

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ARAPIRACA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

ANA PAULA PEREIRA DE OLIVEIRA SILVA

PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
- *Steinernema* (TRAVASSOS, 1927) E *Heterorhabditis* (POINAR, 1976).

ARAPIRACA, AL
2015

ANA PAULA PEREIRA DE OLIVEIRA SILVA

PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
- *Steinernema* (TRAVASSOS, 1927) E *Heterorhabditis* (POINAR, 1976).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Aldomario Santo Negrison Junior.

Coorientadora: Prof. Dra. Carla Ruth de Carvalho Barbosa Negrison.

ARAPIRACA, AL
2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Helena Mendes Lessa

S586p Silva, Ana Paula Pereira de Oliveira.
 Produção e armazenamento de nematoides entomopatogênicos: *Steinernema* (TRAVERSOS, 1927) e *Heterorhabditis* (POINAR, 1976) / Ana Paula Pereira de Oliveira Silva. – Arapiraca, 2015.
 75 f. : il.

 Orientador: Aldomario Santo Negrison Junior.
 Coorientadora: Carla Ruth de Carvalho Negrison.
 Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de Alagoas. Campus Arapiraca. Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente. Arapiraca, 2015.

 Bibliografia: f. 59-75.

 1. Controle biológico. 2. Armadilha de White. 3. Esponja – Controle biológico. 4. *Galleria mellonella*. 5. Nematoides entomopatogênicos (NEPs). I. Título.

CDU: 631:595.132

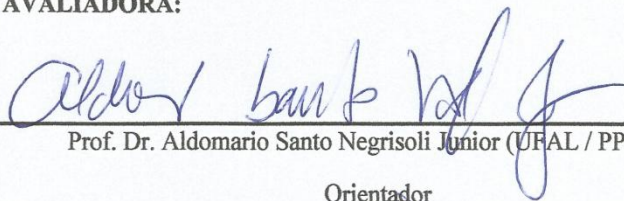
AUTORA: ANA PAULA PEREIRA DE OLIVEIRA SILVA

**PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS: *Steinernema* (TRAVASSOS, 1927) E *Heterorhabditis*
(POINAR, 1976).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente da Universidade Federal de Alagoas - UFAL como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Agricultura e Ambiente.

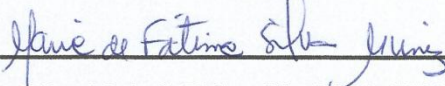
APROVADO: 30/ 03/ 2015

BANCA AVALIADORA:



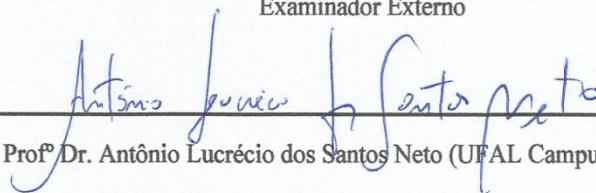
Prof. Dr. Aldomario Santo Negrisoni Junior (UFAL / PPGAA)

Orientador



Prof. Dra. Maria de Fátima Silva Muniz (UFAL / CECA)

Examinador Externo



Prof. Dr. Antônio Lucrécio dos Santos Neto (UFAL Campus Arapiraca)

Examinador Interno

ARAPIRACA, AL
2015

Dedico a Deus, Jesus e Maria por toda inspiração, condução, força, coragem, sabedoria e vitória nessa caminhada tão árdua. Aos meus pais José Admilson da Silva, Neuza Pereira de Oliveira Silva, irmãos Felipe de Oliveira Silva, Livia de Oliveira Silva e noivo José Aparecido da Silva Rocha, por todo amor, carinho, orações, apoio, incentivo e paciência.

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores Dr. Aldomario Santo Negrison Junior e a Dra. Carla Ruth de Carvalho Barbosa Negrison, a minha gratidão pelas sugestões, pelo planejamento, apoio e disponibilidade. Em especial ao Dr. Aldomario pelos ensinamentos, comprometimento, paciência e confiança.

Aos amigos que Deus colocou em meu caminho para ajudar na pesquisa: Alice Maria Nascimento de Araújo, Anderson Rodrigues Sabino, Janaina Ferreira dos Santos, Samara dos Santos, Shirley Pricila Vasconcelos Barbosa e por transformar a minha caminhada mais divertida e leve. Só Deus pode pagar tudo que fizeram.

Ao professor Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo e a Mariana de Macedo Costa pela colaboração e acolhida no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos.

Aos amigos José Atalvanio da Silva e Gleica Maria Correia Martins pela grande ajuda e incentivo.

A Beatriz Caetano da Silva e a Camila Karine Costa e Silva pela paciência, confiança, pelos conselhos e amizade.

A Embrapa por permitir o uso do laboratório e pela recepção por parte de todos os funcionários.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente da UFAL.

A FAPEAL e a CAPES pelo incentivo financeiro e por acreditar no projeto.

A todos muito obrigada!

Tudo contribui para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu desígnio.

Romanos 8,28

RESUMO

Distintas pesquisas revelam o grande potencial dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) no controle biológico de pragas. Nesse sentido, os objetivos deste trabalho foram estabelecer a melhor forma de produção de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) e verificar a influência da temperatura e do tempo no armazenamento com esponja na sobrevivência dos juvenis infectantes desses nematoides. Foi realizada a multiplicação dos NEPs em *Galleria mellonell* e em seguida as lagartas mortas, por nematoide, foram colocadas em armadilhas de White modificadas com esponja e aeração, para ser avaliada a viabilidade e infectividade nas coletas diárias, no quarto e sétimo dias de produção. Os dados experimentais foram submetidos à ANAVA e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Em seguida foi verificado o efeito do armazenamento em esponja na sobrevivência e infectividade dos nematoides. As avaliações foram aos 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias nas temperaturas: 15, 20, 25 e 30°C, os dados foram submetidos à ANAVA e teste de regressão. Posteriormente foram quantificados os lipídios totais dos NEPs por tempo e temperatura, utilizando o método de Blingh & Dyer. Para a viabilidade, nas coletas diárias com o isolado RS38 não se observou diferença significativa entre os tratamentos, enquanto para o AL47 os melhores sistemas foram: convencional, esponja e aeração e esponja. No quarto dia de coleta não houve diferença entre os tratamentos e entre os nematoides. No sétimo dia o melhor sistema, para o RS38 foi esponja com 97,54 % e para o AL47 foi esponja com aeração (82,95%). No teste de infectividade o RS38 foi virulento em todos os tratamentos e em todas as coletas e o AL47 foi virulento nas coletas diárias em esponja, no quarto dia foi no convencional e no sétimo dia foi no convencional e esponja. No armazenamento a 15°C o isolado RS38 se manteve vivo aos 150 dias com 96,48%. *Heterorhabditis* sp. a 20°C apresentou 98,49% da viabilidade aos 30 dias, aos 60 dias teve uma pequena redução na viabilidade. Na análise de infectividade o RS38 aos 15°C apresentou maior mortalidade aos 90 dias (68,8%), comparados as outras temperaturas. Com o isolado AL47, aos 60 dias, a mortalidade caiu drasticamente em todas as temperaturas. Na quantificação de lipídios, os nematoides obtiveram aumento com o tempo, o RS38 teve maior pico aos 90 dias e AL47 aos 30 dias, ambos a 15°C. A escolha do sistema da modificação de armadilha de White depende da quantidade de dias que for colhida. *S. glaseri* sobrevive por mais tempo do que *Heterorhabditis* sp. em armazenamento com esponja.

Palavras-chave: Controle Biológico. Armadilha de White. Esponja. *Galleria mellonella*. Sobrevivência. NEPs.

ABSTRACT

Different researches show the great potential of the entomopathogenic nematodes (EPNs) in biological pest control. In that sense, the objectives of this work were to establish the best way of production of *Steinernema glaseri* (RS38) and *Heterorhabditis* sp. (AL47) and verify the time and temperature influence on storage with sponge in the survival of those infective juveniles nematodes. It was realized the multiplication of EPNs in *Galleria mellonella* and then, the dead caterpillars by nematodes were put in White's traps modified with sponge and aeration to assess the viability and infectivity in daily collections on the fourth and seventh days of production. The experimental data were submitted to ANAVA and Tukey's test to five percent of probability. Then it was verified the storage in sponge effect in the survival and infectivity of nematodes. The evaluations were at 15th, 30th, 60th, 90th, 120th and 150th days at temperatures of 15°C, 20°C, 25°C and 30°C, the data were submitted to ANAVA and regression test. Afterwards, the total lipids of EPNs were quantified by time and temperature, using Blingh & Dyer's method. To the viability in daily collections with RS38 isolated it wasn't noticed great differences neither between treatments nor the nematodes. On the seventh day, the sponge was the best system to RS38 with 97,54% and the best one to AL47 was sponge with aeration (82,95%). In the infectivity test, RS38 was virulent in all treatments and collections and AL47 was virulent in daily collections in sponge, on the fourth day in the conventional and on the seventh, conventional and sponge. The isolated RS38 remained alive in the storage at 15°C and at 150 days with 96,48%. At 20°C, *Heterorhabditis* sp. presented 98,49% of viability at 30 days and it had a small reduction at 60 days. In the infectivity analysis, RS38 presented higher mortality at 90 days (68,8%) and 15°C if compared to the others temperatures. With the isolated AL47, at 60 days, the mortality fell dramatically at all temperatures. In the lipids quantification, the nematodes got an increase with time; RS38 had the higher peak at 90 days and AL47 at 30 days, both at 15°C. The choice of White's trap modifying system depends on the number of days used. *S. glaseri* survives more time than *Heterorhabditis* sp. in storage with sponge.

Keywords: Biological control. White's trap. Sponge. *Galleria mellonella*. Survival. EPNs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Etapas da multiplicação dos nematoides entomopatogênicos. A – Criação de *Galleria mellonella*. B - NEPs mantidos em sacos zip-lock contendo esponjas no banco de nematoides do laboratório de entomologia da Embrapa. C – Suspensão de nematoides entomopatogênicos. D - Inoculação de suspensão de nematoides em *G. mellonella*. E – Lagartas com sintomas de mortalidade, após sete dias, pelo nematoide AL47. F – Lagarta com sintomas de mortalidade, após sete dias, pelo nematoide RS38..... 26
- Figura 2** - Armadilhas de White modificadas. A- Armadilha de White convencional. B – Armadilha com esponja. C – Armadilha com aeração. D – Armadilha com aeração esponja..... 27
- Figura 3** - Avaliação de confirmação de infectividade. A - Sintomas e sinais da morte por *Steinernema glaseri* RS38. B – Sintomas e sinais da morte por *Heterorhabditis* sp. AL47. C - Lagartas de *G. mellonella* sem sintomas e sinais de nematoides entomopatogênicos..... 28
- Figura 4** - A- Armadilhas de White. B – Coleta em Béquer. C – Suspensão de nematoide sendo vertida em peneira de malha 400 mesh. D - Suspensão de nematoide sendo vertida em peneira de malha 500 mesh 30
- Figura 5** - A – Corte da esponja. B – Lavagem da esponja. C – Esponja inserida em saco zip-lock.....30
- Figura 6** - Etapas da montagem do armazenamento em esponja. A - Discos de esponjas cortadas em processo de limpeza com água mineral. B – Pote de coletor universal com quatro discos de esponjas. C – Deposição da suspensão de nematoide no coletor. D – Potes inseridos em bandejas na BOD.....31
- Figura 7** - Avaliação de confirmação de mortalidade por nematoides entomopatogênicos em *Tenebrio molitor*. A – Sintomas e sinais da morte por *Heterorhabditis* sp AL47. B - Sintomas e sinas da morte por *Steinernema glaseri* RS38..... 33
- Figura 8** - Processo de decantação dos NEPs. A – Nematoides AL47 extraídos dos potes, de cada temperatura com volume de 500 ml. B – Retirada da água após a decantação dos nematoides. C – Decantação em tubo Falcon. D – NEPs em microtubo..... 34
- Figura 9** - Extração de lipídios totais. A - Amostras. B - Tubo macerador de vidro com nematoide, clorofórmio e metanol. C – Amostra sendo misturada em vortex. D – Amostra na centrífuga. E – Coleta da fase inferior (orgânica). F – Coleta da fase superior. G – Processo de evaporação em capela de fluxo..... 35
- Figura 10** - Processo de quantificação de lipídios. A – Amostra já evaporada. B – Adição de ácido sulfúrico nas amostras. C – Amostra em banho Maria a 90°C. D – Aplicação da solução de vanilina na amostra em microplaca. E – Coloração da amostra após a vanilina. F - Aparelho Flex Station 3, Molecular Devices. G – Análise pelo SoftMax Pro Software..... 36

- Figura 11** - Viabilidade de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta diária dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 11, 24%..... 37
- Figura 12** - Viabilidade de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no quarto dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 25, 14%..... 38
- Figura 13** - Viabilidade de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no sétimo dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 26,50%..... 39
- Figura 14** - Mortalidade de *Galleria mellonella* causada por *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47), em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta diária dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 25,89%..... 41
- Figura 15** - Mortalidade de *Galleria mellonella* causada por *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47), em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no quarto dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 36,09%..... 42
- Figura 16** - Mortalidade de *Galleria mellonella* causada por *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47), em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no sétimo dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 7,62%..... 43
- Figura 17** - Produção de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta diária dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 33,36%..... 45
- Figura 18** - Produção de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no quarto dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 63,72%..... 46
- Figura 19** - Produção de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no sétimo dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 54,17%..... 47

Figura 20 - Modificação da Armadilha de White no sétimo dia após o início da emergência dos nematoides. A – Armadilha modificada com esponja. B – Poros da esponja visualizados na lupa. C – Armadilha com aeração. D – Armadilha convencional.....	48
Figura 21 - Viabilidade de <i>Steinernema glaseri</i> (RS38) ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.....	50
Figura 22 - Viabilidade de <i>Heterorhabditis</i> sp. (AL47) ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.....	51
Figura 23 - Mortalidade de <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Tenebrio molitor</i> causada pelo <i>Steinernema glaseri</i> (RS38), ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.....	53
Figura 24 - Mortalidade de <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Tenebrio molitor</i> causada pelo <i>Heterorhabditis</i> sp. (AL 47) ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.....	54
Figura 25 - Porcentagem de Lipídios Totais de <i>Steinernema glaseri</i> (RS38), ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.....	56
Figura 26 - Porcentagem de Lipídios Totais de <i>Heterorhabditis</i> sp. (AL 47), ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Nematoides Entomopatogênicos (NEPs).....	16
2.2 Potencial dos Nematoides como Agentes de Controle Biológico	17
2.3 Biologia dos nematoides dos gêneros <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	19
2.4 Produção <i>in vivo</i> de Nematoides Entomopatogênicos.....	20
2.5 Armazenamento de NEPs.....	22
2.6 Fatores Abióticos que Afetam a Sobrevivência dos Nematoides Entomopatogênicos.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Área de Estudo.....	25
3.2 Multiplicação de Nematoides Entomopatogênicos.....	25
3.3 Produção de Nematoides Entomopatogênicos em Armadilhas de White Modificadas e Teste de Viabilidade e Infectividade.....	26
3.3.1 Produção de nematoides entomopatogênicos em armadilhas de White modificadas com esponjas e aeração com estresse de quatro e sete dias.....	28
3.4 Armazenamento de nematoides entomopatogênicos em esponjas com diferentes tempos e temperatura.....	29
3.4.1 Multiplicação de Nematoides Entomopatogênicos	29
3.4.2 Coleta dos Nematoides Entomopatogênicos	29
3.4.3 Armazenamento dos Nematoides Entomopatogênicos em Esponja.....	31
3.4.4 Parâmetros Avaliados e Análises dos Dados.....	32
3.4.4.1 Testes de Viabilidade e Infectividade.....	32
3.4.4.2 Avaliação de Lipídios Totais.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Produção de Nematoides Entomopatogênicos em Armadilhas de White Modificadas e Teste de Viabilidade e Infectividade.....	37
4.1.1 Teste de Viabilidade nas coletas diárias, no quarto e no sétimo dias após o início da produção.....	37
4.1.2 Teste de Infectividade nas coletas diárias, no quarto e sétimo dias após o início da produção.....	40
4.1.3 Produção dos nematoides nas coletas diárias, no quarto e sétimo dias após o início da produção.....	44

4.2 Armazenamento de nematoides entomopatogênicos em esponjas com diferentes tempos e temperaturas.....	49
4.2.1 Teste de Viabilidade dos Nematoides Após o Armazenamento.....	49
4.2.2 Teste de Infectividade dos Nematoides após o Armazenamento	52
4.2.3 Quantificação de Lipídios Totais dos Nematoides	55
5 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca na produção e fornecimento mundial de alimentos e cada vez mais vem buscando de maiores produtividades. Com efeito, cresce o uso de defensivos agrícolas, visando proteger as culturas de pragas, doenças e plantas daninhas. Nesse sentido, a venda de produtos fitossanitários no Brasil saltou de US\$ 2 bilhões para mais US\$ 7 bilhões, entre 2001 e 2008, assumindo assim, a colocação de maior consumidor de agrotóxicos do mundo (LONDRES, 2011).

O uso frequente e muitas vezes incorreto de produtos fitossanitários traz algumas consequências para o ambiente, como por exemplo, a contaminação dos solos agrícolas, das águas superficiais, águas subterrâneas e alimentos, trazendo riscos para a saúde humana, para organismos terrestres e aquáticos, podendo levar à intoxicação ou a morte (SPADOTTO et al., 2004) e ainda provoca a seleção de patógenos resistentes e a diminuição de microrganismos benéficos (GRIGOLETTI et al., 2000).

A adoção de práticas para conservar o ambiente, como a utilização do controle biológico de pragas, proporciona algumas vantagens: menor contaminação ambiental, baixo risco de intoxicação, menor custo financeiro e não interferência no equilíbrio ecológico (GONÇALVES, 1996). Sendo assim, o controle biológico é um fenômeno natural que consiste na regulação de pragas através de inimigos naturais, os quais utilizam parasitóides, predadores e entomopatógenos como agentes para a mortalidade biótica (NAVA, 2007). Nesse sentido, os nematoides entomopatogênicos (NEPs) são usados como agentes de controle biológico.

Os nematoides entomopatogênicos pertencentes às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são patógenos de insetos e o habitat natural é o solo (KAYA; GAUGLER, 1993). Os steinernematídeos possuem simbiose com bactérias do gênero *Xenorhabdus* e heterorhabditídeos estão associados a bactérias do gênero *Photorhabdus*, com o propósito de produzirem grande variedade de toxinas que matam os insetos infectados e também preservam os cadáveres de serem consumidos por outros organismos do solo, sendo eficientes no controle de vários insetos pragas (TÓTH, 2006).

No Brasil, a utilização de NEPs como agentes do controle biológico ainda é recente, mas existe grande potencial para avançarem e tornarem-se controladores de pragas, com o

desenvolvimento de produtos comerciais, de qualidade comprovada, e com características que garantam segurança ao ambiente, ao homem e aos organismos não-alvo (DOLINSKI; MOINO, 2006). E o aumento da utilização de nematoides entomopatogênicos em sistemas agrícolas dependente de avanços tecnológicos para produzi-los em escala industrial e baixo custo de produção (DEL VALLE *et. al.*, 2008).

Dessa forma, a produção dos NEPs é realizada através da armadilha de White que consiste na migração dos juvenis infectivos (JI) do inseto infectado para um recipiente com água e em seguida capturados (WHITE, 1927), para o armazenamento. O armazenamento tem a finalidade de conservar o nematoide durante um período e existem vários métodos para armazenar o nematoide como, em tanques refrigerados com oxigênio, esponja, vermiculita, entre outros (GREWAL, 2002).

No entanto, existem dificuldades para a utilização dos nematoides na agricultura, pois algumas condições são desfavoráveis para a sobrevivência e infectividade dos mesmos, como a variação de temperatura, radiação ultravioleta, oxigenação e umidade (GREWAL *et al.*, 2002). Os nematoides podem ser afetados na produção e no armazenamento, pois são sensíveis e influenciam na viabilidade e infectividade dos NEPs.

Em condições de laboratório os nematoides possuem índices elevados de mortalidade em curto período de armazenamento, e a temperatura é um importante fator, pois influencia tanto na sobrevivência de nematoides como na mobilidade e infectividade (ANDALÓ, 2006). Entretanto cada espécie e isolado de nematoide possui tempo e temperatura ótimos de armazenamento (GREWAL; DHARWADKAR, 2002).

Sendo assim, fazem-se necessárias pesquisas para melhorar as condições de produção e armazenamento, garantindo o prolongamento da sobrevivência e infectividade dos nematoides, visando assim, o aumento da utilização dos mesmos no controle biológico de pragas e a diminuição do uso de produtos fitossanitários. Dessa forma, o trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer o melhor método de produção dos NEPs *Steinernema glaseri* e *Heterorhabditis* sp. e verificar a influência da temperatura e do tempo no armazenamento com esponja na sobrevivência e infectividade dos juvenis infectantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)

A palavra nematoide tem origem grega, onde *nematos* significa fio e pertencem ao filo Nematoda que possui cerca de 25000 espécies descritas, habitantes de mares, água doce e ambientes terrestres (HICKMAN et al., 2013).

O termo entomopatogênico é definido como capacidade de matar ou causar patogenicidade em insetos e são organismos que liberam toxinas e outras substâncias com atividade inseticida (ORTIZ-URQUIZA et al., 2010; CAMPOS et al., 2010; TOLEDO et al., 2010). Os nematoides são encontrados no solo entre as partículas e no filme d'água (WALLACE, 1958).

Dentre as principais famílias de nematoides parasitas de insetos pode-se citar as seguintes: Steinernematidae, Heterorhabditidae, Neotylenchidae e Mermithidae (FERRAZ, 1998). Os membros da família Steinernematidae pertencem aos gêneros: *Steinernema*, que foi classificado por Travassos em 1927; e *Neosteinernema* classificado por Nguyen & Smart em 1994, já a família Heterorhabditidae possui um único gênero, *Heterorhabditis*, descrito por Poinar em 1976, a família Neotylenchidae é representado pela espécie *Beddingia siricidicola*, descrito por Bedding em 1968 e a família Mermithidae possui o gênero *Hexamermis*, descrito por Poinar & Liñares em 1985 (FERRAZ, 1998).

Os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* têm despertado grande interesse como importantes agentes biocontroladores de insetos-praga em todo mundo, a partir da década de 1980 intensificaram-se também, na América Latina (ALVES; LOPES, 2008).

O primeiro nematoide entomopatogênico descrito, em 1923, foi o *Aplectana kraussei* e reclassificado como *Steinernema kraussei* (POINAR; GREWAL, 2012). Em 1930 descobriu-se larvas do besouro japonês, *Popillia japonica*, infectadas com nematoides entomopatogênicos em um campo de golfe de Nova Jersey por Glaser e Fox, que foi identificado como *Neoaplectana* e reclassificado mais recentemente como *Steinernema glaseri* (GLASER; FOX, 1930; DAVIDSON, 2012).

Foi então que começaram as investigações do potencial dos NEPs como agente de controle biológico, onde tentou-se multiplicar, os nematoides, em meios artificiais para a produção massal e o sucesso foi limitado, no entanto, os primeiros estudos foram válidos para

a descoberta do ciclo biológico, do desenvolvimento dos nematóides e de várias espécies (POINAR; GREWAL, 2012).

2.2 Potencial dos Nematoides como Agentes de Controle Biológico

Os nematoides entomopatogênicos têm grande potencial como agentes de controle biológico das pragas que vivem ou passam uma parte do desenvolvimento no solo, podendo substituir inseticidas devido a fácil aplicação e a capacidade de busca do hospedeiro (CAPINERA; EPSKY, 1992). O controle de pragas de solo, com NEPs, vem sendo usado na América do Norte, Europa, Ásia e Austrália (GREWAL et al., 2001) e se intensificando cada vez mais (MCCOY et al., 2000). Várias empresas vem comercializando produtos à base de nematoide entomopatogênico principalmente nos Estados Unidos e na Europa, (GAUGLER et al., 2000). Na Europa têm a empresa E-nema que utiliza o *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *S. carpocapsae* como produto comercializado (E-NEMA, 2015). No Brasil, a empresa é a Bio Controle junto com Instituto Biológico produzem o Bio Nep®, à base de *S. puertoricense* (BIO CONTROLE, 2015).

A partir da década de 1990, as pesquisas intensificaram-se no Brasil na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), na Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF), no Instituto Biológico (IB) e na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (VOSS et al., 2009). Pesquisas como cultivo *in vitro* e armazenamento são apoiadas pelo Programa de Inovação Tecnológica em Pequenas Empresas (Pipe/Fapesp) e pela empresa BioControle Métodos de Controle de Pragas Ltda (ALVES; LOPES, 2008).

A utilização de nematoides entomopatogênicos era há alguns anos voltada apenas para o controle de pragas de solos (ISHIBASHI; CHOI, 1991). Porém, algumas pesquisas mostram que os nematoides têm potencial para controlar pragas acima do solo (TRDAN et al, 2008;. LAZNIK et al., 2011). Nesse sentido, pesquisas no Brasil vem sendo realizadas para testar a eficácia do uso dos NEPs em pragas agrícolas.

Um exemplo é o estudo do controle biológico da mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) (Diptera: Tephritidae) que verificou a eficácia de oito linhagens de NEPs constando assim, que todas as linhagens causaram elevados percentuais de mortalidade

que variaram entre 71% a 98,5% tendo assim, alto potencial para o controle das larvas em laboratório (MINAS et al., 2011).

Segundo Voss et al., (2009) diversos insetos-praga de lavouras brasileiras, que são pragas de solo, tem grande potencial de serem controladas com nematoides como: Cigarra-da-raiz do cafeeiro (*Quesadas gigas*), Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar (*Mahanarva sp.*), Broca-do-rizoma-da-cana-de-açúcar (*Sphenosphorus levis*), Gorgulho-da-goiabeira (*Conotrachelus psidii*), além de outros que tiveram grandes taxas de mortalidade em ensaios feitos em laboratórios como: Lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), Cascudinho de aviário (*Alphitobius diaperinus*), Mosca-das-frutas (*Anastrepha fraterculus*), Coro-das-pastagens (*Diloboderus abderus*), Larva-alfinete (*Diabrotica speciosa*) e Tamandua-da-soja (*Sternechus subsignatus*). Pesquisas, em laboratório e campo, demonstraram que os NEPs possuem um amplo espectro de hospedeiros nos diferentes estádios de desenvolvimento (AKHURST; SMITH, 2002).

Silva (2013) estudou, em laboratório, a ação de dois gêneros de nematoides *Steinernema* e *Heterorhabditis* no controle da broca-da-bananeira *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae), concluindo que todos os isolados de nematoides entomopatogênicos testados foram patogênicos à praga.

No nordeste no Brasil alguns estudos, em laboratório, foram desenvolvidos para testar a eficiência dos NEPs em insetos com grande potencial de controle como as larvas de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) (NEGRISOLI JUNIOR et al., 2011), a broca-gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae) (NEGRISOLI JUNIOR et al., 2013) e a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (NEGRISOLI et al., 2010).

Sabino (2014) avaliou cinco isolados de nematoides (RS38, AL39, AL43, AL44 e AL47), *Steinernema glaseri* RS38 e *Heterorhabditis sp.* AL39, AL43, AL44 e AL47, no controle de adultos de *Rhynchophorus palmarum* L., 1764 (Coleoptera: Curculionidae), conhecido popularmente de broca-do-olho-do-coqueiro. O estudo constatou que em condições de laboratório todos os nematoides foram patogênicos ao inseto, mas *Heterorhabditis sp.* AL43 destacou-se por causar maior taxa de mortalidade em adultos de *R. palmarum*.

Sendo assim, existem muitas vantagens na utilização dos NEPs no controle de insetos, pois são resistentes a defensivos agrícolas, podem mostrar ação sinérgica com outros agentes entomopatogênicos (ex.: *Bacillus thuringiensis*), apresentam boa capacidade de adaptação a novos ambientes (contanto que não tenha condições adversas extremas), não

causam danos às plantas cultivadas e não são nocivos aos animais de criação (FERRAZ, 1998).

Porém a utilização de espécies de nematoides como agente de controle biológico em uma determinada área geográfica, requer conhecimento adequado sobre a biologia e ecologia do nematoide (LALRAMLIANA, 2015). É importante preferir as espécies e/ou isolados nativos, pois são adaptados as condições de origem (KOPPENHÖFER; KAYA, 1999).

2.3 Biologia dos nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*

Os nematoides do gênero *Steinernema* apresentam associações simbióticas com bactérias do gênero *Xenorhabdus*, enquanto *Heterorhabditis* a bactéria do gênero *Photorhabdus* (GEORGIS; MANWEILER, 1994; BURNELL; STOCK, 2000). Estas, por sua vez estão localizadas, na parte anterior do intestino do juvenil infectante (JI). O JI é uma forma de vida livre do nematoide, onde vive no solo até invadir um inseto hospedeiro (STOCK; BLAIR, 2008). É importante ressaltar que nessa fase os nematoides não se alimentam (POINAR, 1979).

A infecção inicia-se com a entrada do J₃, fase do nematoide que infecta o inseto hospedeiro, por aberturas naturais como: boca, ânus, espiráculos ou tegumento (FERRAZ, 1998). Uma vez na hemocela do inseto, o JI libera os simbiossiontes que provocam septicemia causando a morte do hospedeiro e em seguida a multiplicação até a uma elevada densidade para degradar o inseto e fornecer, ao nematoide, nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento (STOCK; BLAIR, 2008). A multiplicação das bactérias altera a cor do inseto; em *Photorhabdus* a cor varia de marrom-escuro e em *Xenorhabdus* marrom claro ou amarelado (VOSS et al., 2009). As toxinas produzidas pelas bactérias, para matar o inseto, produzem antibióticos que impedem o crescimento de outros microrganismos oportunistas (DOLINSKI, 2006).

Os nematoides ao se alimentarem mudam para terceiro e quarto estádios juvenis onde se tornam fêmeas e machos adultos de primeira geração. Em seguida, as fêmeas e machos se acasalam e as fêmeas liberam os ovos que eclodem juvenis de primeira fase e que mudam sucessivamente para as fases de segundo, terceiro e quarto estádios. Os juvenis do quarto estágio se desenvolvem em fêmeas e machos adultos da segunda geração, dentro do corpo do hospedeiro (FUGA et al., 2012).

Após o surgimento e acasalamento dos adultos da segunda geração, tem-se a formação de populações de juvenis infectantes (JIs) que se alimentam temporariamente do cadáver já quase decomposto pelo hospedeiro e depois o abandonam, passando para o ambiente externo, o solo (FERRAZ, 1998). Isso ocorre no segundo estágio juvenil (J_2), quando os nematoides já carregam certa quantidade da bactéria, que fica acumulada no início do intestino, nessa ocasião, a cavidade bucal e o ânus dos juvenis apresentam-se fechados deixando de se alimentar, em seguida passam a J_3 , infestantes, mantendo o envoltório cuticular do estágio anterior; que permanecem até encontrar outro hospedeiro, fechando o ciclo (FERRAZ, 1998).

O gênero *Heterorhabditis* possui ciclo de vida semelhante ao de *Steinernema*, porém a primeira geração possui fêmeas hermafroditas que se autofecundam e produzem os demais estádios (ovo, J_1 , J_2 , J_3 e J_4), que irão se diferenciar em machos e fêmeas na segunda geração (FERRAZ, 1998). Após duas ou três gerações, quando o alimento é esgotado, os JIs saem do inseto e vão para o solo à procura de novos hospedeiros (GREWAL; GEORGIS, 1998).

2.4 Produção *in vivo* de Nematoides Entomopatogênicos

O sistema de produção *in vivo* mais utilizado é baseado na armadilha de White (1927) que iniciou os trabalhos envolvendo a coleta dos nematoides. Dutky et al. (1964), adaptaram o conceito da coleta dos JI aperfeiçoando a ideia de que os nematoides deveriam migrar, dos insetos hospedeiros, para um reservatório de água. Cada laboratório que usa o nematoide utiliza a armadilha de White, porém com algumas modificações (GAUGLER; HAN, 2002), como Woodring e Kaya (1988) que baseiam-se na adição de suspensão de juvenis infectantes vertidos em um papel absorvente e em seguida são colocados as larvas de insetos e após cinco a sete dias, os insetos são transferidos para as armadilhas de White e os JIs são coletados.

O uso de insetos, na produção *in vivo* é fundamental para a multiplicação dos nematoides. A escolha do hospedeiro é importante para a produção dos NEPs, alguns fatores devem ser levados em consideração como a alta suscetibilidade a maioria dos nematoides, facilidade na criação e a capacidade de produzir altos rendimentos, essa é uma característica do inseto mais utilizado nas culturas de nematoides a *Galleria mellonella* (WOODRING; KAYA, 1988). Algumas espécies como cerambicídeos, produzem nematoides duas vezes mais do que a *G. mellonella* entretanto, existe dificuldade na manutenção da criação, possui

alto custo e apresenta baixa infecção (BLINOVA; IVANOVA, 1987). Sendo assim, as espécies mais utilizadas são: traça-dos-favos *Galleria mellonella* (LINNEUS, 1758), (Ordem Lepidoptera e Família Pyralidae) (GREWAL et al., 2001; GAUGLER; HAN, 2002) e *Tenebrio molitor* (FABRICIUS, 1798) (Ordem Coleoptera e a Família Tenebrionidae) como inseto alternativo (FISCHER et al., 2013).

A traça-da-cera é praga de favo de abelhas melíferas, causa a destruição dos favos (WOLFF et al. 2009). As larvas, do referido inseto, podem ser usadas na multiplicação dos nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, pois oferecem elevada produção de juvenis infectantes (POINAR, 1979).

A criação de *G. mellonella* pode ser realizada em condições de laboratório. Segundo Nomura et al. (2006), que avaliaram o efeito da dieta no ciclo biológico das lagartas, verificaram que as condições devem ser mantidas semelhantes às observadas em colméias como, em sala climatizada e praticamente sem luminosidade, utilizando recipientes de alumínio de 7,5 cm de altura e 16,5 cm de diâmetro, com tampas dotadas de tela metálica com malha de 12 mm² e a dieta artificial contendo: 192,6 g de fubá, 94,0 g de levedura de cerveja, 80,2 g de farinha de soja, 48,2 g de leite em pó desnatado, 47,0 g de favo, 236,0 g de mel e 208,0 g de glicerina.

De acordo com Cardoso et al. (2007) que pesquisaram as exigências térmicas dos estádios imaturos de *G. mellonella* concluiu que existe uma temperatura ideal para o desenvolvimento de cada estágio do inseto como: em relação à fase de ovo à 27 °C, larva à 32°C, o estágio pupal, entretanto, pode ser mantido à temperatura de 22°C quando se prioriza o aspecto produtividade de espécimes, ou a 32°C quando o objetivo é velocidade de desenvolvimento. Existem dificuldades na obtenção dessas larvas, em grande quantidade e em diferentes períodos, sendo necessário que o ciclo biológico seja sincronizado, para que estejam disponíveis na periodicidade necessária no desenvolvimento dos experimentos (CARDOSO et al., 2007).

A utilização de *T. molitor* é uma alternativa para a multiplicação dos nematoides e é considerado inseto praga de grãos armazenados e em populações elevadas resultam em prejuízos econômicos (FISCHER et al., 2013). O alimento em abundância, somado com a temperatura e umidade amenas, propiciam a reprodução e proliferação (VARGAS; ALMEIDA, 1992). A criação pode ser mantida em laboratório, em bandejas plásticas, com tampa perfurada contendo farelo de trigo, colmos de cana-de-açúcar ou fatias de chuchu para suprir a necessidade de líquidos (MENEZES et al., 2014).

A produção em escala comercial de nematoides entomopatogênicos vem nos últimos anos conseguindo avanços significativos e o aumento da sua utilização em sistemas agrícolas depende do desenvolvimento de novas técnicas capazes de produzi-lo em escala industrial, com menores custos (MINAS, 2008). Pensando nisso, Gaugler et al. (2002), desenvolveram uma tecnologia automatizada que inclui a coleta, separação e limpeza da produção, de nematoides entomopatogênicos, visando reduzir o custo com mão de obra, a qual é voltado para pesquisa de laboratório que exige grandes quantidades de nematoides para estudos de libertação em campo. Barbosa (2005) comparou os sistemas de armadilhas de White com o funil de Baermann com o propósito de avaliar a melhor produção *in vivo* de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* em lagartas de *G. mellonella* e constatou que a produção foi maior em funil de Baermann com 3.984.758 JIs comparado a armadilha de White que atingiu 486.610 JIs. Demonstrando assim que é possível obter alta produção de nematoides na produção *in vivo*.

Além dos fatores supracitados, para diminuir os custos de produção, é necessário melhorar outros aspectos como a criação dos insetos e desenvolver sistemas de armazenamento para conservar os nematoides (FLANDERS, 1996), tema alvo do presente trabalho.

2.5 Armazenamento de NEPs

O armazenamento é um dos principais obstáculos para a ampliação do uso de nematoides entomopatogênicos como bioinseticidas, pois nenhuma formulação desses organismos atinge o tempo de prateleira de dois anos que é o período de vida útil dos pesticidas químicos convencionais (GREWAL, 2002). Os juvenis podem ser armazenados até vários meses na água em tanques refrigerados com oxigênio, mas é um método com alto custo e são geralmente formulados com aditivos, tendo estes o principal objetivo de aumentar a estabilidade durante o armazenamento, facilitar o transporte, reduzir os custos e aumentar a sobrevivência dos nematoides (GREWAL, 2002).

As formulações à base de esponja de poliéster poliuretano são amplamente utilizados por indústrias nos EUA, para armazenar e transportar pequenas quantidades de nematoides atendendo principalmente aos mercados de gramado casa e jardim. São feitas por aplicação de uma suspensão aquosa de JIs contidos em uma folha de esponja, na concentração de 500 a 1000 JI/mL podendo ser armazenados durante 1 a 3 meses a 5 a 10 ° C (GREWAL, 2002).

Os nematoides que são armazenados na forma de juvenis infectantes (JIs), não se alimentam e dependem unicamente de reserva energética para a sua sobrevivência (QIU; BEDDING, 1999). Os lipídios são considerados predominantes nos nematoides, em se tratando de reserva de energia em longo prazo (BARRETT; WRIGHT, 1998) e são as principais formas de armazenar energia na maioria dos organismos e os principais constituintes das membranas celulares (NELSON; COX, 2011). O nível de reserva de energia é um dos fatores chave que afetam o tempo de vida e infectividade (PATEL et al., 1997; PATEL; WRIGHT, 1997; QIU; BEDDING, 1999).

2.6 Fatores Abióticos que Afetam a Sobrevivência dos Nematoides Entomopatogênicos

A sobrevivência e o sucesso do controle de insetos com nematoides dependem da capacidade do juvenil em se dispersar e da persistência no ambiente até localizar um hospedeiro (KOPPENHÖFER; FUZY, 2007). Os fatores como falta de umidade, exposição extrema de temperatura, radiação ultravioleta e oxigênio podem interferir na eficiência dos NEPs (KAYA; GAGULER, 1993), e as combinações desses fatores podem alterar a sobrevivência e a capacidade que o nematoide tem de infectar o inseto (KAYA, 1990).

Os juvenis movem-se pela película de água que reveste os espaços intersticiais do solo (WALLACE, 1958). Quando o solo seca a película de água diminui restringindo os movimentos do nematóide (KOPPENHÖFER; FUZY, 2007). Sendo assim, a umidade do solo é um dos fatores mais importantes, pois afeta a sobrevivência, virulência e persistência dos nematoides (KLEIN, 1990; CURRAN, 1993). Radová e Trnková (2010), pesquisando o efeito da temperatura e umidade do solo sobre a patogenicidade de duas espécies de steinernematídeos: *S. carpocapsae* e *S. feltiae* verificaram que o nível de umidade mostrou um profundo impacto sobre a patogenicidade das espécies testadas de nematoides e a capacidade de infectar o hospedeiro *T. molitor* diminuiu significativamente em solo com 6% de umidade comparada ao solo com 12,5% de umidade.

Existem espécies que podem tolerar temperaturas extremas, mas é possível que interfira na capacidade de dispersão e persistência se houver baixa umidade do solo (KUNG et al., 1987).

A radiação ultravioleta (UV) é geralmente considerado como o mais destrutivo fator abiótico afetando a eficácia dos entomopatógenos (IGNOFFO; HOSTETTER, 1977). Os NEPs são sensíveis a UV e intolerantes à rápida dessecação (KAYA, 1990), porém são capazes de sobreviver à exposição de dessecação por longos períodos (COOPER; VAN GUNDY, 1971; WHARTON, 1986), por um processo chamado de anidrobiose que é geralmente alcançado na sequência de uma baixa taxa de perda de água (CROWE; MADIN, 1975). A anidrobiose é um processo em que o nematoide fica em estado de dormência induzida por desidratação, sendo um mecanismo reversível (BARRETT, 1991) podendo perder até $95 \pm 98\%$ da água corporal e se a dessecação persistir entram em estado de criptobiose que é a redução do metabolismo (COOPER; VAN GUNDY, 1971). Alguns autores relatam a ação da anidrobiose no organismo do nematoide bem como o efeito fisiológico Goyal et al. (2005), Grewal et al. (2006) e Ali (2012).

Em situações adversas no ambiente algumas populações de nematoides podem ser capazes de evitar o estresse (GLAZER, 2002). Como por exemplo, alguns fitonematoides que migraram para camadas mais úmidas do solo para escapar do calor (VARIN, 1986). Este comportamento pode explicar as conclusões de Glazer et al. (1996), que isolaram maior número de heterorhabditídeos em camadas mais profundas do solo (35-40 cm) durante a temporada de verão, em comparação com a camada superior do solo (5-10 cm de profundidade). Os hospedeiros também podem servir como proteção contra as condições desfavoráveis tais como a temperatura extrema (BROWN; GAUGLER, 1995) e a baixa umidade (BROWN; GAUGLER, 1997; KOPPENHÖFER et al., 1997).

O oxigênio é importante para a sobrevivência dos nematoides, pois são organismos aeróbicos e é considerado um fator limitante, solo saturado de água ou solos com altos teores de matéria orgânica (GLAZER, 2002). A redução de concentrações de oxigênio induz um estado de dormência (WHARTON, 1986), e a baixa disponibilidade pode reduzir a sobrevivência dos NEPs (EVANS; PERRY, 1976; WHARTON, 1986). Sendo um fator limitante no solo e no armazenamento. De acordo com Burman e Pye (1980) investigaram o consumo de oxigênio em JIs de *S. carpocapsae* nas temperaturas de 13, 15, 20, 25 e 30 °C e mostrou que o consumo de oxigênio foi alterado de acordo com a temperatura e que os nemátodos infectantes sobreviveram 43 dias com apenas 0,5% de saturação do oxigênio a 20°C.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Entomologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros da Unidade de Execução de Pesquisa em Rio Largo, Alagoas, Brasil e no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos da UFAL no *Campus* A. C. Simões em Maceió, AL.

3.2 Multiplicação de Nematoides Entomopatogênicos

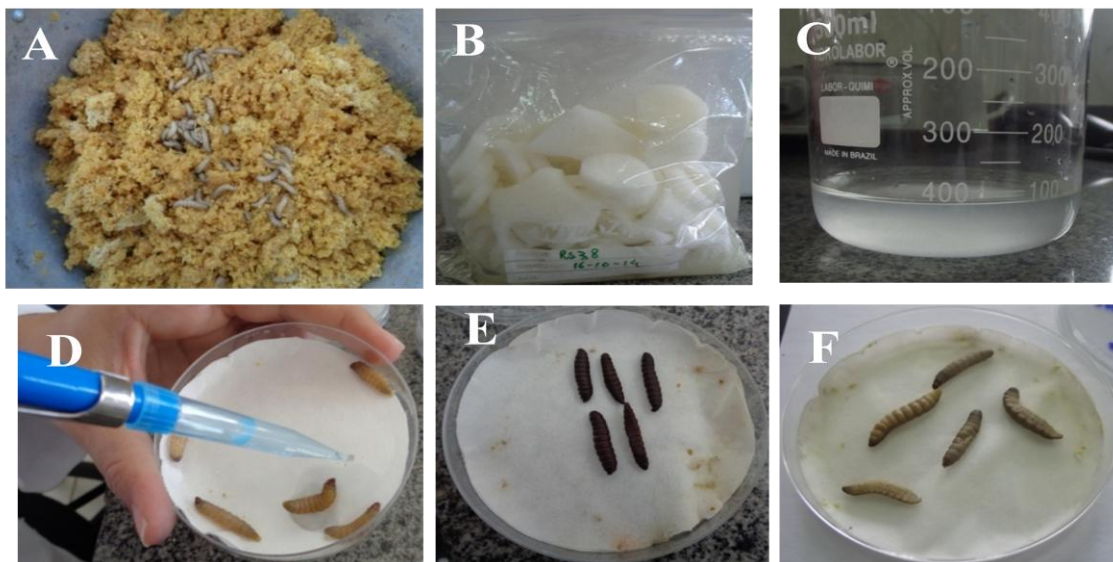
Neste estudo foram utilizados os seguintes nematoides entomopatogênicos: *Heterorhabditis* sp. AL47 e *Steinernema glaseri* RS38. Os NEPs foram mantidos em bolsas, *zip-lock*, com esponjas de poliuretano (Figura 1 B) em sala climatizada com temperatura de $16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, os quais se encontram depositados na coleção de nematoides entomopatogênicos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

O isolado *Heterorhabditis* sp. AL47 foi obtido de amostra de solo coletada em área de cultivo de cana-de-açúcar, no município de Arapiraca, AL, coordenadas $10^{\circ}08'05,4''$ (latitude) $36^{\circ}26'18,4''$ (longitude) (BARBOSA-NEGRISOLI, comunicação pessoal). O nematoide *S. glaseri*, RS 38, foi isolado de amostra de solo coletada em área de cultivo de milho em Passo Fundo, RS (NEGRISOLI, 2009; BARBOSA-NEGRISOLI, 2009).

Para a multiplicação dos nematoides, foram usadas lagartas de *G. mellonella* (Figura 1 A), criadas no Laboratório de Entomologia de acordo com a metodologia adaptada por Parra (1998), modificada por Guerra (1973).

Foram utilizadas cinco lagartas por placa de petri, com 9 cm de diâmetro, contendo dois papeis filtro no seu interior (Figura 1 D). No total foram utilizadas 800 lagartas, para garantir 400 lagartas na distribuição dos tratamentos. Em seguida foi adicionado 2 mL de suspensão de nematoides na concentração total de 200 JIs por placa. As placas foram mantidas à temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ em câmara climatizada tipo BOD. Após sete dias as lagartas de *G. mellonella* infectadas por JIs dos NEPs (Figura 1 E e 1 F) foram pesadas, em balança analítica, com a finalidade de se obter uma média na produção dos JIs e transferidas para os tratamentos que consistiam de modificações da armadilha de White (WHITE, 1927).

Figura 1 - Etapas da multiplicação dos nematoides entomopatogênicos. A - Criação de *Galleria mellonella*. B - NEPs mantidos em sacos zip-lock contendo esponjas no banco de nematoides do laboratório de entomologia da Embrapa. C – Suspensão de nematoides entomopatogênicos. D - Inoculação de suspensão de nematoides em *G. mellonella*. E – Lagartas com sintomas de mortalidade, após sete dias, pelo nematoide AL47. F – Lagarta com sintomas de mortalidade, após sete dias, pelo nematoide RS38.



Fonte: Autora, 2014.

3.3 Produção de Nematoides Entomopatogênicos em Armadilhas de White Modificadas e Teste de Viabilidade e Infectividade

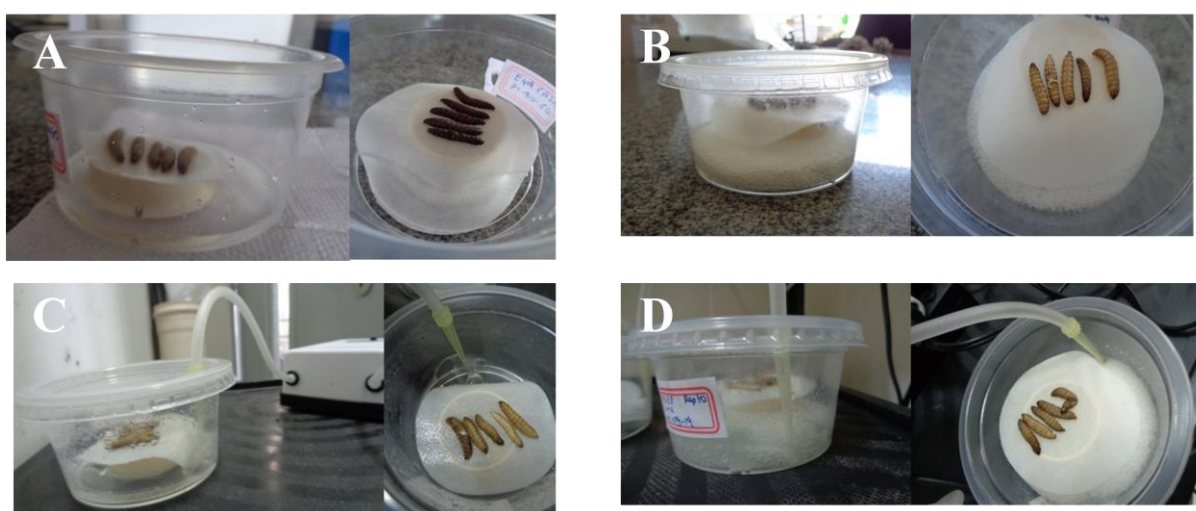
A produção de nematoides foi conduzida em diferentes tratamentos, modificações da armadilha de White, visando a diminuição de mortalidade dos NEPs (JIs) e o aumento da sobrevivência.

Para a realização dos ensaios foram utilizados o controle e os tratamentos em armadilhas de White.

Para o controle foi utilizado a armadilha de White convencional (WHITE, 1927), onde foram utilizados potes de plástico com capacidade de 250 mL, adicionado 20 mL de água destilada, um suporte de cano de PVC (± 2 cm de espessura) e papel filtro (Figura 2 A). Para a realização de todos os experimentos foram utilizados os mesmos materiais e o mesmo volume de água destilada que o controle. Os tratamentos consistiam em armadilhas com esponja e aeração. O tratamento da armadilha com esponja foi acrescentado, no fundo do pote, esponja de poliuretano com um centímetro de espessura (Figura 2 B). O tratamento com aeração fornecia oxigênio através de compressor de ar para aquário (2 watts) conectado a uma

mangueira de silicone e uma ponteira descartável com capacidade de 100 μ L (Figura 2 C), e o tratamento com esponja e aeração fornecia oxigênio da mesma forma que o tratamento com aeração e continha esponja de poliuretano com um centímetro de espessura no fundo do pote (Figura 2 D). O bioensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com dez repetições para cada tratamento. Os tratamentos foram mantidos em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 2 - Armadilhas de White modificadas. A- Armadilha de White convencional. B – Armadilha com esponja. C – Armadilha com aeração. D – Armadilha com aeração e esponja.



Fonte: Autora, 2015.

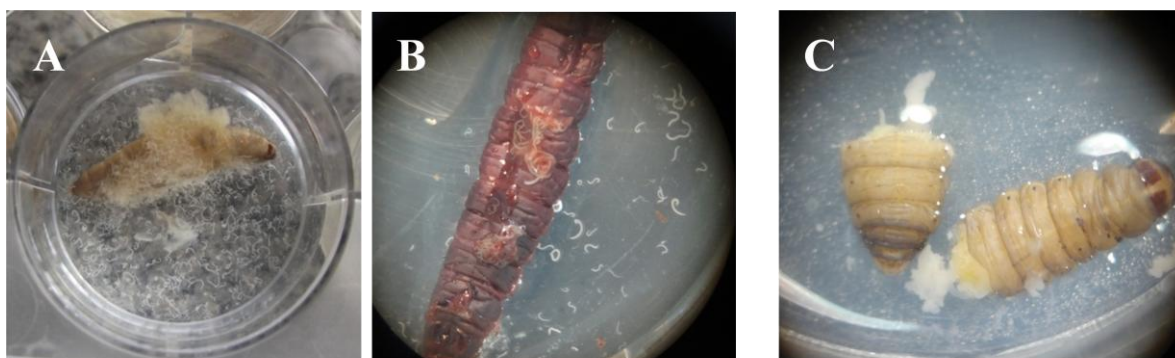
A avaliação foi realizada durante sete dias consecutivos verificando-se a viabilidade dos NEPs. Esta foi determinada a partir da contagem dos nematoides vivos e mortos em microscópio estereoscópio. Foi verificado o número de JIs em 5 alíquotas de 0,25 μ L cada, distribuídas em poços na placa de Elisa. Os nematoides foram considerados mortos quando estavam em uma posição reta e não responderam aos estímulos oferecidos.

O teste de infectividade (Figura 3) foi feito no sétimo dia da avaliação de viabilidade, em todas as repetições dos tratamentos e controle, onde foram utilizadas cinco lagartas de *G. mellonella*, colocadas em uma placa de Petri de 5 cm de diâmetro com dois papéis filtro ao fundo. Foi adicionado 2 mL de suspensão dos nematoides na concentração total de 200 JIs/mL. Após sete dias foi verificada a mortalidade dos insetos, os quais foram individualizados em placas com 24 células, dissecados com a ajuda de pinça, tesoura e bisturi. Em seguida, adicionou-se água destilada sobre o inseto e com o auxílio de um microscópio

estereoscópio, foi visualizado se havia a presença de NEPs e/ou sintomas (Figura 3A, 3B e 3C).

Os dados obtidos foram submetidos à ANAVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

Figura 3 - Avaliação de confirmação de infectividade. A - Sintomas e sinais da morte por *Steinernema glaseri* RS38. B – Sintomas e sinais da morte por *Heterorhabditis* sp. AL47. C - Lagartas de *G. mellonella* sem sintomas e sinais de nematoides entomopatogênicos.



Fonte: Autora, 2014.

3.3.1 Produção de nematoides entomopatogênicos em armadilhas de White modificadas com esponjas e aeração com estresse de quatro e sete dias

Para a realização dos experimentos de produção com estresse de quatro e sete dias houve a multiplicação dos NEPs que ocorreram da mesma forma citada no item 3.2. Em seguida foram preparados os tratamentos e o controle da mesma forma e no mesmo local que o item 3.3.

Os NEPs produzidos não foram retirados e sim acumulados nos potes até o quarto e sétimo dia para a avaliação de viabilidade e infectividade. A importância desses testes está na verificação da eficácia dos tratamentos na sobrevivência dos NEPs.

3.4 Armazenamento de nematoides entomopatogênicos em esponjas com diferentes tempos e temperaturas

3.4.1 Multiplicação de Nematoides Entomopatogênicos

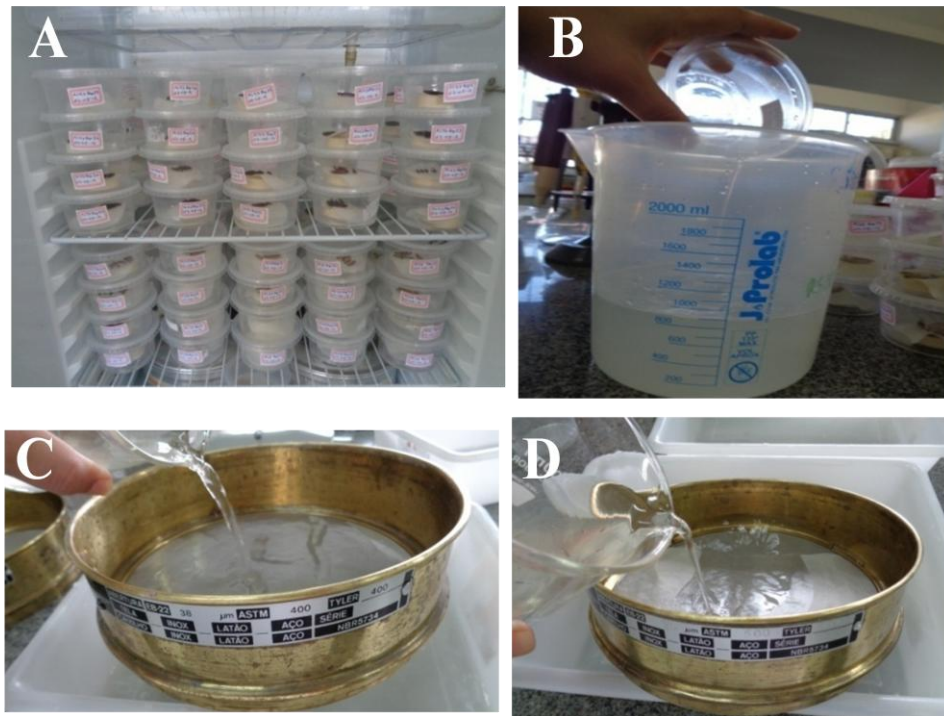
Para a multiplicação dos nematoides foram utilizadas 700 lagartas de *G. mellonella*, sendo que 350 lagartas para o isolado AL47 e 350 lagartas para o isolado RS38, os quais foram colocadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro com duas folhas de papel filtro no fundo. Em seguida foi inoculado 2 mL de suspensão de nematoides, na concentração de 100 JIs/mL. As placas foram mantidas na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em BOD por sete dias.

Após esse período as lagartas infectadas foram transferidas para armadilhas de White, totalizando 140 unidades de coleta, sendo 70 armadilhas para o isolado AL47 e 70 para o isolado RS38. Para cada unidade de coleta foram inseridas 5 lagartas infectadas e 20 mL de água mineral no fundo do pote com capacidade de 250 mL. As armadilhas foram mantidas em BOD na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para a saída dos JIs.

3.4.2 Coleta dos Nematoides Entomopatogênicos

As suspensões de nematoides foram coletadas durante 10 dias (Figura 4). A cada dia de coleta as suspensões foram colocadas em Becker de 2000 mL (Figuras 4 A e 4 B), em seguida peneirados, com peneira de malha 400 mesh (Figura C), para reter a sujeira e ao mesmo tempo permitir a passagem dos JIs. Em seguida, o material foi vertido em peneira de 500 mesh (Figura D) para que os nematoides fossem coletados. Esse processo teve a finalidade de separar os JIs dos nematoides adultos e do corpo gorduroso dos insetos.

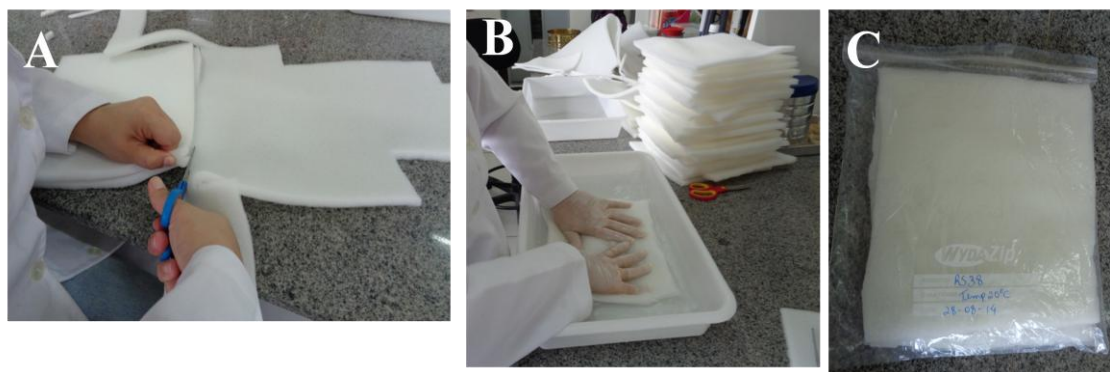
Figura 4 - A - Armadilhas de White. B – Coleta em Béquer. C – Suspensão de nematoide sendo vertida em peneira de malha 400 mesh. D - Suspensão de nematoide sendo vertida em peneira de malha 500 mesh.



Fonte: Autora, 2014.

Em seguida, o volume coletado foi dividido em quatro béqueres de 100 mL. A suspensão de cada um dos béqueres foi armazenada em sacos zip-lock com esponja de poliuretano com espessura de 1 cm. As esponjas foram previamente cortadas do mesmo tamanho do saco (Figura 5 A), e lavadas com água mineral (Figuras 5 B e 5 C). Cada saco com a suspensão foi mantido em BODs com temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C.

Figura 5 - A – Corte da esponja. B – Lavagem da esponja. C – Esponja inserida em saco zip-lock.

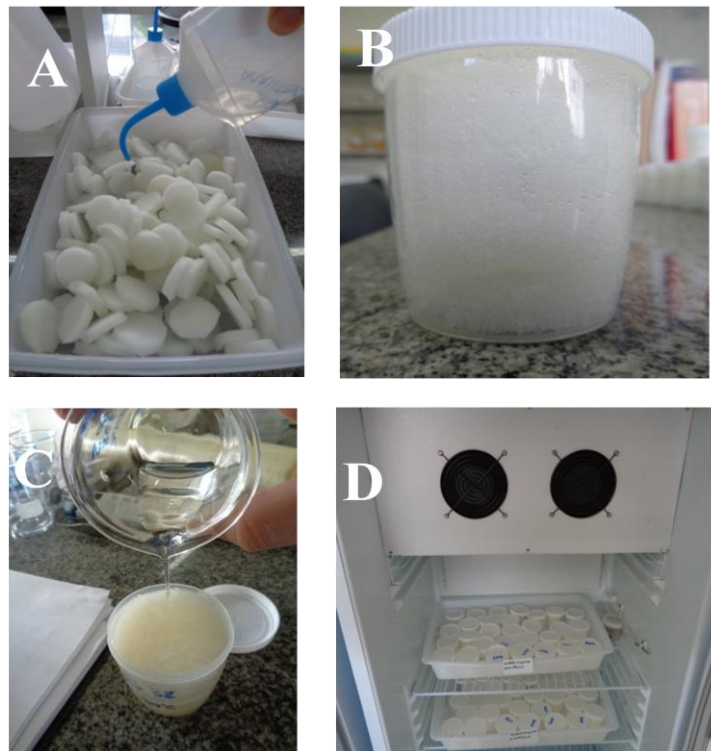


Fonte: Autora, 2014.

3.4.3 Armazenamento dos Nematoides Entomopatogênicos em Esponja

Depois da realização do processo de coleta, foi efetuada a padronização da concentração dos nematoides entomopatogênicos, que foi de 1000 JIs/mL. Em seguida foram colocados 20 mL de suspensão de nematoides em coletor universal. Os coletores continham quatro discos de esponjas que atingiram um volume de 80 mL (Figura 6 B). As esponjas foram cortadas em discos, de acordo com a largura do pote e lavadas com água mineral (Figura 6 A). No total foram utilizados 288 potes, sendo 144 potes para o nematoide AL47 e 144 potes para o nematoide RS38 que foram inseridos em bandejas e distribuídos em BOD nas seguintes temperaturas: 15, 20, 25 e 30°C (Figura 6 D).

Figura 6 - Etapas da montagem do armazenamento em esponja. A - Discos de esponjas cortadas em processo de limpeza com água mineral. B - Pote de coletor universal com quatro discos de esponjas. C - Deposição da suspensão de nematoide no coletor. D - Potes inseridos em bandejas na BOD.



Fonte: Autora, 2014.

3.4.4 Parâmetros Avaliados e Análises dos Dados

Os testes realizados foram: viabilidade, infectividade e quantificação de lipídio dos nematoides. As avaliações foram realizadas aos 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias após o armazenamento durante o período de setembro de 2014 a fevereiro de 2015. Para cada tratamento (tempo) foi considerada 6 repetições por espécie de nematoide e temperatura. Para a retirada dos nematoides foi adicionado 10 mL de água destilada, no coletor universal, para a lavagem da esponja, em seguida pressionado com a pinça para a retirada dos JIs.

3.4.4.1 Testes de Viabilidade e Infectividade

A cada análise de viabilidade foram retiradas, por repetição, cinco alíquotas de 0,25µL e distribuídas em poços na placa de Elisa, para a contagem dos JIs vivos e mortos utilizando estereoscópio. Os nematoides foram considerados mortos quando estavam em uma posição reta e não responderam aos estímulos oferecidos.

Para a análise de infectividade, para cada repetição foi utilizadas cinco lagartas de *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794), para o primeiro teste, pois não havia insetos disponíveis e para todos os outros testes foi utilizado *T. molitor*, que foram colocadas em uma placa de Petri de 5 cm de diâmetro com dois papéis filtro ao fundo. Foi adicionado 2 mL de suspensão dos nematoides na concentração total de 200 JIs/mL. Após sete dias foi verificada a mortalidade dos insetos, sendo estes individualizados em placas com 24 células, dissecados com a ajuda de pinça, tesoura e bisturi para o corte do tegumento. Em seguida, adicionou-se água destilada sobre o inseto e com o auxílio de um microscópio estereoscópio, foi visualizado se havia a presença de NEPs e/ou sintomas (Figura 7 A e 7 B).

Os dados obtidos foram submetidos à ANAVA e teste de regressão utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

Figura 7 - Avaliação de confirmação de mortalidade por nematoides entomopatogênicos em *Tenebrio molitor*. A – Sintomas e sinais da morte por *Heterorhabditis* sp AL47. B - Sintomas e sinais da morte por *Steinernema glaseri* RS38.

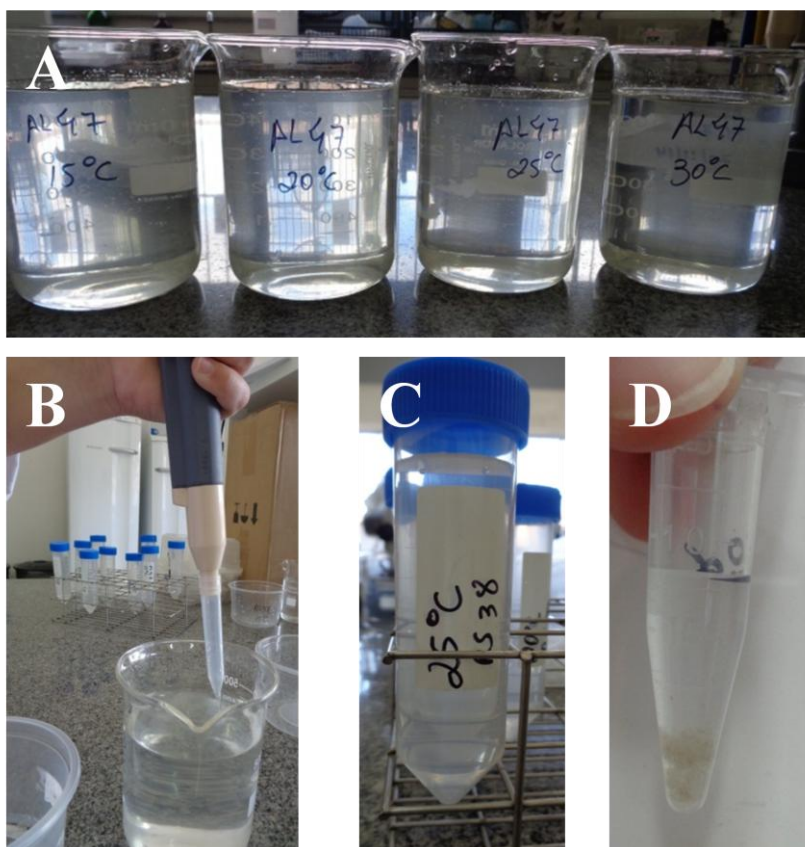


Fonte: Autora, 2014.

3.4.4.2 Avaliação de Lipídios Totais

Para a extração de lipídios totais, teve a união das repetições de cada temperatura para chegar ao volume de 0,1 ml de NEPs (Figura 8 D). Os potes, de cada temperatura, de armazenamento, foram lavados até atingirem um volume de 500 ml e inseridos em Béquer (Figura 8 A) para que os NEPs decantassem, para a retirada da água com pipeta (Figura 8 B), com capacidade de 5 ml, até atingir um volume de 45 ml que foram inserido em tubo falcon (Figura 8 C) para decantar e retirar o excesso de água e só deixar a massa de NEPs.

Figura 8 - Processo de decantação dos NEPs. A – Nematoides AL47 extraídos dos potes, de cada temperatura com volume de 500 ml. B – Retirada da água após a decantação dos nematoides. C – Decantação em tubo Falcon. D – NEPs em microtubo.

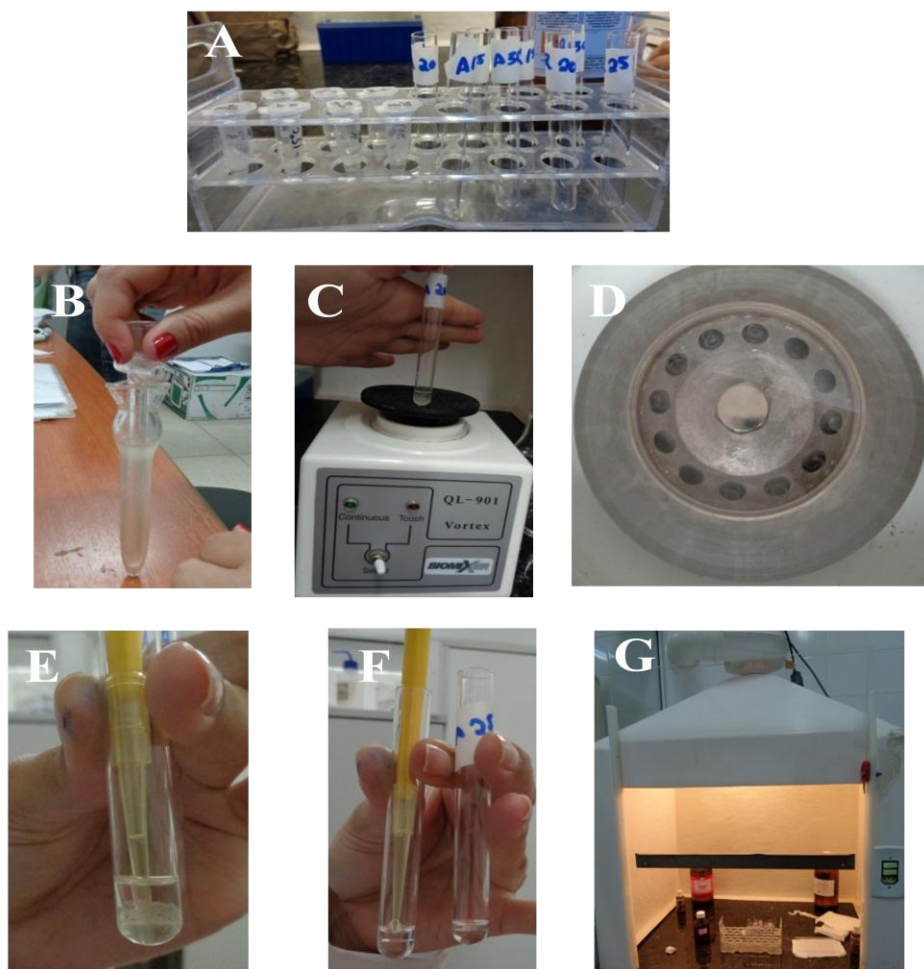


Fonte: Autora, 2015.

As amostras (Figuras 8 D e 9 A) de NEPs foram levadas para o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos da UFAL para a extração dos lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer (1959). Adicionou-se na amostra de NEPs, 0,125mL de clorofórmio (CHCl_3) e 0,25 mL de metanol (MeOH) em um tubo macerador de vidro (Figura 9 B), logo após colocou a mistura em tubo de ensaio para agitar no vórtex (Figura 9 C) e homogeneizar a amostra. Adicionou 0,125mL de clorofórmio e agitou bem em vórtex e colocou 0,125 ml de água e agitou novamente em vórtex. Em seguida foi centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente para gerar um sistema de duas fases (aquosa superior e inferior orgânica) (Figura 9 D). Recuperou a fase de fundo (fase orgânica) (Figura 9 E) com pipeta automática e colocou em um tubo de ensaio para ser misturada com a fase autêntica. A fase autêntica consiste no mesmo procedimento acima, usando água em vez da amostra com as mesmas quantidades de solvente, depois foi agitado no vórtex e centrifugado a 1000 rpm

em seguida recolheu-se a fase superior (Figura 9 F), que foi misturada com a amostra. Por fim, o solvente foi evaporando em capela de fluxo (Figura 9 G).

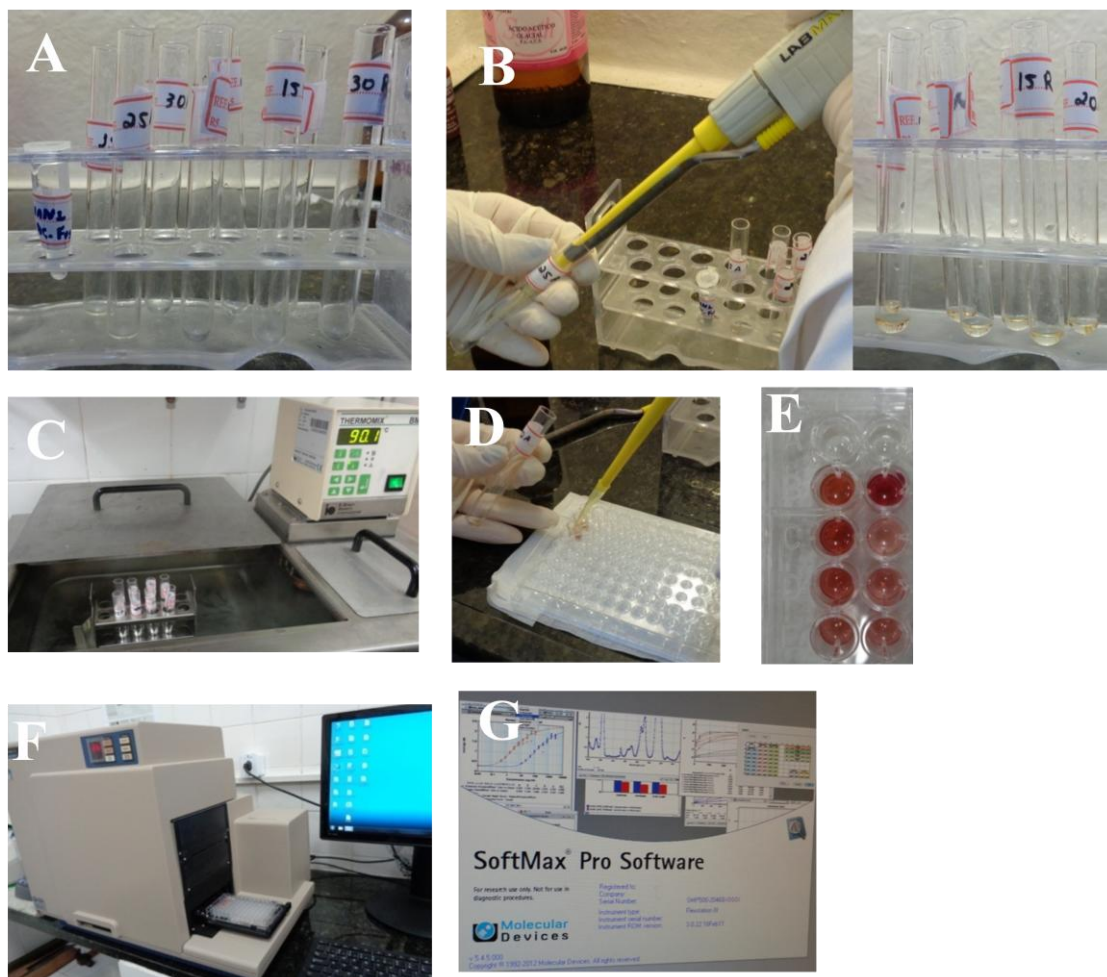
Figura 9 - Extração de lipídios totais. A - Amostras. B - Tubo macerador de vidro com nematoide, clorofórmio e metanol. C - Amostra sendo misturada em vortex. D - Amostra na centrifuga. E - Coleta da fase inferior (orgânica). F - Coleta da fase superior. G - Processo de evaporação em capela de fluxo.



Fonte: Autora, 2015.

Para a quantificação dos lipídios totais, foi empregada a metodologia em microplaca de Cheng et al. (2011). Após a evaporação do solvente (Figura 10 A) adicionou-se 100µL de ácido sulfúrico (Figura 10 B) e foi mantido em banho Maria a 90°C por 20 min (Figura 10 C), resfriou até a temperatura ambiente e acrescentou 50µL da solução de vanilina (0,2mg/mL) e ácido fosfórico 17% (Figura 10 D e 10 E). Após 10 minutos foi medida a absorbância em um comprimento de onda de 540 nm no aparelho Flex Station 3, Molecular Devices (Figura 10 F) e analisado em SoftMax Pro Software (Figura 10 G).

Figura 10 - Processo de quantificação de lipídios. A – Amostra já evaporada. B – Adição de ácido sulfúrico nas amostras. C – Amostra em banho Maria a 90°C. D – Aplicação da solução de vanilina na amostra em microplaca. E – Coloração da amostra após a vanilina. F - Aparelho Flex Station 3, Molecular Devices. G – Análise pelo SoftMax Pro Software.



Fonte: Autora, 2015.

A análise dos dados foi obtida através de porcentagem dos dados comparados com a da massa de nematoide fresca e com as temperaturas empregadas.

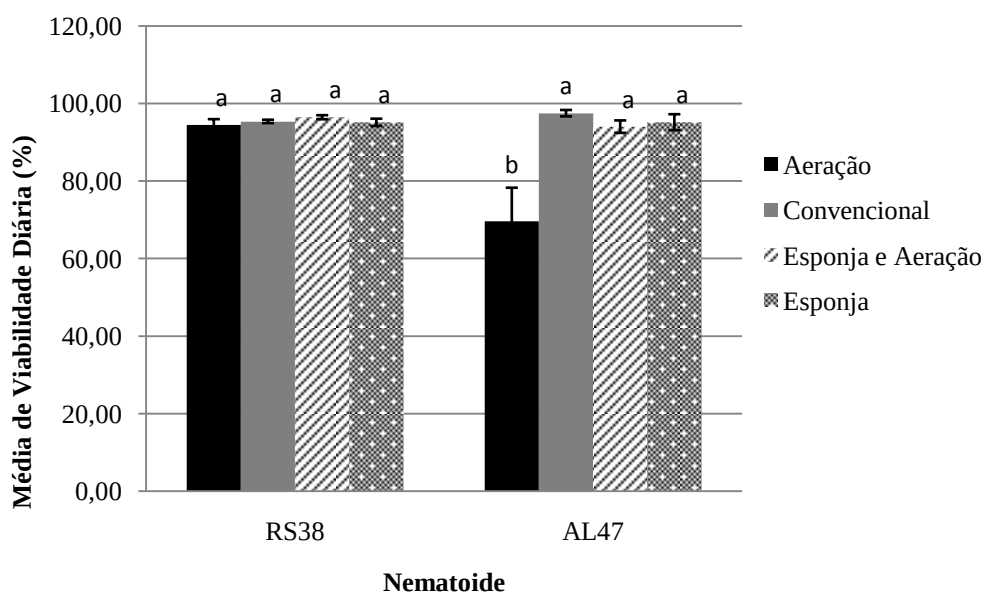
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de Nematoides Entomopatogênicos em Armadilhas de White Modificadas e Teste de Viabilidade e Infectividade

4.1.1 Teste de Viabilidade nas coletas diárias, no quarto e no sétimo dias após o início da produção

Em relação à viabilidade dos nematoides, quando estes foram coletados diariamente observou-se que para *Steinernema glaseri* RS38 não houve diferença significativa entre os tratamentos, isto é, a sobrevivência em todos os tratamentos foi superior a 95%. Por outro lado, o nematoide *Heterorhabditis* sp. AL47 apresentou melhores condições nos métodos: “convencional”, “esponja e aeração” e “esponja” com 97,46; 93,99; 95,13% de viabilidade, respectivamente (Figura 11).

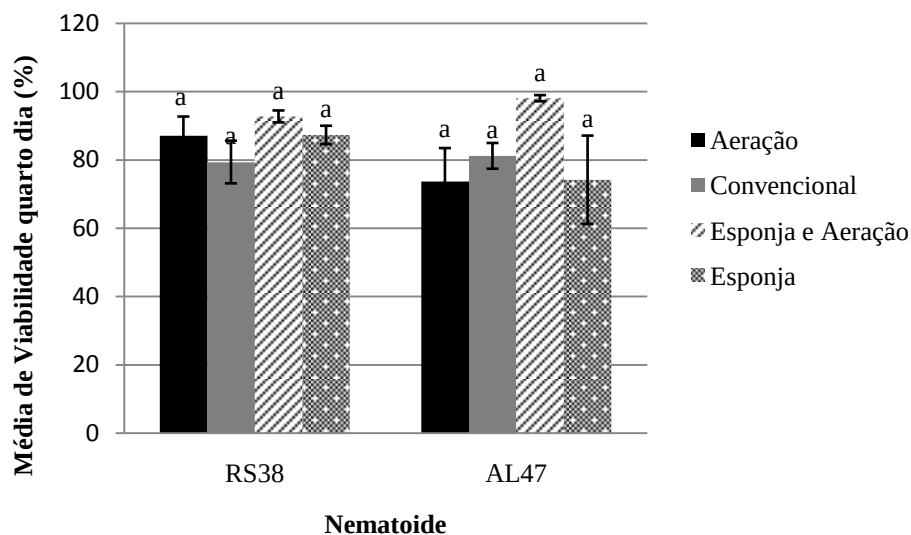
Figura 11 - Viabilidade de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta diária dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 11, 24%.



Fonte: Autor, 2015.

Em relação à viabilidade dos nematoides, quando estes foram coletados no quarto dia de emergência dos JIs, não foram verificadas diferenças significativas, na sobrevivência dos NEPs entre os tratamentos e mesmo entre os nematoides (Figura 12).

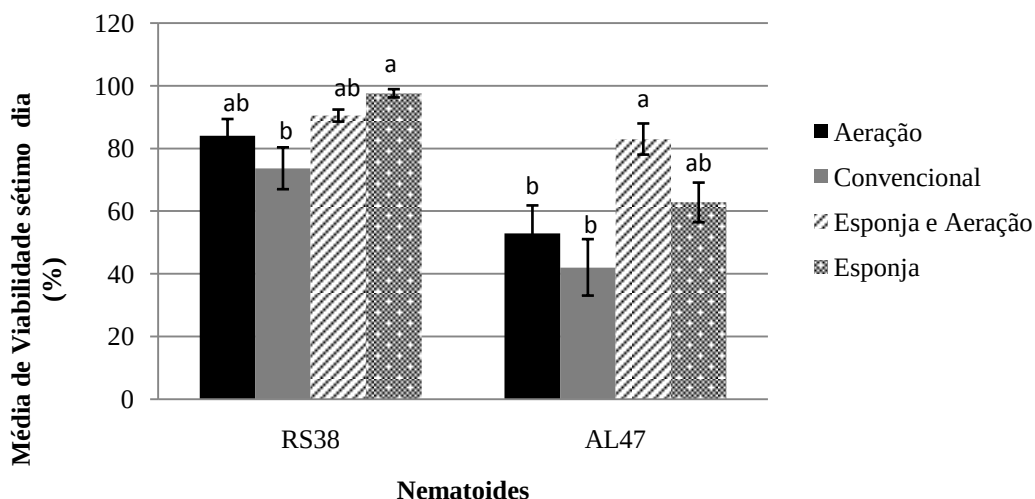
Figura 12 - Viabilidade de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no quarto dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 25, 14%.



Fonte: Autor, 2015.

Em relação à viabilidade dos nematoides quando estes foram coletados no sétimo dia de emergência dos JIs, (Figura 13) o isolado RS38 foi aquele que apresentou melhores resultados nos tratamentos com aeração (84,09%), esponja e aeração (90,43%) e esponja (97,54 %), em comparação com o isolado AL47 (82,95%) e (62,74%), com melhores resultados nos tratamentos com “esponja e aeração” e “esponja”.

Figura 13 - Viabilidade de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no sétimo dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 26,50%.



Fonte: Autor, 2015.

A armadilha de White é um aparato utilizado na coleta de JIs dos nematoides entomopatogênicos na produção *in vivo* e é importante na captura dos JIs que saem das lagartas infectadas. Nesse sistema, os JIs geralmente são coletados diariamente, com o objetivo de não aumentar a concentração dos JIs na água da armadilha e diminuir a demanda de oxigênio, pois quando as condições não são propícias, a sobrevivência dos nematoides fica comprometida. Nesse sentido, a principal contribuição deste estudo foi modificar a armadilha a fim de diminuir o tempo de coleta e como consequência a mão de obra, de forma que não afetasse a sobrevivência dos NEPs. O uso da esponja, já largamente difundido como forma de formulação (e nem tanto para armazenamento), assemelha-se às condições as quais os NEPs são encontrados na natureza. Assim, como as condições de umidade e porosidade do solo, a esponja foi a imitação de um solo arenoso, dando condições de oxigênio e mobilidade ao nematoide para que fiquem viáveis e infectivos. Essa proposta da modificação da armadilha de White é pioneira e proporcionou fácil produção.

Sendo assim, foi verificado nas avaliações diárias que os nematoides permaneceram vivos em todos os tratamentos, devido à renovação de água por conta da coleta dos JIs diariamente, não havendo disputa por oxigênio. Esse fato foi verificado também por Sáenz e Luque (2000) que pesquisaram o cultivo *in vivo* de *S. feltiae* em armadilhas de White

(convencional) e verificaram que as coletas diárias dos juvenis infectantes nos primeiros dez dias de produção, permitiram a obtenção de 90% dos JIs viáveis.

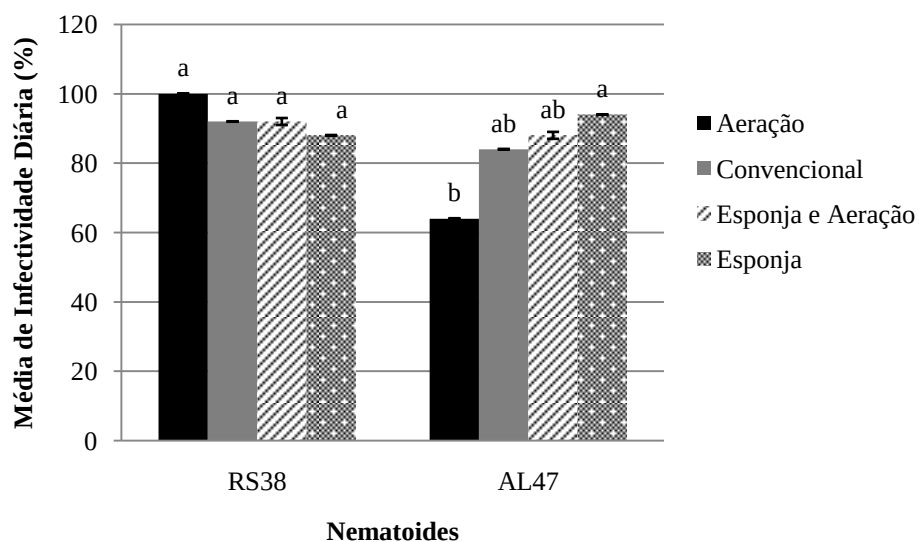
Acredita-se que no quarto dia (Figura 12) os nematoides suportaram as condições de estresse nos tratamentos. No sétimo dia (Figura 13) os melhores tratamentos que favoreceram a sobrevivência dos nematoides foram os que tinham esponja e oxigênio.

Resultados similares, utilizando areia em armadilha, foram encontrados por Perez et al. (2003) que analisaram a sobrevivência e infectividade dos juvenis de *S. riobrave* e *H. bacteriophora* em três condições de emergência, a partir de *Galleria mellonella*: surgimento dos JIs em armadilha de White com água, o aparecimento dos JIs diretamente da areia e o surgimento de JIs em uma malha suspensa sobre areia. Os experimentos foram avaliados após a saída dos nematoides que foram retiradas das lagartas e analisados a cada três dias durante 21 dias, onde as amostras eram retiradas por datas. Sendo assim, o efeito da sobrevivência e infectividade, em armadilha de White em água, foi reduzido significativamente ao longo do tempo, comparados com os outros tratamentos, enquanto a utilização de areia esterilizada aumentou a taxa de sobrevivência do nematoide. Dessa forma, concluíram que a emergência dos JIs em água pode afetar a sobrevivência e infectividade em experimentos de laboratório.

4.1.2 Teste de Infectividade nas coletas diárias, no quarto e sétimo dias após o início da produção

Quanto à infectividade dos isolados RS 38 em coletas diárias, os tratamentos não diferiram entre si, causando elevada mortalidade de lagartas de *G. mellonella*. No entanto, para o isolado AL47, o tratamento com esponja foi mais eficiente causando 94% da mortalidade do inseto-alvo (Figura 14).

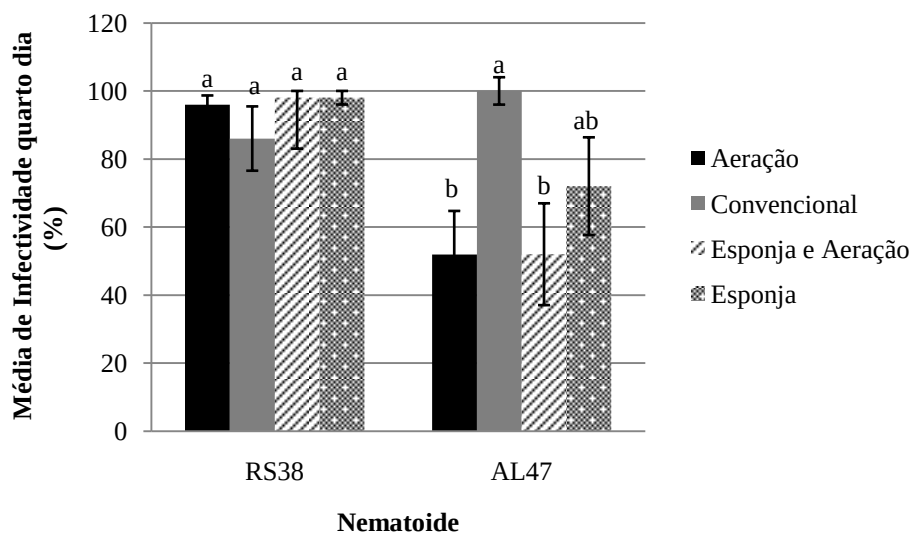
Figura 14 - Mortalidade de *Galleria mellonella* causada por *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis sp.* (AL47), em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta diária dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 25,89%.



Fonte: Autor, 2015.

Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos quando a coleta foi realizada no quarto dia de produção do isolado RS38 não diferem entre si, causando mortalidade em *G. mellonella*. Com relação ao isolado AL47 o sistema convencional causou 100% e a esponja 72% de mortalidade (Figura 15).

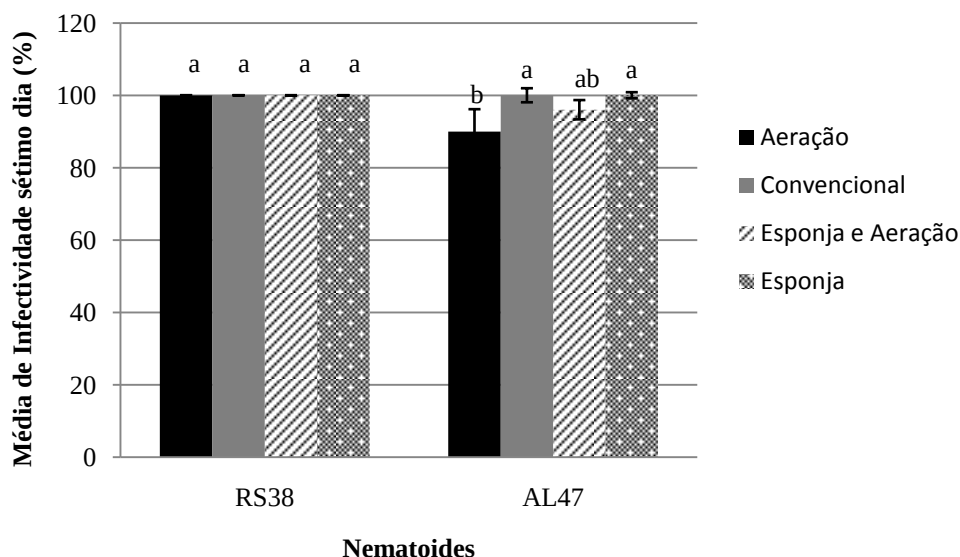
Figura 15 - Mortalidade de *Galleria mellonella* causada por *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47), em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no quarto dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 36,09%.



Fonte: Autor, 2015.

O teste de infectividade com JIs do isolado RS 38 coletados no sétimo dia após o início da produção mostraram que não houve diferença significativa na mortalidade em *G. mellonella*. Por outro lado, com o isolado AL47, os sistemas, convencional e de esponja se destacaram com 100% de mortalidade (Figura 16).

Figura 16 - Mortalidade de *Galleria mellonella* causada por *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47), em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no sétimo dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 7,62%.



Fonte: Autor, 2015.

Observou-se que os tratamentos nas armadilhas, para o teste de infectividade, foram diferentes para os nematoides. Este pode ser uma característica de adaptação das espécies, pois as mesmas condições foram dadas para ambas. Resultados similares de característica adaptativa foi verificada por Koppenhöfer et al. (1995) que analisaram a infectividade de duas espécies de nematoides, *S. capocapsae* e *S. glaseri* em diferentes profundidades de solo e umidades e verificaram que a presença de *S. glaseri* foi favorecida em solo com baixa umidade.

Nesse sentido, Pinto (2009) avaliou o efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade de nematoide entomopatogênicos e observou que os substratos com areia acima de 60% e menos de 30% de argila alcançaram índices de infectividade próximos a 100%. Entretanto, quando a relação areia foi menor que 60% e argila superior a 30%, observou-se uma queda drástica na mortalidade. O autor verificou também que nos solos que possuíam maiores conteúdos de argila, havia redução dos movimentos dos JIs e do potencial de aeração, diminuindo assim, a sobrevivência e eficiência do nematoide.

A diferença da infecção do isolado AL47 nos tratamentos foi devido ao nematoide entrar no inseto, a bactéria causar a infecção, mas não haver multiplicação do nematoide.

No sentido de compreender a interação nematoide e bactéria na eficiência da multiplicação no inseto, Martens et al. (2003) estudaram a interação de *S. carpocapsae* com a bactéria *Xenorhabdus nematophila*. Concluíram que quando a colonização do nematoide inicia no inseto, as células de *X. nematophila* se reproduzem na vesícula intestinal até alcançar alta densidade, sendo assim, o nematoide fornece o alimento para suas bactérias simbiotes e o microorganismo pode ter mecanismos evolutivos para limpar o nematoide, sugerindo que a manutenção das bactérias simbiotes no organismo dos JI é um gasto de energia para o nematoide. Verificaram também que ocorrem declínios populacionais da bactéria podendo indicar uma seletiva pressão imposta pelo nematoide para limitar o tamanho da colônia de seus simbiotes. Isso quer dizer que o nematoide limita eficazmente o crescimento potencial de *X. nematophila* dentro de seu intestino. Analisaram também que a ausência completa de *X. nematophila* da vesícula acabaria com a capacidade reprodutiva do JI.

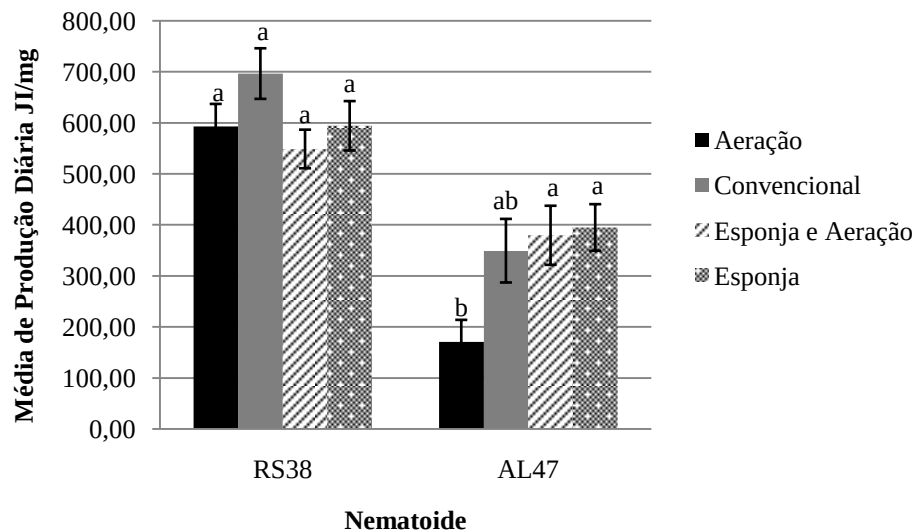
Dessa forma Li et al. (2006), investigando a relação entre a infectividade dos nematoides entomopatogênicos *S. glaseri*, *S. scarabaei*, *S. feltiae*, *H. bacteriophora* e a resposta de imunidade dos hospedeiros: *Exomala orientalis*, *Cyclocephala borealis*, *P. japonica*, *G. mellonella*, *A. domesticus*, *Manduca sexta*, verificaram que *G. mellonella* obteve 100% de infectividade sendo suscetível ao *H. bacteriophora* e *S. glaseri*, no qual se reproduziram com sucesso.

4.1.3 Produção dos nematoides nas coletas diárias, no quarto e sétimo dias após o início da produção

A produção média dos JIs do isolado RS38 nas coletas diárias não foi significativamente diferente entre os tratamentos. Porém, para o isolado AL47 o tratamento “convencional”, bem como o tratamento “esponja e aeração” e o tratamento “esponja” obtiveram melhores produções com 349,15 JIs/mg, 379,36 JIs/mg e 394,65 JIs/mg

respectivamente, sendo que a produção obtida nas avaliações diárias do nematoide RS38 superou ao nematoide AL47, com 65% (Figura 17).

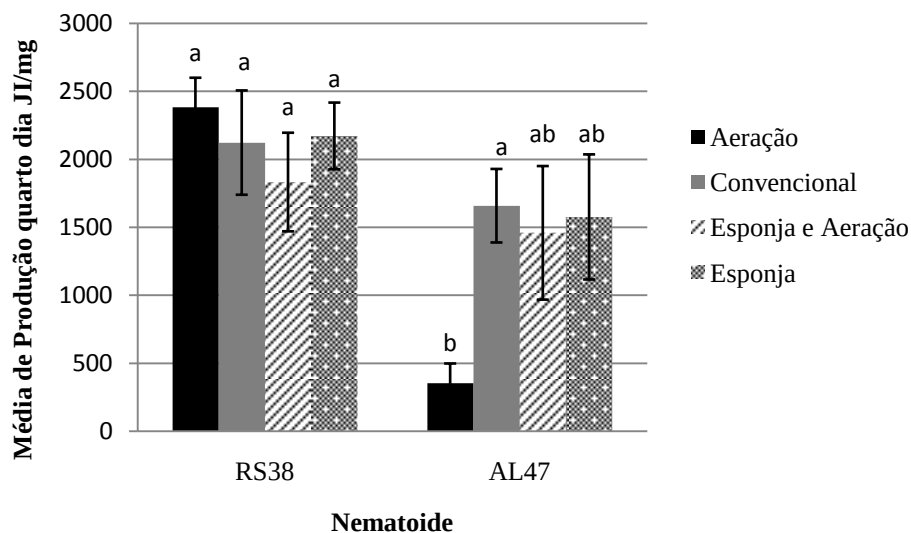
Figura 17 - Produção de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta diária dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 33,36%.



Fonte: Autor, 2015.

Os resultados alcançados para o isolado RS38 nos tratamentos, com coleta no quarto dia de produção não apresentaram diferença significativa. Para o isolado AL47 a armadilha convencional atingiu melhor produção, com 1657,58 JIs/ mg. A produção média do quarto dia do RS38 superou ao do AL47 em 63% (Figura 18).

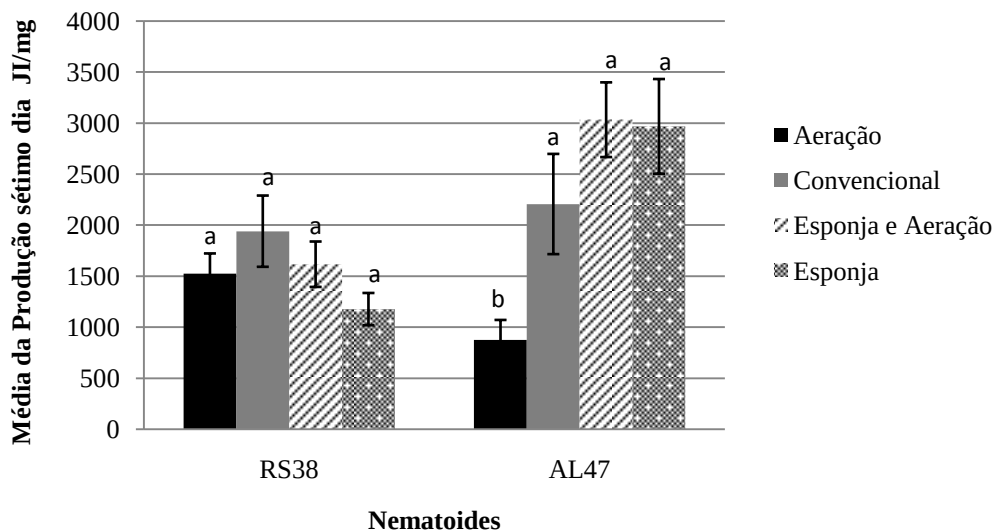
Figura 18 - Produção de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no quarto dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 63,72%.



Fonte: Autor, 2015.

Com relação à produção no sétimo dia, para o isolado RS38 não se observou diferença entre os tratamentos, ou seja, a quantidade de nematoides nos tratamentos foi inferior a 2000 JIs/mg. Em contrapartida, o isolado AL47 obteve melhores produções nos métodos: convencional, esponja e aeração e esponja com números médios de 2205,675, 3031,686 e 2966,426 JIs/mg respectivamente (Figura 19).

Figura 19 - Produção de *Steinernema glaseri* (RS38) e *Heterorhabditis* sp. (AL47) em diferentes sistemas de armadilha de White modificada com coleta no sétimo dia após o início da emergência dos nematoides. Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, CV= 54,17%.



Fonte: Autor, 2015.

Nota-se que de uma forma geral as produções não foram influenciadas pelas modificações das armadilhas e sim pelo comportamento do nematoide. Flanders et al. (1996), observaram em seus experimentos que o estado do hospedeiro poderia influenciar na produção dos JIs, onde alcançou número médio de 336.000 JI por lagarta.

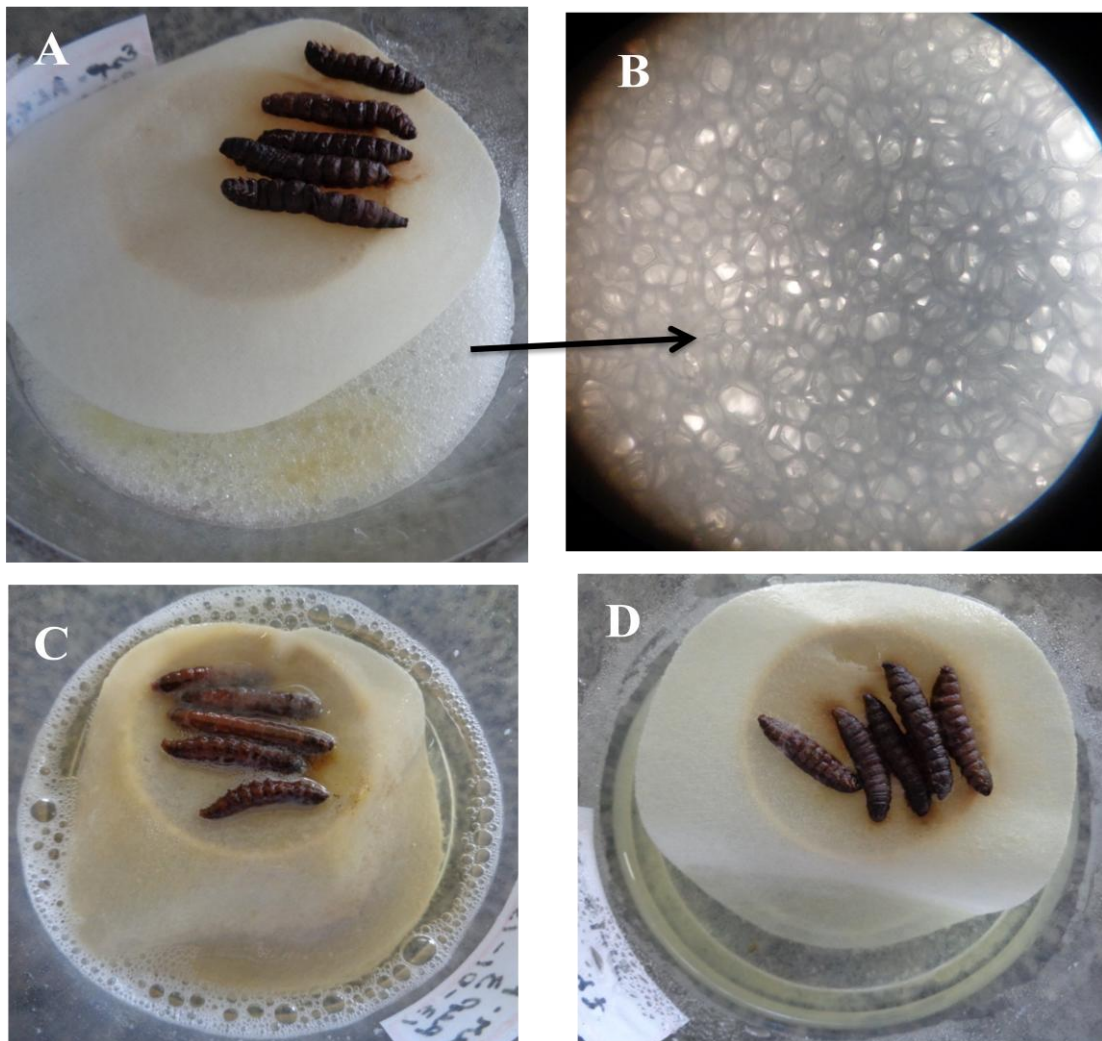
Contudo Molina et al. (2004) avaliaram a multiplicação *in vivo* de três espécies de NEPs do gênero *Steinernema* em quatro hospedeiros e verificaram que as espécies *S. carpocapsae* e *S. arenarium* apresentaram as maiores produções totais de JIs/larva, com 302.124 e 149.213 respectivamente em *G. mellonella*. Segundo os autores, a produção de JIs está relacionada ao tamanho do hospedeiro e à espécie de nematoide. Barbosa (2005) obteve uma produção de 486.610 JIs de *H. bacteriophora*/g em lagarta de *G. mellonella* em sistema de armadilha de White convencional.

Em outro estudo Ozer e Unlu (2003) avaliaram o potencial reprodutivo de *S. feltiae* e *Heterorhabditis bacteriophora* e o maior número de juvenis que emergiram de *G. mellonella* foi observado nos dias quatro e cinco após o período de emergência em *H. Bacteriophora* e nos dias dois e três em *S. feltiae*. Os autores comprovaram que houve diferença significativa

do número de nematoides liberados entre as espécies e o tempo de emergencia dos nematoides, sendo assim as duas espécies apresentaram características distintas.

No sétimo dia de produção a armadilha com esponja (Figura 20 A, B) manteve as lagartas inteiras e as suspensões limpas, contendo apenas os juvenis infectantes. Os poros da esponja facilitaram a circulação de ar e evitaram que os NEPs ficassem concentrados no fundo do recipiente. O sistema com aeração (Figura 20 C) facilitou a proliferação de protozoários, deixou a suspensão com resíduos do cadáver do inseto e com nematoides adultos. Na armadilha convencional (Figura 20 D), as lagartas ficaram intactas, mas os NEPs ficaram concentrados no fundo do pote, correndo o risco de diminuir os níveis de oxigênio e a sobrevivência dos JIs.

Figura 20 - Modificação da Armadilha de White no sétimo dia após o início da emergência dos nematoides. A – Armadilha modificada com esponja. B – Poros da esponja visualizados na lupa. C – Armadilha com aeração. D – Armadilha convencional.



Quando os NEPs ficam concentrados no fundo do recipiente, pode acontecer uma situação de estresse por conta do baixo teor de oxigênio, podendo acelerar as perdas de reservas energéticas, como lipídios (GAUGLER; HAN, 2002).

As lagartas mais conservadas impedem o surgimento de outros microorganismos. Os insetos infectados por nematoides ao serem inseridos no solo estão sujeitos à ação de diversos artrópodes e microorganismos (KAYA, 2002). Dessa forma nas larvas infectadas, em laboratório, por microorganismos diminui os tecidos da lagarta, afetando a produção.

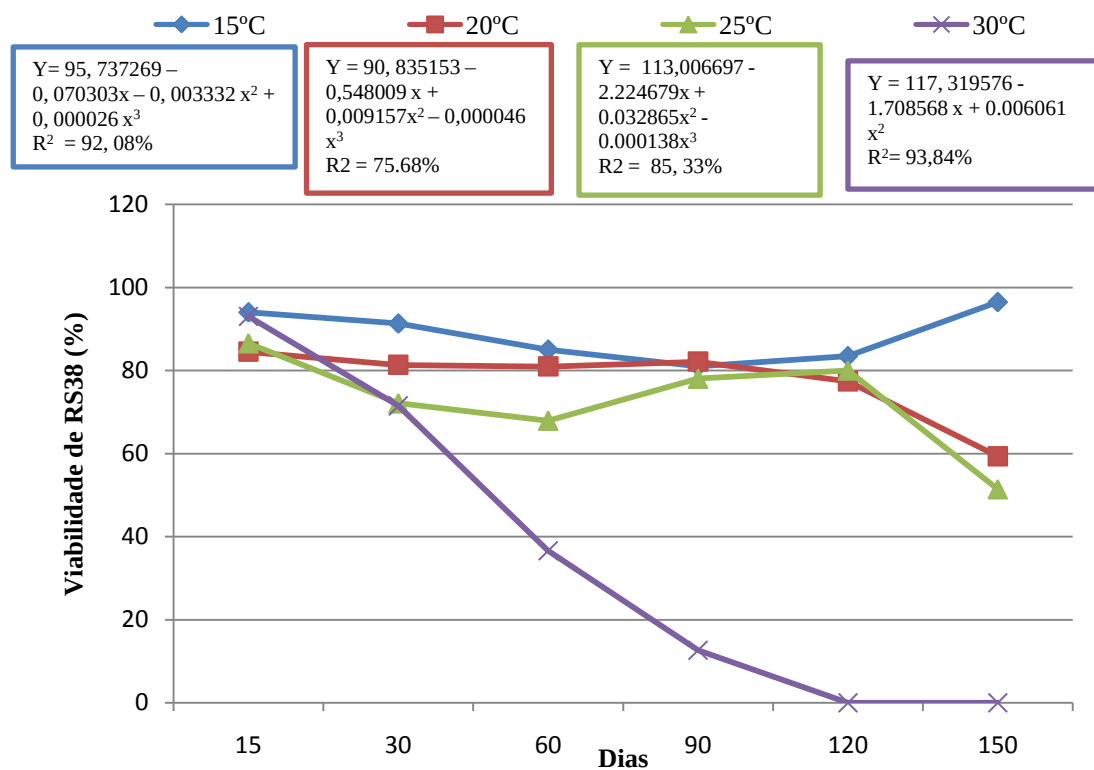
Pensando nisso Del Valle et al. (2009) investigaram o efeito de diferentes revestimentos de proteção em cadáveres de *G. mellonella* infectados com *H. baujardi* LPP7 visando a aplicação dos JIs em campo, onde são colocados no solo e os nematoides saem em busca de novos hospedeiros. Para essa finalidade foram verificadas várias substâncias para cobrir o inseto infectado a fim de evitar danos por atrito e ruptura dos cadáveres. Os tratamentos incluíam as seguintes coberturas de proteção: pó comercial de calcário, pó de talco comercial e cápsulas de gelatina e constataram que estes revestimentos não interferiram na emergência dos JIs e que houve alta infectividade dos JIs que surgiram a partir de cadáveres em todos os tratamentos.

4.2 Armazenamento de nematoides entomopatogênicos em esponjas com diferentes tempos e temperaturas

4.2.1 Teste de Viabilidade dos Nematoides Após o Armazenamento

O *S. glaseri*, RS38, aos 15 dias apresentou 94,01%; 84,52%; 86,56% e 93,05% de viabilidade a 15, 20, 25 e 30°C respectivamente. Após 30 dias a 30°C houve diminuição na sobrevivência, de modo que a cada avaliação foi se acentuando, até que aos 150 dias não foram encontrados nematoides viáveis. Nas temperaturas de 20 e 25°C a partir de 120 dias houve redução, aos 150 dias chegou a 59,33% e a 51,39% respectivamente. Porém, a temperatura de 15°C os nematoides se mantiveram vivos aos 150 dias com 96,48% de viabilidade (Figura 21).

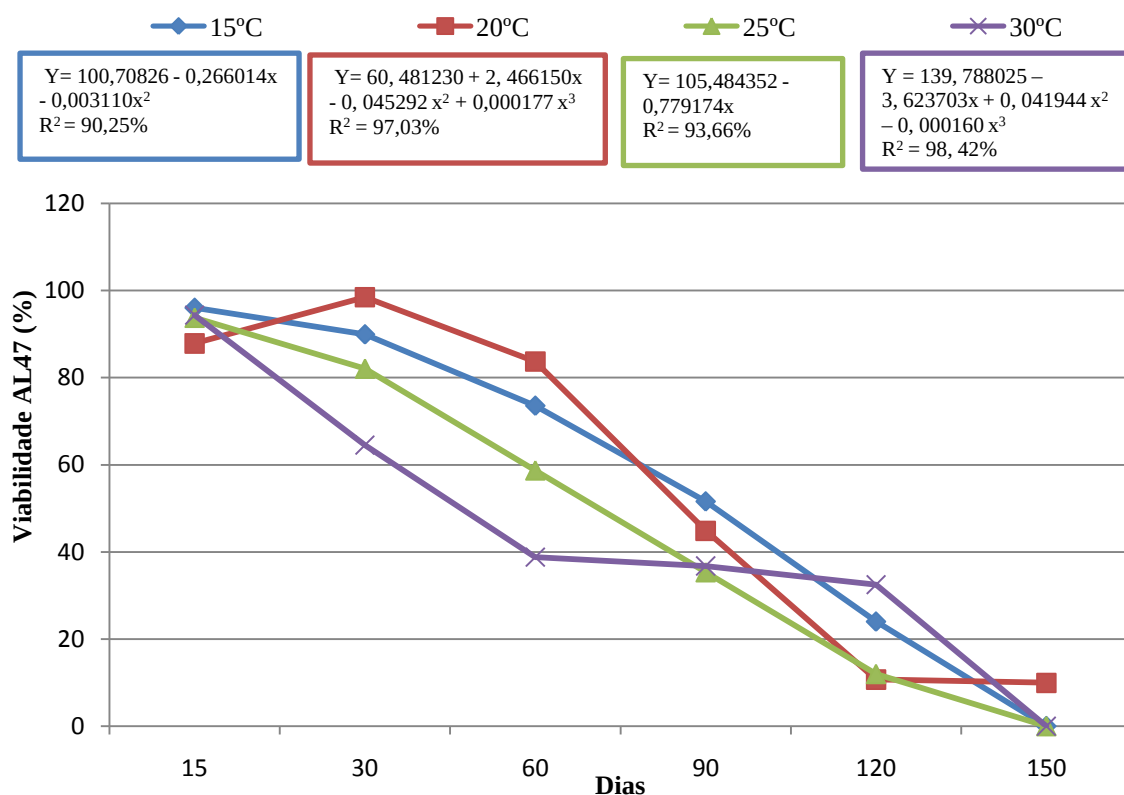
Figura 21 - Viabilidade de *Steinernema glaseri* (RS38) ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.



Fonte: Autor, 2015.

O *Heterorhabditis* sp. AL47 apresentou aos 15 dias 96,01%; 87,88%; 93,79%; 94,32% de viabilidade quando armazenados nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C respectivamente. A partir de 30 dias a viabilidade começou a diminuir nas temperaturas 15, 25 e 30°C, e aos 150 dias não foram encontrados nematoides vivos. Porém, na temperatura de 20°C houve um aumento de 98,49% da viabilidade aos 30 dias, aos 60 dias houve uma pequena redução e aos 150 dias obteve-se 9,96% de viabilidade (Figura 22).

Figura 22 - Viabilidade de *Heterorhabditis* sp. (AL47) ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.



Fonte: Autor, 2015.

O armazenamento é a chave para a utilização dos nematoides entomopatogênicos no controle biológico de pragas. Investigar a melhor forma de conservar o JI por longo período e na temperatura adequada é um desafio, pois em condições de laboratório ocorre alta mortalidade em pouco tempo. Nesse sentido o armazenamento dos JIs em esponja visa compreender o tempo da sobrevivência de *S. glaseri* e *Heterorhabditis* sp. em diferentes temperaturas. Sendo assim, os nematoides foram avaliados em amostras separadas, isso favoreceu a sobrevivência dos JIs nas temperaturas adequadas. Cada espécie de nematoide tem uma faixa de temperatura específica para a sua sobrevivência, infectividade e reprodução, pois está relacionado às condições climáticas de origem (MOLYNEUX, 1986).

Resultados similares foram verificados por Carvalho (2006) que pesquisou a viabilidade dos NEPs: *Heterorhabditis* sp. CCA, *Heterorhabditis* sp. JPM4, *S. riobrave* e *S. carpocapsae*, armazenamentos em água destilada com bombas de oxigênio nas temperaturas

de: 8, 12, 16, 20, 24 e 28°C até 180 dias. Constatou que os JIs de *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4 até 15 dias armazenados não apresentaram redução da viabilidade nas diferentes temperaturas. Aos 30 dias a 8°C teve redução acentuada e aos 60 dias a redução aconteceu com as temperaturas de 12, 24 e 28°C. Aos 120 dias não foram encontrados nematoides viáveis a 8 e 28°C e aos 150 e 180 dias houve decréscimos em 12 e 24°C, sendo melhores as temperaturas de 16 e 20°C para o armazenamento de tais NEPs em suspensão aquosa. *Steinernema riobrave* e *S. carpocapsae* se mantiveram vivos até 60 dias e após esse tempo houve decréscimo nas temperaturas 24 e 28°C; em 150 dias não foram encontrados nematoides viáveis em 28°C e após 180 dias não foram observados nematoides viáveis em 24°C. Assim, as temperaturas de 8, 12, 16 e 20°C foram consideradas adequadas para o armazenamento.

Dados de Lalramliana (2015), também corroboram com o estudo onde avaliou o armazenamento dos JIs em água deionizada de três espécies, *Heterorhabditis indica*, *S. thermophilum* e *S. glaseri*, durante 120 dias a 5 e 25°C. Na temperatura de 5°C aos 15 dias foram as taxas mais elevadas de sobrevivência, com 74% para o *H. indica* e 86% para o *S. thermophilum* e só foram viáveis até 60 dias. *S. glaseri* sobreviveu até os 120 dias onde a taxa mais elevada de sobrevivência foi aos 15 dias com 99,37%. A 25°C foi observado a sobrevivência dos JI's até 120 dias para todas as espécies, onde as taxas de sobrevivência foram baixas, com 25% para *H. indica* e *S. thermophilum* e 60% para *S. glaseri*.

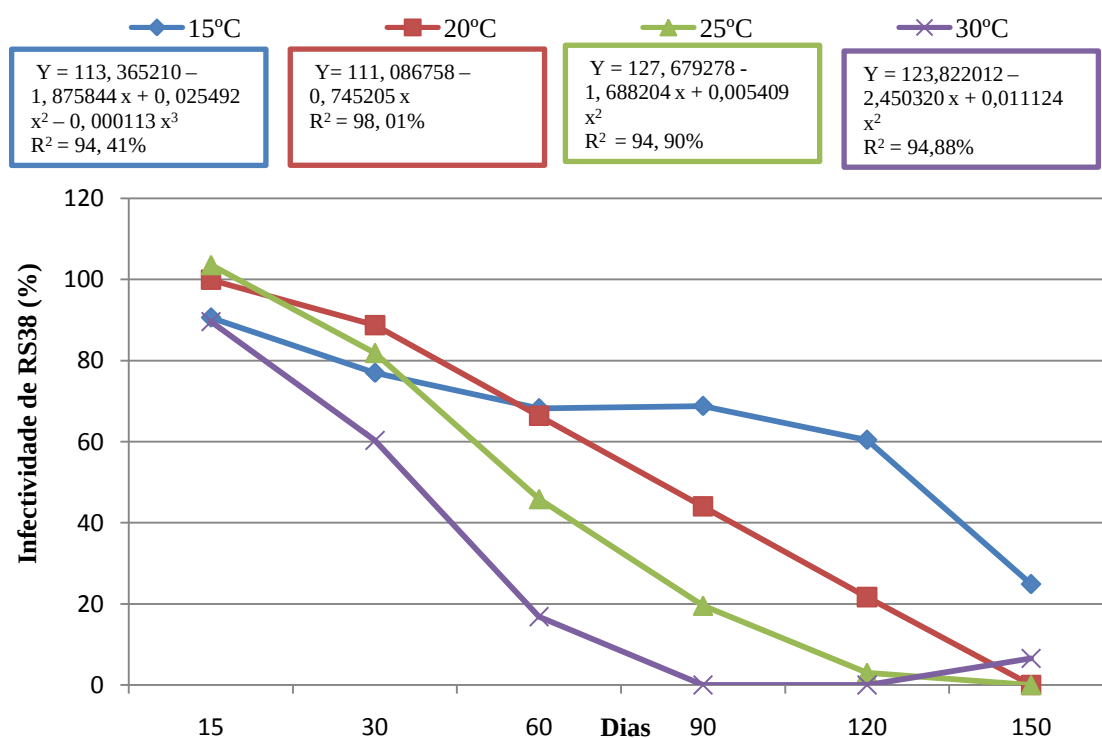
Do mesmo modo, Divya et al., (2011) analisaram seis formulações para o armazenamento de *Heterorhabditis indica* a 27°C e dentre estas a esponja com 2 cm de largura. O experimento foi avaliado durante 11 semanas ou 75 dias. Entre as formulações, não houve diferença significativa na percentagem de sobrevivência na segunda semana, já na quinta semana, esponja teve 65% de sobrevivência e na décima semana chegou a 6% de sobrevivência.

4.2.2 Teste de Infectividade dos Nematoides após o Armazenamento

Aos 15 dias o isolado RS38 causou alta mortalidade nas larvas de *D. saccharalis*: 90,58%, 99,9%, 100% e 89,57% nas temperaturas 15, 20, 25 e 30°C respectivamente. A partir dos 30 dias houve redução das mortalidades, onde a temperatura de 30°C teve o menor índice, com 60,32%. Observa-se que na temperatura de 15°C houve maior mortalidade aos 90 dias

(68,8%), comparados às temperaturas 20, 25 e 30°C que atingiram 44,01%, 19,55% e 0% respectivamente. Aos 150 dias, em todas as temperaturas, a infectividade diminuiu acentuadamente, porém a temperatura de 15°C manteve-se mortalidade acima de 20% (Figura 23).

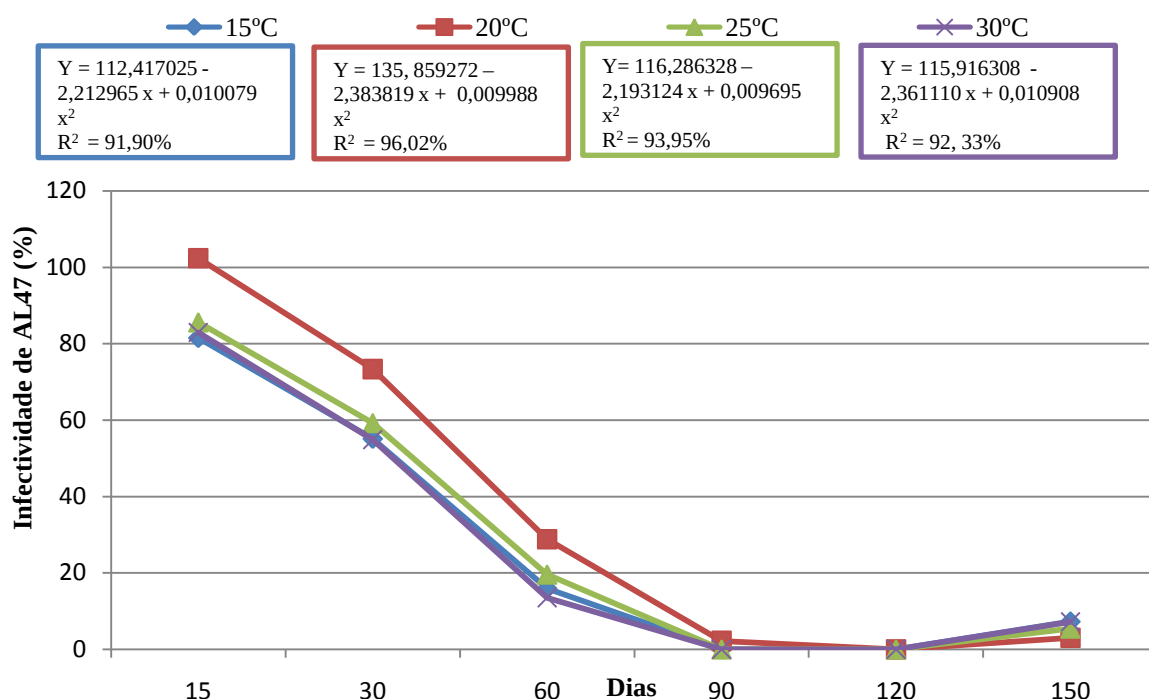
Figura 23 - Mortalidade de *Diatraea saccharalis* e *Tenebrio molitor* causada pelo *Steinernema glaseri* (RS38), ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.



Fonte: Autor, 2015.

Para o isolado AL47, aos 15 dias, a mortalidade foi de 81,49%, 100%, 85,57%, 82,95%, em *D. saccharalis*, nas temperaturas de 15, 20, 25 e 30°C respectivamente. Aos 60 dias, a mortalidade caiu drasticamente para: 15,92%, 28,78%, 19,6% e 13,51% nas diferentes temperaturas testadas. A partir de 90 dias não se observou mais mortalidade nas lagartas (Figura 24).

Figura 24 - Mortalidade de *Diatraea saccharalis* e *Tenebrio molitor* causada pelo *Heterorhabditis* sp. (AL 47) ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.



Fonte: Autor, 2015.

Foram observados os parâmetros de viabilidade e infectividade (Figuras: 21, 22, 23 e 24) e constatou-se que nem todo nematoide vivo é infectivo. Por isso, esses parâmetros devem ser avaliados para detectar a eficiência do nematoide armazenado e verificar a temperatura adequada para a sobrevivência e a patogenicidade em insetos, importante para garantir a eficácia no controle de pragas.

Dados parecidos, com *Heterorhabditis* sp. no presente estudo, foram analisados por BOFF et al. (2000) que estudaram o efeito da temperatura e do tempo no armazenamento a 5, 10, 15 e 20 ° C na infectividade de *H. megidis* durante um período de até dez semanas (70 dias), utilizando larvas de *G. mellonella*. Em quatro semanas de armazenamento houve mais de 30% de mortalidade em todas as temperaturas. À medida que o período do armazenamento aumentava a infectividade dos JIs diminuía tanto em baixas como em altas temperaturas.

No entanto, com relação ao *Steinernema glaseri*, resultados aproximados foram verificados por Barreto (2013) que buscou compreender a preservação de *S. brazilense* e *H. indica* em diferentes condições de temperatura e umidade em solo, durante 60 dias. Concluiu que a areia foi mais adequada na preservação dos nematoides a 15°C, onde causou 100% de mortalidade em *G. mellonella* por até 60 dias.

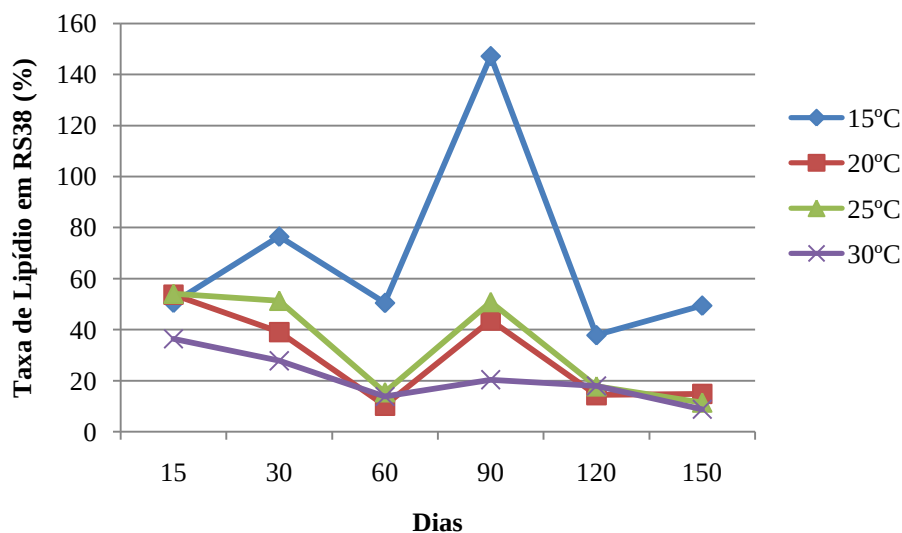
Resultados diferentes foram encontrados por Divya et al. (2011) que investigaram *H. indica* armazenado em varias substâncias, entre estas a esponja, a 27°C durante 11 semanas. A infectividade do nematoide em estudo foi verificado em *Helicoverpa armigera* e apresentou melhor infectividade até oito semanas com valores de 80%. A alta infectividade do NEP deve-se, provavelmente, a espécie do inseto utilizada, pois no presente estudo foi usado espécie de Coleoptera, onde o tegumento é mais rígido do que a *Helicoverpa armigera* e isso pode ter dificultado a penetração do nematoide no inseto.

No sentido de compreender a temperatura adequada para o armazenamento dos nematoides Grewal et al. (1994) investigaram amplitudes térmicas de 12 espécies de NEPs, duas de *Heterorhabditis* e 10 de *Steinernema*, isolados de diversas localidades do mundo. Concluíram que as amplitudes térmicas diferiram entre as espécies de nematoides estudadas e que os isolados da mesma espécie, mas de diferentes localidades, tinham os mesmos nichos térmicos.

4.2.3 Quantificação de Lipídios Totais dos Nematoides

Os lipídios dos nematoides foram observados nos diferentes tempos e temperaturas (Figuras 25 e 26). Para o nematoide RS38 aos 90 dias na temperatura 15°C houve um aumento de 147%, na temperatura 20°C de 43,5% e a 25°C houve aumento de 50,7% na quantidade dos lipídios totais (Figura 25).

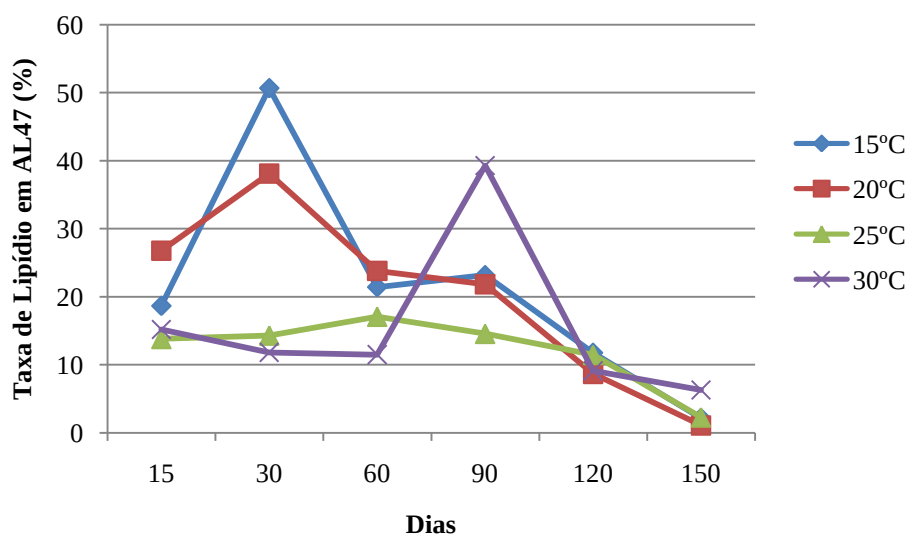
Figura 25 - Porcentagem de Lipídios Totais de *Steinernema glaseri* (RS38), ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.



Fonte: Autor, 2015.

Para o nematoide AL47 verificou-se que aos 30 dias a 15°C e a 20°C houve um aumento de 50,6% e 38% respectivamente. Já aos 60 dias a 25°C houve um pico de 17%. Aos 90 dias houve aumento de 39, 2% na temperatura de 30°C (Figura 26).

Figura 26 - Porcentagem de Lipídios Totais de *Heterorhabditis* sp. (AL 47), ao longo do tempo após o armazenamento com esponja e exposto a diferentes temperaturas.



Fonte: Autor, 2015.

O lipídio é um fator importante na sobrevivência do JI, pois é a principal forma de acumular energia e a quantidade deste é um parâmetro para verificar o tempo de vida e capacidade de infectar o inseto.

A quantidade de lipídios totais encontrados nos NEPs tende a aumentar em determinado tempo e determinada temperatura e em seguida há um declínio, isso seria uma característica de adaptação e um mecanismo de sobrevivência. Os níveis altos encontrados provavelmente devem-se às substâncias envolvidas capazes de prolongar a vida. Como não houve testes para saber qual substância estaria predominando a hipótese seria trealose, pois houve a maceração do nematoide, no método de quantificação de lipídio, permitindo que outras substâncias energéticas fossem envolvidas.

Resultados contraditórios foram encontrados por Andaló et al. (2011) que verificaram a concentração de lipídios neutros no corpo dos JIs, dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* através de coloração, utilizando o método “Oil Red O” e constataram que o teor de lipídio diminuía ao longo do tempo em armazenamento com bomba de oxigênio. Nas temperaturas de 8 e 16°C, após 180 dias os JIs estavam com percentual acima de 50% de lipídio e nas temperaturas 24 e 28°C aos 90 dias apresentavam menos que 50% de suas reservas e aos 120 dias em muitos espécimes as reservas estavam esgotadas. Essa diferença deve-se aos métodos serem diferentes, onde o presente estudo utilizou um método bioquímico para obter o lipídio, através da maceração do nematoide e isso pôde ter facilitado o envolvimento de outras substâncias energéticas.

O aumento do teor de substâncias energéticas, como a trealose, em nematoides ao longo do tempo foi analisado por Jagdale e Grewal (2003), que avaliaram o teor de trealose em três espécies de *Steinernema* (*S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. riobrave*) em 5°, 25° e 35°C durante seis dias. O conteúdo de trealose de nessas espécies aumentou em 350%, 146% e 30% com relação ao nível inicial, respectivamente, no sexto dia a 5°C. Comparando a temperatura de 35°C o conteúdo de trealose de *S. feltiae* aumentou em 182% no segundo dia, *S. carpocapsae* aumentou 122% no dia 4 e 87% em *S. riobrave* no dia 6. Comprovaram que a trealose é uma resposta dos nematoides ao estresse sofrido pela temperatura.

Isso acontece como mecanismo de sobrevivência, onde os nematoides convertem glicogênio e reservas lipídicas em trealose (WOMERSELY, 1990; SOLOMON et al., 1999). Durante as condições de anidrobiose a trealose tem a função de proteger as membranas celulares, substituindo a água (CLEGG, 1986; STOREY; STOREY, 1992; WHARTON et al., 2000) e as proteínas, prevenindo a inativação enzimática durante o estresse sofrido (SINGER; LINDQUIST, 1998).

5 CONCLUSÕES

- Todas as armadilhas de White modificadas são eficientes na sobrevivência, infectividade e produção de *Steinernema glaseri* RS38 nas coletas diárias e no quarto dia.
- Para o sétimo dia de coleta o sistema de armadilha com esponja foi mais eficaz na viabilidade para *S. glaseri* RS38.
- O sistema com esponja favorece a maior sobrevivência, virulência e produção em *Heterorhabditis* sp. AL47 nas coletas diárias.
- O isolado AL47 em sistema convencional de armadilha de White apresenta maior virulência e produção no quarto dia de coleta.
- A escolha do sistema da modificação de armadilha de White depende da quantidade de dias que o nematoide for coletado.
- *Steinernema glaseri* pode ser conservado, no máximo, por até 120 dias a 15°C e *Heterorhabditis* sp. pode ser preservado, no máximo, 60 dias a 20°C em esponja.
- A temperatura de 15°C é mais adequada para preservar o lipídio em RS38 e AL47 aos 90 e 30 dias respectivamente.
- *Steinernema glaseri* sobrevive por mais tempo do que *Heterorhabditis* sp. em armazenamento com esponja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHURST, R. J.; SMITH, K. Regulation and safety. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. Wallingford, CABI Publishing, p. 311-332, 2002.
- ALI, F. **Cold Tolerance Mechanisms of Entomopathogenic Nematodes**. Thesis (Doctor of Philosophy) University of Otago, Dunedin, New Zealand, 2012.
- ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios**. São Paulo: Editora FAELQ, 2008. 414p.
- ANDALÓ, V.; MOINO A. JR; 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**, v. 37, n.2, p. 203-209, 2011.
- BARBOSA, C. R. C. **Técnicas de Produção in vivo de Nematóides Entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) em *Galleria mellonella* (Lepidoptera: pyralidae) e hospedeiros alternativos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Lavras, 2005.
- BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. C. ; GARCIA, M. S. ; DOLINSKI, C. ; NEGRISOLI JR., A. S. ; BERNARDI, D. ; NAVA, D. Efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p. 6-13, 2009.
- BARRETO, A. F. **Preservação de *Steinernema brazilense* e *Heterorhabditis indica* (Nemata: Rhabditida) em Diferentes Condições de Temperatura e Teores de Umidade em Solo**. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2013.

BARRETT, J. & WRIGHT, D.J. Intermediary metabolism. In: Perry, R.N. & Wright, D.J. (Eds). **The physiology and biochemistry of free-living and plantparasitic nematodes**. CAB International, Wallingford, UK, p. 331-353, 1998.

BARRETT, J. Anhydrobiotic nematodes. **Agricultural Zoology Reviews**, v.4, p.161 – 176, 1991.

BIO CONTROLE, 2015. Disponível em:

<<http://www.biocontrole.com.br/?area=produtos&id=32>> Acesso em: maio 2015.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

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

BOFF, M. C.; WIEGERS, G. L.; SMITS, P. H. Effect of storage time and temperature on infectivity, reproduction and development of *Heterorhabditis megidis* in *Galleria mellonella*. **Nematology**. v. 2, n.6, p. 635-644, 2000.

BONGERS, T.; FERRIS, H. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, n. 6, p. 224-228, 1999.

BROWN, I.M.; GAUGLER, R. Cold tolerance of steinernematid and heterorhabditid nematodes. **Journal of Thermal Biology**, v.23, p. 75–80, 1995.

BROWN, I.M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, v.43, p. 363–375, 1997.

BURMAN, M.; PYE, A. E. *Neoplectana carpocapsae*: Respiration of infective juveniles. **Nematologica**, v.26, p.214–219, 1980.

BURNELL, A.N.N.; STOCK, S.P. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. **Nematology**, v. 2, p. 31-42, 2000.

CAMPOS, R.A.; BOLDO, J. T.; PIMENTEL, I. C.; DALFOVO, V.; ARAUJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; VAINSTEIN, M. H.; BARROS, N. M. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Genetic and Molecular Research**, Rio Grande do Sul, v. 9, p. 1421-1430, 2010.

CAPINERA, J.L.; EPSKY, N.D. Potential for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes. **Florida Entomologist**, v.75, p.525-532, 1992.

CARDOSO, A. C.; PRATA, M. C. A.; FURLONG, J.; PREZOTO, F. Exigências Térmicas de Estágios Imaturos de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Ecology, Behavior and Bionomics. **Neotropical Entomology**, v.36, n.5, p. 657-661, 2007.

CARVALHO, V. A. M. **Estudos taxonômicos e armazenamento de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Lavras, 2006.

CHENG, Y.S.; ZHENG, Y.; VANDERGHEYNST, J. S. Rapid Quantitative nalysis of Lipids Using a Colorimetric Method in a Microplate Format. **Lipids**, v. 46, p. 95–103, 2011.

CLEGG, J. S. The physiological properties and metabolic states of *Artemia* cysts at low water contents: the ‘water replacement hypothesis’. In: LEOPOLD, C. A. **Membranes, Metabolism and Dry Organisms**. Comstock Publishing Association, London, p. 169 –187, 1986.

COOPER, A.F. J.;VAN GUNDY, S.D. Senescence, quiescence and cryptobiosis. In: ZUCKERMAN B.M., MAI, W.F; ROHDE, R. A. **Plant Parasitic Nematodes**, v. 2, Academic Press, New York, p. 297–318, 1971.

CROWE, J.H.; MADIN, K.A.C. Anhydrobiosis in nematodes: Evaporative water loss and survival. **Journal of Experimental Zoology**, v.193, p. 323–334, 1975.

CURRAN, J. Post-application biology of entomopathogenic nematodes in soil. In: BEDDING, R.; AKHURST, R.; KAYA, H. **Nematodes and the Biological Control of Insect Pests**. East Melbourne: CSIRO, p. 67–77. 1993.

DAVIDSON, E. W. History of Insect Pathology. In: **Insect Pathology**. VEJA, F. E.; KAYA, H. K. Academic Press. 2 ed., p. 19, 2012.

DEL VALLE, E. E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E. L. S.; SOUZA, R.M., Effect of cadaver coatings on emergence and infectivity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) and the removal of cadavers by ants. **Biological Control**, v. 50, p. 21–24, 2009.

DEL VALLE, E. E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E.L.S.; SOUZA R.M.; SAMUEL, S. R. I. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Bio. Sci. & Tech**, v.18, n.1, p. 33-41, 2008.

DIVYA, K.; SANKAR, M.; MARULASIDDESHA, K. N.; SAMBASHIV, R.; KRUPANIDHI, K. Formulation Technology of Entomopathogenic Nematode for the Control of the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Bioscience Discovery**, v.2, n.2, p.174-180, 2011.

DOLINSKI, C. Nematóides como agentes do controle biológico de insetos. In: OLIVEIRA FILHOS, E.C.; MONNERAT, R.G. **Fundamentos para regulação de semioquímicos inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 1 ed., p.73- 101, 2006.

DOLINSKI, C.; MOINO, A. J. Utilização de nematoides Entomopatogênicos Nativos ou Exóticos: O perigo das Introduções. **Nematologia Brasileira**. v. 30, n.2, p. 139-149, 2006.

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

EVANS, A. A. F.; PERRY, R.N. Survival strategies in nematodes. In: CROLL, N. A. **The Organization of Nematodes**. Academic Press, London, p. 383–401, 1976.

E-NEMA. Products, 2015. Disponível em:< <http://www.e-nema.de/products/>> Acesso em: maio 2015.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematoides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ-USP, p. 551–567, 1998.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FISCHER, M. L.; WANTO, M. M.; PAULA, M. C. Z. Interações entre *Gnatocerus cornutus* (Linnaeus, 1758) e *Tenebrio molitor* (Fabricius, 1798) (Coleoptera, Tenebrionidae). **Revista Agrarian**, v.6, n.22, p.519-523, 2013.

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

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

GAUGLER, R.; BROWN, I.; SHAPIRO-ILAN, D.; ATWA, A. Automated technology for in vivo mass production of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 24, p. 199–206, 2002.

GAUGLER, R.; GREWAL, P.; KAYA, H.; SMITH-FIOLA, D. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, San Diego, v. 17, n.1, p. 100-109, 2000.

GAUGLER, R.; HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. CAB International, p.289-310, 2002.

GEORGIS, R.; MANWEILER, S.A. Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. **Agricultural Research Review**. v. 6, p. 63-94, 1994.

GLASER, R. W.; FOX, H. A nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). **Science**, v. 71, p. 16-17, 1930.

GLAZER, I. Survival Biology. In: Gaugler, R.(Ed.). **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, New York, USA, p. 170-182. 2002.

GLAZER, I., KOZODOI, E., SALAME, L. AND NESTEL, D. SPATIAL and temporal occurrence of a natural population of *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Rhabditida) in a semi-arid region. **Biological Control**, v.6, p. 130–136, 1996.

GONÇALVES, L. Fatos Históricos do controle Biológico. **Revista Floresta e Ambiente**, p. 96 – 101, 1996.

GOYAL, K.; BROWNE, J.A.; BURNELL, A.M.; TUNNACLIFFE, A. Dehydration-induced *tps* gene transcripts from an anhydrobiotic nematode contain novel spliced leaders and encode atypical GT-20 family proteins. **Biochimie**, v.87, p. 565–574, 2005.

GREWAL, A. S. Formulation and Application Technology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 265 – 268, 2002.

GREWAL, P. S.; BORNSTEIN-FORST, S.; BURNELL, A. M.; GLAZER, I.; JAGDALE, G. B. Physiological, genetic, and molecular mechanisms of chemoreception, thermobiosis, and anhydrobiosis in entomopathogenic nematodes. **Biological Control** , v.38, p. 54–65, 2006.

GREWAL, P. S.; GEORGIS, R. Entomopathogenic nematodes. In: Hall, F. R.; Menn, J. (eds) **Methods in Biotechnology: Biopesticides: Use and Delivery**. Humana Press, Totowa, New Jersey, p. 271-299, 1998.

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.

GREWAL, P.S. Anhydrobiotic potencial and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida:Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**, v.30, n.14, p.995-1000, 2000.

GREWAL, P.S.; NARDO, E.A.B.; AGUILLERA, M.M. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, v.30, n. 20, p.191-205, 2002.

GREWAL, R.; DHARWADKAR, R. The Role of the Institutional Environment in Marketing Channels. **Journal of Marketing** , v.66, p. 82-97,2002.

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

GRIGOLETTI, A. J.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, PR, v. 30, n. 12. p. 155-165, 2000.

HICHMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; KEEN, S. L.; EISENHOUR, D. J.; LARSON, A. I'ANSON, H. **Princípios Integrados de Zoologia**. Guanabara Koogan, 15. ed., Rio de Janeiro, p. 404, 2013.

IGNOFFO, C. M.; HOSTETTER, D. L. Environmental stability of microbial insecticides. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v.10, p. 1-80, 1977.

ISHIBASHI, N.; CHOI, D. R. Biological control of soil pests by mixed application of entomopathogenic and fungivorous nematodes. **Journal of Nematology**, v. 23, p.175-181, 1991.

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

JAGDALE, G. B.; GREWAL, P. S. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. **International Journal for Parasitology**, v.33, p. 145–152, 2003.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic Nematodes. **Annual Review of Entomology**, v.38, p. 181-206, 1993.

KAYA, H. K. Soil ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton: CRC Press, p.93-116, 1990.

KAYA, H. K. Natural enemies and other antagonists. In: GAUGLER, R. (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 189–204. 2002.

KLEIN, M.G. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In Gaugler R, Kaya H (eds.): **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. CRC Press, Boca Raton, Florida, p.195–214, 1990.

KOPPENHÖFER, A. M.; FUZY, E. M. Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *H. bacteriophora*. **Applied Soil Ecology**, v. 35, p. 128–139, 2007.

KOPPENHÖFER, A.M.; BAUR, M.E.; STOCK, S.P.; CHOO, H.Y.; CHINNASRI, B.; KAYA, H.K. Survival of entomopathogenic nematodes within host cadavers in dry soil. **Applied Soil Ecology**, v.6, p. 231–240, 1997.

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

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

KUNG JR., L.; SATTER, L.D.; JONES, B.A. et al. Microbial inoculation of low moisture alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.10, p.2069-2077, 1987.

LALRAMLIANA, A. K. Y. Effects of storage temperature on survival and infectivity of three indigenous entomopathogenic nematodes strains (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Meghalaya. **Indian Society for Parasitology**, 2015.

LAZNIK Ž.; ŽNIDARČIČ, D.; TRDAN, S. Control of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) adults on glasshouse-grown cucumbers in four different growth substrates: an efficacy comparison of foliar application of *Steinernema feltiae* (Filipjev) and spraying with thiamethoxam. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 35, 2011.

LEWIS, E. E.; SELVAN, S.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Changes in foraging behaviour during the infective stage of entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, v.110, p. 583-590, 1995.

LI, X.-Y.; COWLES, R.S.; COWLES, E. A.; GAUGLER, R.; COX-FOSTER, D. L. Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. **International Journal for Parasitology**, v.37, p. 365–374, 2006.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: Um Guia para Ação em Defesa da Vida**. ANA - Articulação Nacional de Agroecologia. RBJA - Rede Brasileira de Justiça Ambiental. Rio de Janeiro. 2011. ISBN 978-85-87116-15-4. Disponível em: <<http://br.boell.org/sites/default/files/agrotoxicos-no-brasil-mobile.pdf>> Acessado em: 15 dez. 2014.

MARTENS, E. C.; HEUNGENS, K.; GOODRICH-BLAIR, H. Early Colonization Events in the Mutualistic Association between *Steinernema carpocapsae* Nematodes and *Xenorhabdus nematophila* Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.185, n. 10, p. 3147–3154, 2003.

MCCOY, C.W., SHAPIRO, D.I., DUNCAN, L.W., NGUYEN, K. Entomopathogenic nematodes and Other Natural Enemies as Mortality Factors for Larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Biol. Control**, v.19, pg 182-190, 2000.

MENEZES, C. W. G.; CAMILO, S. S.; FONSECA, A. J.; JÚNIOR, S. L. A.; BISPO, D. F.; SOARES, M. A. A dieta alimentar da presa *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) pode afetar o desenvolvimento do predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)? **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.3, p. 250-256, 2014.

MINAS, R. S. **Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visando o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*) em dois sistemas de cultivo**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes, 2012.

MINAS, R. S. **Potencial dos nematóides entomopatogênicos como agentes de controle biológico da mosca-do- mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae)**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes, 2008.

MINAS, R. S.; DOLINSKI, C.; CARVALHO, R. S.; SOUZA, R. M. Controle Biológico da mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* utilizando nematoides entomopatogênicos em laboratório. **Scientia Agraria**, v.12, n.2, p.115-119, 2011.

MOLINA, J. P. A.; MOINO JUNIOR, A.; CAVALCANTI, R. S. Produção *in vivo* de nematoides entomopatogênico em diferentes insetos hospedeiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.3, p.347-354, 2004.

MOLYNEUX, A.S. Heterorhabditis spp. and Steinernema spp. (= Neoplectana) spp: temperature and aspects of behaviour and infectivity. **Experimental Parasitology**, v.62, p.169-180, 1986.

NAVA, D. E. **Controle biológico de insetos-praga em frutíferas de clima temperado: uma opção viável, mas desafiadora**. Documento 208 - Embrapa, Clima Temperado. Pelotas, RS 2007. Disponível em: ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAP/26658/1/doc_208.pdf. Acesso em: 20 fev. 2015.

NEGRISOLI, C. R. DE C. B. **Prospecção e identificação de nematoides entomopatogenicos (Heterorhabditidae e Steinernematidae) no Rio Grande do Sul e sua eficiência no controle de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) em pessegueiro**. Tese (Doutorado em Fitossanidade) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 88f, 2009.

NEGRISOLI, A. S.; GARCIA, M. S.; NEGRISOLI, C. R. C. B. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. **Crop Protection**, v. 29, Ed. 6, p. 545-549, 2010.

NEGRISOLI JUNIOR, A. S.; GUZZO, E. C.; SANTOS, N. L.; BARBOSA NEGRISOLI, C. R. C.; SILVA, E. S. Avaliação da patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. AL39 (Rhabditida: heterorhabditidae) sobre lavras de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO**, v.12., São Paulo, 2011.

NEGRISOLI JUNIOR, A. S.; SILVA, J. F. da; SANTOS, D. dos; NEGRISOLI, C. R. S. B.; GUZZO, E. C. Seleção de isolados de *Heterorhabditis* sp. para controle da broca-gigante da cana-de-açúcar *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae). In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO**, v.13., Bonito, MS, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed., Porto Alegre, Artmed, p. 805 – 850, 2011.

NOMURA, E.; CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N. Efeito da dieta no ciclo biológico das lagartas das traças-da-cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera, Pyralidae) e *Achroia grisella*. **Revista Brasileira de Zoociências.**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2006.

ORTIZ-URQUIZA, A.; RIVEIRO-MIRANDA, L.; SANTIAGO-ALAVAREZ, C.; QUESADA-MORAGA, E. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 3, p. 270-278, 2010.

OZER, N.; UNLU, I.O. Evaluation of the reproductive potential and competition between two entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora*, Poinar 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Turkish Journal of Biology**, v.27, p.149-155, 2003.

PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos, p. 1015-1038. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ,1998. 1163p.

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.

PATEL, M.N.; WRIGHT, D. J. Glycogen: its importance in the infectivity of the aged juveniles of *Steinernema carpocapsae*. **Parasitology**, v.114, p. 591-596, 1997.

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

PINTO, C. C. S. **Efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade do nematóide entomopatogênico heterorhabditis baujardi lpp7 (rhabditida: heterorhabditidae)**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes, 2009.

POINAR, G. O.; GREWAL, P. S. History of Entomopathogenic Nematology. **Journal of Nematology**, v. 44, n.2, p.153–161, 2012.

POINAR, G.O. **Nematodes for biological control of insects**. CRC Press, Boca Ration, Florida, p.143-148, 1979.

QIU, L.; BEDDING, R. A rapid method for the estimation of mean dry weight and lipid content of the infective juveniles of entomopathogenic nematodes using image analysis. **Nematology**, v. 1, n.6, p. 655-660, 1999.

QIU, L.H.; BEDDING, R.A. The relationship between the survival and the energy metabolism of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under both aerobic and anaerobic conditions. In: **Survival of Entomopathogenic Nematodes**. Wellesbourne, Warwick, UK, p. 148-159, 1999.

RADOVÁ, S.; TRNKOVÁ, Z. Effect of soil temperature and moisture on the pathogenicity of two species of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Agrobiology**, v. 27, n.1, p. 1–7, 2010.

SABINO, A. R. **Utilização de Nematoides Entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) e Inseticidas Botânicos Visando ao Controle de Adultos de *Rhynchophorus palmarum* L., 1764 (Coleoptera: Curculionidae)**. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 78f, 2014.

SÁENZ, A.; LUQUE, J. E. Cultivo *in vivo* y Metodo de Almacenamiento para Juveniles Infectivos de *steinernemafeltiae* (rhabdita: steinernematidae). **Agronomía Colombiana**, v. 17, p. 37-45, 2000.

SILVA, M. G. M. **Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e nematoides entomopatogênicos para o controle da broca-da-bananeira *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae)**. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, São Paulo, 2013.

SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Multiple effect of trehalose on protein folding in vivo. **Molecular Cell**, v.1, p. 639–648, 1998.

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

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C. **Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações**. Documento 42, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, 2004. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos_42.pdf> Acesso em: 13 fev. 2015.

STOCK, S. P.; BLAIR, H. G. Entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts: The inside out of a mutualistic association. **Journal Symbiosis**, v. 46, p. 65–75, 2008.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Biochemical adaptations for winter survival in insects. **Advances in Low-Temperature Biology**, v. 1, p. 101–140, 1992.

TOLEDO, A.V.; de REMES LENICOV, A.M. ; LOPEZ-LASTRA, C.C.
Histopathology caused by the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, in the adult planthopper, *Peregrinus maidis*, a maize virus vector. **Journal of Insect Science**, p. 10 - 35, 2010.

TÓTH, T. Collection of entomopathogenic nematodes for the biological control of insect pests. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**. v. 14, n. 3, p. 225-230, 2006.

TRDAN S., VIDRIH M., VALIČ N., LAZNIK Ž. Impact of entomopathogenic nematodes on adults of *Phyllotreta* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae) under laboratory conditions. **Acta Agriculturae Scandinavica**, B Soil Plant Science, v.58, p. 169-175, 2008.

VARGAS, C.H.B.; ALMEIDA, A.A.. Influência da temperatura no desenvolvimento de *Gnathocerus cornutus* (Coleoptera, Tenebrionidae). I. Fases Imaturas. **Acta Biológica Paranaense**, v.21, p.149-159, 1992.

VARIN, T.C. Role of soil water in population dynamics of nematodes. In: LEONARD, K. J.; FRY, W. E. (eds) **Plant Disease Epidemiology** , v. 1, New York, Macmillan, p. 101–124, 1986.

VOSS, M.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI JÚNIOR, A. S.; BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos**. Documento 119, Embrapa Trigo, Passo Fundo, 44 p, 2009. Disponível em: < http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do119.pdf > Acesso em: 18 dez. 2014.

WALLACE, H.R. Movement of eelworms. **Annals of Applied Biology**, v.46, p.74–85, 1958.

WHARTON, D.A. **A Functional Biology of Nematodes**. Croom Helm, London, 192 p, 1986.

WHARTON, D.A.; JUDGE, K. F.; WORLAND, M. R. Cold acclimation and cryoprotectants in a freeze tolerant Antarctic nematode, *Panagrolaimus davidi*. **Journal of Comparative Physiology**, v. 170, p. 321-327, 2000.

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

WOLFF, L. F.; SANTOS, R. S. S.; MELO, M. **Controle Biológico de Traça-da-cera com *Bacillus thuringiensis* para a conservação de favos na apicultura sustentável e agricultura familiar**. Documento 97, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 22 p, 2009. Disponível em: < <http://core.ac.uk/download/pdf/15430663.pdf> > Acesso em: 12 jan. 2015.

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

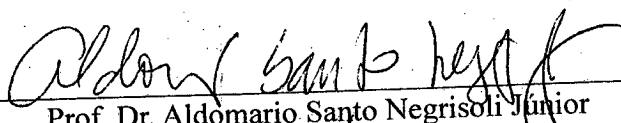
WOODRING, J.L.; KAYA, H.K. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: A Handbook of Techniques Southern Cooperative Series Bulletin 331. Arkansas: Arkansas Agricultural Experiment Station Fayetteville, 1988.

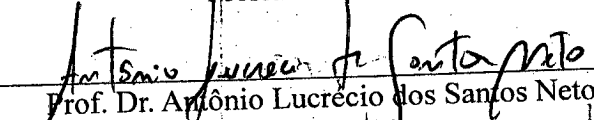


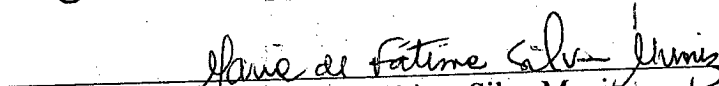
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
UFAL CAMPUS ARAPIRACA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE
CÓDIGO-CAPEs - 2600102033P9

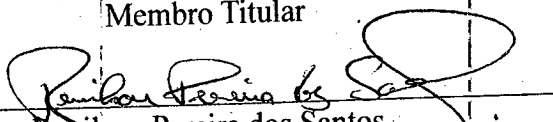
Aos trinta dias do mês de março de dois mil e quinze, no Auditório da Universidade Federal de Alagoas - UFAL Campus de Arapiraca, às (09:20) nove horas e vinte minutos, sob a Presidência do Prof. Dr. Aldomario Santo Negrisoni Júnior, reuniu-se a Banca Examinadora para Defesa Pública da Dissertação da Bióloga **Ana Paula Pereira de Oliveira Silva**, aluna do Curso de Mestrado em Agricultura e Ambiente da UFAL, com o título: **PRODUÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS *Steinernema glaseri* (STEINER, 1929) e *Heterorhabditis* sp. (POINAR, 1976)**. A Banca examinadora ficou assim constituída: Prof. Dr. Aldomario Santo Negrisoni Júnior (EMBRAPA/Rio Largo) - Orientador - Membro Titular, Prof. Dr. Antônio Lucrécio dos Santos Neto (UFAL/Campus de Arapiraca) - Membro Titular, Prof. Dr. Maria de Fátima Silva Muniz (CECA/UFAL) - Membro Titular, Prof. Dr. João Gomes da Costa (EMBRAPA/Rio Largo) - Membro Suplente e Prof. Dr. Elio Cesar Guzzo (EMBRAPA/Rio Largo) - Membro Suplente - Ocorrências: Abertura pelo Presidente da Banca Prof. Dr. Aldomario Santo Negrisoni Júnior que agradeceu a valiosa presença dos demais membros componentes da Banca, manifestando sua satisfação pela defesa da Dissertação do Curso de Mestrado em Agricultura e Ambiente da UFAL, desta feita sob sua orientação. A seguir, parabenizou a aluna **Ana Paula Pereira de Oliveira Silva** pelo trabalho apresentado e solicitou a apresentação do trabalho a aluna, que expôs com veemência os resultados de sua pesquisa. O presidente da Banca Examinadora iniciou os trabalhos passando a palavra ao Prof. Dr. Maria de Fátima Silva Muniz e logo após foram ouvidos os comentários e análises do Prof. Dr. Antônio Lucrécio dos Santos Neto. Terminada a defesa, procedeu-se o julgamento, pelos membros examinadores, sendo a candidata **APROVADA**. A candidata foi informada que terá um prazo de sessenta dias para entregar na Coordenação do Curso os exemplares da Dissertação com as modificações sugeridas pela banca examinadora e apresentar o comprovante de submissão de pelo menos um artigo extraído de sua Dissertação para expedição do Diploma de Mestre em Agricultura e Ambiente. Os trabalhos foram encerrados às onze horas (11:00). Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos Senhores Membros da Banca Examinadora e por mim, Renilson Pereira dos Santos, Secretário Executivo. Arapiraca (AL), 30 de março de 2015.

Arapiraca, 30 de março de 2015.


Prof. Dr. Aldomario Santo Negrisoni Júnior
Presidente Titular


Prof. Dr. Antônio Lucrécio dos Santos Neto
Membro Titular

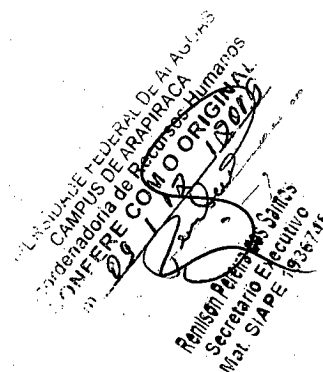

Prof. Dr. Maria de Fátima Silva Muniz
Membro Titular


Renilson Pereira dos Santos
Secretário Executivo

DOCUMENTO RECEBIDO

Em: 18/04/2016

Assinatura do Funcionário



**FAPEAL**FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA
DO ESTADO DE ALAGOAS

Rua Melo Moraes, 354 - CEP: 57020-330 - Centro - Maceió - Alagoas

Fone: 82 3315 2200/3315 2232 CNPJ Nº: 35.562.321/0001-84

DATA: 04 /04/2016

INTERESSADOS: ANA
PAULA PEREIRA DE
OLIVEIRA SILVA/CICERO
CARLOS DE SOUZA
ALMEIDAPROCESSO: 20130603-002-0040-0052
EDITAL Nº.001/2013MODALIDADE: BOLSA DE
MESTRADO CAPES/FAPEAL

Assunto: Apresentar à FAPEAL após sua defesa o Exemplar da dissertação no formato impresso e encadernado em capa dura na cor preta e com letras douradas e no formato eletrônico em CD-ROOM ou dispositivo de armazenamento equivalente ou similar. (FORMATO PADRÃO DA FAPEAL). E cópia da ata.

Prezado(a) Senhor(a),

A FAPEAL solicita de V. Sa. a apresentação do Exemplar da dissertação acima referenciado, conforme acordo assinado com a CAPES/ FAPEAL em 15.08.2013.

Comunicamos-lhe que, lamentavelmente, o não atendimento a essa solicitação no prazo de 45 (quarenta e cinco) dias, contados a partir da data de expedição deste documento, ficará o Bolsista e Orientador na condição de inadimplente, inviabilizando a concessão de futuros auxílios que venham a ser apresentados a esta Fundação.

Também, está a FAPEAL obrigada a abrir processo e encaminhá-lo para a Procuradoria para fins de ressarcimento.

Lembramos, ainda, ser indispensável, ao encaminhar-nos qualquer documento, fazer constar o nome completo de V. S^a. e o número do processo correspondente.

Sendo o que se apresenta no momento, subscrevemo-nos,

Atenciosamente,

João Vicente Ribeiro Costa Lima
Diretor da UGC&TJoão Vicente Ribeiro Costa Lima
Diretor da UGC&T
Maceió - AlagoasOK. Em: 13/04/16
DOCUMENTO RECEBIDO
Em: 13/04/16
Assinatura do Funcionário