

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Instituto de Biologia**  
**Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Efeito da temperatura no comportamento de nematoides entomopatogênicos.**

**Bibiana Hahn Meira**

**Pelotas, 2018**

**Bibiana Hahn Meira**

**Efeito da temperatura no comportamento de nematoides entomopatogênicos.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Andressa Lima de Brida

Coorientador: Prof. Dr. Flávio Roberto Mello Garcia

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M111e meira, Bibiana Hahn

Efeito da temperatura no comportamento de nematoides entomopatogênicos / Bibiana Hahn meira ; Andressa Lima de Brida, orientadora ; Flávio Roberto Mello Garcia, coorientador. — Pelotas, 2018.

50 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Controle biológico. 2. Galleria melonella. 3. Produção in vivo. 4. Multiplicação. 5. Heterorhabditis, steinernema. I. Brida, Andressa Lima de, orient. II. Garcia, Flávio Roberto Mello, coorient. III. Título.

CDD : 632.96

**Bibiana Hahn Meira**

Efeito da temperatura no comportamento de nematoides entomopatogênicos

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26/11/2018

Banca examinadora:

.....  
Profa. Dra. Andressa Lima de Brida (Orientadora) Doutora em Agronomia, Proteção de Plantas, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

.....  
Prof. Dr. Cristiano Agra Iserhard Doutor em Biologia Animal pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

.....  
Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela Doutor em Ciências da Saúde pelo Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andressa Lima de Brida, pela orientação, ajuda e ensinamentos. Ao coorientador Prof. Dr. Flávio Roberto Mello Garcia por toda ajuda e conhecimento que pude adquirir. Obrigada aos familiares e amigos. Agradeço aos professores Cristiano Agra Iserhard e Marcos Marreiro Villela por terem aceito o convite de fazer parte da banca.

## Resumo

MEIRA, Bibiana Hahn. **Efeito da temperatura no comportamento de nematoides entomopatogênicos**. 2018, 50f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Ciências Biológicas Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são agentes importantes para o controle biológico de pragas de relevância econômica, pois estes matam o hospedeiro por septicemia entre 24 a 48 horas, através da relação mutualista com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*. Estudos para melhorar sua sobrevivência e patogenicidade em condições de armazenamento são necessários, onde fatores como temperatura determinam sua viabilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o período de mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) após a infecção de nematoides *Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Steinernema rarum* PAM 25 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB, o período de emergência de juvenis infectantes (JIs) e o número de juvenis produzidos durante o período de 30 dias em diferentes temperaturas. Os tratamentos foram constituídos por placas de Petri, revestidas com duas folhas de papel filtro, inoculados 100 JIs/ml/placa, contendo uma lagarta de *G. mellonella* por placa. As testemunhas com 2 mL de água destilada (sem nematoide). Placas de Petri foram vedadas com papel filme tipo PVC e acondicionadas em BOD a 14, 18, 22, 25 e 30°C. As avaliações foram realizadas diariamente. Após a mortalidade das lagartas de *G. mellonella*, os cadáveres foram transferidos para armadilhas de White e o período para a mortalidade e emergência registrada, e número JIs contabilizados aos 30 dias consecutivos. A temperatura que apresentou menor período de mortalidade foi 14 °C para *S. brazilense* NBCBn 06, e 30 °C para *S. rarum* PAM 25 e *H. bacteriophora* HB (2,5, 4,75 e 3,63 dias, respectivamente). O menor período para emergência foi nas temperaturas 30, 25 e 18 °C para *S. brazilense* NBCBn 06 (2,13 dias), *S. rarum* PAM 25 (2,25 dias) e *H. bacteriophora* HB (três dias), respectivamente. Já a temperatura que proporcionou maior multiplicação de JI em todos os tratamentos foi à 25 °C, sendo essa considerada a que apresentou condições favoráveis à criação de JIs de *S. brazilense* NBCBn 06 (24083,88 JI/lagarta), *S. rarum* PAM 25 (19238,75 JI/lagarta) e *H. bacteriophora* HB (21344,25 JI/lagarta).

**Palavras-chave:** Controle biológico; *Galleria melonella*; produção *in vivo*; multiplicação; *Heterorhabditis*, *Steinernema*

## Abstract

MEIRA, Bibiana Hahn. **Effect of temperature on the development of entomopathogenic nematodes.** 2018, 50f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Ciências Biológicas Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are important agents for the biological control of pests of economic importance, which kill the host by septicemia between 24 and 48 hours, through the mutualist relationship with bacteria of the genus *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. Studies to improve its survival and pathogenicity under storage conditions are necessary, where factors such as temperature determine its viability. The objective of this work was to evaluate the mortality period of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae after nematode infection of *Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Steinernema rarum* PAM 25 and *Heterorhabditis bacteriophora* HB, the IJ emergency period and the number of juveniles produced during the period of 30 days at different temperatures. The treatments consisted of Petri dishes, coated with two sheets of filter paper, inoculated 100 IJs/ml/plate, containing one *G. mellonella* larvae per plate. The controls with 2 mL of distilled water (without nematode). Petri dishes were sealed with PVC film and conditioned in BOD at 14, 18, 22, 25 and 30 °C. Evaluations were performed daily. After mortality of *G. mellonella* larvae, corpses were transferred to White traps and the period for mortality and emergency recorded, and number IJs counted at 30 consecutive days. The temperature with the lowest mortality was 14 °C for *S. brazilense* IBCBn 06 and 30 °C for *S. rarum* PAM 25 and *H. bacteriophora* HB (2,5, 4,75 and 3,63 days, respectively) . The lowest period for emergence was at temperatures 30, 25 and 18 °C for *S. brazilense* IBCBn 06 (2,13 days), *S. rarum* PAM 25 (2,25 days) and *H. bacteriophora* HB (three days), respectively. The temperature that provided the highest IJ multiplication in all treatments was at 25 °C, which was considered to be the one that presented favorable conditions for the creation of IJs *S. brazilian* IBCBn 06 (24083.88 JI/larvae), *S. rarum* PAM 25 (19238.75 JI/larvae) and *H. bacteriophora* HB (21344.25 IJ/larvae).

**Keywords:** Biological control; *Galleria melonella*; *in vivo* production; multiplication; *Heterorhabditis*, *Steinernema*.

## Lista de Figuras

Figura 1	Fotografia de: (A) Criação de <i>Galleria mellonella</i> ; (B) Lagarta de <i>G. mellonella</i> ; (C) Adultos de <i>G. mellonella</i> .....	25
Figura 2	Fotografia de suspensão de Juvenis infectantes (JIs) de nematoides sendo inoculados em lagarta de <i>G. mellonella</i> .....	26
Figura 3	Fotografia de juvenis infectantes (JIs) armazenadas.....	27
Figura 4	Fotografia de juvenis infectantes (JIs)s para contagem.....	28
Figura 5	Gráfico da média diária de juvenis infectantes (JIs) de <i>Steinernema rarum</i> PAM 25 emergidos por lagartas de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) em cinco temperaturas durante 30 dias.....	31
Figura 6	Gráfico da média diária de juvenis infectantes (JIs) de <i>Steinernema brazilense</i> IBCBn 06 emergidos por lagartas de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) em cinco temperaturas durante 30 dias.....	32
Figura 7	Gráfico da média diária de juvenis infectantes (JIs) de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HB emergidos por lagartas de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) em cinco temperaturas durante 30 dias.....	32



## Lista de Tabelas

Tabela 1	Período de mortalidade (dias) de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) após infecção por <i>Steinernema rarum</i> PAM 25, <i>Steinernema brazilense</i> IBCBn 06 e <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HB, período para emergência (dias) de juvenis infectantes (JIs) e número de JIs emergidos no período de 30 dias em diferentes temperaturas.....	30
----------	---	----

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Revisão bibliográfica .....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos .....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Material e métodos .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Local de desenvolvimento .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Obtenção de isolados .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>Criação de <i>Galleria mellonella</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>4.4</b>	<b>Multiplicação de juvenis infectantes (JI) .....</b>	<b>25</b>
<b>4.5</b>	<b>Período de mortalidade de lagartas de <i>Galleria mellonella</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>4.6</b>	<b>Período de emergência .....</b>	<b>27</b>
<b>4.7</b>	<b>Número de juvenis infectantes (JIs) emergidos .....</b>	<b>27</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Período para mortalidade de lagartas de <i>G. mellonella</i> e emergência de juvenis infectantes (JIs) .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>Número de juvenis infectantes (JIs) .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>37</b>
	<b>Referências .....</b>	<b>38</b>

## 1 Introdução

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são organismos terrestres, e apresentam ampla distribuição mundial, sendo encontrados em áreas agrícolas, florestas, gramados, desertos e praias (GREWAL, 2000). Por se adaptarem a novos ambientes, ter capacidade de disseminar-se em busca de hospedeiros e poderem ser produzidos em larga escala, são considerados promissores no controle de pragas, pois apresentam ampla gama de hospedeiros, são inócuos ao ambiente e podem ser aplicados com equipamentos convencionais (GREWAL; JAGDALE, 2001).

Os NEPs pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea), a qual pertencem as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. A família Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, 1994, enquanto a família Heterorhabditidae possui o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (ADAMS et al., 2006). O total de 82 espécies de NEPs foram identificadas, número que aumenta conforme novas pesquisas (Nguyen, 2014).

Estes nematoides são considerados patogênicos por possuírem associação simbiótica com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* Thomas e Poinar, 1979 e *Photorhabdus* Boemare, Louis e Kuhl, 1983, que matam o hospedeiro dentro de 24 a 48 horas, podendo chegar até 72, por septicemia (DOWDS; PETERS, 2002). Os nematoides se alimentam das bactérias e dos tecidos decompostos do inseto. Ao esgotar as fontes de alimento, os juvenis infectantes (JIs) buscam um novo hospedeiro (CHASTON; GOODRIH-BLAIR, 2010). São considerados futuros potenciais para o Manejo Integrado de Pragas (MIP) pois, a fase juvenil infectante desses nematoides, infecta e mata insetos de diversas famílias e ordens (WOUTS, 1991).

A ampla distribuição dos nematoides indica que possuem habilidades genéticas para adaptação e sobrevivência em condições de estresses ambientais, como mudanças na osmolaridade, temperatura e dessecação do solo (WOODRING; KAYA, 1988; FINNEGAN et al., 1999; GLAZER; SALAME, 2000). Esses fatores podem gerar a mortalidade dos NEPs, principalmente quando armazenados por longos períodos (GREWAL; SELVAN; GAUGLER 1994; DEL VALLE, 2005), pois afetam as reservas lipídicas dos nematoides, do qual dependem para manterem-se vivos e obter energias para encontrar um novo hospedeiro (VAN GUNDY, 1985).

A fase juvenil dos NEPs é composta por quatro estádios, sendo o terceiro que se encontra no solo, chamado juvenil infectante (VAN TOL et al., 2001). Os nematoides penetram no inseto através das aberturas naturais (boca, ânus, espiráculos ou cutícula), e migram para a hemolinfa, onde liberam as bactérias simbiotes (FORST; CLARKE, 2002). O tempo de duração do ciclo do nematoide no hospedeiro depende da espécie do inseto hospedeiro, tamanho do JI, temperatura ambiente e quantidade de JIs que penetram no inseto (BOFF et al., 2000).

Para serem usados como agente de controle biológico com sucesso, é necessário que haja a capacidade de produção em massa, e formulá-lo em um produto com tempo de prateleira, onde os juvenis viáveis se mantenham de três a seis meses (VAN ZYL; MALAN, 2014). Os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* possibilitam a produção em escala industrial e formulação em produtos comerciais, havendo assim, um maior interesse nesses gêneros. Além de oferecerem segurança ao ambiente, aplicadores e consumidor final por serem entomopatógenos específicos (NEGRISOLI JR; NEGRISOLI; SILVA, 2015).

A produção de NEPs pode ser feita utilizando métodos de cultura *in vivo*, que possibilita a produção estável em pequenas escalas, onde há indícios de nematoides de maior qualidade quando criados em hospedeiro natural, propiciando padrões de armazenamento prolongado, ou *in vitro*, que possibilita a produção em larga escala, tornando os produtos mais competitivos no mercado (NEVES; ALVES; AGUILLERA, 1998). Porém, devido à redução da mobilidade e infectividade quando criado em condições laboratoriais (WESTERMAN, 1999), existe uma alta mortalidade em função do tempo de armazenamento (ABU HATAB; GAUGLER, 2001; GLAZER, 2002).

A produção *in vivo* de NEPs é utilizada no isolamento de espécies, estudo da biologia e produção em pequena escala para trabalhos de laboratório, casa-de-vegetação e campo (MOLINA et al., 2004). Porém, fatores ambientais como aeração, umidade e temperatura podem afetar o rendimento da produção e duração do ciclo de vida (tempo até a emergência) (GREWAL; SELVAN; GAUGLER, 1994). A temperatura ótima da cultura está relacionada ao clima de origem do nematoide (MOLYNEUX, 1986; GREWAL; SELVAN; GAUGLER, 1994). Este método favorece a produção em pequena escala para laboratórios de pesquisa, nichos de mercado e cooperativas de produtores orgânicos (VAN ZYL; MALAN, 2014). A produção *in vitro* é o cultivo do nematoide em meio sólido axênico, inicialmente e desinfetados em um meio monoxênico onde são inoculados com as bactérias simbiontes (SHAPIRO; GAUGLER, 2002), alimentando-se dos componentes do meio e da cultura do microrganismo (LEITE et al., 2011).

Esse estudo visa ampliar o conhecimento acerca do comportamento de nematoides entomopatogênicos em lagartas de *G. mellonella*, sob diferentes temperaturas, em condições laboratoriais, a fim de obter melhor desempenho na produção e armazenamento dos NEPs. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da temperatura na mortalidade de *G. mellonella*, e emergência e multiplicação dos JIs de *Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Steinernema rarum* PAM 25 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB.

## 2 Revisão bibliográfica

Os nematoides são vermes cilíndricos não segmentados pertencentes ao Filo Nematoda (DE LEY, 2006). Os nematoides entomopatogênicos fazem parte da ordem Rhabditida e são utilizados no controle biológico de diversas espécies de insetos-praga (ALMENARA et al., 2012).

Entre os nematoides entomopatogênicos, as principais famílias são Steinernematidae e Heterorhabditidae, que compreende três gêneros: *Neosteinerinema* Nguyen e Smart, 1994 e *Steinerinema* Travassos, 1927 e *Heterorhabditis* Poinar 1976 (POINAR, 1990), respectivamente. *Steinerinema* e *Heterorhabditis* são mais utilizados como agentes de controle biológico de pragas por serem parasitos obrigatórios de insetos (DOLINSKI; MOINO JR, 2006; DOLINSKI et al., 2008; SHAPIRO-ILAN; HAN; DOLINKSI, 2012). Assim, considerados eficazes para serem incorporados em programas de manejo integrado de pragas (MIP), representando uma parte importante dos agentes de biocontrole (DOLINSKI et al., 2017).

Os NEPs dispõem de características altamente desejáveis para o controle biológico: matam rapidamente; não atacam plantas; não são prejudiciais para vertebrados; possuem especificidade; não poluem as águas; não necessitam de equipamentos especiais para aplicação; não necessitam de equipamentos de proteção individual para o aplicador; podem ser produzidos em insetos ou em meio de cultura; deslocam-se no solo em busca do inseto; e podem se estabelecer no solo, mantendo, por longo tempo, baixa população da praga combatida (VOSS et al., 2009).

Estes agentes possuem a característica de ter um juvenil infectante (JI) ativo de terceiro estágio como estágio infeccioso, o que os torna excelentes modelos para biocontrole. Além de serem fáceis e baratos de cultivar, vivem de várias semanas até meses no estágio infeccioso e há um grande grupo de espécies que facilita estudos comparativos (LEWIS et al., 2006).

Os JIs, único estágio de vida livre, entram no inseto hospedeiro através de suas aberturas naturais (cavidade oral, ânus e espiráculos) ou, em alguns casos, através da cutícula (DOWDS; PETERS, 2002). Ao serem introduzidas no interior da hemocele do inseto, os JIs, liberam bactérias simbióticas na hemolinfa, onde excretam toxinas, que matam o inseto em 24 a 48 horas (VOSS, 2009), podendo chegar até 72 horas (DOWDS; PETERS, 2002; BRIDA et al., 2017). A proliferação de bactérias altera a cor do inseto, que varia de marrom-escuro, com *Photorhabdus* em *Heterorhabditis*, a marrom claro ou amarelado para *Xenorhabdus* em *Steinernema* (VOSS, 2009).

As bactérias simbióticas vivem em vesículas no intestino dos nematoides, que as transportam de um hospedeiro a outro. Essas são responsáveis pela morte do hospedeiro, e também fornecem nutrição aos nematoides e defesa contra outros invasores (POINAR, 1990). Dentro do hospedeiro os nematoides completam seu desenvolvimento e vivem por duas ou três gerações. Quando o alimento esgota, os JIs saem em busca de um novo inseto (GREWAL; CONVERSE; GEORGIS, 1999).

Segundo Poinar (1975) *Heterorhabditis*, possuem a característica de desenvolver fêmeas hermafroditas (o esperma está presente no útero de fêmeas recém-formadas), ou seja, se apenas um único jovem invade um inseto, a continuação da espécie é mais ou menos segurada. Como *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976, é capaz de destruir insetos sadios, tem potencial como agente de controle biológico.

Diversos insetos-praga de lavouras são alvos potenciais dos nematoides entomopatogênicos, especialmente os que têm uma fase do seu ciclo no solo. Entre os insetos com testes avançados visando seu controle, estão: *Quesada gigas* Olivier (Hemiptera: Cicadidae) Cigarra-da-raiz do cafeeiro, *Mahanarva* sp. (Hemiptera: Cercopidae) Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae) Broca-da-cana-de-açúcar, *Sphenosphorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) Broca-do-rizoma-da-cana-de-açúcar e *Conotrachelus*

*psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) Gorgulho-da-goiabeira. Os insetos que têm apresentado alta taxa de mortalidade em ensaios feitos em laboratórios são: *Spodoptera frugiperda* JE Smith (Lepidoptera: Noctuidae) Lagarta-do-cartucho, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) Cascudinho de aviário, *Anastrepha fraterculus* Wied (Diptera: Tephritidae) Mosca-das-frutas, *Diloboderus abderus* Sturm (Coleoptera: Melolonthidae) Coró-das-pastagens, *Diabrotica speciosa* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) Larva-alfinete e *Sternechus subsignatus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) Tamanduá-da-soja (VOSS et al., 2009).

Os nematoides entomopatogênicos e seus hospedeiros de insetos são organismos ectotérmicos, sendo afetados pela temperatura ambiente (GOUGE; LEE; HENNEBERRY, 1999). Conhecer características como a tolerância à temperatura entre espécies de NEPs pode ser benéfico na seleção da espécie ideal para uso em determinadas áreas geográficas ou microclima (CHOO et al., 2002). A faixa de atividade da temperatura do nematoide representa a condição climática de sua origem (MOLYNEUX, 1986).

Os NEPs são capazes de sobreviver às temperaturas do seu habitat, onde ocorrem ciclos de flutuação diária e/ou sazonal, esse gradiente de temperatura tolerável varia em cada espécie (para sobrevivência, infecciosidade e desenvolvimento) (CHOO et al., 2002). Os JIs podem resistir à exposição a altas temperaturas, por curtos períodos do dia, especialmente em zonas climáticas mais quentes ou após aplicação foliar (FINEGAN et al., 1999).

Temperaturas e umidade relativa baixas impedem a emergência do JI dos cadáveres hospedeiros, porém permanecer no cadáver por períodos prolongados (até 50 dias) (BROWN; GAUGLER, 1997), proporciona proteção limitada aos JIs contra a dessecação e baixas temperaturas, podendo acontecer de os nematoides ficarem presos e morrerem dentro do cadáver. A temperatura e umidade relativa ao qual o cadáver é exposto determina o grau de proteção oferecido. O efeito combinado da temperatura e da umidade relativa também podem ser potencializados (RAHOO et al., 2016).

Pesquisas feitas por Choo et al. (2002) mostraram que a temperatura pode afetar o reconhecimento do hospedeiro, a penetração, a infectividade e a multiplicação de NEPs, em temperaturas mais baixas, essas atividades dos nematoides são



reduzidas. Entre os NEPs de teste, *Heterorhabditis* sp., *Steinernema* sp. e *Oscheius gingeri* mostraram-se promissores a 30 °C em bioensaios de laboratório contra Broca-do-fruto *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae) (Gueneé, 1854). A temperatura de 30 °C também foi ótima para a cultura de NEPs e para números máximos de JIs a serem usados para propósitos de pesquisa ou aplicação em campo.

Segundo Molineux (1986), a atividade térmica em campo de *Steinernema* se encontra entre 3 e 14 °C, e em *Heterorhabditis* entre 10 e 16 °C, porém, Kaya e Stock (1997) relatam que espécies de NEPs são ativas em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), e em armazenamento *Steinernema* resistem de 6 a 9 meses nas temperaturas entre 8 a 15 °C, enquanto *Heterorhabditis* sobrevivem por 3 a 4 meses, sendo ideais baixas concentrações (entre 1000 a 2000 JI/mL). A fim de aumentar a estabilidade no transporte e armazenamento a longo prazo, pode-se aumentar a tolerância dos nematoides a estresses ambientais, como calor, induzindo um estado fisiológico ao expor JIs a solutos não iônicos em concentrações específicas (GLAZER; SALAME, 2000). Ou através da anidrobiose, que prolonga a longevidade sem ter efeito negativo na infectividade do nematoide, porém depende da estratégia de forrageamento e adaptação à temperatura (GREWAL, 2000).

Acevedo et al. (2006) observou que em juvenis de *Steinernema*, as temperaturas de armazenamento em um intervalo de 8 a 20 °C, independentemente da concentração utilizada, favoreceram a alta sobrevivência do JI, prolongando sua viabilidade em até três meses. Nos nematoides *Heterorhabditis*, as temperaturas de armazenamento na faixa de 16 a 24 °C, na menor concentração e por um tempo entre 15 e 30 dias de armazenamento, favoreceram a alta sobrevivência dos JIs. Sendo assim, as temperaturas ideais para a sobrevivência dos JIs de *S. capocapsae* IBCB 02, *H. amazonensis* IBCB 24 e *S. feltiae* IBCB 47 são 18 e 22 °C em três meses de armazenamento. Cada espécie de NEP tende a apresentar características particulares de temperatura, concentração e tempo de armazenamento para sua preservação com alta sobrevivência (BRIDA et al., 2015).

Dell'Acqua et al. (2013) em estudos em São Paulo e Mato Grosso do Sul identificaram *H. indica* IBCB-n5 e *H. amazonensis* IBCB-n10, IBCB-n24, IBCB-n40, IBCB-n44 e IBCB-n46, *S. riobrave* IBCB-n49, *S. glaseri* IBCB-n1, *Steinernema australe* Edgington, Buddie, Tymo, Hunt, Nguyen, França, Merino & Moore IBCB-n5 e IBCB-n28, *Steinernema puertoricense* Román & Figueroa IBCB-n27 e IBCB-n38 e

*S. brazilense* IBCB-n9. E Machado et al. (2005) isolaram o *H. indica* IBCB-n5 em Itapetininga, São Paulo onde testaram contra *Migdolus fryanus*.

Grewal, Selvan e Gaugler (1994) relataram que a exposição de *Heterorhabditis* e *Steinernema* a baixas temperaturas prolongou o tempo de emergência. Por outro lado, Brown e Gaugler (1997) descobriram que *H. bacteriophora* não apresentou um claro prolongamento da emergência de J1 se cadáveres de *G. mellonella* ou *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) forem mantidos a 5 °C. Embora houvesse JIs ativos após 8 e 12 semanas a 5 °C, os números não eram suficientemente grandes para justificar esse tratamento com essa espécie de nematoide.

Para Rahoo et al. (2016) é possível que mais nematoides sobrevivam ao armazenamento refrigerado se uma espécie estiver mais adaptada a condições mais frias. Os limites de temperatura mais baixos para o movimento da maioria dos juvenis infecciosos de *Steinernema* podem refletir os climas mais frios de suas origens europeias e norte-americanas. Em contraste, a incapacidade das *Heterorhabditis* de se mover a 10 e 14 ° C, respectivamente, sugere que elas são nativas do clima tropical úmido quente (MOLYNEUX, 1986).

Barbosa-Negrisoni et al. (2010) isolaram NEPs em áreas nativas do Rio Grande do Sul e encontraram espécies como *Steinernema rarum* De Doucet, 1986 Mamiya, 1988. *S. rarum* e *H. bacteriophora* foram os nematoides mais encontradas (36,8% e 31,6%, respectivamente), principalmente em solos arenosos, em locais com temperaturas médias de 25 °C e altitude de 700 a 1.100 m. O nematoide *Steinernema brazilense* n. sp. Foi isolado, primeiramente de uma amostra de solo no Mato Grosso, utilizando larvas de *G. mellonella* como isca (NGUYEN et al., 2010).

Para utilizar NEPs como agente de controle biológico, é necessário que haja a capacidade de produção em massa, e formulá-lo em um produto com tempo de prateleira longa, de três a seis meses (VAN ZYL; MALAN, 2014). A produção comercial pode ser feita usando os métodos de cultura: *in vivo* e *in vitro* (meio sólido e líquido) (FRIEDMAN, 1990; GAUGLER; HAN, 2002). As abordagens diferem em relação ao custo de produção, gasto de capital, especialização técnica necessária, economia de escala e qualidade do produto (GEORGIS; DUNLOP; GREWAL, 1995). Na produção *in vitro*, o nematoide é cultivado em meio artificial, onde é inoculado em

um meio sólido axênico, e desinfestados em meio monoxênico com bactérias simbiotes, alimentando-se dos componentes do meio e da cultura dos microrganismos (LEITE et al., 2011).

A cultura sólida foi o primeiro método desenvolvido, onde nematoides são criados em esponjas de poliéster e poliuretano impregnadas com vísceras de porco e gordura bovina contendo a bactéria simbiote. Esse método produz em torno de 6 a  $10 \times 10^5$  JIs/g de meio de cultura (BEDDING, 1984). Um meio desenvolvido à base de fígado bovino embebido em esponja, proporcionou altas taxas de produção do nematoide *Heterorhabditis* sp., com um rendimento de até 180.000 JIs/mL de meio (LEITE, 2006). Leite et al. (2016a) testaram um meio líquido rico à base de gema de ovo, clara de ovo, extrato de levedura, glicose e óleo de amendoim, obtendo mais de 100.000 JIs/mL de meio. A adição de 0,2% de ágar ao meio também aumentou a produção de nematoides, a 280 rpm e 25 °C (LEITE et al. 2016b; 2017).

Nematoides de alta qualidade são produzidos através do método com armadilha de White que envolve a migração natural de JIs longe do cadáver hospedeiro infectado para dentro, e o aprisionamento em uma camada de água circundante de onde é colhida. Em comparação, alguns estudos mostraram que a criação *in vitro* diminui a eficácia e a persistência de *H. bacteriophora* em função da perda de características infecciosas que podem ocorrer com as consecutivas multiplicações (GAUGLER; GEORGIS 1991; NANDINI et al. 2008).

A produção *in vivo* é utilizada no isolamento de espécies, no estudo da biologia e na produção em pequena escala para trabalhos de laboratório, casa-de-vegetação e campo (MOLINA, 2004). Apesar de ser uma técnica simples, possui alto custo de produção, não permitindo economia de escala. Fatores como suscetibilidade do hospedeiro e espécie do nematoide multiplicado influenciam no número de juvenis obtidos (MOLINA; LOPEZ, 2001).

O primeiro trabalho sobre a produção de NEPs no Brasil concentrou-se na multiplicação *in vivo*, utilizando principalmente lagartas de *G. mellonella* como hospedeiro do inseto (FOLEGATI et al., 1988; LEITE; BATISTA; PRADA, 1990). Aprimorar as práticas utilizadas pode contribuir para a eficácia, economia e praticidade da produção em massa (VAN ZYL; MALAN, 2014).

Os rendimentos de produção *in vivo* variam entre os diferentes hospedeiros de insetos e espécies de nematoides (WOODRING; KAYA, 1988) O principal hospedeiro utilizado é a *G. mellonella* por sua suscetibilidade à maioria das espécies de NEPs (WOODRING; KAYA, 1988; GAUGLER; HAN, 2002). Entre as principais pragas nos apiários e causadoras de danos severos a favos de mel armazenados, *G. mellonella* é amplamente utilizado como inseto hospedeiro das várias espécies de nematoides. As larvas de 4 a 5º instar produzem números suficientes de NEPs para viabilizar seu uso para produção *in vivo* (FLANDERS et al. 1996; HAZIR et al. 2003).

Os hospedeiros utilizados para produção de NEPs que não são suscetíveis à cultura em *G. mellonella* são: *Acheta domesticus* Linnaeus (Insecta: Orthoptera: Gryllidae) Grilo-doméstico, *Amyelois transitella* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) traçado-focinho, *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) Lagarta-da-espiga, *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) Lagarta-das-maçãs, *Lymantria dispar* Linnaeus (Lepidoptera: Lymantriidae) lagarta-do-sobreiro, *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) Lagarta rosada do algodão, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) lagarta da beterraba, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) Bicho-da-farinha, *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) lagarta plusia, entre outros Coleópteras (LINDEGREN et al., 1979; SHAPIRO; POINAR; LINDEGREN, 1985; BLINOVA; IVANOVA, 1987; CABANILLAS; RAULSTON, 1994; GREWAL; CONVERSE; GEORGIS, 1999; ELAWAD; GOWEN; HAGUE, 2001; SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002).

A produção *in vivo* utiliza métodos para o cultivo de nematoides entomopatogênicos em hospedeiros de insetos utilizando armadilha de White (VAN ZYL; MALAN, 2014), onde os JI são recolhidos ao migrarem para longe do cadáver do hospedeiro quando estes emergem (SHAPIRO-ILAN et al. 2001) e ficam aprisionados em uma camada de água circundante (GAUGLER; GEORGIS 1991; NANDINI et al. 2008). Os métodos consistem em inoculação, recolhimento, concentração e, se necessário, descontaminação (SHAPIRO-ILAN et al. 2001).

Uma preocupação para a produção *in vivo* e *in vitro* é que existe a possibilidade de que os NEPs possam se adaptar aos hospedeiros em que são criados, levando a redução de caracteres de qualidade e aptidão, como virulência, tolerância ambiental ou capacidade reprodutiva (SHAPIRO; GLAZER; SEGAL, 1996; STUART;

GAUGLER, 1996). Quando um agente de controle biológico é isolado da natureza e criado em laboratório, ou produzido em massa para fins comerciais, ele pode perder traços benéficos devido a processos genéticos, incluindo deriva, endogamia ou seleção inadvertida (HOPPER; ROUSH; POWELL, 1993).

A fim de superar o possível desenvolvimento da deterioração da deformação, o material genético de NEP fresco pode ser introduzido ou os nematoides poderiam ser criopreservados (SHAPIRO-ILAN et al. 2004; STOKWE, 2009). A criopreservação em nitrogênio líquido é utilizada no armazenamento e manutenção de culturas de nematoides (LEWIS; CLARKE, 2012), com objetivo de a longo prazo (POPIEL; VASQUEZ, 1991; CURRAN; BUTLER, 1992; NUGENT; O'LEARY; BURNELL, 1996), prevenir a mudança ou a perda de características que podem ocorrer durante as consecutivas multiplicações (WANG; GREWAL, 2002).

Gaugler e Han (2002) relatam que o custo de produção de NEPs *in vivo* pode chegar a menos de um centavo de dólar por lagarta de *G. mellonella* produzindo mais que  $1 \times 10^5$  JIs, com capacidade de até  $3,5 \times 10^5$  JIs/lagarta. Sendo necessário mais de 25 mil lagartas de *G. mellonella* para tratar um hectare no padrão de  $2,5 \times 10^9$  nematoide por hectare. A cultura líquida *in vitro* é o processo mais econômico para a produção de nematoides entomopatogênicos, em que a eficiência está em sua economia de escala: à medida que a escala aumenta, o custo de produção por unidade diminui (FRIEDMAN, 1990), porém, exige maior investimento de capital e maior nível de conhecimento técnico (SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002).

No processo de produção da NEPs, parâmetros abióticos críticos para a sobrevivência dos nematoides (temperatura, umidade e disponibilidade de oxigênio), podem ser ajustados para criar um ambiente ideal para a atividade e sobrevivência dos nematoides (VAN ZYL; MALAN, 2014). Esses fatores podem interferir no reconhecimento do hospedeiro, penetração (CHOO et al., 2002), infectividade, mortalidade, desenvolvimento, reprodução e armazenamento de NEPs (GRIFFIN, 1993; GREWAL et al., 1994; FINNEGAN et al., 1999; KOPPENHOFER; KAYA, 1999). Em temperaturas mais baixas, essas atividades são reduzidas (KAYA, 1990; GRIFFIN, 1993; CHOO et al., 2002), afetando diretamente os JIs na diminuição na infectividade que está relacionado com o declínio de reservas lipídicas (ANDALÓ et al., 2011). A produção de nematoides utilizando larvas de *G. mellonella* pode atingir valores entre  $0,5 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$  JIs/lagarta, dependendo da espécie do nematoide

entre 100.000 e 300.000 JIs por larva infectada (POINAR, 1990; GREWAL; NARDO; AGUILLERA, 2001).

O hospedeiro de NEPs e a temperatura são fatores associados, a exemplo foi o estudo de Brida et al. (2015), ao avaliarem o período de mortalidade de lagartas de *G. mellonella* após a infecção de *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24, o período da emergência e JIs multiplicados durante o período de 30 dias em cinco temperaturas, e concluíram que lagartas infectadas por *H. amazonensis* apresentaram menor período (três dias) de mortalidade nas temperaturas de 26 °C e 30 °C, e o menor período de tempo para a emergência de JIs em temperatura de 30 °C, (9,4 dias), e o número de JIs produzidos a 26 (229.563 JIs/lagarta) e 30 °C (127.157 JI/lagarta) foi superior as demais temperaturas estudadas.

Cada espécie de NEP tende a apresentar características particulares de temperatura, concentração e tempo de armazenamento para sua preservação com alta sobrevivência (ACEVEDO et al., 2006). Assim como a exposição a baixas temperaturas pode prolongar o tempo de emergência (GREWAL et al., 1994) e sobrevivência se a espécie estiver mais adaptada a condições frias (RAHOO et al., 2016).

Alguns nematoides possuem mais especificidade que outros, sendo ideal buscar os com menor espectro de hospedeiros, e priorizar a utilização de nematoides nativos, que estão adaptados às condições climáticas e entomofauna local, sobre os exóticos, que devem ser aplicados em último caso (DOLINSKI e MOINO JR., 2006).

No Brasil, estudos com NEPs ainda são recentes. No entanto, eles são realizados com o objetivo de resolver não apenas problemas importantes de pragas na agricultura, mas também para entender a biodiversidade (DOLINSKI et al., 2017). O Brasil é um dos países líderes no uso de agrotóxicos, causando preocupação quanto ao uso excessivo desses produtos (DOLINSKI et al., 2017). A situação atual na agricultura, busca favorecer o uso de abordagens benignas ao meio ambiente para o controle de pragas de insetos (VAN ZYL e MALAN, 2014), propiciando novas pesquisas para desenvolver e implementar o uso e produção efetiva de NEPs (DOLINSKI et al., 2017; VAN ZYL E MALAN, 2014).

Diante disto, entre diversos fatores, a temperatura para a produção de NEPs influencia no período de persistência do nematoide, importante para o processo de

produção em laboratório e sobrevivência no meio ambiente (BROWN e GAUGLER, 1997; WANG et al., 2014). Sendo importante que sejam feitos estudos sobre a resposta à sensibilidade à baixa ou alta temperatura no comportamento de NEPs em desenvolvimento no hospedeiro.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura no período de mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) após a infecção por nematoides, na infecciosidade, na emergência de JIs e na produção juvenis infectivos.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- a) Avaliar o período de mortalidade de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) após a infecção de nematoides *Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Steinernema rarum* PAM 25 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB.
- b) Analisar o período de emergência de juvenis infectantes em diferentes temperaturas.
- c) Observar o número de juvenis produzidos em diferentes temperaturas.



## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Local de desenvolvimento**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia de Insetos do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), localizado no município de Capão do Leão – RS.

### **4.2 Obtenção de isolados**

As espécies de NEPs foram obtidas da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos do Banco de Nematoides Entomopatógenos “Oldemar Cardim Abreu” do Instituto Biológico, Campinas - SP.

### **4.3 Criação de *Galleria mellonella***

Lagartas de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) utilizadas no experimento foram criadas em temperatura controlada em B.O.D à 30 °C, com dieta à base de favo e cera de abelha, sem luminosidade (Figura 1A, B, C).



Figura 1 – Fotografias de: (A) Criação de *Galleria mellonella*; (B) Lagarta de *G. mellonella*; (C) Adultos de *G. mellonella*.

Fonte: Criação de *Galleria melonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Andressa L. Brida , 2018.

#### 4.4 Multiplicação de juvenis infectantes (JI)

Os nematoides *Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Steinernema rarum* PAM 25 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB foram multiplicados em lagartas de quinto instar de *G. mellonella*, utilizando-se cinco lagartas por placa de Petri de (9 cm de diâmetro) com duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5 mL de suspensão com 500 juvenil/placa, disponibilizando 100 juvenis/lagarta para cada espécie separadamente. Essas placas foram lacradas com papel filme PVC e acondicionadas em B.O.D. com temperatura a 25 °C (WOODRING e KAYA, 1988). As lagartas mortas, após três dias, foram transferidas para armadilha de White e armazenadas à 25 °C em B.O.D. de três a 15 dias. Os JIs que emergiram dos cadáveres foram recolhidos com água destilada, filtrados e decantados para a retirada dos corpos gordurosos dos insetos e quantificados em placas de contagem.



Figura 2 – Fotografia de suspensão de Juvenis infectantes (JIs) de nematoides sendo inoculados em lagarta de *G. mellonella*.

Fonte: Meira, BH.

#### **4.5 Período de mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella***

Os tratamentos consistiram dos nematoides *S. brazilense* IBCBn 06, *S. rarum* PAM 25 e *H. bacteriophora* HB inoculados em *G. mellonella* e uma testemunha (sem nematoide) nas temperaturas de 14, 18, 22, 25 e 30 °C. O delineamento experimental foi esquema fatorial 3 x 5 x 8 x 1 (isolado x temperatura x repetições x testemunha), totalizando 120 parcelas.

Cada parcela teve uma placa de Petri (5 cm de diametro) revestida com duas folhas de papel filtro umedecido com 2 mL de suspensão contendo 100 JIs/ml/placa, contendo uma lagarta de *G. mellonella* (quarto ao quinto instar) por placa. As testemunhas foram umedecidas com 2 mL de água destilada (sem nematoide). Placas de Petri foram vedadas com papel filme tipo PVC e acondicionadas em BOD a 14, 18, 22, 25 e 30 °C. A mortalidade de *G. mellonella*, o número de dias de emergência do JIs e a taxa de multiplicação de JI emergidos por *G. mellonella* após 15 e 30 dias foram avaliados a cada 24 horas.

#### 4.6 Período de emergência

Após a mortalidade das lagartas de *G. mellonella*, os cadáveres foram transferidos para armadilhas de White e acondicionadas nas mesmas temperaturas para avaliação da emergência dos JIs. As suspensões com JIs foram recolhidas no primeiro dia de emergência e as mesmas quantificadas diariamente até 30 dias (Figura 3).



Figura 3 - Fotografia de suspensões de juvenis infectantes (JIs) armazenadas.

Fonte: Meira, BH.

#### 4.7 Número de Juvenis infectantes (JIs) emergidos

A contagem foi feita sob microscópio estereoscópio, com a retirada de 1 mL da suspensão para a contagem de juvenis vivos e mortos com Siracusa graduada (figura 4), e o resultado multiplicado pelo valor total da amostra.

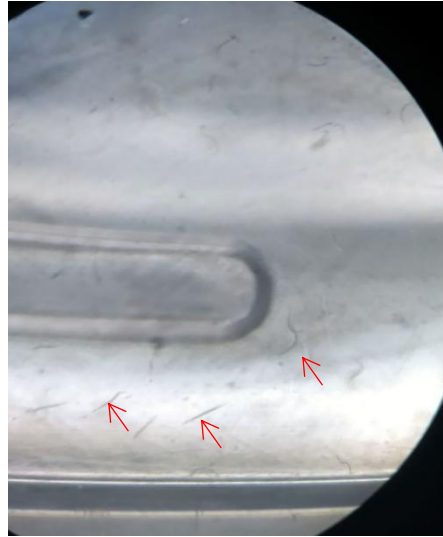


Figura 4 – Fotografia de juvenis infectantes (JIs) para contagem

Fonte: Meira, BH.

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa computacional de estatística Sisvar versão 5.6 (FERRREIRA, 2010).

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Período para a mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e emergência de juvenis infectantes (JIs)

Os nematoides, *S. rarum* PAM 2, *S. brazilense* IBCBn 06 e *H. bacteriophora* HB causaram 100% de mortalidade de lagartas de *G. mellonella* em todas as temperaturas estudadas.

O menor período para a mortalidade de lagartas de *G. mellonella* infectadas por *S. rarum* PAM 25 foi às temperaturas de 22 e 30 °C, (4,75 dias), e o maior período a 18 °C (10,32 dias). O período para a emergência dos JIs de *S. rarum* PAM 25 do cadáver hospedeiro foram menores em temperaturas de 18, 25 e 30 °C (2,63, 2,25 e 2,38 dias), já a temperatura de 14 °C permitiu o maior número de dias (8,63) para a emergência. Não houve diferença estatisticamente significativa de dias para mortalidade de lagartas e emergência de JIs entre as temperaturas estudadas. O período de emergência representa o sucesso na infecção das lagartas pelo nematoide, onde ao extinguirem as reservas nutricionais, migram para longe do cadáver (Tabela 1).

As temperaturas de 14, 22 e 30 °C permitiram o menor período de mortalidade (2,5, 4,38 e 3,25 dias) de lagartas infectadas por (JIs) de *S. brazilense* IBCBn 06. Não houve diferença no número de dias para emergência, entretanto a temperatura de 30 °C obteve o menor período (2,13 dias), e as temperaturas de 18 e 22 °C, o maior período (4,38 dias).

As lagartas infectadas por *H. bacteriophora* HB apresentaram o maior período de mortalidade (11 dias) a 18 °C, diferindo estatisticamente do período de mortalidade

nas demais temperaturas que variou de 3,63 a 4,38 dias. O maior período de emergência dos JIs de *H. bacteriophora* HB foi a 14 °C, com 10, 25 dias, e na temperatura de 22 °C, 6,13 dias. O menor período para a emergência dos JIs em 18, 25 e 30 °C, variou de 3,00 a 3,13 dias, respectivamente.

Tabela 1 – Período de mortalidade (dias) de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) após infecção por *Steinernema rarum* PAM 25, *Steinernema brazilense* IBCBn 06 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB, período para emergência (dias) de juvenis infectantes (JIs) e número de JIs emergidos no período de 30 dias em diferentes temperaturas

<i>Steinernema rarum</i> PAM 25		
T°C	Mortalidade (dias)	Emergência (dias)
14	6,25 [2,0 - 14,0] a	8,63 [0,0 - 25] a
18	10,38 [4,0 - 21,0] a	2,63 [2,0 - 4,0] a
22	4,75 [2,0 - 12] a	6,63 [0,0 - 5,0] a
25	7,13 [4,0 - 11,0] a	2,25 [1,0 - 3,0] a
30	4,75 [2,0 - 7,0] a	2,38 [0,0 - 11,0] a
<b>CV%</b>	<b>28,43</b>	<b>53,12</b>
<b>P:</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1066</b>

<i>Steinernema brazilense</i> IBCBn 06		
T°C	Mortalidade (dias)	Emergência (dias)
14	2,50 [2,0 - 4,0] a	3,38 [0,0 - 12,0] a
18	12,13 [9,0 - 14,0] c	4,38 [2,0 - 13,0] a
22	4,38 [2,0 - 10,0] ab	4,38 [0,0 - 9,0] a
25	6,75 [3,0 - 12,0] b	2,38 [1,0 - 4,0] a
30	3,25 [2,0 - 7,0] a	2,13 [0,0 - 3,0] a
<b>CV%</b>	<b>14,32</b>	<b>37,48</b>
<b>P:</b>	<b>0,0011</b>	<b>0,4244</b>

<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HB		
T°C	Mortalidade (dias)	Emergência (dias)
14	4,13 [2,0 - 8,0] a	10,25 [0,0 - 19,0] b
18	11,00 [7,0 - 14,0] b	3,00 [2,0 - 5,0] a
22	4,25 [2,0 - 12,0] a	6,13 [2,0 - 15,0] ab
25	4,38 [0,0 - 6,0] a	3,13 [1,0 - 6,0] a
30	3,63 [2,0 - 5,0] a	3,00 [0,0 - 6,0] a
<b>CV%</b>	<b>22,07</b>	<b>42,86</b>
<b>P:</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,1130</b>

Médias de uma mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 Número de Juvenis infectantes (JIs)

O número de JIs de *S. rarum* PAM 25 nas temperaturas de 18 e 25 °C foram considerados os maiores, indicando maior tolerância às variações, não apresentou diferenças significativas entre si (17097,38 e 19238,75 JIs/lagarta). A temperatura de 22 °C permitiu a produção de 8475,25 JIs/lagarta. O menor número de JIs foi a 14 e 30 °C, (1089,63 e 2614 JIs/lagarta) não apresentando diferenças significativas entre as temperaturas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); (ANOVA,  $F = 6,167$ ;  $P < 0,05$ ), com variabilidade de 55,18% (Figura 5).

As temperaturas de 14 e 22°C, promoveram o menor número de JIs de *S. brazilense* IBCBn 06 por lagarta (5162,5 e 9936,13 JIs/lagarta). As maiores taxas de produção foram nas temperaturas de 18, 25 e 30 °C, com a produção de 20465,24083,88 e 12224,75 JIs/lagarta, e apresentou diferenças entre as temperaturas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); (ANOVA,  $F = 6,167$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 6).

*H. bacteriophora* HB obteve as maiores taxas de produção de JIs em 18, 22 e 25°C com 18843,75, 15357,38 e 21344,25 JIs/lagarta. As temperaturas de 14 e 30°C permitiram as menores taxas de produção (972,63 e 9736,75 JIs/lagarta), o que indica que sejam originados em regiões com temperatura entre 18 e 15 °C (figura 7).



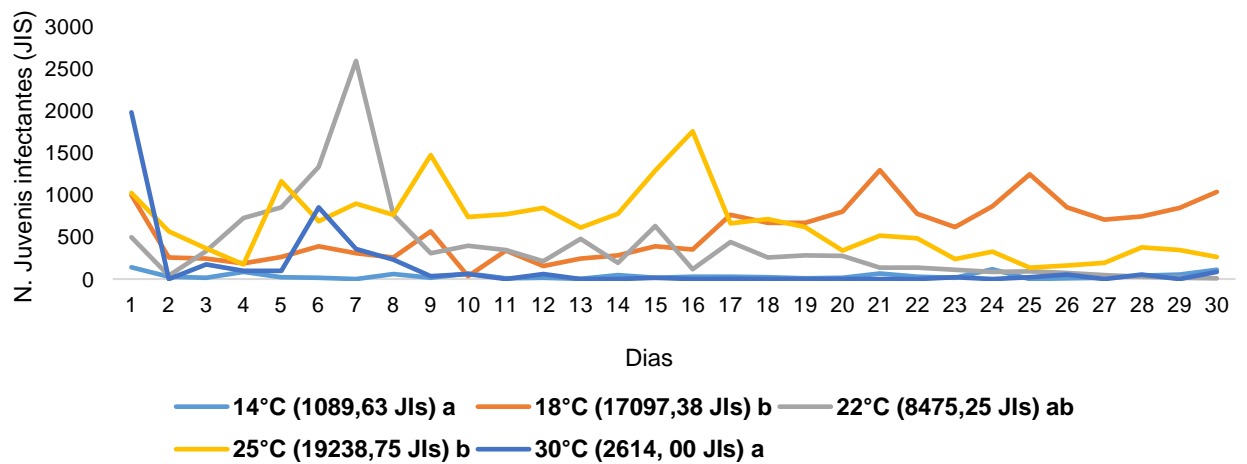


Figura 5 – Gráfico da média diária de juvenis infectantes (JIs) de *Steinernema rarum* PAM 25 emergidos por lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) em cinco temperaturas durante 30 dias

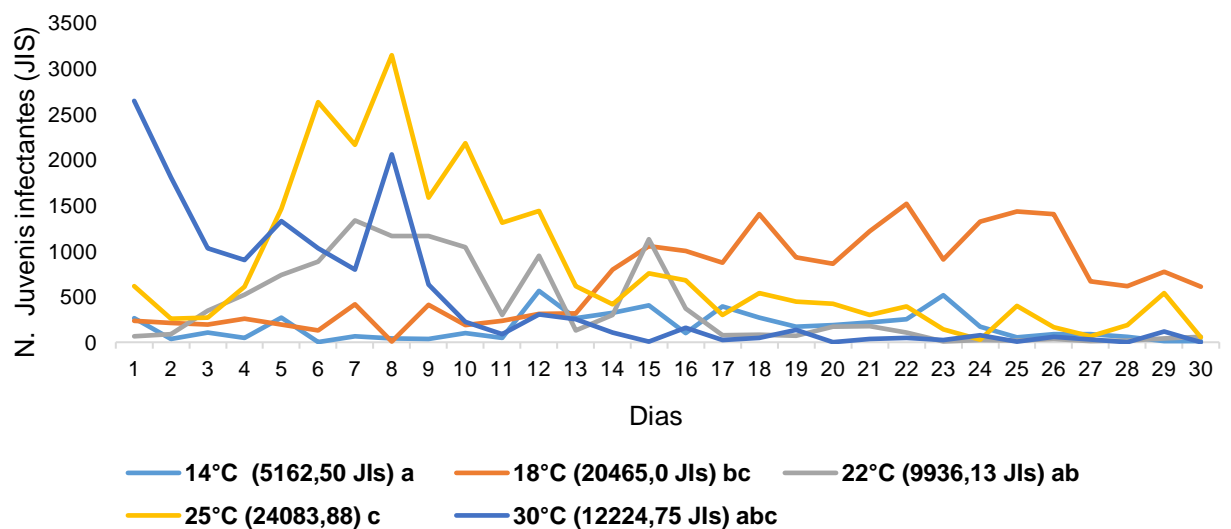


Figura 6 – Gráfico da média diária de juvenis infectantes (JIs) de *Steinernema brazilense* IBCBn 06 emergidos por lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) em cinco temperaturas durante 30 dias

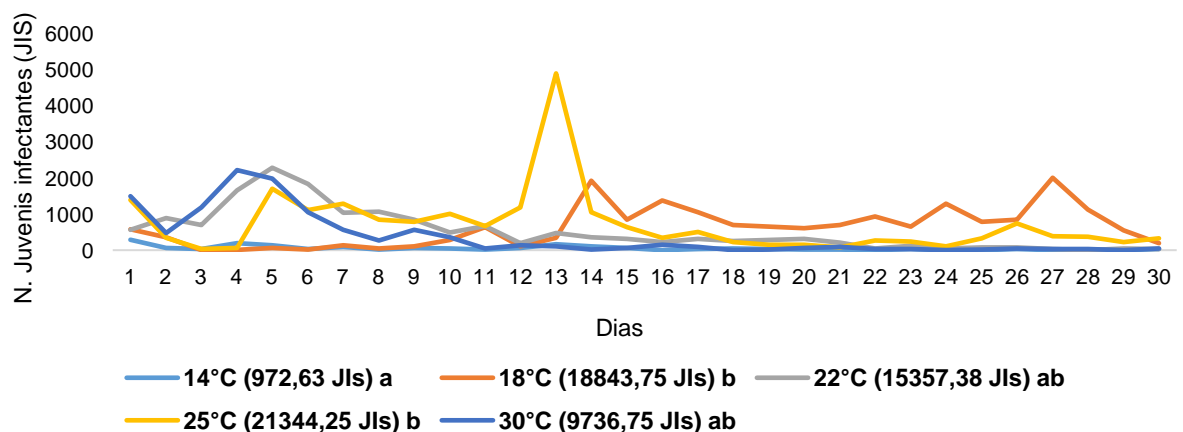


Figura 7 – Gráfico da média diária de juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis bacteriophora* HB emergidos por lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) em cinco temperaturas durante 30 dias

Os aspectos comportamentais, ciclo de vida e patogenicidade dos NEPs podem variar entre gêneros, espécies e até mesmo cepas da mesma espécie. Essa variabilidade deve ser detectada para que os nematoides sejam usados com sucesso em programas de controle (BRIDA et al., 2017). A influência da temperatura na viabilidade dos nematoides entomopatogênicos e sua capacidade de se reproduzir é reconhecida (MORTON; GARCIA-DEL-PINO, 2009), portanto estudos acerca dos resultados desse fator no ciclo de vida de nematoides são importantes (GRIFFIN, 1993).

Segundo Molineux (1986), os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* apresentam diferenças quando expostos a diferentes temperaturas, as condições climáticas do local de origem podem determinar as temperaturas e tornar um ambiente que inative os nematoides. É preferível utilizar nematoides nativos ao invés de exóticos, por já estarem adaptados ao clima do local (DOLINSKI, 2006). Temperaturas extremas, como 40 °C são letais aos nematoides (MORTON; GARCIA-DEL-PINO, 2009), enquanto são consideradas temperaturas adequadas entre 20 °C e 35 °C para patogenicidade, infecciosidade e reprodução destes (KOPPENHOFER e KAYA, 1999).

Conforme Brida (2015) na temperatura de 14 °C, as lagartas apresentam maior período de tempo para mortalidade (oito dias, e sem emergência de JIs ao longo de 30 dias), onde provavelmente seja crítica para o desenvolvimento dos JIs. Morton e Garcia-del-Pino (2009), afirmam que a temperatura ótima para infecção de algumas cepas de *H. bacteriophora* é de 25 °C. Para Cagnolo e (2008), *S. rarum* mantém sua infectividade a  $23 \pm 2$  °C.

Nesse estudo todas as temperaturas apresentaram 100% de mortalidade das lagartas infectadas pelas três espécies de nematoides. As temperaturas que apresentaram menor período de mortalidade foram 14 e 22 °C para *S. brazilense* IBCBn 06 (2 dias) e 30 °C para *S. rarum* PAM 25 e *H. bacteriophora* HB (4 e 3 dias). Porém, em experimento com cepas de *S. feltiae*, Hazir, et al. (2001) não registraram infectividade à 30 °C, e todos os isolados causaram tempo de morte mais rápido em 25 e 28 °C e o menor tempo de morte a 8 °C.

Essa inconsistência de resultados em relação à temperatura, para diferentes espécies de *Heterorhabditis* mostram que a infectividade de JIs pode depender do tamanho do inseto, da profundidade do hospedeiro no substrato e do comportamento de busca dos JIs não podendo ser atribuída uma única temperatura ao gênero (BOFF et al., 2001; SUSURLUK e EHLERS, 2008). Morton e Garcia-del-Pino (2009) afirmam que em temperaturas entre 15 e 35 °C a taxa de infecção por NEPs é ideal, enquanto abaixo dessa não é considerada boa. Em algumas espécies de *Heterorhabditis*, as temperaturas de 25 °C e/ou 30 °C são consideradas ótimas para o desenvolvimento, o que pode ser observado na presente pesquisa, sendo as temperaturas de 14, 22, 25 e 30 °C permitindo menor período para mortalidade, porém à 14 °C, o período de emergência dos JIs foi superior as demais temperaturas, no entanto em todas as temperaturas os JIs infectaram e desenvolveram-se em *G. mellonella*.

Hazir, et al. (2001) observaram que todos os isolados de *S. feltiae* apresentaram primeira emergência do cadáver mais rápido à 20 e 25 °C e tempo de emergência mais lento a 8 °C, e não houve emergência à 5 e 28 °C. O que é consistente com o observado no tempo de emergência de *S. rarum* PAM 25, onde a temperatura de 25 °C permitiu tempo de emergência de dois dias, enquanto o maior período registrado foi à 14 °C, 8 dias. A emergência de JIs de *S. brazilense* IBCBn 06 foi mais rápida à 30 °C (dois dias) e JI de *H. bacteriophora* HB à 18 °C (3 dias). Enquanto Brida (2015) em análise à 5 diferentes temperaturas encontrou o maior período de tempo registrado para a emergência de JIs de *H. amazonensis* IBCB 24 à 18°C (24,7 ± 2,8 dias), e o menor período de emergência à 30 °C (9,4 ± 2,8). Morton e Garcia-del-Pino (2009) relatam que na temperatura 20 °C, a primeira emergência dos nematoides ocorreu após 20 dias em temperaturas mais baixa, e após 45 dias em temperaturas mais altas.

Andaló, et al. (2011) observaram que temperaturas entre 8 e 20 °C conservam reservas lipídicas de JIs por mais tempo, já entre 24 e 28 °C a porcentagem de lipídios diminui rapidamente, diminuindo a capacidade dos JIs de infectarem as larvas de insetos em 15 dias de armazenamento. Neste estudo, a produção de nematoides foi maior nos primeiros 15 dias em todas as temperaturas, exceto 18 °C em *S. rarum* PAM 25 e *H. bacteriophora* HB e 14 e 18 °C em *S. brazilense* IBCBn 06.

Segundo Kaya e Stock (1997), a obtenção de adultos de primeira ou segunda geração de *Heterorhabditis*, é realizada de 3 a 4 dias após a infecção para a primeira

geração, de 6 a 9 dias para a segunda geração e 15 ou mais para a terceira geração. Os nematoides *S. brazilense* IBCBn 06, *S. rarum* PAM 25 e *H. bacteriophora* HB, apresentaram um ciclo longo, provavelmente com três gerações, mesmo com um número menor de JIs emergidos a 14 °C em *H. bacteriophora* HB e 30 °C em *S. rarum* PAM 25, a emergência estendeu-se mais que 15 dias chegando aos 30 dias ainda com JI emergindo dos cadáveres.

A produção de JIs foi maior à 25 °C nos tratamentos com *S. brazilense* IBCBn 06 (192671 JIs/lagarta), *S. rarum* PAM 25 (153910 JIs/lagarta) e *H. bacteriophora* HB (170750 JIs/lagarta), e menor em *S. brazilense* IBCBn 06 (41300 JIs/lagarta), *S. rarum* PAM 25 (8717 JIs/lagarta) e *H. bacteriophora* HB (7781 JIs/lagarta) em 14 °C.

Corroborando com estes encontros, Brown (1997) relatou que houve menor produção de JIs de *H. bacteriophora* à 15 °C do que em 25 °C. Para Hazir, et al. (2001) todos os isolados apresentaram menor produção de JIs à 8 °C e maior produção à 15 °C.

De acordo com Brida (2015) embora o aparecimento dos juvenis de *H. amazonensis* tenha necessitado de mais tempo à 18 °C, a multiplicação de JI foi maior na temperatura de 26 °C, o que indica que esta é a temperatura ótima e favorável para a reprodução e recuperação de JIs, mesmo não apresentando diferenças com o número de juvenis recuperados a 22 e 30 °C. Sáenze e Lopez, (2011), citam que 25 °C indica ser uma ótima temperatura para o desenvolvimento de NEPs. No presente experimento, o menor período registrado para mortalidade de lagartas infectadas por *H. bacteriophora* HB foi em 30 °C (três dias), porém não houve diferença estatística entre as demais temperaturas, exceto à 18 °C (11 dias).

Entretanto, o menor período para emergência de JIs foi em 18, 25 e 30 °C (três dias). O maior número de JIs produzidos foi em 18 e 25 °C (150.750 a 170.750), sendo 25 °C a temperatura que apresentou condições favoráveis à criação de JIs de *H. bacteriophora* HB.

A quantidade do inóculo empregado é um fator que também afeta o ciclo de vida dos diferentes isolados de NEPs, onde lagartas inoculadas com concentração baixa 25 JIs/lagarta ou com concentração alta 200 JIs/lagarta apresentam um ciclo de vida longo e curto, respectivamente, é provável que esta resposta esteja associada a quantidade de recursos nutricionais oferecidos pelo hospedeiro (ACEVEDO et al.,

2005). A concentração intermediária, 100 JIs/lagarta, utilizada neste estudo pode ser explicada por essa condicional, o que proporciona uma baixa competição entre os juvenis para a infecção e com o ciclo relativamente longo. O estreito gradiente de temperatura onde se obtém o máximo aproveitamento dos recursos dos nematoides fica entre 15 e 30 °C, onde temperaturas marginais comprometem a capacidade de infecção e persistência no solo (KAYA, 1990).

Sendo assim, o presente trabalho agrega informações importantes acerca do comportamento de *S. brazilense* IBCBn n 06, *S. rarum* PAM 25 e *H. bacteriophora* HB, em cadáveres de lagartas *G. mellonella* em diferentes temperaturas, buscando conhecer o efeito deste fator no ciclo de vida desses isolados contribuindo para melhores resultados na produção *in vivo* e utilização desse recurso no biocontrole de insetos praga.

## 6 Conclusão

Logo, a partir destes resultados, conclui-se que a faixa de temperatura de 14 a 30 °C foi efetiva para a produção de nematoides *S. brazilense* IBCBn 06. A produção de *S. rarum* PAM 25 é melhor à  $23 \pm 2$  °C, já a produção de *H. bacteriophora* HB apresentou melhores resultados entre 18 e 30 °C.

## Referências

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

ACEVEDO, J. P. M.; MOINO, A. J.; CAVALCANTI, R. S.; ANDALÓ, V.; MENDONÇA, L. A. Efecto de temperatura, concentración y tiempo de almacenamiento en la supervivencia de nemátodos entomopatógenos. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 32, n. 1, p. 24-30, 2006.

ADAMS, B. JR.; FODOR, A.; KOPPENHOFFER, H. S.; STACKEBRANDT, E.; STOCK, S. P.; KLEIN, M. G. Biodiversity and systematics of nematodebacterium entomopathogens. **Biological Control**, v. 38, n. 1, p. 4-21, 2006.

ALMENARA, Daniela P.; ROSSI Carolina; NEVES Maira R. C.; WINTER Carlos E. Nematoides Entomopatogênicos. In: INCTEM (org.) Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. **INCTEM: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**, Brasília, Cap.16, 2012, p. 1-40.

ANDALÓ, V.; MOINO, A.; MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P.; MENDONÇA, L. A.; Influence of temperature and duration of storage on the lipid reserves of entomopathogenic nematodes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 37, n. 2, p. 203-209, 2011.

BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. C.; NEGRISOLI, A. S. JR.; DOLINSKI C.; BERNARDI D. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) to control Brazilian apple leafroller *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae). **Crop Protection**, v. 29, n. 11, p. 1274-1279, 2010.

BEDDING, R. A. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Annals Applied Biology**, West Sussex, v. 104, n.1, p. 117-120, 1984.

BLINOVA, S. L.; IVANOVA, E. S. Culturing the nematode– bacterial complex of *Neoaplectana carpocapsae* in insects. In: Sonin MD (Ed.), **Helminths of Insects**. American Publishing, New Delhi, 1987. p. 22– 26.

BOFF, M. I. C.; WIEGERS, G. L.; GERRITSEN, L. J. M.; SMITS, P. H. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E87.3 in *Galleria mellonella*. **Nematology**, Leiden, v. 2, n.3, p. 303- 308, 2000.

BRIDA, A. L.; ROSA, J. M. O.; OLIVEIRA, C. M. G.; CASTRO, B. M. C.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C.; LEITE, L. G.; WILCKEN S. R. S.; Entomopargogenic nematodes in agricultural areas in Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, n. 45254, p. 1-7, 2017.

BRIDA, Andressa Lima. **Levantamento de nematoides entomopatogênicos em áreas agrícolas e influência da temperatura e do substrato na sobrevivência, multiplicação e armazenamento**. 2015. 141 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2015.

BROWN, I. M., GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematode. **Nematologica**, v. 43, n. 5, p. 363-375, 1997.

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



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

CHOO, H. Y.; KAYA, H. K.; HUH, J.; LEE, D. W.; KIM, H. H.; LEE, S. M.; CHOO, Y. M. Entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp. And *Heterorhabditis* bacteriophora) and a fungus *Beauveria brongniartii* for biological control of the white grubs, *Ectinohoplia rufipes* and *Exomala orientalis*, in Korean golf courses. **Biocontrol**, Berlin, v. 47, n. 2, p.177-192, 2002.

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

DE LEY, P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. In: WormBook (org) **The C. elegans Research Community**. California, 2006. 8 p.

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

DELL'ACQUA, R.; TOMAZINI, M. D. O.; HAKAKAVA, R.; OLIVEIRA, C. M. G.; ROSA, J. M. O.; LEITE, L. G. Molecular characterization of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) from Mato Grosso do Sul and São Paulo states, Brazil. **Nematologia Brasileira**, v. 37, p. 66-74, 2013

DOLINSKI, C.; KAMITANI, F. L.; MACHADO, I. R.; WINTER, C. E. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n. 2, p. 150-159, mar. 2008

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

DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALÓ, V.; LEITE, L.G.; Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. **Nematoda**, v. 4, n. 10, 2017.

DOWDS Barbara C. A.; PETERS, Arne. Virulence mechanisms. In: gaugler, r. (ed). **Entomopathogenic nematology**. CABI publishing, new York, NY, 2002. p. 79-98,

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

FINNEGAN, M. M.; DOWNES, M. J.; O'REGAN, M.; GRIFFIN, C. T. Effect of salt and temperature stresses on survival and infectivity of *Heterorhabditis spp.* infective juveniles. **Nematology**, Leiden, v. 1, n. 1, p. 69-78, 1999

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

FOLEGATTI, M. E. G.; ALVES, S. B.; HAWAI, P. C.; BOTELHO, P. C. M. Nova metodologia para produção in vivo de *Neoaplectana carpocapsae*. **Nematologia Brasileira**, v. 12, p. 76-83, 1988.

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

FRIEDMAN, M. J. Commercial production and development. In: Gaugler R and HK Kaya (Eds.), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. CRC Press, Boca Raton, 1990, p. 153–172.

GAUGLER, R.; GEORGIS, R. Culture method and efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). **Biological Control**, v. 1, n. 4, p. 269-274, 1991.

GAUGLER, Randy; HAN, Richou. Production technology. In: Gaugler R, (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**. CABI, In press, 2002. p. 289-307..

GEORGIS, Ramon; DUNLOP, Donald B.; GREWAL, Parwinder S. Formulation of entomopathogenic nematodes. In: FR Hall and JW Barry (Eds.), **Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery**. American Chemical Society, Washington, 1995. p. 197–205.

GLAZER, I.; SALAME, L. Osmotic Survival of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae*. **Biological Control**, v. 18, n. 3, p. 251–257, 2000.

GLAZER, Itamar. Survival biology. In Gaugler R (ed) **Entomopathogenic nematology**, CABI Publishing, Wallingford, 2002. p. 205-220.

GOUGE, D. H.; LEE, L. L.; HENNEBERRY, T. J. Effect of Temperature and Lepidopteran Host Species on Entomopathogenic Nematode (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) Infection. **Environmental Entomology**, v. 28, n. 5, p. 876–883, 1999.

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

GREWAL, P. S.; CONVERSE, V.; GEORGIS, R. Influence of production and bioassay methods on infectivity of two ambush foragers (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, n. 1, p. 40– 44, 1999.

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

GREWAL, P. S.; LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; CAMPBELL, J. F. Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, Cambridge, v. 108, n.2, p. 207-215, 1994.

GREWAL, P. S.; NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, M. Entomopathogenic nematode: Potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 191-205, 2001.

GREWAL, P. S.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. **Journal of Thermal Biology**, v. 19, n. 4, p. 245– 253, 1994.

GRIFFIN, C. T. Temperature responses of entomopathogenic nematodes for the success of biological control programs. In: **Nematodes and the Biological Control of Insect Pests**, CSIRO Publications, East Melbourne, 1993. P. 101-111.

HAZIR, S.; KESKINS, N.; STOCK, S. P.; KAYA, H. K.; ÖZCAN, S. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. **Biodiversity & Conservation**, v. 12, n. 2, p. 375–386, 2003.

HAZIR, S.; STOCK, S. P.; KAYA, H. K.; KOPPENHÖFER, A. M.; KESKIN, N. Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 4, p. 243-250, 2001.

HOPPER, K. R.; ROUSH, R. T.; POWELL, W. Management of genetics of biological - control introductions. **Annual Review of Entomology**, v. 38: p. 27– 51, 1993.

KAYA, Harry K. Soil ecology. In: Entomopathogenic nematodes. R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.). **Biological control**. CRC Press, Boca Raton 1990. p. 93-115.

KAYA, Harry K.; STOCK, Patricia S. Techniques in insect nematology. In: Lacey LA (Ed.), **Manual of Techniques in Insect Pathology**. Academic Press, San Diego, CA, 1997. p. 281– 324.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K. Ecological characterization of *Steinernema rarum*. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 73, n. 1, p. 120–128, 1999.

LEITE, L. G. Nematodes entomopatogênicos. In: Batista A Fo (ed.). **Controle biológico de insetos e ácaros**. Instituto Biológico, São Paulo, 2006. p. 42-51.

LEITE, L. G.; BATISTA, FILHO A.; PRADA, W. L. A. Produção de *Neoplectana glaseri* em lagartas vivas e mortas de *Galleria mellonella*. **Revista de Agricultura**, v. 65, p. 225-232, 1990

LEITE, L. G.; SCHMIDT, F. S.; DELLACQUA, R.; PIETROBON, T. C.; MARRASCHI, R. Avanços na produção "in vitro" de nematóides entomopatogênicos. In: Simpósio De Controle Biológico "Mudanças Climáticas E Sustentabilidade: Quebrando Paradigmas", 12., 2011, São Paulo. **Anais do XII Simpósio de Controle Biológico (SICONBIOL)**. São Paulo-SP, Brasil, 2017. P. 51.

LEITE, L. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAZIR, S.; JACKSON, M. A. A new medium for liquid fermentation of *Steinernema feltiae*: selection of lipid and protein sources. **Nematropica**, v. 46, n. 2, p. 147-153, 2016a.

LEITE, L. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAZIR, S.; JACKSON, M. A. The effects of nutriente concentration, addition of thickeners, and agitation speed on liquid fermentation of *Steinernema feltiae*. **Journal of Nematology**, v. 48, p. 126-133, 2016b.

LEITE, L. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAZIR, S.; JACKSON, M. A.. Effect of the inoculum age and physical parameters on in vivo culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 6, p. 686-695, 2017.

LEWIS, E. E.; CLARKE, D. J. Nematode Parasites and Entomopathogens. In: Vega, F. E.; Kaya, H. K. **Insect Pathology**. 2 ed. Amsterdam, Holanda: Academic Press (Elsevier), 2012. p. 395- 424.

LEWIS, E.E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 38, p. 66–79, 2006.

LINDEGREN, J. E.; HOFFMAN, D. F.; COLLIER, S. S.; FRIES, R. D. Propagation and storage of *Neoaplectana carpocapsae* Weiser using *Amyelois transitella* (Walker) adults. **Advances in agricultural technology**. v. 3, p. 1 –5, 1979.

MACHADO, L. A.; HABIB, M.; LEITE, L. G.; CALEGARI, L. C.; GOULART, R. M.; TAVARES, F. M. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 221-226, 2005.

MOLINA, A. J. P.; MOINO, JR. A.; CAVALCANTI, R. S.; DOLINSKI, C.; CARVALHO, F. A. Amostragem e avaliação de técnicas para isolamento de nematóides entomopatogênicos nativos obtidos em Lavras, Minas Gerias. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 17-23, jun. 2005

MOLINA, J. P.; LÓPEZ, J. C. Desplazamiento y parasitismo de los entomonematodos *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) y *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) hacia frutos infestados con la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomología**. v. 28, p. 63-69, 2002.

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

MORTON, A.; GARCIA-DEL-PINO, F. Ecological characterization of entomopathogenic nematodes isolated in stone fruit orchard soils of Mediterranean areas, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p. 203–213, 2009.

NANDINI, G.; LAVHE, N. V.; PANCHBHAI, P. R.; KHADI, B. M. Cottage industry scale in vivo production of *Heterorhabditis indica* for the control of *Helicoverpa armigera* on cotton in India. **International Journal of Nematology**, v. 18: 79–82. 2008

NEGRISOLI JUNIOR, Aldomário Santo, NEGRISOLI Carla Ruth De Carvalho Barbosa, SILVA Ana Paula Pereira De Oliveira. **Produção e Armazenamento de Nematoides Entomopatogênicos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 24 p.

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

NGUYEN, K. B.; GINARTE, C. M.; LEITE, L. G.; SANTOS, J. M.; HARAKAVA, R. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 103, n.1, p. 8 – 20, 2010.

NGUYEN, K. B.; SMART, JR. G. C. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditida). **Journal of Nematology**, v. 28, p. 286-300, 1996

NUGENT, M. J.; O'LEARY, S. A.; BURNELL, A. M. Optimised procedures for the cryopreservation of different species of Heterorhabditis. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 1996.

NGUYEN, Khuong Ba. Entomopathogenic nematodes. Entomology & Nematology Department. University of Florida. 2014. Disponível em: <<http://entnemdept.ufl.edu/nguyen/morph/kbnstein.htm>>. Acesso em: 06 dez. 2018.

POINAR JR, George O. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae, In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K.(eds.), **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton, CRC Press, 1990, p. 23-61.

POINAR, G. Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. Gen., N. Sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae N. Fam.) **Nematologica**, v. 21, n. 4, p. 463-470, 1975.

POPIEL, I.; VASQUEZ, E. M. Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. **Journal of Nematology**, Loudonville, OH, v.23, p. 432-437, 1991.



RAHOO, A. M.; MUKHTAR, T.; ABRO, S.I.; GOWEN, S. R.; BUGHIO, B. A. Effect of temperature on emergence of *Steinernema feltiae* from infected *Galleria mellonella*. **International Journal of Pure and Applied Zoology**, v. 4, n. 1, p. 65-69, 2016.

SÁENZE, A., LÓPEZ, J. C. Ciclo de vida y patogenicidad de un aislamiento nativo de *Heterorhabditis* sp., (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Revista Colombiana de Entomología**. v. 37, p. 43-47, 2011;

SHAPIRO, D. I.; GAUGLER, R. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, Byron, v. 28, n. 3, p. 137-146, 2002.

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

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

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R.; LEWIS, E. E.. In vivo production of entomopathogenic nematodes. **International Journal of Nematology**, v. 14, n. 1, p. 13–18, 2004

SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAN, R.; DOLINKSI, C. Entomopathogenic nematode production and application technology. **Journal of Nematology**, v. 44, n. 2, p. 206-217, 2012.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; LEWIS, E. E.; BEHLE, R. W.; MCGUIRE, M. R. Formulation of entomopathogenic nematode-infected cadavers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 1, p. 17-23, 2001

STOKWE, Nomakholwa Faith. **Entomopathogenic nematodes: Characterization of a new species, long-term storage and control of obscure mealybug, *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae) under laboratory conditions**. 2009. 103 f. M.Sc.. Agric. thesis, Stellenbosch University, South Africa, 2009.

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

SUSURLUCK, A., EHLERS, R. U. Field persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophaga* in different crop. **Biocontrol**, v. 53, p. 627-641, 2008.

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

VAN TOL, R. W. H. M; VAN DER SOMMER, A. T. C.; BOFF, M. I. C.; VAN BEZZOOIJEN, J.; SABLEEIS, M. W.; SMITS, P. H.. Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. **Ecology letters**, v. 4, n. 4, p. 292-294, 2011.

VAN ZYL, C.; MALAN, A.P.; The role of entomopathogenic nematodes as biological control agents of insect pests, with emphasis on the history of their mass culturing and *in vivo* production. **African Entomology**, v. 22, n. 2, p. 235-249, 2014.

VOSS, M.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI JÚNIOR, A. S.; BARBOSA-NEGRISOLI, C. R.; Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos. **Passo Fundo: Embrapa Trigo**, 2009. 44 p.

WANG, H.; LUAN, J.; DONG, H.; QIAN, H.; CONG, B. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes in Liaoning (Northeast China). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 17, n. 3, p. 399–406, 2014.

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

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

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

WOODRING, Jennifer L.; KAYA, Harry K. **Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques**. Southern Cooperative Series Bulletin 331. Fayetteville: Arkansas Agricultural Experiment Station, 1988. 30 p.

WOUTS, W. M. *Steinernema (Neoaplectana)* and *Heterorhabditis* species. IN: NICKLE, WR ed. **Manual of agricultural nematology**, New York, 1991. p.855-897.