamentos correspondentes (fig.10 A). Foram então oferecidas aos

nematoides entomopatogênicos das espécies *H. bacteriophora*, *H. amazonensis*, *S. puertoricense*, *S. rarum* e *S. feltiae* (fig.10 B), provenientes da criação do Laboratório de Nematologia Agrícola da FCA/UNESP Botucatu-SP, dando início às avaliações da segunda etapa do experimento.

Figura 10 - Lagartas de *G. mellonella* e recipientes com NEPs

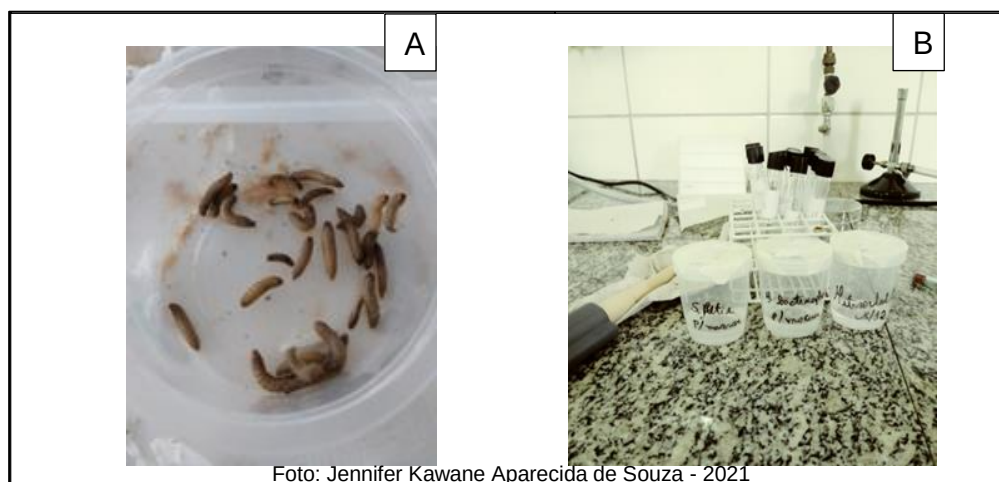


Foto: Jennifer Kawane Aparecida de Souza - 2021

A fim de avaliar a influência das lagartas alimentadas pelas dietas sobre a infecção, virulência e multiplicação das cinco espécies de NEPs citados, foram verificados o número de lagartas mortas pela entrada dos NEPs; tempo de morte necessário das lagartas após a exposição aos nematoides (ambas avaliações contabilizadas com a verificação de 51% de lagartas mortas por placas); e o número médio de indivíduos gerados de cada espécie de NEPs, originados a partir da infecção.

Para a avaliação sobre a infecção das lagartas de *G. mellonella* pelos nematoides entomopatogênicos, montou-se uma caixa de exposição dos insetos aos vermes com bandeja branca de 3,5 L forradas com papel de germinação de 45 por 30 cm como substrato. O papel foi umedecido com suspensão contendo 500 juvenis infectantes (JIS) para cada espécie de NEPs individualmente, em volume de 25 mL.

As lagartas foram postas vivas nas bandejas com os NEPs e levadas a B.O.D., a $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$ e UR% de $60\%\pm 10$. As avaliações aconteceram em até 72 horas, respeitando o tempo médio de infecção causado pelos NEPs. A cada 24 horas foi feita a observação da morte das lagartas, sendo consideradas mortas aquelas que não se moviam mesmo com estímulos. Para contabilização das mortes e horas necessárias para a mortalidade, consideraram-se 51% do número de lagartas mortas.

Após a constatação da morte das lagartas, os cadáveres foram transferidos para armadilhas de White (1927) (fig.11) composta do uso de placas de Petri autoclavadas com um suporte (podendo ser uma placa menor) recoberto com recorte retangular de papel qualitativo (filtro). Na placa maior é acrescida a água purificada de preferência deionizada ou destilada, cobrindo a base da placa e umedecendo filete de papel. Na superfície da placa menor com o papel colocaram-se as lagartas contaminadas sem que a água encharcasse os cadáveres, evitando o aparecimento de microorganismos saprófitos. As armadilhas foram catalogadas e armazenadas em B.O.D. por 10 dias a $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2$ e UR% de $60\%\pm 10$.

Figura 11 - Preparo de armadilhas de White



Foto: Jennifer Kawane Aparecida de Souza - 2021

Ao fim do período de inoculação (fig.12), o líquido de cada armadilha foi posto sob microscópio estereoscópico para visualização da presença dos NEPs. Após a certificação, o líquido foi transferido para tubos de ensaio volumétricos, a fim de se determinar o volume da suspensão, utilizado posteriormente para os cálculos de estimativa populacional para cada repetição de cada tratamento. Alíquotas destas suspensões foram postas em câmara de Peters até o preenchimento do espaço total da câmara, e se deu a contagem dos JIS presentes.

Figura 12 - Contagem dos JIS

Foto: Jennifer Kawane Aparecida de Souza - 2021

O valor obtido correspondente a 1 mL de suspensão é multiplicado pelo volume total e assim obteve-se o valor estimado para as repetições, e foi calculado as médias dos tratamentos. Esta etapa foi realizada de 29 de março a 11 de abril de 2021 para o tratamento 3, e de 26/07 a 07/08 de 2021 para os tratamentos 1 e 2.

3.3 Análise estatística

Os dados dos parâmetros para as duas etapas foram apresentados com média e seu erro padrão. Foi realizada a investigação dados influentes e outliers (dados que fogem da normalidade e podem causar anomalias nos resultados obtidos), e a Homoscedasticidade e normalidade analisados pelo teste de Levene e Kolmogorov-Smirnov nessa ordem. Após certificação pelas análises citadas, os resultados foram submetidos à análise de variância — ANOVA e os tratamentos foram comparadas com o uso do teste de Tukey. Os parâmetros não homoscedásticos foram analisados pelo teste de hipóteses Kruskal-Wallis, quando verificado a presença de normalidade, ambos os testes com significância de α 0,05. Os softwares estatísticos utilizados foram AgroEstat e Minitab19.

4 RESULTADOS

4.1 Estatística descritiva obtida para os parâmetros avaliados

Após a certificação da ausência de outliers (inconsistências entre os dados), favorecendo a interpretação correta dos resultados dos testes estatísticos aplicados às amostras, foram realizados os testes para verificação de normalidade e Homoscedasticidade dos dados. Confirmada a normalidade, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, os dados foram avaliados em sua Homoscedasticidade pelo teste de Levene.

Os parâmetros que se apresentaram como homoscedásticos postos m análise pelo teste ANOVA e suas médias comparadas no teste Tukey (p-value 0,05%), as avaliações que não apresentaram dados homogêneos (com variâncias dos erros diferentes nas observações feitas) foram analisadas pelo teste de hipóteses Kruskal-Wallis (p-value 0,05%).

Constata-se pela ANOVA que as médias calculadas para o parâmetro razão sexual (RS) durante às oito gerações, possuem média variabilidade estando no esperado para ensaios com insetos, boa precisão dos dados (CV% 17,7), tendência dos dados a estarem próximos da média (σ 0,10) e estimativa precisa para as populações (ErP 0,03) (CAMPOS, 1984; PIMENTEL-GOMES, 1985; FERREIRA, 1991).

O número de adultos ($N^{\circ}a$), número de fêmeas ($N^{\circ}f$), número larval residual ($N^{\circ}RL$), taxa de natalidade (TN%) e período de tempo necessário para a população dobrar em tamanho (TD), demonstraram alta variabilidade dos dados, com média a baixa precisão, com distância mínima das médias esperadas, exceto para a taxa de natalidade e TD que se aproximaram dos valores esperados das médias pelo desvio padrão e estimativa média, exceto para TN% e TD que apresentaram estimativa precisa pelo erro padrão médio, entretanto nenhum desses parâmetros se mostrou fora do esperado para ensaios entomológicos agrícolas (CAMPOS, 1984; PIMENTEL-GOMES, 1985; FERREIRA, 1991).

Os dados para o número de ovos por fêmeas ($N^{\circ}o/f$) foram de média variabilidade e boa precisão dos dados (CV% 16,5), a tendência dos dados foi intermediária em relação à média esperada para a avaliação (σ 48,6) e de acordo com

o erro padrão médio, a estimativa da população para os três tratamentos foi adequada (ErP 17,1) (CAMPOS, 1984; PIMENTEL-GOMES, 1985; FERREIRA, 1991).

Para as avaliações do número de indivíduos observados em cada estágio de desenvolvimento (ax) e a proporção de sobreviventes em cada estágio (Lx) para adultos, fêmeas e lagartas, apresentaram baixa variabilidade e alta precisão dos dados pelo coeficiente de variação, os dados tendenciaram a estarem próximos da média pelo desvio padrão das médias e a estimativa foi precisa para as populações (CAMPOS, 1984; PIMENTEL-GOMES, 1985; FERREIRA, 1991).

Os valores de fecundidade total (Fx), fecundidade individual (Mx) e o número da prole ($LxMx$), comprimento e largura das lagartas apresentaram baixa variabilidade com alta precisão dos dados pelo coeficiente de variação, os dados tendenciaram a estarem próximos da média pelo desvio padrão das médias com estimativa precisa para as populações (CAMPOS, 1984; PIMENTEL-GOMES, 1985; FERREIRA, 1991).

Para os parâmetros avaliados pelo teste K-S, todos mostraram evidências que pelo menos um dos grupos diferencia-se dos demais. Visto que as probabilidades se distribuem e diferem, é importante entender se as medidas da distribuição possuem contrastes, neste caso, empregou-se o uso de Box-Plot, técnica para ilustrar os escores (MCGILL, TUKEY e LARSEN, 1978), esse procedimento de comparações múltiplas realizado com gráficos Box-Plots permite ilustrar as avaliações realizadas e apontar os grupos que diferem, similar a ANOVA (MONTORO, 2020).

4.2 Etapa I – Avaliação da resposta de *G. mellonella* a nova dieta artificial adaptada

O valor nutricional foi calculado para cada dieta utilizada no experimento de acordo com seus componentes e respectivas quantidades, de forma que os resultados para o valor energético, carboidratos e proteínas estão representados na tabela 2

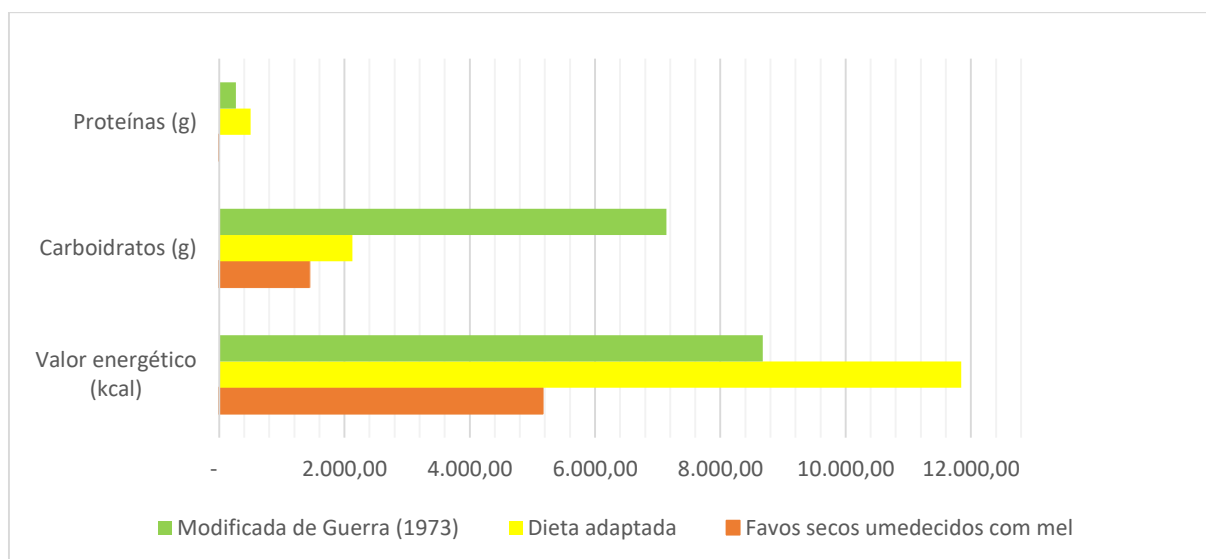
Verifica-se que a dieta correspondente ao tratamento 1 (favos secos umedecidos com solução de mel a 75%), possui maior valor energético e baixo para proteínas. O tratamento 2 (adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998)) apresenta alto valor energético, com grande quantidade de carboidratos e proteínas, e o tratamento 3 (modificada (Guerra, 1973)) possui alto valor energético, com boa quantidade de carboidratos e proteínas.

Tabela 4 - Tabela nutricional das dietas utilizadas no experimento

	Valor energético (kcal)	Carboidratos (g)	Proteínas (g)
Favos secos umedecidos com mel	5.155,20	1.446,60	5,04
Dieta adaptada	11.847,36	2.126,40	501,16
Modificada de Guerra (1973)	8.677,34	7.137,36	265,31

Valores nas linhas são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Ao nível de comparação, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis para os parâmetros a fim de identificar se existem diferenças entre os tratamentos para os valores nutricionais expostos, considerando $\alpha 0,05\%$, obtém-se que o tratamento 2 possui maior valor energético entre os demais, também com maior valor para carboidratos e proteínas, enquanto o tratamento 1 se mostra inferior aos outros tratamentos para todos os parâmetros da tabela nutricional (p -value: 0,0368), como pode ser melhor visualizado na figura 13.

Figura 13 - Comparação dos valores nutricionais para as dietas avaliadas

Valores nas linhas são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Como apresentado na tabela 3, o número de instares atingidos pelas lagartas se mostraram estatisticamente iguais para às três dietas testadas. Para o parâmetro RS — razão sexual, as populações de lagartas alimentadas pelo tratamento 2 (Dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) e tratamento 3 (modificada de guerra (1973)), apresentam um predomínio de fêmeas entre a população final, ao contrário dos insetos alimentados com o tratamento

1 (favos secos umedecidos em solução de mel a 75%), que demonstraram o predomínio de machos nas populações.

Tabela 5 - Médias dos parâmetros biométricos avaliados para as três dietas

Abordagem biométrica								
Trat.	Nºi	RS	Nº a	Nº f	Nº o/f	Nº e	Nº m	Nº p
1	7 (a)	0,4146 (b)	159 (b)	93 (a)	189 (b)	380	204	295
2	7 (a)	0,6841 (a)	239 (ab)	158 (a)	485 (a)	491	12	487
3	7 (a)	0,6133 (a)	251(a)	157 (a)	205 (b)	483	22	477

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores nas linhas são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Número de instares (Nºi);

Razão sexual média para a população (RS);

Número médio de adultos (Nºa);

Número médio de fêmeas (Nºf);

Número médio de ovos por cada fêmea (Nºo/f);

Número médio de eclosões (Nºe);

Número médio de mortes (Nºm);

Número médio da população ao final do ciclo de vida (Nºp).

Assim os tratamentos 2 e 3 se igualaram com as maiores médias de RS com proporção de 68% ($\pm 4\%$) e 61% ($\pm 3,5\%$) de fêmeas entre os adultos gerados, enquanto o tratamento 1 apresentou a menor média ao nível de comparação estatística com proporção de 41% ($\pm 2,3\%$) de fêmeas entre os adultos gerados (DMS (5%) = 0,1275; p-value 0,0001), sugerindo que esse regime alimentar das lagartas proporciona efeito desfavorável sobre a capacidade reprodutiva.

O número de adultos de *G. mellonella* obtidos diferiu estatisticamente para as dietas, em que o tratamento 3 foi o com maior número médio de insetos que chegaram a fase adulta entre os experimentos, com 251 (± 5) adultos em média, seguido do tratamento 2 com 239 (± 7) adultos em média, e do tratamento 1, que apresentou a menor população de adultos registrada, com média. De 159 (± 3) insetos que conseguiram chegar a fase adulta no período avaliado (DMS (5%) = 87,8079; p-value 0,0312).

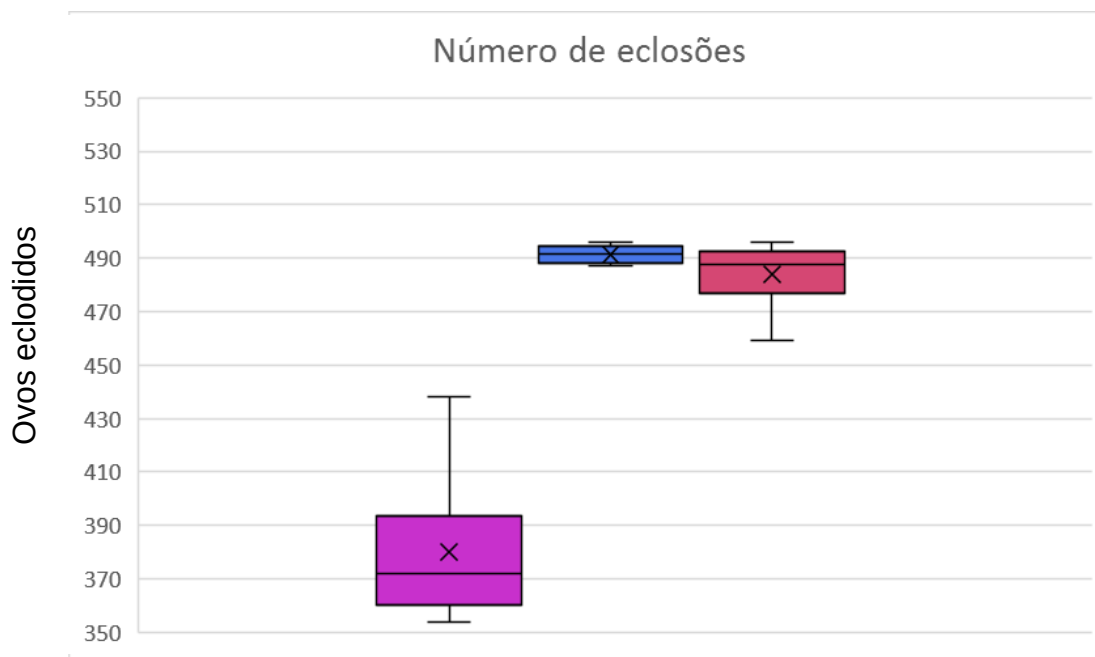
Para o número de fêmeas, os resultados se mostraram iguais ao nível estatístico entre às três dietas avaliadas, mesmo com os tratamentos 2 e 3 apresentando maior número de mariposas fêmeas, com diferença de 65 e 64 fêmeas a mais que o tratamento 1 respectivamente (DMS (5%) = 93,1928; p-value 0,01).

Para os valores referentes ao número de ovos por fêmea, temos que o tratamento 1 apresentou o menor índice (189 ovos/fêmea (± 9)) entre às três dietas,

mas se aproximou estatisticamente ao tratamento 3 (205 ($\pm 3,5$) ovos/fêmea), sendo o tratamento 2 com o maior número de ovos depositados, com 485 (± 5) ovos por fêmeas entre os tratamentos (DMS (5%) = 61,2953; p-value 0,0001). Destes ovos as médias de eclosões se mostram diferentes, em que os tratamentos 2 e 3 expuseram os melhores índices de eclosões, com 491 (± 3) e 483 ($\pm 4,83$) ovos eclodidos em média respectivamente, e o tratamento 1 teve o menor índice, com 380 (± 2) eclosões como pode ser visualizado na figura 14 (p-value 0,0001).

Pode-se observar na ilustração que os dados encontrados para o tratamento 2 se mostram próximos da média, ao contrário dos demais tratamentos, os quais mesmo que dentro da normalidade, apresentaram dados que se dispersão da média.

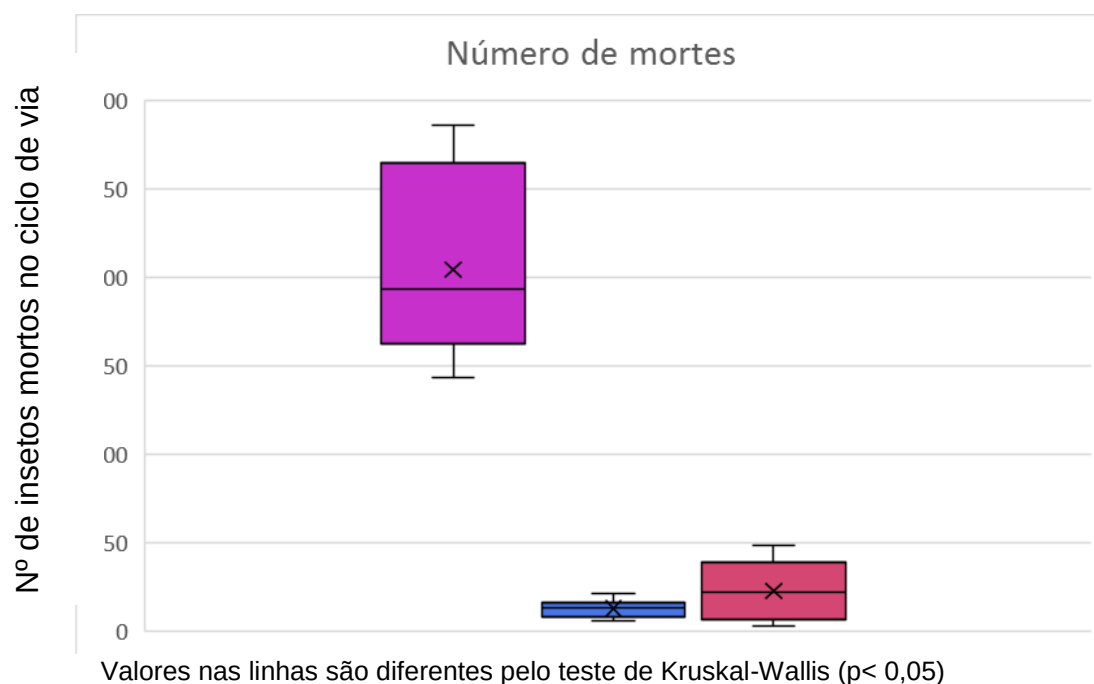
Figura 14 - Comparação do número de eclosões de ovos entre os tratamentos usando Box Plot



Valores nas linhas são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

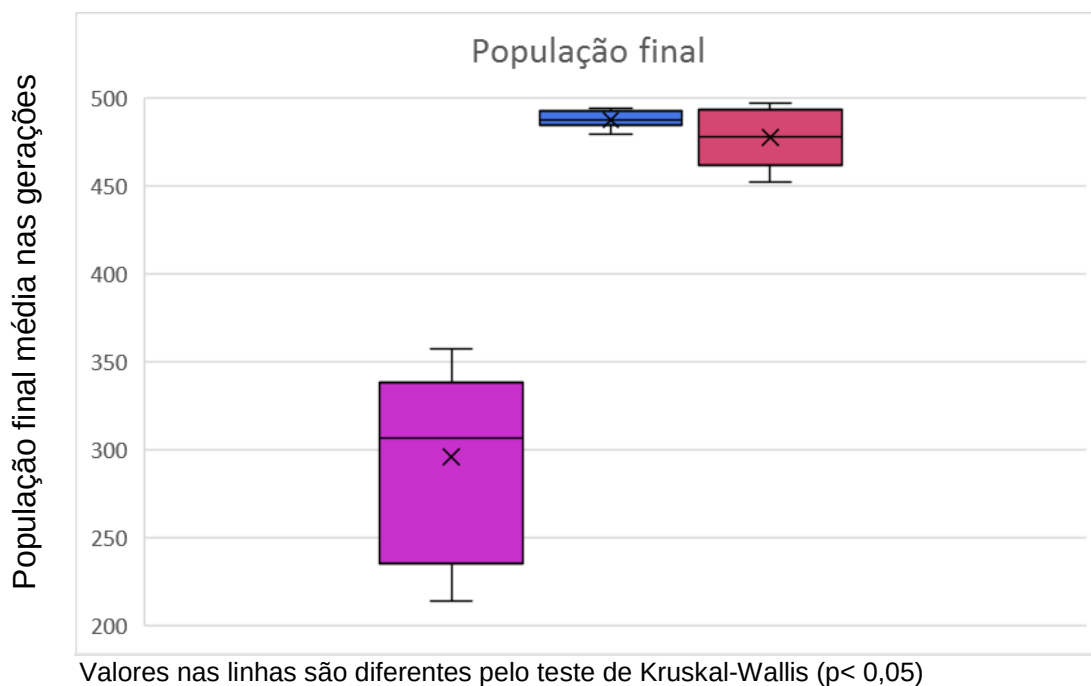
O número de mortos para todos os tratamentos se diferenciou estatisticamente. O tratamento 1 apresentou o maior número médio de mortes entre as gerações com 204 (± 3) mortes ao final do ciclo. As mortes foram consideravelmente menores para os tratamentos 2 e 3 com 12 (± 2) e 22 ($\pm 4,2$) mortes em média respectivamente, ao final do ciclo de vida para cada geração avaliada (p-value 0,001), como se verifica na figura 15.

Figura 15 - Comparação do número de mortes entre os tratamentos usando Box Plot



Isso implica diretamente para o número médio de população ao final do ciclo. É possível observar na figura 16 que esse número foi menor para as lagartas que foram alimentadas pelo tratamento 1 com população final de 295 (± 5) indivíduos. Os maiores índices populacionais foram alcançados pelas lagartas alimentadas do tratamento 2 e 3 com populações médias de 487 (± 3) e 477 (± 6) indivíduos respectivamente (p -value 0,001).

Figura 16 - Comparação do número da população final entre os tratamentos usando Box Plot



Com base na abordagem biométrica podemos observar que os resultados se mostraram positivos para os tratamentos aos quais foram oferecidos a dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) e a dieta modificada de Guerra (1973), e uma maior incidência de valores negativos foi obtida para as gerações alimentadas com a dieta a base de favos secos umedecidos com solução de mel a 75%.

Mesmo com o surgimento das mariposas (adultos) ainda se tinham lagartas nas criações. Este número de lagartas “restantes” é importante quando nos referimos a uma criação de insetos mantidas em laboratório, visto que o intuito é oferece-las como hospedeiros a algum parasita, predador ou parasitoide. Isso porque é desejável que se tenham lagartas a disposição para a realização dos experimentos. Assim, o residual larval (número de lagartas restantes ao final do ciclo) para cada tratamento foi registrado e analisado.

Tabela 6 - Médias das lagartas que estenderam seu estágio larval

Trat.	Nº Lagartas residuais
1	65,5 (b)
2	128,5 (a)
3	51,875 (b)

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao nível de comparação das médias obtidas para os três tratamentos, o número de lagartas restantes nas caixas de criações (mesmo após aparecimento e fecundação dos adultos), foram significativos estatisticamente, em que as gerações alimentadas com o tratamento 2 (dieta 2) tiveram um número maior de lagartas que prolongaram seu ciclo, sendo de 128 (± 3) lagartas restantes em média para uma população inicial de 500 indivíduos. O tratamento 1 e 3 se igualaram estatisticamente com 65 (± 3) e 51 ($\pm 2,3$) lagartas presentes ao final do período respectivamente como apresentado na tabela 4.

Deste modo podemos dizer que a adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) se mostra interessante para uso em criações de *G. mellonella* com o intuito de serem oferecidas como hospedeiros em fase larval, pois apresenta os maiores valores de indivíduos em fase larval prolongada por um maior período de tempo, enquanto o tratamento 3 é recomendado para criação da traça-da-cera com interesse em manutenção dessa espécie em laboratório (DMS (5%) = 49,3461; p-value 0,0018). Como exemplo seu uso na área de medicina e farmácia.

Para o estudo das dinâmicas populacionais entre os tratamentos realizou-se a análise de demografia. Nela foram coletados, analisados e interpretados dados que se referem a parâmetros de desenvolvimento em relação à descendência, sobrevivência, natalidade e mortalidade das lagartas de *G. mellonella* quando submetidas às três dietas artificiais avaliadas (tratamento 1: favos secos umedecidos com solução de mel a 75%; tratamento 2: dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998); tratamento 3: dieta modificada de Guerra (1973). Os resultados encontrados foram expressos na tabela a seguir.

Tabela 7 - Médias dos parâmetros demográficos avaliados para as três dietas

Abordagem demográfica						
Trat.	RS	X	mx	lx	TN%	TM%
1	0,4146 (b)	60 (a)	78,8775	0,59125	0,6788 (b)	0,40875
2	0,6841 (a)	60 (a)	333,0454	0,975	0,9966 (a)	0,025
3	0,6133 (a)	45 (b)	125,6422	0,95475	0,4301 (b)	0,04525

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias diferentes nas linhas são estatisticamente

Razão sexual (RS)

Período médio de desenvolvimento (x)

Número de fêmeas geradas por fêmeas (mx)

Taxa de sobrevivência (lx)

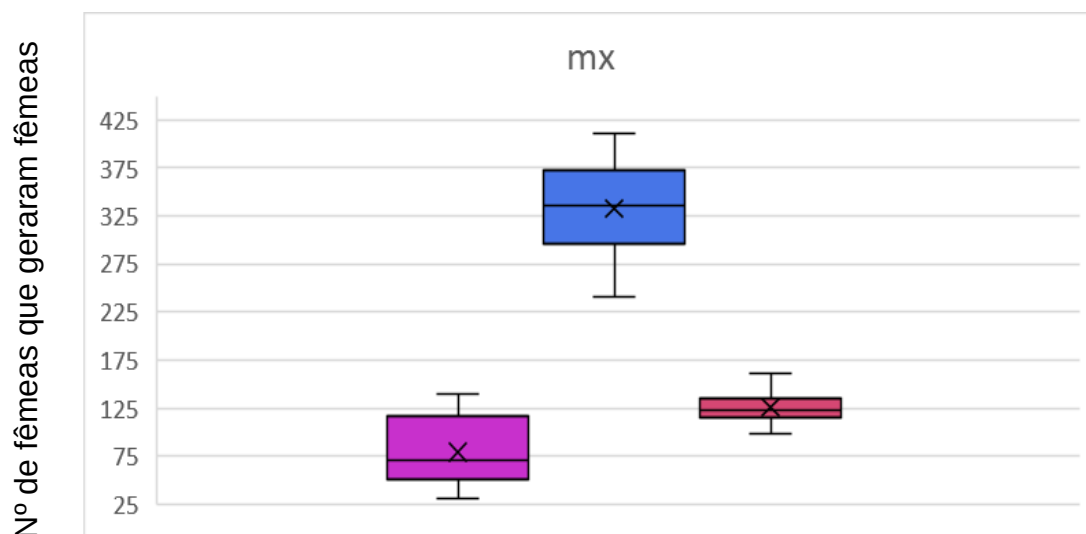
Taxa de natalidade (TN%)

Taxa de mortalidade (TM%)

O período médio de desenvolvimento (x) se apresentou igual entre os tratamentos 1 e 2, com ciclo de vida sendo alcançado em 60 (± 5) dias em média por 51% da população inicial conhecida para cada geração estudada. Para o tratamento 3, esse ciclo foi alcançado em 45 (± 5) dias em média para todas as gerações avaliadas.

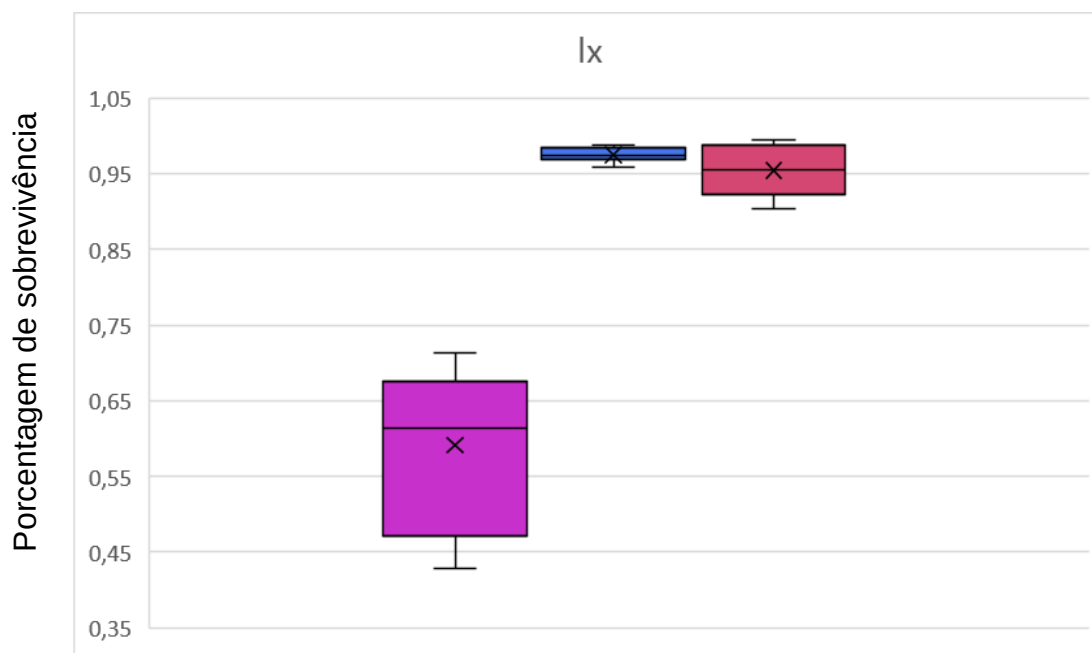
Em relação ao número médio de fêmeas geradas por fêmeas (mx), pode-se ver na figura 17 que o tratamento 1 apresentou o menor índice, com 78,87 (± 5) fêmeas geradas por fêmeas, porém se mostrou igual estatisticamente ao índice encontrado para o tratamento 3, com 125,64 (± 5) fêmeas geradas por fêmeas. Nesse parâmetro o tratamento 2 apresentou o maior índice com média de 333,04 (± 5) fêmeas geradas por fêmeas.

Figura 17 - Comparação do número de fêmeas geradas por fêmeas entre os tratamentos usando Box Plot



Valores nas linhas são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Figura 18 - Comparação do índice de sobrevivência entre os tratamentos usando Box Plot



Valores nas linhas são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

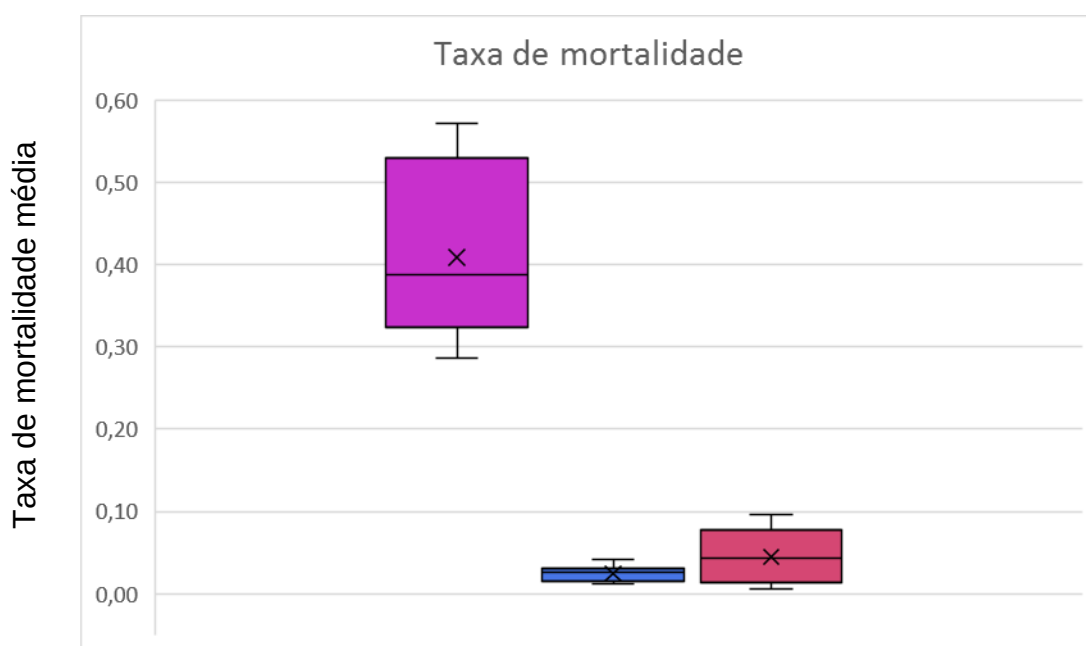
Para o parâmetro taxa de sobrevivência (l_x), os tratamentos 2 e 3 se destacaram com médias de 0,975 ($\pm 0,05$) e 0,95475 ($\pm 0,05$) respectivamente, correspondendo a proporção de 97% e 95% de indivíduos sobreviventes até a próxima geração. Ao contrário do tratamento 1, que apresentou taxa de sobrevivência de 59%, sendo a menor média entre às três dietas avaliadas. Com estes dados podemos também dizer que a população para o tratamento 1 é classificada em número relevante de indivíduos sobreviventes ($l_x > 0,50-0,70$) e as populações referentes aos tratamentos 2 e 3, são classificadas como de alta sobrevivência ($l_x > 0,70$) como apresentado na figura 18 (p-value 0,0001).

A taxa de natalidade (TN%) para às três dietas avaliadas, também se mostrou significativa, em que os tratamentos 1 e 3 se igualaram ao nível estatístico, com 0,6788 ($\pm 0,023$) e 0,4301 ($\pm 0,03$) respectivamente, representando 67% e 43% de nascimentos em média para as gerações avaliadas. Já o tratamento 2 se destacou com taxa de natalidade correspondente a 99% (± 2). Com base nos dados até o momento, pode-se dizer que a taxa de natalidade para o tratamento 1 é correspondente a tentativa de sobrevivência dos indivíduos, que no parâmetro anterior

se mostrou menor entre às três avaliadas, e agora na taxa de natalidade se igualou ao tratamento 3 com números consideráveis (DMS (5%) = 0,2562; p-value 0,0001).

No último parâmetro desta tabela, encontramos a taxa de mortalidade (TM%). Esse parâmetro se refere a proporção de indivíduos mortos durante o período da geração. Para essa taxa, os tratamentos 2 e 3 apresentaram os menores índices, sendo o tratamento 2 o que apresentou 2,5% de mortes médias para as gerações avaliadas. O tratamento 3 com 4,5% (0,04525 ($\pm 0,001$)) de mortes médias durante as gerações se igualou estatisticamente ao tratamento 2. Em contrapartida, o tratamento 1 demonstrou a maior TM% com 40% (0,40875 ($\pm 0,2$)) de indivíduos mortos em média durante as gerações o que pode ser facilmente observado nos Box Plots da figura 19 (p-value 0,0001).

Figura 19 - Comparação da taxa de mortalidade entre os tratamentos usando Box Plot



Valores são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (p< 0,05)

Com os parâmetros demográficos calculados e interpretados, é necessário conhecer a fundo os resultados da alimentação oferecida as lagartas de *G. mellonella*, para verificar se as dietas podem interferir ou não em seu desenvolvimento, o que implica diretamente no seu uso em laboratórios como hospedeiros, visto que a organização geral da fisionomia e fisiologia das lagartas precisa ser considerada normal e saudável, para a validação dos experimentos e diminuição de possíveis erros. Para isso, montou-se a tabela de vida e fertilidade (tab.8), que tem por objetivo

estudar esses processos demográficos das populações, acompanhando a natalidade, mortalidade e os padrões de fertilidade e fecundidade.

A tabela de vida e fertilidade representa como a sobrevivência e a fertilidade mudam com a idade e/ou ciclo de vida das espécies, de modo a estimar os dados estatísticos para a população em estudo. Entre as tabelas de vida e fertilidade, para este estudo adotou-se o modelo Coortes (conjunto de indivíduos de mesma idade) seguindo o destino de um grupo de indivíduos nascidos durante o mesmo intervalo de tempo.

Tabela 8 - Médias dos parâmetros de vida e fertilidade de *G. mellonella* para as dietas avaliadas

Tabela de vida e fertilidade						
Trat.	X	ax	Lx	Fx	Mx	LxMx
1	Ovos	500 (a)				
	Lagartas	380 (c)	0,76 (c)	17365 (c)	185 (c)	34,73 (c)
	Adultos	194 (c)	0,388 (c)			
	Fêmeas	94 (c)	0,187 (c)			
2	Ovos	500 (a)				
	Lagartas	491 (a)	0,983 (a)	80935 (a)	489 (a)	161,87 (a)
	Adultos	240 (b)	0,48 (b)			
	Fêmeas	166 (a)	0,331 (a)			
3	Ovos	500 (a)				
	Lagartas	484 (b)	0,968 (b)	31941 (b)	202 (b)	63,88 (b)
	Adultos	252 (a)	0,503 (a)			
	Fêmeas	157 (b)	0,315 (b)			

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Estágio de desenvolvimento (x)
Número de indivíduos observados (ax)
Proporção de sobreviventes (Lx)

Fecundidade total (Fx)
Fecundidade individual (Mx)
Prole efetiva (LxMx)

O número de indivíduos observados em cada estágio de desenvolvimento (ax) foi igual para o número de ovos em todos os tratamentos, em vista da padronização com 500 ovos para o início das populações avaliadas a cada geração. O número de lagartas de *G. mellonella* nesse parâmetro foi estatisticamente diferente para às três dietas, sendo maior para a dieta do tratamento 2 (491(±2)), seguido do tratamento 3 (484(±4)) e com menor número de lagartas do tratamento 1 (380(±5)) (DMS (5%) = 2,9548; p-value 0,0001).

O mesmo foi observado para o número de adultos e fêmeas, em que os três tratamentos diferiram entre si, em que o tratamento 3 apresentou o maior número de adultos, com 252 (± 2) e segundo maior número de fêmeas com 157 (± 2), seguido da dieta 2 com 240 (± 2) mariposas e maior número de fêmeas com 166 (± 3) e o tratamento 1 com o menor número para ambos (194 (± 2) adultos e 94 fêmeas (± 5)) (DMS (5%) = 2,9548; p-value 0,0001; DMS (5%) = 2,9548; p-value 0,0001).

Para a proporção de sobreviventes em cada estágio (Lx), o tratamento 1 apresentou os menores índices de sobrevivência entre os estágios de vida de lagarta, adultos e fêmeas com 76%, 38% e 18% de indivíduos sobreviventes respectivamente. Já o tratamento 2 apresentou percentagens maiores para sobreviventes no estágio larval e de fêmeas com 98% e 33%, e menor que a dieta 3 para os adultos sobreviventes com 48%, enquanto o tratamento 3 apresentou 96% de sobreviventes em estágio larval, 50% de sobreviventes no estágio adulto, sendo o maior entre os três tratamentos, e 31% para a sobrevivência de fêmeas (DMS (5%) = 0,0030; p-value 0,0001).

Para os valores de fecundidade total (Fx) encontrados entre os tratamentos, todos se apresentaram diferentes ao nível estatístico. A população alimentada pelo tratamento 2 apresentaram maior capacidade reprodutiva total entre os tratamentos (80935 (± 5) ovos/geração), o tratamento 3 com índice de 31941 (± 5) ovos/geração se apresentou intermediário em relação à capacidade de reprodução populacional ao todo, enquanto os indivíduos alimentados pelo tratamento 1 tiveram a menor capacidade reprodutiva de seus adultos, com 17365 (± 5) ovos/geração (DMS (5%) = 2,9548; p-value 0,0001).

A fecundidade individual (Mx), que quantifica a capacidade reprodutiva média para cada fêmea, teve maior índice obtido pelas fêmeas alimentadas pelo tratamento 2, apresentaram maior capacidade reprodutiva individual média entre os tratamentos (489 (± 5) ovos), o tratamento 3 com índice de 202 (± 5) ovos, se apresentou intermediário em relação à capacidade de reprodução de cada uma de suas fêmeas ao todo, enquanto as fêmeas alimentadas pelo tratamento 1 tiveram a menor capacidade reprodutiva individual, com 185 (± 5) ovos (DMS (5%) = 2,9548; p-value 0,0001).

O último parâmetro estruturante da tabela de vida e fertilidade se refere ao número da prole ($LxMx$). Para esta avaliação, o tratamento 2 novamente apresenta o maior índice, com 161,87 filhos produzidos por cada fêmea em média que sobreviverão e se reproduziram efetivamente a cada geração. O tratamento 3 se encontra em segundo lugar, com 63,88 indivíduos por fêmea com capacidade de se reproduzir e sobreviver a cada geração, e o tratamento 1 se apresentou com número de 34,73 filhos por fêmea capazes de se reproduzir e sobreviver em média a cada geração (DMS (5%) = 0,022; p-value 0,0001).

Os valores encontrados para o parâmetro $LxMx$, ilustram também o crescimento ou decréscimo da população avaliada. A partir dos valores encontrados, concluímos que as populações dos três tratamentos estão crescendo, pois, as taxas apresentam reprodução básica >1 , mesmo que em densidade populacional diferente. Com a obtenção desses dados é possível ilustrar em gráfico a sobrevivência para as populações alimentadas pelas três dietas.

A partir dos resultados encontrados podemos afirmar que para a dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) e dieta modificada (Guerra, 1973), apresentaram ótima sobrevivência, ou seja, à medida que passa o tempo o número de sobreviventes se mantém praticamente estável, somente com 2/3 de vida o número de sobreviventes começa a reduzir (fase de senescência natural), assim a morte é concentrada no final da vida, enquanto para a dieta de favos + sol. mel (75%) se apresenta insatisfatória, ou seja, o número de indivíduos sobreviventes tem uma proporção que se mantém praticamente fixa do início ao fim da vida, existindo fatores de intervenção que geram mortes de forma semelhante ao decorrer do ciclo de vida desta, assim a probabilidade de morte permanece constante independente do estágio de vida, conduzindo a sobrevivência a um linear declínio.

Podemos também baseados nas informações deduzir que a dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998), dieta modificada e dieta de favos + sol. mel (75%) possuem risco de mortalidade pequeno no início da vida, e aumenta significativamente ao fim da vida para às três populações.

Os dados do parâmetro de desenvolvimento para as populações dos três tratamentos avaliados nesta etapa estão apresentados na tabela a seguir (tab.9). Os

valores para a taxa líquida de reprodução (R_0) de *G. mellonella* para os tratamentos diferem estatisticamente ($p\text{-value} < 0,0001$), evidenciando que as dietas artificiais disponibilizadas as lagartas interferem no potencial de aumento de indivíduos nas gerações.

Tabela 9 - Médias dos parâmetros de desenvolvimento avaliados para as três dietas

Parâmetros de desenvolvimento					
Trat.	R_0	T	r_m	λ	TD
1	364,8820	60	16,5292	2,0661	0,0419
2	2598,3886	60	117,7070	4,2272	0,0059
3	961,7074	45	58,0871	5,7209	0,0119

Valores nas linhas são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Taxa líquida de reprodução (R_0)

Tempo de geração (T)

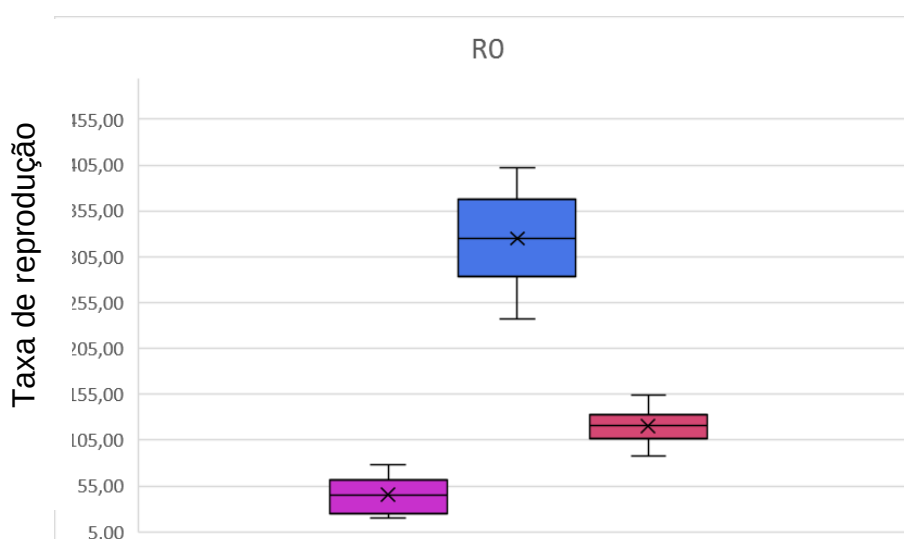
Taxa intrínseca de crescimento (r_m)

Taxa finita de aumento (λ)

Tempo de duplicação da população (TD)

Para o tratamento 2, a taxa líquida de reprodução de *G. mellonella* mostrou acréscimo na geração de 7,12 vezes em relação à dieta 1 e aumento de 2,70 vezes em relação ao tratamento 3. As dietas favos + sol. mel (75%) e modificada, promoveram o decréscimo populacional da espécie, uma vez que, o aumento populacional é dependente da quantidade de fêmeas de cada geração, conforme apresentado nos Box Plots na figura 20.

Figura 20 - Comparação da taxa líquida de reprodução entre os tratamentos usando Box Plot

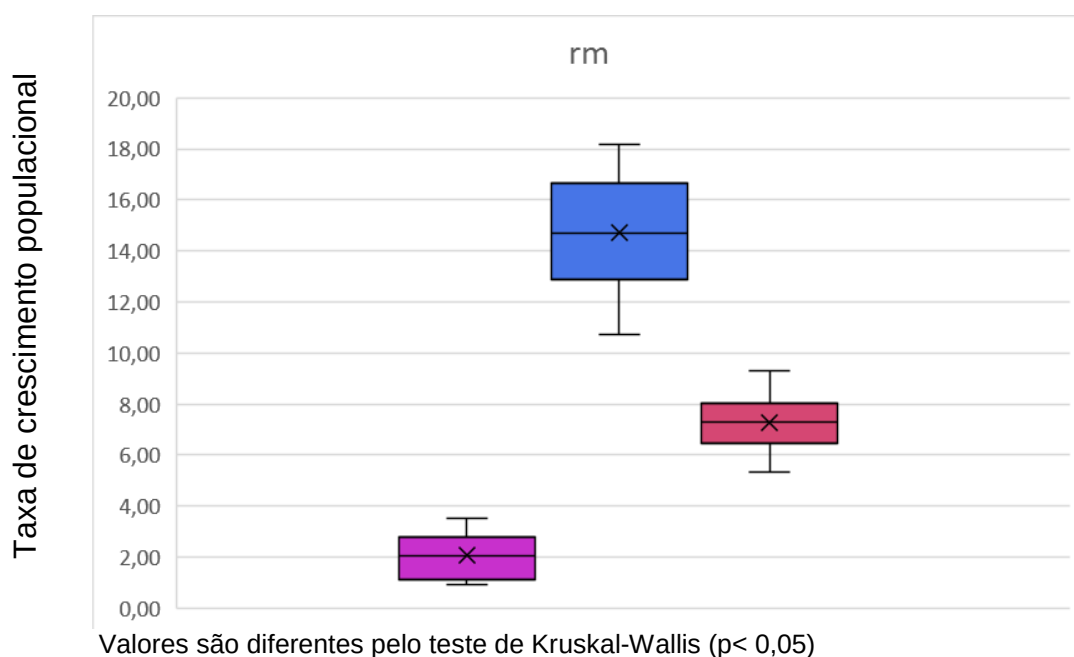


Valores são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

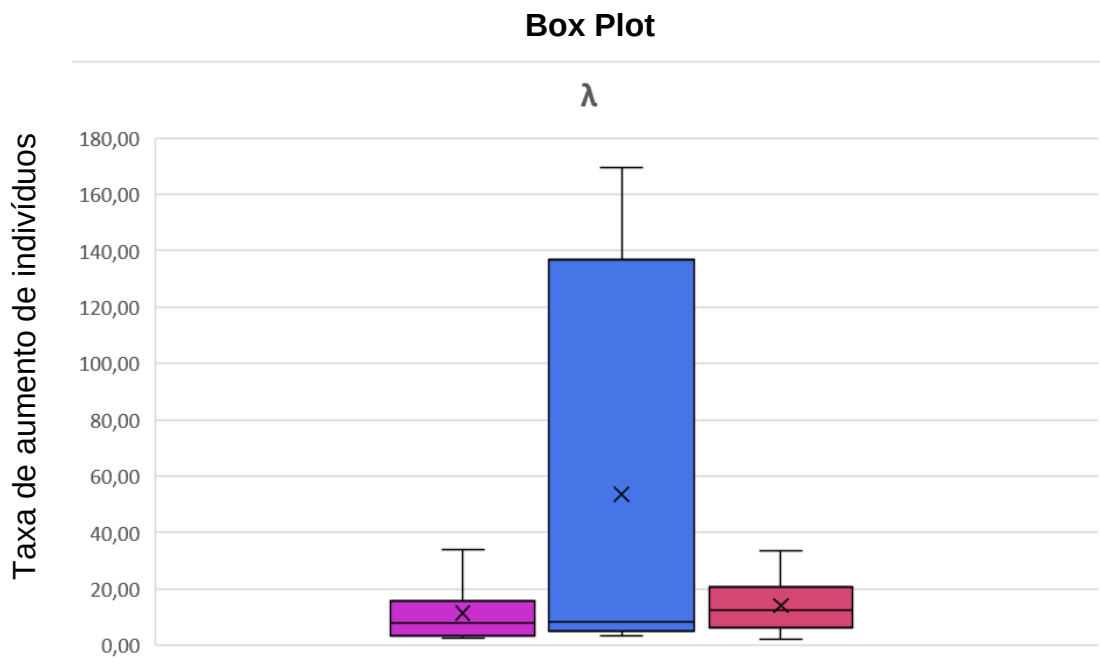
O tempo de geração (T) da espécie *G. mellonella* apresentou-se menor para o tratamento 3, diferindo significativamente dos tratamentos 1 e 2 (p-value 0,0001). A partir deste resultado é possível obter ao ano 6,08 gerações de *G. mellonella* ao ano quando as lagartas são alimentadas por favos secos + sol. mel (75%) e dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) e 8,11 gerações ao ano para a dieta modificada (Guerra,1973).

Os valores da taxa intrínseca de crescimento (r_m) se mostram positivos, sugerindo o aumento populacional de *G. mellonella* nos três tratamentos (p-value 0,0001). Os tratamentos diferem estatisticamente, sendo que o valor de r_m foi igual para os tratamentos 2 e 3 ao nível de comparação, enquanto o tratamento 1 apresentou o menor índice entre os tratamentos, como representado na figura 21.

Figura 21 - Comparação da taxa intrínseca de crescimento entre os tratamentos usando Box Plot



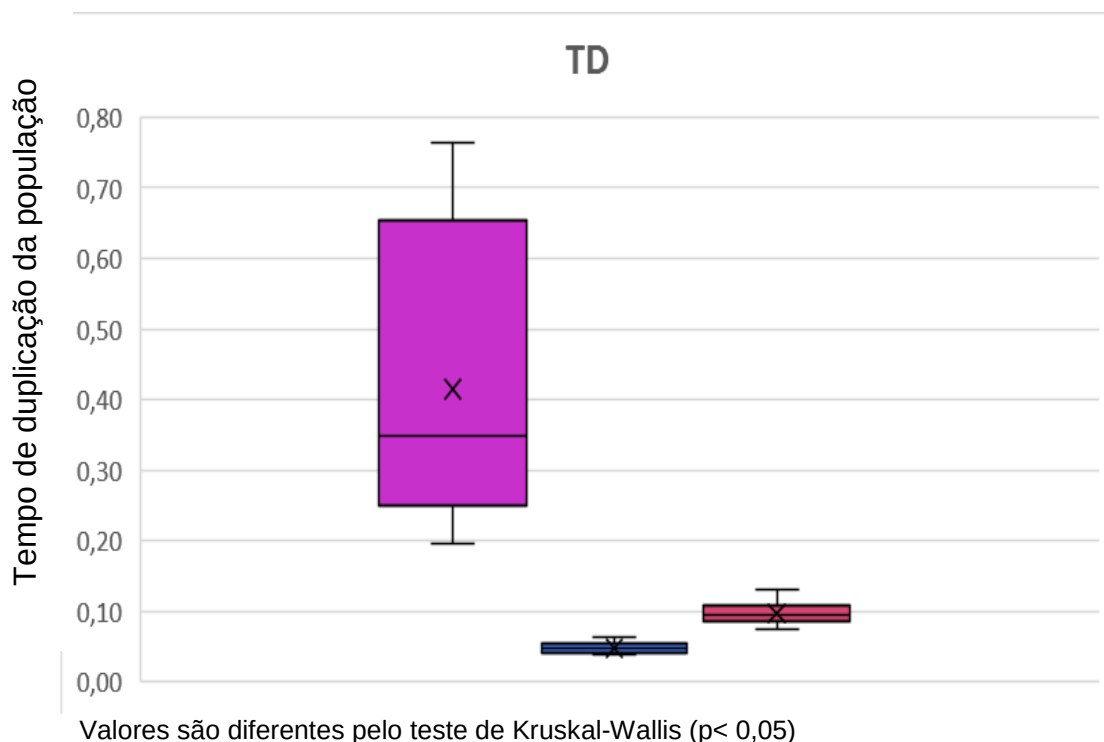
Quanto a razão finita de aumento (λ), apresentou diferença estatística (p-value 0,0001) para as dietas, das quais o maior valor foi encontrado para o tratamento 3, porém semelhante ao tratamento 2, assim ambas as dietas possuem maior multiplicação de indivíduos dentro dos seus respectivos períodos (T). O tratamento 1 apresentou a menor taxa, assim pode-se dizer que para as gerações alimentadas com essa dieta a multiplicação dos indivíduos por unidade de tempo é menor, como podemos ver na figura 22.

Figura 22 - Comparação da taxa finita de aumento entre os tratamentos usando

Valores são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

O período de tempo necessário para a população inicial de *G. mellonella* dobrar (TD) foi influenciado pelo regime alimentar das lagartas como representado na figura 23 (p -value 0,0001). O grupo alimentado com a dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998), mostrou o menor período, sugerindo que a espécie possui condições de dobrar sua população em aproximadamente $1 (\pm 0,05)$ dia de oviposição. As lagartas alimentadas. No tratamento 1 apresentaram o período de $4 (\pm 2)$ dias de oviposição para duplicação da espécie e ao tratamento 3, com $1 (\pm 2)$ dia de oviposição é capaz de duplicar o número de indivíduos inicial.

Figura 23 - Comparação do período de tempo necessário para a população dobrar de tamanho entre os tratamentos usando Box Plot



4.3 Etapa II – Avaliação da relação entre os NEPs e as lagartas alimentadas pela nova dieta adaptada

Para início da segunda etapa da pesquisa, as lagartas avaliadas por 8 gerações, foram mensuradas em comprimento e largura, a fim de se definir um padrão para os experimentos seguintes, sendo realizados com a oferta das lagartas alimentadas pelas três dietas às espécies de nematoides entomopatogênicos. Os dados obtidos dessa padronização estão apresentados na tabela 10 a seguir.

Tabela 10 - Parâmetros métricos obtidos para as três dietas avaliadas

Parâmetros métricos das lagartas no 6º instar		
Trat.	Comprimento (mm)	Largura (mm)
1	13,125 (c)	3,75 (b)
2	15,875 (a)	5,75 (a)
3	15,375 (b)	5,56 (a)

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados obtidos foram significativos estatisticamente (p -value 0,0001), em que o tratamento 2, apresentou comprimento médio entre seus indivíduos de 6º instar de desenvolvimento larval de 15,875 mm de comprimento, sendo a maior entre as

dietas, em que o tratamento 3 se aproximou com média de 15,375 mm de comprimento e o tratamento 1 apresentou a menor média com 13,125 mm de comprimento (DMS (5%) = 0,4862).

Em relação à largura das lagartas, a maior média foi de 5,75 mm e 5,56 mm para os tratamentos 2 e 3 respectivamente e a menor média foi de 3,75 mm de largura correspondente ao tratamento 1 (DMS (5%) = 0,5303; p-value 0,0001).

Assim, para os experimentos de infecção, virulência e multiplicação de espécies de nematoides entomopatogênicos (NEPs), foram oferecidas lagartas seguindo o padrão médio para cada dieta, sendo as lagartas provenientes de 8º geração de cada uma das dietas, selecionadas de acordo com sua estrutura. De modo que para os tratamentos compostos de lagartas provenientes do tratamento 1, selecionados indivíduos com 13 ($\pm 0,15$) mm X 3,5 ($\pm 0,2$) mm, para os tratamentos compostos pelos indivíduos vindos da dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998), foram selecionados aqueles com 15,5 mm ($\pm 0,3$) X 5,5 ($\pm 0,2$) mm, e para os tratamentos com uso de lagartas advindas da dieta modificada de Guerra (1973), foram selecionadas aquelas com 15 ($\pm 0,3$) mm X 5,5 ($\pm 0,3$) mm.

4.3.1 Infecção das lagartas de *G. mellonella* por nematoides entomopatogênicos

Constata-se pela ANOVA que as médias calculadas para o parâmetro, possuem baixa variabilidade estando no esperado para ensaios com insetos, ótima precisão dos dados (CV% 3,05), tendência dos dados a estarem próximos da média (σ 1,45) e estimativa precisa para as populações (ErP 0,46) (CAMPOS, 1984; PIMENTEL-GOMES, 1985; FERREIRA, 1991).

Para avaliação da interferência da alimentação das lagartas com dieta favos secos + sol. mel (75%) (G. mel. D1); dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) (G. mel. D2); dieta modificada (Guerra, 1973) (G. mel. D3) sobre a infecção das cinco espécies de nematoides entomopatogênicos *H. bacteriophora* (H.b.), *H. amazonensis* (H.a.), *S. puertoricense* (S.p.), *S. rarum* (S.r.), *S. feltiae* (S.f.), foram contabilizados o número de lagartas mortas após exposição aos nematoides. Os dados estão representados na tabela 11.

Os tratamentos se mostraram diferentes (DMS (5%) = 2,2519; p-value 0,0001). Os tratamentos constituintes da dieta G. mel. D2 apresentaram o maior número de lagartas mortas, com 49 lagartas mortas após a exposição aos nematoides *H. bacteriophora* e *S. puertoricense* e *S. feltiae*, e 48 lagartas mortas em média para *H. amazonensis* e *S. rarum*, iguais a nível estatístico dos tratamentos constituídos das lagartas alimentadas pela dieta G. mel. D3, com média de 48 lagartas mortas para as espécies *S. puertoricense* e *S. rarum* e 47 lagartas mortas para as espécies *H. bacteriophora*, *H. amazonensis* e *S. feltiae*.

Tabela 11 - Médias obtidas para o parâmetro de infecção de *G. mellonella* alimentadas pelas diferentes dietas, por nematoides entomopatogênicos

Infecção de lagartas de <i>G. mellonella</i> por nematoides entomopatogênicos					
Tratamento	<i>H. b.</i>	<i>H. a.</i>	<i>S. p.</i>	<i>S. r.</i>	<i>S. f.</i>
G. mel. D1	46,8 (b)	46 (b)	45,6 (b)	46,5 (b)	38,4 (b)
G. mel. D2	49,1 (a)	48,5 (a)	49 (a)	48,3 (a)	49,5 (a)
G. mel. D3	47,7 (a)	47,8 (a)	48,2 (a)	48 (a)	47,5 (a)

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05).

Heterorhabditis bacteriophora (H.b.)

Heterorhabditis amazonensis (H. a.)

Steinernema puertoricense (S.p.)

Steinernema rarum (S.r.)

Steinernema feltiae (S.f.)

A menor média do número de mortes foi obtido para as lagartas alimentadas pela dieta D1 exposta aos NEPs *S. feltiae*, 38 lagartas mortas em média. Entre os valores obtidos, para as lagartas alimentadas com dieta de favos secos os tratamentos G. mel. D1+H.b. (46,8); G. mel. D1+H.a. (46); G. mel. D1+S.r. (46,5); foram os com maior número de lagartas mortas, mas inferior aos valores do uso de lagartas alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998).

Assim pode-se dizer que as lagartas alimentadas pela dieta de favos secos umedecidos com solução de mel a 75% apresentaram o menor número de mortes após exposição aos nematoides entomopatogênicos, em principal a espécie *S. feltiae*, com infecções de 90% para *S. puertoricense*, 92% para *H. bacteriophora*, *H. amazonensis* e *S. rarum*, e 76% de infecção para *S. feltiae*. Em contrapartida, as lagartas alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998), apresentaram as maiores médias de mortes após exposição às cinco espécies de NEPs avaliadas, correspondendo a um maior

índice de infecções por estes nematoides, sendo de 98% de infecção das lagartas pelos NEPs *H. bacteriophora*, *S. puertoricense* e *S. feltiae*; e de 96% para as espécies *H. amazonensis* e *S. rarum*.

As espécies *S. puertoricense* e *S. rarum* apresentaram índices de infecção próximos e iguais estatisticamente para os tratamentos com lagartas alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) e dieta modificada, ambas com índice de infecção superior a 96%, enquanto que as espécies *H. bacteriophora*, *H. amazonensis* e *S. feltiae*, obtiveram maior sucesso de infecção com níveis acima de 96% sobre as lagartas de *G. mellonella* alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998).

4.3.2 Virulência de Nematoides entomopatogênicos a lagartas de *G. mellonella*

Para a avaliação de virulência, foram contabilizadas as horas necessárias para a morte dos insetos após exposição aos nematoides. Os resultados obtidos estão na tabela 12 a seguir. Os resultados se mostraram significativos e diferentes entre si (p-value 0,0001).

Tabela 12 - Médias obtidas para o parâmetro de virulência de nematoides entomopatogênicos á *G. mellonella* alimentadas pelas diferentes dietas

Horas necessárias para a morte de <i>G. mellonella</i>					
Tratamento	<i>H. b.</i>	<i>H. a.</i>	<i>S. p.</i>	<i>S. r.</i>	<i>S. f.</i>
G. mel. D1	38,4	43,2	40,8	38,4	38,4
G. mel. D2	24	24	24	33,6	24
G. mel. D3	26,4	31,2	33,6	40,8	36

Valores nas linhas são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis (p< 0,05)

Heterorhabditis bacteriophora (*H.b.*)
Heterorhabditis amazonenses (*H. a.*)
Steinernema puertoricense (*S.p.*)

Steinernema rarum (*S.r.*)
Steinernema feltiae (*S.f.*)

Ao nível de comparação, as lagartas alimentadas pela dieta G. mel. D1+ H.a.; G. mel. D1+ S.p.; G. mel. D1+ H.b.; G. mel. D1+ S.r. e G. mel. D1+ S.f., apresentaram o maior tempo necessário para a morte de 51% das lagartas oferecidas, com 43,2; 40,8; 38,4 horas respectivamente. Enquanto os tratamentos provenientes de lagartas alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) (G. mel. D2), apresentaram os menores tempos para

causar a mortalidade das lagartas após exposição às cinco espécies de NEPs, desses o maior tempo necessário foi obtido pelo tratamento G. mel. D2 + S.r., com 33,6 horas de exposição para causar a virulência de 51% das lagartas. Para os tratamentos com lagartas alimentadas pela dieta modificada (G. mel. D3), o menor tempo para morte dos insetos foi obtido para a espécie *H. bacteriophora* com 26 horas.

A menor média do número de horas necessárias para causar a morte a 51% das lagartas oferecidas para aquelas alimentadas com a dieta de favos secos, foi obtido nos tratamentos G. mel. D1+H.b. (38,4); G. mel. D1+S.r. (38,4); G. mel. D1+S.f. (38,4), entretanto o tempo de virulência para esses tratamentos foi maior que os tratamentos que receberam lagartas alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) (G. mel. D2) e dieta modificada (Guerra, 1973) (G. mel. D3).

Desta forma temos que, o menor tempo necessário para causar a morte das lagartas é obtido com o uso da alimentação das mesmas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998), em que este tratamento apresentou o menor tempo e conseqüentemente a maior virulência entre os tratamentos para todas as espécies de NEPs. A menor virulência corresponde a maior unidade de tempo, foi encontrada no tratamento G. mel. D1+ H.a. com 43 horas necessárias para que o NEPs em questão cause a morte de 51% das lagartas expostas.

Os tratamentos em que as lagartas foram alimentadas pela dieta modificada (G. mel. D3), se apresentaram como intermediários neste parâmetro, não sendo as maiores e nem menores virulências, porem se assemelhou estatisticamente ao tratamento G. mel. D1 para as espécies *S. rarum* e *S. feltiae*, em que os NEPs precisaram de 40,8 e 36 horas respectivamente para causar a virulência de 51% das lagartas oferecidas.

Em representação gráfica de Box Plots (fig. 24), pode-se observar que apenas os tratamentos que utilizaram a dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) (G. mel D2) se apresentaram diferentes dos demais, com menor tempo necessário para que os nematoides entomopatogênicos possam causar a morte das lagartas de *G. mellonella*.

Figura 24 - Comparação de Virulência (em horas para a morte) das lagartas de *G. mellonella* com o uso de nematoides entomopatogênicos



Valores são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

4.3.3 Multiplicação de nematoides entomopatogênicos em lagartas de *G. mellonella*

Após a exposição das lagartas alimentadas pelas três diferentes dietas às cinco espécies de nematoides entomopatogênicos e suas respectivas mortes, as lagartas foram postas em armadilha de White para incubação e obtenção da prole dos juvenis infectantes que parasitaram as lagartas. Os resultados desta avaliação correspondem ao parâmetro de multiplicação de nematoides entomopatogênicos, parâmetro este que finaliza a série de análises realizadas e determina se a dieta artificial oferecida as lagartas podem influenciar no sucesso da manutenção de NEPs em laboratório. Os dados são apresentados na tabela 13.

Os tratamentos para este parâmetro se mostraram diferentes estatisticamente (p -value 0,0001). Os tratamentos correspondentes as lagartas alimentadas com dieta de favos secos umedecidos com sol. mel a 75% (G. mel. D1) apresentam o menor índice de juvenis infectantes (JIS) para cada 5 ml de suspensão entre os demais, sendo os menores números encontrados com o oferecimento de lagartas alimentadas

por essa dieta como hospedeiros para as espécies *S. rarum* e *S. feltiae* com 127.475 JIS /5ml de suspensão.

Tabela 13 - Médias obtidas para o parâmetro de multiplicação de nematoides entomopatogênicos em *G. mellonella* alimentadas pelas diferentes dietas

Número de juvenis infectantes de nematoides entomopatogênicos em lagartas de <i>G. mellonella</i>					
Tratamento	<i>H. b.</i>	<i>H. a.</i>	<i>S. p.</i>	<i>S. r.</i>	<i>S. f.</i>
G. mel. D1	128906,8	148587,2	142989,2	127475	127475
G. mel. D2	235430,5	263402,5	267456,3	254406,7	269912,4
G. mel. D3	243137,4	176303,8	198368,6	198812,8	181687,2

Valores nas linhas são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Heterorhabditis bacteriophora (*H.b.*)

Steinernema rarum (*S.r.*)

Heterorhabditis amazonenses (*H. a.*)

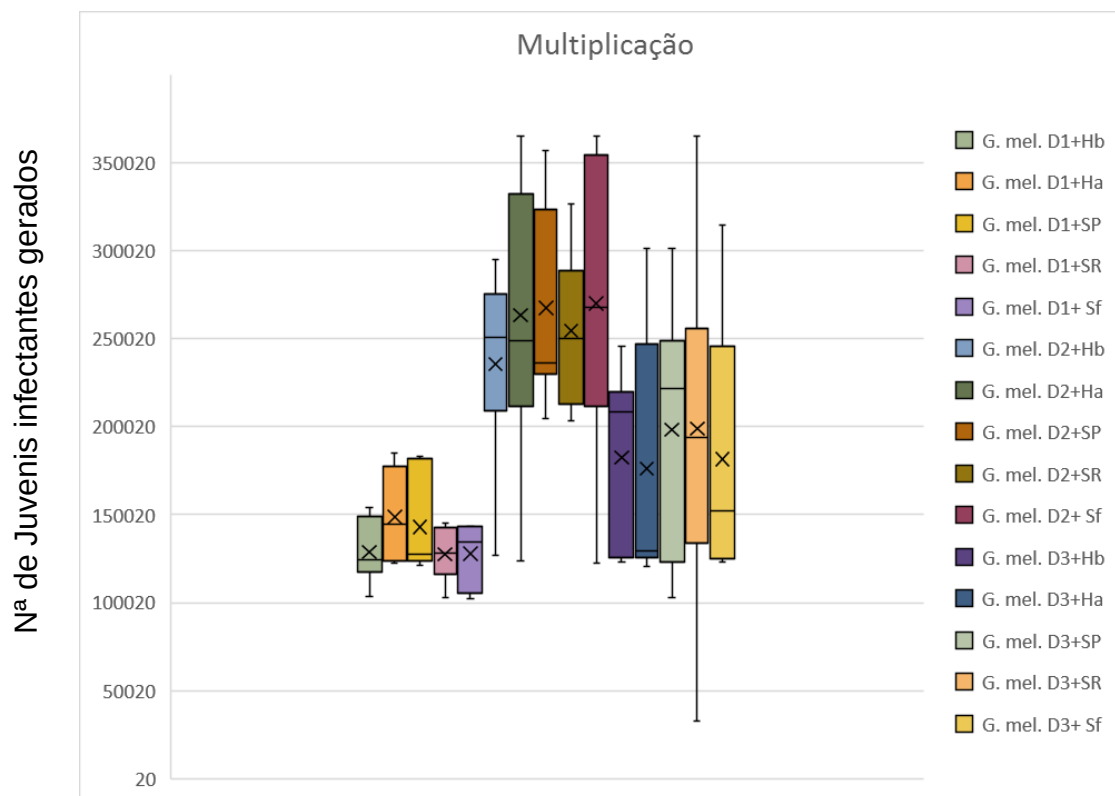
Steinernema feltiae (*S.f.*)

Steinernema puertoricense (*S.p.*)

Os maiores níveis populacionais de JIS foram encontrados com o uso de lagartas alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) (G. mel. D2) oferecidas como hospedeiras aos nematoides *S. feltiae*, *S. puertoricense*, *H. bacteriophora* e *S. rarum*, com prole de 269.912,4 JIS, 267.456,3 JIS, 263.402,5 JIS e 254.406,7 JIS em média para cada 5ml de suspensão. Para a espécie *H. bacteriophora* o número de juvenis obtido foi menor que numero encontrado com o uso da dieta modificada (Guerra, 1973), com 235.430,5 JIS contra 243.137,4 JIS respectivamente, conforme representado na figura 25.

Ainda referente a dieta G. mel. D3, o menor número de JIS obtidos foi referente ao uso das lagartas como hospedeiras de *H. bacteriophora* com 176.303,8 JIS/5ml de suspensão. Para as espécies *S. puertoricense* e *S. rarum* este número se mostrou semelhante para ambas as espécies com 444,2 JIS de diferença.

Figura 25 - Comparação de multiplicação de NEPS em *G. mellonella*



Valores são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Conforme os dados obtidos na etapa I e etapa II, a dieta artificial com uso de favos secos umedecidos com solução de mel a 75%, se mostrou ineficiente em criação de *G. mellonella* para oferecimento como hospedeiras as espécies de nematoides entomopatogênicos em laboratórios, apresentando os menores e piores valores para todos os parâmetros avaliados.

A dieta artificial adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) constituída de leite em pó integral, mel, farinha de aveia, gérmen de trigo e proteína de soja, apresentou médias significativas e satisfatórias sobre as demais dietas avaliadas nesta pesquisa, se mostrando eficiente para uso na alimentação de *G. mellonella* em laboratórios de nematologia, a serem oferecidas como hospedeiras aos nematoides entomopatogênicos. E melhor desempenho também na infecção, virulência e multiplicação de *H. bacteriophora*, *H. amazonensis*, *S. puertoricense*, *S. rarum* e *S. feltiae*, demonstrando que o uso desta dieta favoreceu principalmente a multiplicação de nematoides entomopatogênicos, o que se espera de uma criação para manutenção de espécies em laboratório.

A dieta realizada pelo Instituto biológico de Campinas (modificada de Guerra, (1973)), foi similar em alguns parâmetros a dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998), e em outros se assemelhou a dieta com uso de favos umedecidos. Apresentou também medias inferiores à dieta 2 em relação à multiplicação e virulência dos nematoides entomopatogênicos, e se assemelhando a dieta de favos secos em relação à infecção das lagartas pelos NEPs.

5 DISCUSSÃO

Este estudo buscou o desenvolvimento de uma dieta artificial para a criação de *G. mellonella* a ser oferecida como hospedeira a nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*. Essa dieta deve ser capaz de proporcionar o melhor desenvolvimento dos insetos e a permanência de parte dos indivíduos em estágio larval, para existir uma escala no fornecimento de lagartas, de modo a dispor continuamente de indivíduos em estágio larval. A dieta deve ainda promover ou não interferir nos processos de infecção, virulência e multiplicação de NEPs em laboratório.

5.1 Avaliação da resposta de *G. mellonella* a nova dieta artificial adaptada

Para os insetos o fator nutricional está relacionado diretamente aos aspectos de sua biologia, incluindo comportamento, fisiologia, morfologia e ecologia (SCRIBER e SLANSKY JR., 1981). Toda a alimentação feita durante a fase larval é importante para os insetos holometabólicos, pois influencia no desenvolvimento dos insetos, para chegarem a fase adulta com sucesso em suas metamorfoses, sem deformações, aptos a dispersão e a reprodução (SCHOWALTER, 2011).

Alguns autores consideram que as dietas que não possuem mel, pólen ou favos em sua composição, não atendem as necessidades nutricionais de *G. mellonella* e que as dietas devem conter carboidratos, proteínas e lipídios (NIEMXERKO e WLODAWER, 1950; DADD, 1964; COSKUN, KAYIS, *et al.*, 2006). Para as dietas avaliadas nesse estudo, a dieta de favos secos umedecidos se mostrou rica em energia, mas pobre em carboidratos e proteínas, o tratamento 2 é rico em proteínas, carboidratos e energia, e a dieta modificada de Guerra (1973) é rica em energia com valor considerável de carboidratos e proteínas. Em comparação, o tratamento 2 apresenta maiores valores em carboidratos e proteínas entre as demais, mas perde em valor energético para a dieta modificada de Guerra (1973).

Apesar de não ter sido avaliado o consumo das dietas pelas lagartas, foi possível observar no decorrer da pesquisa, que a fase imatura de *G. mellonella* teve preferência pelo tratamento 2 e tratamento 3 pois as consumiram mais. De modo geral, as lagartas toleraram as diferentes dietas, pois completaram seu desenvolvimento, apesar das baixas nas populações. O mesmo foi considerado por

COSKUN, KAYIS, *et al.* (2006), que em seu trabalho descrevem as lagartas da espécie serem tolerantes as diversas dietas existentes sem graves problemas em seu desenvolvimento, entretanto existe uma perda de peso quando a dieta não contém, ou contém pouco mel em sua composição, resultando em deficiência nutricional com consequente pupação precoce de até 50% da população.

Krams, Kecko, *et al.* (2015), em seu estudo, destacaram que a espécie *G. mellonella* tem desenvolvimento rápido na fase larval com maior peso corporal quando alimentadas com dietas altamente nutricionais, e que a má nutrição resulta em diminuição do tamanho, precoce pupal e consequente encurtamento do ciclo de vida. Isso sugere que a dieta modificada de Guerra (1973) pode não ser a ideal para os primeiros estágios de *G. mellonella*, nas condições desse experimento. Por outro lado, a dieta modificada de Guerra (1973), se assemelhou em alguns parâmetros a dieta do tratamento 2, e foi superior à dieta que utilizou favos secos, apresentando lagartas saudáveis com população considerável a cada geração, mostrando que essa diminuição de dias no ciclo de vida pode não ser negativa, ou pela falta de nutrientes na dieta.

Um ponto importante a ser considerado, é que as lagartas alimentadas pelo tratamento 2 apresentaram a mesma duração do ciclo de vida que a dieta com favos secos, mas em todos os parâmetros avaliados, demonstrou índices de influência positivos sobre a população, com maior número de fêmeas, consequentemente maior número de ovos depositados por cada fêmea, maior número de eclosões, menor número de mortes correspondendo a maior taxa de natalidade encontrada e a menor taxa de mortalidade entre as dietas avaliadas, com maior população entre os tratamentos, ao contrário da dieta de favos secos que foi negativa para todos os parâmetros apresentados.

Os resultados encontrados indicam que as principais influências para as avaliações desta etapa são os ingredientes que compõe as dietas. Sendo a relação proteínas: carboidratos as variáveis importantes. O mesmo foi obtido por RIBEIRO (2017) avaliando possíveis dietas para criação em laboratório de *Helicoverpa armigera*, o autor conclui que as dietas com as melhores proporções entre carboidratos e proteínas produzem indivíduos com desenvolvimento contínuo, além de as lagartas apresentarem maior aceitação para as dietas com esses elementos em

equilíbrio quando comparadas com as dietas com menores níveis dessas substâncias. Conforme obtido nesse experimento para as dietas do tratamento 2 e 3.

Em estudo realizado por Mohamed, Ansari, *et al.* (2014), os autores analisaram cinco dietas naturais no desenvolvimento e mortalidade de lagartas de *G. mellonella*, e concluíram que existem mudanças significativas do crescimento das lagartas, em que o oferecimento de favos novos, demonstrou ser uma dieta pobre em nutrientes, o que induz a uma maturação prolongada, capaz de diminuir ovos, tardando a oviposição e estendendo a duração do ciclo de vida, com consequente aumento na mortalidade em todas as fases de vida. Podendo indicar que ao contrário do esperado, o uso de elementos naturais nas dietas oferecidas em condições de laboratório, pode ter resultados negativos.

As dietas dos tratamentos 2 e 3, com proporção superior entre proteínas e carboidratos, acarretaram gerações com desenvolvimento contínuo e maior sobrevivência. Isso pode ter relação com a quantidade de proteínas presentes nas dietas, em que de acordo com alguns autores a proteína é essencial para o desenvolvimento, reprodução e sobrevivência dos insetos, atuando também na produção de lipídios que são importantes para as formas imaturas (PARRA, PANIZZI e HADDAD, 2012; COHEN, 2015).

Em relação às avaliações sobre a reprodução das gerações de *G. mellonella*, os parâmetros: número de ovos por fêmeas, número de eclosões, fêmeas geradas por fêmeas, taxa de natalidade, fecundidade total, fecundidade individual (fertilidade) e prole foram encontrados em maior nível para o tratamento 2, indicando que o nível de proteína existente nessa dieta é capaz de favorecer os parâmetros reprodutivos para a espécie. O mesmo foi observado por Cohen (2001) em seu trabalho, o qual concluiu que a dieta artificial utilizada rica em proteínas, influencia positivamente na capacidade reprodutiva dos insetos. CHAPMAN, SIMPSON e DOUGLAS (2013), complementam que a produção dos ovos está relacionada com a quantidade de proteínas do alimento ingerido pelas fêmeas durante a fase larval.

A taxa de natalidade para a dieta formulada com favos secos e solução de mel a 75% foi a menor entre os tratamentos e consequentemente a maior taxa de mortalidade foi encontrada nas gerações alimentadas por essa mesma dieta. Os resultados podem ser atribuídos a quantidade de carboidratos encontrada nas dietas,

pois segundo REINECKE (1985), os carboidratos estão relacionados com o suprimento de energia e fonte de carbono, além de seu envolvimento com funções estruturais da síntese de quitina, reservas nutricionais e produção de aminoácidos que por sua vez, produziram proteínas, o autor ainda complementa que os insetos necessitam de carboidratos na fase pré-imaginal e sua deficiência causa baixa vitalidade. PARRA, PANIZZI e HADDAD (2012) relatam que a adição de carboidratos pode atuar como fagoestimulantes em dietas artificiais, estimulando o consumo do alimento pelo inseto, contribuindo em sua nutrição em condições artificiais em laboratório.

A nível de comparação, os resultados encontrados pelos autores coincidem com as interferências negativas sofridas pelas gerações alimentadas com a dieta que utilizou favos secos e velhos umedecidos com solução de mel a 75%, em que para todos os parâmetros avaliados apresentou os piores índices entre os tratamentos, incluindo aqueles descritos acima mencionados pelos pesquisadores. Em contrapartida, MOHAMED, ANSARI, *et al.* (2014), quando utilizaram favos envelhecidos com pólen, obtiveram influencias positivas para as avaliações e vitalidade nas fases de desenvolvimento de *G. mellonella*. Entretanto, esse resultado pode ser atribuído ao uso de grãos de pólen pelos autores, visto que todos os tratamentos em que o pólen estava presente, tiveram uma diminuição acentuada dos dias de vida, exceto o único tratamento sem pólen, correspondente aos favos novos.

A capacidade de crescimento populacional e a taxa líquida de reprodução foram altamente influenciadas pela dieta oferecida as gerações, confirmando o maior sucesso reprodutivo para o tratamento 2 em comparação as demais. Os resultados demonstram o alto potencial biótico da espécie *G. mellonella* quando alimentada por dietas que oferecem condições nutricionais adequadas.

A variação do tempo de duração do ciclo de vida para às três dietas demonstra que o alimento oferecido as lagartas interfere no tempo entre o nascimento do individuo e os seus descendentes. Segundo RIBEIRO (2017), um tempo menor nesse parâmetro é desejável em criações em alta escala de insetos, visto que quão menor for o índice, maior é o número de gerações obtidas por ano. Sugerindo que a dieta modificada de Guerra (1973), é uma boa opção para a criação massal de *G. mellonella*.

Segundo Birch (1948), o parâmetro r_m está relacionado com os índices de fertilidade, mortalidade e tempo necessário para que uma população de insetos aumente em determinado ambiente. Para essa avaliação, encontra-se diferenças entre as populações avaliadas nesse experimento, em que o tratamento 2 se ressaltou sobre as demais, apesar de ser estatisticamente igual à dieta modificada de Guerra (1973). Esse parâmetro quando utilizado para comparações entre dietas, indica que a dieta com maior valor nutritivo, como apresentado pelo tratamento 2, tem as melhores características para multiplicar os insetos, e a que apresenta baixo valor nutricional como a dieta formulada por favos secos umedecidos com mel, não prove condições necessárias para o desenvolvimento da espécie (COHEN, 2015).

Em relação ao número de fêmeas gerados por fêmeas, o maior valor representado na taxa finita de aumento, foi obtido para a dieta modificada de Guerra (1973), seguida do tratamento 2, se igualando estatisticamente. E o menor tempo de duração para a duplicação da população foi encontrado apenas nas populações alimentadas pelo tratamento 2.

Os parâmetros de desenvolvimento, se mostraram essenciais para a seleção do melhor regime alimentar a ser oferecido as lagartas de *G. mellonella*, comprovando a relação entre o equilíbrio nutricional com o aumento populacional. Para certificar a capacidade real da dieta manter os parâmetros avaliados é necessário o acompanhamento das populações por algumas gerações (COHEN, 2015), como o que foi realizado nessa pesquisa, em que o acompanhamento se deu durante oito gerações das populações para cada dieta.

O tratamento 2 correspondeu a todas as exigências descritas por Parra (2012) onde proporcionou desenvolvimento ótimo na fase imatura com 75% de sobrevivência, promoveu a alta capacidade reprodutiva em adultos, mantiveram o vigor no decorrer das gerações, insumos de baixo custo, ingredientes disponíveis, fácil preparo, mantém as características iniciais durante armazenamento por até 15 dias.

Essa etapa demonstra que o conhecimento de uma espécie em relação a sua alimentação, pode ser obtido pelo uso de parâmetros de desenvolvimento populacional de *G. mellonella* em laboratório. Os resultados encontrados para a etapa, destacam a influência de aspectos físicos das dietas oferecida a *G. mellonella* e sugerem que as pequenas alterações na proporção proteína: carboidrato pode intervir

na criação a níveis críticos. Dessa forma, com a utilização de regime alimentar artificial para criações de *G. mellonella*, com adaptações, se espera que os estudos aplicados possam promover informações consistentes a pesquisadores de nematoides entomopatogênicos sendo capaz de manter as populações da espécie em escala de fornecimento aos NEPs, de modo que não falem lagartas para a implantação de experimentos. Contribuindo para o desenvolvimento de pesquisas com tais agentes de controle biológico.

5.2 Avaliação da relação entre os NEPs e as lagartas alimentadas pela nova Dieta adaptada

As lagartas de 6º instar alimentadas pelas três dietas foram suscetíveis aos nematoides, apesar dos níveis diferentes apresentados pelas mesmas.

O número de insetos mortos, correspondente a infecção, indica a maior suscetibilidade das lagartas alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) e pela dieta modificada de Guerra (1973), pois apresentaram o maior número de lagartas mortas entre os tratamentos para às cinco espécies de NEPs avaliadas. A espécie *S. feltiae* apresentou os menores números de insetos mortos entre os NEPs avaliados para as lagartas alimentadas pela dieta de favos secos e pela dieta modificada de Guerra (1973), e maior número de mortes para as lagartas alimentadas pela adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) tanto entre as lagartas quanto entre as espécies de NEPs.

Alguns autores declaram que a suscetibilidade aos NEPs está relacionada com o tamanho larval, em que quão maiores as lagartas, menor seria a sua vulnerabilidade aos nematoides entomopatogênicos (GOTTHARD, 2008; DAMME, BECK, *et al.*, 2016; VAILLANT, 2019), o que não foi observado nesse trabalho, visto que as maiores infecções foram obtidas pelos tratamentos que apresentaram lagartas de 6º instar em maior tamanho, correspondentes as alimentadas pelas adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) e modificada de Guerra (1973), com 15,87 mm x 5,75 mm e 15,37 mm x 5,56 mm respectivamente, enquanto os tratamentos com as menores lagartas (alimentadas pela dieta de favos), com 13,12 mm x 3,75 m, teve o menor número de lagartas infectadas pelos NEPs.

As lagartas alimentadas pela dieta de favos secos umedecidos com mel apresentaram menor infecção, maior tempo necessário para causar a virulência dos insetos e menor multiplicação dos NEPs, fato que pode ser explicado pelo pequeno porte das lagartas, que limitou o recurso nutricional reduzindo os parâmetros ou por influências fisiológicas entre a alimentação do inseto e seu sistema imune (ZIL e MALAN, 2015; TOURTOIS, ALI e GRIESHP, 2017).

O menor tempo para a virulência foi encontrado para os tratamentos que utilizaram lagartas alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) em todas as espécies de nematoides entomopatogênicos avaliadas, com destaque para a espécie *H. bacteriophora* que causou a mortalidade de 98% da população oferecida em 24 horas de exposição, para as lagartas alimentadas por essa dieta. Esse mesmo nematoide também apresentou tempos menores para as lagartas alimentadas pelas outras dietas. Entretanto, todos os tratamentos se mostraram no período de tempo necessário para causar a mortalidade dos insetos de 24 a 48 horas, conforme dito por POINAR JR. (1990).

A maior produção de juvenis mL⁻¹ encontrada nos cadáveres é atribuída aos tratamentos que continham lagartas alimentadas pela Dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998), em que a maior população de JIs foi obtida para a espécie *S. feltiae* o que pode ser explicado por RAHOO, MUKHTAR, et al. (2019), que em seu trabalho dizem que quanto maior o inseto, maior é a multiplicação de juvenis infectantes. Em contrapartida, os tratamentos com lagartas alimentadas por favos umedecidos com solução de mel a 75% e dieta modificada de Guerra (1973) se igualaram no parâmetro multiplicação de nematoides entomopatogênicos, sendo a menor população de JIs encontrada para a espécie *S. feltiae* e *H. amazonensis* respectivamente.

Essa produção baixa de JIs menor nas lagartas alimentadas pela dieta modificada de Guerra (1973), mesmo que tenham apresentado lagartas de estrutura semelhante ao nível estatístico das lagartas alimentadas pela dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998), é contrária aos resultados encontrados pelos pesquisadores FLANDERS, MILLER e SHIELDS (1996), em que o inseto com maior massa corporal terá maior produção de JIs mL⁻¹, concluindo que a massa corporal do hospedeiro interfere na produção de

NEPs. O que indica uma possível interferência não do tamanho das lagartas, mas sim da alimentação das lagartas sobre o processo de reprodução e multiplicação de nematoides entomopatogênicos.

Outro ponto a ser considerado para a multiplicação de nematoides entomopatogênicos é a constituição do ambiente líquido que ocorre a reprodução, em que a presença de lipídios é a mais importante, pois mais de 60% do conteúdo corporal dos juvenis infectantes é formado por lipídios (VAILLANT, 2019), refletindo em certa dependência desse macronutriente como fonte de energia e nutrição dos JIs ao emergir do cadáver (HATAB, GAUGLER e EHLERS, 1998; HATAB e GAUGLER, 2001).

Considerando que a massa corporal de *G. mellonella* é constituída por 50% de lipídios (VAILLANT, 2019) e que a dieta com maior teor de proteínas oferecidas as lagartas corresponde a dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998), e ainda que as proteínas sintetizam grande parte dos ácidos graxos que por sua vez produzem lipídeos, pode-se dizer que seria esse o fator indicativo de que a dieta utilizada pelas lagartas pode contribuir nos processos reprodutivos e de produção de JIs de NEPs, sendo a dieta adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) a melhor dieta para produção de nematoides entomopatogênicos, uma vez que a falta de lipídeos pode resultar em número menor de juvenis infectantes (HATAB e GAUGLER, 2001), indicando a perda de gordura para as lagartas alimentadas pelas outras dietas avaliadas, ou que não foram produzidas em quantidade suficiente para beneficiar os NEPs.

Apesar das lagartas alimentadas pela dieta modificada de Guerra (1973), serem grandes, seu conteúdo nutricional pode ser baixo para a multiplicação de nematoides entomopatogênicos, indicando um baixo teor de lipídios, devido a esse ser a principal fonte de nutrição e energia dos nematoides entomopatogênicos é o fator limitante para a produção de nematoides entomopatogênicos (PATEL, STOLINSKI e WRIGHT, 1997; VAILLANT, 2019).

Outro fator que pode ter influenciado nessa diferenciação entre as dietas adaptada de Jorjão et al. (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) e modificada de Guerra (1973), seria o sistema imunológico, baseado em

fatores de reconhecimento, protegendo de maneira eficiente e rápida a infecção por parasitas. Esse sistema é altamente desenvolvido, com componentes celulares e humorais acionados na invasão (HOFFMANN, 1995).

Visto que, embora os NEPs tenham liberado suas bactérias simbiotes na hemolinfa dos insetos, causado infecção e virulência, a resposta do sistema imune de *G. mellonella* pode ter sido desencadeada, acontecendo o encapsulamento ou a melanização dos patógenos, impedindo o êxito do processo de infecção, resultando na redução na reprodução e população dos nematoides (GIRLING, ENNIS, *et al.*, 2010), o que pode indicar ser a dieta modificada de Guerra (1973) favorável as lagartas de *G. mellonella* por beneficiar seu sistema imunológico, e consequentemente desfavorável aos NEPs, pelo mesmo motivo, sugerindo que essa dieta não é conveniente para criações que serão oferecidas como hospedeiras de nematoides entomopatogênicos.

Por fim, pode-se considerar que a alimentação das lagartas tem influências sobre os processos de infecção, virulência e multiplicação de nematoides entomopatogênicos das espécies *H. bacteriophora*, *H. amazonensis*, *S. puertoricense*, *S. rarum* e *S. feltiae*, em que lagartas alimentadas pela dieta de favos secos umedecidos com solução de mel a 75% comprometendo a produção de NEPs, a alimentação de *G. mellonella* pela dieta adaptada de Jorjão *et al.* (2018), baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998) contribui para a produção de NEPs e a dieta modificada de Guerra (1973) é uma boa opção para alimentação das lagartas de *G. mellonella*, mas não é favorável aos NEPs. Com base nos resultados encontrados, aceita-se a hipótese alternativa (H1) e a hipótese nula é recusada, alcançando os objetivos da pesquisa.

Para complementar sugere-se que sejam avaliados em outros trabalhos o estudo da abordagem nutricional quantitativa da dieta, os elementos presentes na hemolinfa das lagartas alimentadas por essa dieta e o plaqueamento das bactérias simbiotes nas mesmas, para avaliação de desempenho e formação de colônias.

6 CONCLUSÃO

A dieta Adaptada de Jorjão et al. (2018, baseada em Guerra (1973) e modificada de Parra (1998)) é capaz de melhorar o desempenho do desenvolvimento da *G. mellonella*, proporciona a possibilidade de escalonamento da criação, se mostrando como uma boa opção em pesquisas com nematoides entomopatogênicos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2007. p. 1-33.
- AGROFIT. Agrofit. **Consulta de produtos formulados: *Heterorhabditis***, 2019. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 06 jul. 2022.
- ALMENARA, D. P. *et al.* Nematoides entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose. **Revista da Biologia**, v. 6, p. 1-6, 2010.
- ALMENARA, D.P; ROSSI, C., N. M. R. C.; WINTER, C.R. Nematóides entomopatogênicos. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. São Paulo: Instituto nacional de ciência e tecnologia em entomologia molecular, 2012. p. cap.16.
- AMARASINGHE, L.D. Entomopathogenic Nematodes from the Coastal Belt of Sri Lanka and their Efficacy in Controlling Termites. **Pest Technology** 2 (2), 125-129. 2008.
- BIRCH, L. C. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. **The Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 17, p. 15-26, 1948.
- BIRD, A.F.; BIRD, J. Observations on the use of insect parasitic nematodes as a means of biological control of root-knot nematodes. International. **Journal for Parasitology**, v. 16, p. 511, 1986.
- BODE, H.B. Entomopathogenic bacteria as source of secondary metabolites.. **Curr. Opin. Chem. Biol.** , n. 13, p. 224-230, 2009.
- BRIDA, A. L. *et al.* Situação atual e perspectiva do emprego de neps no manejo de insetos-praga. **ANAIS - 35º Congresso Brasileiro de Nematologia** , Bento Gonçalves, 2018. 55-56.
- BRIGHENTI, D. M.; BRIGHENTI, C. R. G.; CARVALHO, C. F. traça da cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) em favos de *Apis mellifera* Linnaeus (1758) (Hymenoptera: Apidae) - Noções Gerais.. **Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíficas Européias**, v. 89, p. 2, 2006.
- CARDOSO, A. C. *et al.* Exigências térmicas de estágio de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotrop. entomol.**, v. 36, n. 5, p. 657-661, 2007.
- CARDOSO, D.O. Potencial e caracterização do isolado de nematoide entomopatogênico lpp35 como agente no controle de formas imaturas de *Aedes aegypti*. **Dissertação (mestrado)**. Campos dos Goytacazes : Universidade, 2014. p. 76 f..
- CARVALHO, L. B. Efeito "*in vitro* e *in vivo*" de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) sobre o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2008. p. 37 f.

CHAPMAN, R. F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E. The insects: structure and function. **Cambridge University Press**, Cambridge, p. 398-462, 2013.

CHARRIERE, J.D.; IMDORF, A. Protection of honey combs from wax moth damage. **Am Bee J.**, n. 139, p. 627-630, 1999.

CICHE, T.A., KIM, K-S., KAUFFMAN-DASZCZUK, B., NGUYEN, K.C.Q. ; HALL, D.H. Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. **App. Environ. Microbiol.** 74, 2275-2287. 2008.

CLARKE, D. J. *Photorhabdus* : a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. **Cell. Microbiol.**, n. 10, p. 2159-2167, 2008.

COHEN, A. C. Formalizing insect rearing and artificial diet technology. **American Entomologist**, Lanham, v. 47, p. 198-206, 2001.

COHEN, A. C. **Insect diets**: science and technology. Boca Raton: CRC Press, 2015. 1-164 p.

CORREIA, M. E. F. **Relação entre a diversidade da fauna de solo e o processo de decomposição e seus reflexos sobre a estabilidade dos ecossistemas**. Documento 156. ed. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 33 p.

COSKUN, M. *et al.* Effects of different honeycomb and sucrose levels on the development of greater wax moth *Galleria mellonella* larvae. **Int J Agril Biol.**, n. 8, p. 855-858, 2006.

COSTA, J. C. R. estudo da ecologia de infecção de nematoides entomopatogenicos *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (rhabditida: heterorhabditidae, steinernematidae) em *Alphitobius diaperinus* (coleoptera: tenebrionidae).

DISSERTAÇÃO (MESTRADO). Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2006. p. 109 f.

DABORN, P.J. *et al.* Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. **J. Bacteriol.**, n. 183, p. 5834-5839, 2001.

DABORN, P.J. *et al.* A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects.. **PNAS**, n. 99, p. 10742-10747, 2002.

DADANT, C. C.; HIJOS. **La colmena y la abeja melifera**. Uruguai: Editorial Hemisferio Sur, 1975. 936 p.

DAMME, V. M. V. *et al.* Efficacy of entomopathogenic nematodes against larvae of *Tuta absoluta* in the laboratory. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1702-1709, 2016.

DAMASCENA, A.P. Nematoides entomopatogênicos para o controle de nematoide-das-galhas *Meloidogyne enterolobii*. Botucatu- SP. **Dissertação (Mestrado)** -

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2019

DEVI, G. Mass production of entomopathogenic nematodes- a review. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 3, p. 1032-1043, 2018.

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

DOWDS, B.C.; PETERS, A. Virulence mechanisms. In: GAUGLER, R **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 79-98.

DUNN, P.E. Biochemical aspects of insect immunology. **Annual review Entomology**, n. 31, p. 321-339, 1986.

DUTKY, S.R.; THOMPSON, J.V.; CANTWELL, G.E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **J. Insect. Pathol**, v. 6, p. 417-422, 1964.

ELEFThERIANOS, I. *et al.* An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. **PNAS** , n. 104, p. 2419-2424, 2007.

ELEFThERIANOS, I. *et al.* A single locus from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* inhibits activated *Manduca sexta* phenoloxidase.. **FEMS Microbiol**, n. 293, p. 170-176, 2009.

ELLIS, J.D.; GRAHAM, J.R.; MORTENSEN, A. Standard methods for wax moth research. **J of Apicult Res.** , n. 52, p. 1-17, 2013.

FERRAZ, L. Nematoides entomopatogênicos. In: Alves, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2ª Ed. revisada e atualizada. Cap. 16, p. 541-569. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 1998.

FFRENCH-CONSTANT, R.H. *et al.* *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen.. **FEMS Microbiol. Reviews**, n. 26, p. 433-456, 2003.

FLANDERS, K. L.; MILLER, J. M.; SHIELDS, A. J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. **Journal Econonic Entomology**, v. 89, n. 2, p. 373-380, 1996.

FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria-nematode Symbiosis. In: GAUGLER R **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CAB International, 2002. p. 57-78.

FUGA, C. A. G.; FERNANDES, R. H.; LOPES, E. A. Nematoides entomopatogênicos. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** , v. 6, n. 3, p. 56-75, 2012.

GARCIA, E. S. *et al.* O sistema neuroendócrino dos insetos. In: **Tópicos avançados em Entomologia Molecular**: Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Entomologia Molecular INCTEM, 2012.

GARCIA, E.S. *et al.* Trypanosoma rangeli: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. **Parasites and Vectors**, n. 2, p. 33, 2009.

GARCIA L. C, RAETANO C. G, LEITE L. G. Tecnologia de aplicação dos nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) para controlar *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotrop. Entomol.** ;37:305–311. 2008.

GAUGLER, R. Entomopathogenic Nematology. **CABI Publishing**, pp.402. New York, NY, USA. 2002.

GIRLING, R. D. *et al.* The lethal and sub-lethal consequences of entomopathogenic nematode infestation and exposure for adult pine weevils, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 195-202, 2010.

GLAZER, I. Invasion rate as a measure of infectivity of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes to insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 90-94, 1992.

GOODRICH-BLAIR, H.; CLARKE, D. J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Molecular Microbiology**, Volume: 64, Issue: 2, Pages: 260-268, 2007.

GOTTHARD, K. Adaptive growth decisions in butterflies. **BioScience**, v. 58, n. 3, p. 222-230, 2008.

GOULART, A.M.C. Diversidade de nematoides em agroecossistemas e ecossistemas naturais / Alexandre Moura Cintra Goulart. – Planaltina, DF : **Embrapa Cerrados**, 71 p. 2007.

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

GREWAL, P.; DE NARDO, E.A.B.; AGUILLERA, M.M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotrop. Entomol.**, v. 30, p. 191-205, 2001.

GUERRA, M. S. Bionomia das traças de cera *Galleria mellonella* L. e *Achroia grisella* F. (Lepidóptera, Galleridae) no Município de Piracicaba. **Dissertação (Mestrado em entomologia)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1973. p. 133 f..

GULLAN, P. J.; CRASNSTON, P.S. Anatomia Interna e Fisiologia. In: GULLAN, P. J.; CRASNSTON, P.S. **Os Insetos Um Resumo de Entomologia**. 2°. ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 54-57.

- HATAB, M. A.; GAUGLER, R. Diet composition and lipids of in vitro-produced *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biological Control**, v. 20, p. 1-7, 2001.
- HATAB, M. A.; GAUGLER, R.; EHLERS, R. I. Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 215-221, 1998.
- HERBERT, E. E.; GOODRICH-BLAIR, H. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. **Nature Reviews Microbiol.** , n. 5, p. 634-646, 2007.
- HILLYER, F. J. Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental and Comparative Immunology** , n. 58, p. 102-118, 2016.
- HOFFMANN, J.A. Innate immunity of insects. **Cur. Opinion in Immunol.**, v. 7, p. 4-10, 1995.
- HOFFMANN, J.A. Antifungal defense in *Drosophila*. **Nat Immunol.**, v. 8, n. 6, p. 543-545, 2007.
- HUNT, D. J. Introduction. In: NYGUEN, K. B.; HUNT, D. J. **Entomopathogenic Nematodes: systematic, phylogeny and bacterial symbionts**. Leiden: Brill, 2007. p. 1-26.
- JEAN-BAPTISTE, M.C. Nematoides entomopatogênicos e sua compatibilidade com inseticidas químicos no controle de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Dissertação (Mestrado) em Fitossanidade**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2020. p. 58 f..
- JORJÃO, A.L. *et al.* From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 2018.
- JOYCE, S. A. *et al.* Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. **Angew Chem Int**, n. 47, 2008.
- KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 101-112, 2004.
- KAYA, HK ; GAUGLER, R. Nematóides entomopatogênicos. **Annual Reviews in Entomology**, 38, 181-206. 1993.
- KIM, Y. *et al.* Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* share an inhibitory action against phospholipase A2 to induce host immunodepression. **J. Inverteb. Pathol**, n. 89, p. 258-264, 2005.
- KOPPENHÖFER, A.M., R.S. COWLES, E.A. COWLES, E.M. FUZY & L. BAUMGARTNER. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, 24: 90-97. 2002
- KOPPENHÖFER, A.M., I.M. BROWN, R. GAUGLER, P.S. GREWAL, H.K. KAYA & M.G. KLEIN. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white grubs: greenhouse and field evaluation. **Biological Control**, 19: 245-251. 2000.

KOPPENHÖFER, AM. Nematóides. In: Lacey, LA, Kaya, HK (eds) Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. **Springer**, Dordrecht. 2007.

KWADHA, A. *et al.* The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Insects**, n. 8, 2017.

LAMANA, C. X.; BRANCO, P. M. Serviço Geológico do Brasil - SGB/CPRM. **Canal Escola - Brasil- Breve História da Terra**, 2009. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/publique/SGB-Divulga/Canal-Escola/Breve-Historia-da-Terra-1094.html?tpl=printerview>. Acesso em: 14 jun 2022.

LAWRENCE, J.L., HOY, C.W. ; GREWAL, P.S. Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematodes in a heterogeneous vegetable production landscape. **Biological Control**. 37, 247-255. 2006.

LEITE, L. G. **Tecnologia sustentável. Nematóides contra insetos**. Campinas : Instituto Biológico de Campinas, 2015.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**, n. 25, p. 697-743, 2007.

LI, X. Y. *et al.* Characterization of immunosuppressive surface coat proteins from *Steinernema glaseri* that selectively kill blood cells in susceptible hosts.. **Mol. Biochem. Parasitol.**, n. 165, p. 162-169, 2009.

MANGUM, W.A. Honey bee biology. **America-Bee-Journal**, v. 140, n. 6, p. 431-433, 2000.

MCGILL, R.; TUKEY, J. W.; LARSEN, W. A. Variations of Box Plots. **The American Statistician**, v. 32, n. 1, p. 12-16, 1978.

MOHAMED, A.A. *et al.* Effect of larval nutrition on the development and mortality of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).. **Revista Colombiana de Entomología**, n. 40, p. 49-54, 2014.

MONTEIRO, C. M. O. *et al.* Entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulations for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 310-317, 2014.

MONTORO, E. Análise Box-Plot: ERMONTORO. **ERMONTORO**, 2020. Disponível em: <https://www.ermontoro.com/post/box-plot-versatility>. Acesso em: 15 jun 2022.

MORSE, R.A. **Honey Bee Pests, Predators, and Diseases**. 1978. 430 p.

NEGRISOLI JR., A.S., C.R.C. BARBOSA e A. MOINO JR. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC / WPRS. 2008. **Nematologia Brasileira**. Piracicaba - SP. Vol. 32(2). 111-116. 2008.

OLIVEIRA, L. M. G.; KANASHIRO, M. K. **Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, v. 2, 2010. 248 p.

- OROZCO, J. G. C. Caracterização e virulência de bactérias simbiontes de nematoides entomopatogênicos nativos do Brasil, e toxicidade de seus metabolitos secundários para lagartas de traça da colmeia (Lepidoptera: Pyralidae). **Dissertação (mestrado)**: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014. p. 63 f.
- PALMER, W. J.; JIGGINS, F. M. Comparative Genomics Reveals the Origins and Diversity of Arthropod Immune Systems.. **Molecular Biology Evolution** , v. 32, n. 8, p. 2111-2129, 2015.
- PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. ESALQ/FEALQ, 2001.
- PARRA, J. R. P.; PANIZZI, A. R.; HADDAD, M. L. Nutritional indices for measuring. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Boca Raton: CRC, 2012. p. 13-49.
- PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, Sérgio B. In: **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 1015- 1037. 1998.
- PATEL, M. N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D. J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. **Parasitology**, v. 114, p. 489-496, 1997.
- PEREIRA, R. A. *et al.* Nematoides entomopatogênicos. In: SILVA, D. A. S. **Agronomia: elo da cadeia produtiva**. Ponta Grossa: Atena Editora, v. 6, 2019. Cap. 3, p. 22-32.
- PIROVANI, V.D. Métodos de manejo para *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) na cultura do morangueiro. **Tese de doutorado – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias**. Alegre, 2016. p. 113 f.
- POINAR JR., G. O. **The natural history of nematodes**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, Inc., 1983. 350 p.
- POINAR JR., G. O. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R., K. H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. [S.l.]: [s.n.], 1990. p. 26-61.
- POINAR JR., G. O. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Fundam. appl. Nematol.**, França, v. 16, n. 4, p. 333-338, 1993.
- POINAR, Jr., G. O.; PAFF, M. Laboratory infection of terrestrial isopods (Crustacea : Isopoda) with neoaplectanid and heterorhabditid nematodes. **F. Invert. Pathol.**, v. 45, p. 24-27, 1985.
- POPIEL, I.; HOMINICK, W.M. **Nematodes as biological control agents: part II. Advances in Parasitol.** 31, 381-431. 1990.
- POWNING, R.F.; DAVIDSON, W.J. Studies on insect bacteriolytic enzymes. I. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*. **Comp Biochem Physiol B**, n. 45, p. 669-686, 1973.

QUINTINO, V.L. Valores energéticos da glicerina e óleos residuais de soja determinados com frangos de corte. Rio Verde - **Dissertação (mestrado)** apresenta ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, 39 f. 2012.

RAHOO, A. M. *et al.* Relationship between the size of *Galleria mellonella* larvae and the production of *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 51, p. 79-84, 2019.

RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. Role of hemocytes in defense against biological agents. In: GUPTA, A.P **Insect hemocytes**. 1979. p. 331-414.

REINECKE, J. P. Nutrition: artificial diets. In: KERKUT, G. A.; I., GILBERT L. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press., v. 4, 1985. p. 391-420.

RIBEIRO, Z. A. Dieta artificial e metodologia de criação massal para o bem-estar de *Helicoverpa armigera*. **Tese (doutorado)**, Jaboticabal, p. 122p., 2017.

RIOS DIEZ, J. D. Sistema imune de insetos: caracterização de inibidores de proteases do tipo serpin e análise proteômica da hemolinfa de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). **Tese (doutorado)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2018. p. 79 f..

ROCHA, N.N. Controle da broca do abacate, *Stenoma catenifer*, com *Heterorhabditis amazonensis*. **Universidade Federal de Uberlândia**, Monte Carmelo, p. 21 f., 2017.

SABINO, A.R. *et al.* Uso associado do óleo de nim e nematoide entomopatogênico no controle de *Rhynchophorus palmarum*. **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia – CONTECC.** , Maceió, 2018.

SAINT-EXUPÉRY, A. D. **O pequeno príncipe**. Tradução de G. MIRANDA. Ed. especial. ed. Cotia: Pandorga, 2020. 208 p.

SALAMITOU, S. *et al.* The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. **Microbiology (Reading)**, v. 146, n. 11, p. 2825-2832, 2000.

SANTOS, V. Potencial de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) para o controle de *Diabrotica speciosa*. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Lavras, 2009. p. 46 f.

SCHOWALTER, T. D. Insect ecology: an ecosystem approach. **Elsevier**, San Diego, p. 53-93, 2011.

SCORZONI, L. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. 6047, 2013.

SCRIBER, J. M.; SLANSKY JR., F. The nutritional ecology of immature insects.. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 26, p. 183-211, 1981.

- SERGEANT, M. *et al.* Identification, typing and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the xpt toxin loci. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 72, p. 5895-5907, 2006.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAN, R.; QIU, X. Production of entomopathogenic nematodes. In: MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I. **Beneficial**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 321-346.
- SHELLEY, A J. L. C. *et al.* Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia Onchocerciasis Focus. **Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology**, n. 33, p. 1-121, 1997.
- SHRESTHA, S.; KIM, Y. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, n. 38, p. 99-112, 2008.
- SILVA, J. C. Identificação e caracterização morfológica de hemócitos em *Ectemnaspis rorotaense* (Floch & Abonnenc) e *Ectemnaspis trombetense* (Hamada, Py-Daniel & Adle) (Diptera: Simuliidae). **Dissertação (mestrado)**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, v. XV, 2014. p. 66 f.
- SILVERMAN, N. *et al.* Immune Activation of NF- κ B and JNK Requires *Drosophila* TAK1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, p. 48928-48934, 2003.
- SIMI, L.D. Controle de *Sphenophorus levis* e *Conotrachelus humeropictus* pelo uso combinado de nematoides e fungos entomopatogênicos. Botucatu - SP. **Tese (doutorado)** Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho" 104f. 2014.
- SPMR. SPMR - Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução. **SPMR**, s.i. Disponível em: <https://spmr.pt/index.php/20-repropedia/e/149-efetor>. Acesso em: 15 jun. 2022.
- STANLEY, D. W. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. **Ann. Rev. Entomol.**, n. 51, p. 25-44, 2006.
- SOUZA, J.K.A.; VENÂNCIO, R.A.A.; SOUZA, J.A.; SANTOS, J.S.; NUNES, M.G.S. Ensaio de compatibilidade de espécie de nematoide entomopatogênicos (rhabditida: heterorhabditidae) a produtos fitossanitários. 8º JORNACITEC. Fatec. Botucatu - SP. 9 p. 2019.
- TOURTOIS, J.; ALI, J. G.; GRIESHOP, M. J. Susceptibility of wounded and intact black soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) to entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 150, p. 121-129, 2017.
- TRIPLEHORN, C. A.; JONNISON, N. F. Estudos dos insetos. In: BORROR; DELONG'S **introduction to the study of insects**. Tradução de C. A. TRIPLEHORN e N. F. JONNISON. 7º. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 809.
- TSAI, C. J.-Y.; LOH, J. M.-S.; PROFT, T. Modelos de infecção por *Galleria mellonella* para o estudo de doenças bacterianas e para testes de drogas antimicrobianas. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.

- URSIC-BEDOYA, R.; BUCHHOP, J.; LOWENBERGER, C. Cloning and characterization of Dorsal homologues in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. **Insect Mol. Biol.**, n. 18, p. 681-689, 2009.
- VAILLANT, R. M. L. Produção de nematoides entomopatogênicos em *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). **Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)**. [S.l.]: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, 2019. p. 68 f.
- VALLET-GELY, I.; LEMAITRE, B.; BOCCARD, F. Bacterial strategies to overcome insect defences. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 4, p. 302-313, 2008.
- VALICENTE, F. H. Controle biológico de pragas com entomopatógenos. **Rev. Informe agropecuário**. Belo Horizonte. v. 30, n. 251, p. 48-55. 2009.
- WATERFIELD, N. R. *et al.* Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. **Cell. Microbiol**, n. 7, p. 373-382, 2005.
- WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v. 66, p. 302-303, 1927.
- WOOD, W.; JACINTO, A. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 542-551, 2007.
- ZACARIN, G. G.; GOBBI, N.; CHAUD-NETTO, J. Preferência de *Apanteles galleriae* Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae) por *Galleria mellonella* (L.) ou *Achroia grisella* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotrop. entomol.**, v. 33, p. 65-70, 2004.
- ZIL, C. V.; MALAN, A. P. Cost-effective culturing of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* and entomopathogenic nematode production in various hosts.. **African**, v. 23, n. 2, p. 361-375, 2015.
- ZUCKERMAN, B.M.; JANSSON, H.B. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host-prey recognition. **Ann. Rev. of Phytopathol.**, n. 22, p. 95-114, 1984.