

INTERAÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS COM OS NEMATOIDES  
ENTOMOPATOGÊNICOS *Steinernema carpocapsae* NCALL E  
*Heterorhabditis indica* LPP30 (RHABDITIDA)

**ANÁLIA ARÊDES**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 2014

INTERAÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS COM OS NEMATOIDES  
ENTOMOPATOGÊNICOS *Steinernema carpocapsae* NCALL E  
*Heterorhabditis indica* LPP30 (RHABDITIDA)

**ANÁLIA ARÊDES**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Cláudia de Melo Dolinski

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 045/2014

Arêdes, Anália

Interaçãode fungos nematófagos com os nematoides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae* NCALL e *Heterorhabditis indica* LPP30 (RHABDITIDA) / Anália Arêdes. – 2014. 53 f. : il.

Orientador: Cláudia de Melo Dolinski.

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Bibliografia: f. 46 – 52.

1. Nematoides entomopatogênicos 2. *Steinernema carpocapsae* 3. *Heterorhabditis indica* 4. Fungos nematófagos 5. *Arthrobotrys* I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 632.6257

INTERAÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS COM OS NEMATOIDES  
ENTOMOPATOGÊNICOS *Steinernema carpocapsae* NCALL E  
*Heterorhabditis indica* LPP30 (RHABDITIDA)

**ANÁLIA ARÊDES**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 10 de março de 2014

Comissão Examinadora

---

Dr.<sup>a</sup> Inês Ribeiro Machado (D. Sc., Produção Vegetal) - UFOPA

---

Dr.<sup>a</sup> Liliana Parente Ribeiro (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF

---

Dr. Vicente Mussi Dias (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF

---

Prof.<sup>a</sup> Cláudia de Melo Dolinski (Ph.D. Fitopatologia) – UENF  
(Orientadora)

Ao meu amado filho Murilo, ao meu esposo Bruno,  
À minha mãe Oneida, ao meu pai José Nicolau,  
Às minhas irmãs Aline, Aída e Agda e ao meu irmão Alan.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por ter me guiado até aqui; Aos meus pais Oneida e José Nicolau, agradeço-lhes imensamente pelo amor, pelo carinho, pela compreensão, pela sabedoria e pela dedicação na educação dos filhos;

Às minhas irmãs Aline, Aída e Agda e ao meu irmão Alan, que foram essenciais na minha vida. Deles eu sempre tive contribuições, são exemplos de perseverança e atitude. Seus incentivos não me deixaram desanimar e acomodar;

Ao meu esposo Bruno, pelo carinho, pela compreensão, pelo companheirismo e pelo incentivo em todos os momentos. Seu apoio foi fundamental para que eu desenvolvesse de forma centrada este trabalho;

Ao meu filho Murilo, fonte de luz, alegria e inspiração. Agradeço-lhe pela compreensão, pelo amor, pelo carinho e por cada sorriso que tornaram este trabalho menos árduo e a minha vida mais feliz;

À professora Cláudia de Melo Dolinski, pela excelente orientação, seriedade, amizade e confiança em mim depositada para o desenvolvimento deste trabalho. E ao professor Ricardo Moreira de Sousa, pela agradável convivência e pelos ensinamentos transmitidos. Agradeço-lhes por contribuírem para o meu crescimento profissional, científico e humano;

Ao Dr. Vicente Mussi Dias, pela paciência, pelos ensinamentos transmitidos e pela grande ajuda com os experimentos realizados na Clínica Fitossanitária da UENF;

Aos integrantes da banca examinadora, Dr.<sup>a</sup> Inês Ribeiro Machado, Dr.<sup>a</sup> Liliana Parente Ribeiro e Dr. Vicente Mussi Dias, por aceitarem o convite para participarem como membros efetivos da banca de defesa. Muito obrigada pelos conselhos, pelos incentivos, pelos conhecimentos transmitidos e pela valiosa amizade;

Ao professor, Clóvis de Paula Santos do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (CBB/ UENF) por ceder os isolados de fungos *A. oligospora* AM2 e *A. musiformis* AM4, utilizados no presente trabalho;

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Nematologia, pela agradável convivência e pelos momentos de descontração. Em especial, aos amigos Felipe, Thiago, Karla, Renata, Letícia, Lili e Inês, por todo auxílio durante a execução deste trabalho, os conselhos, os incentivos, o carinho e a amizade;

Às bolsistas do Programa Jovens Talentos, Yara e Myllena pela amizade e ajuda na realização deste trabalho;

Ao técnico de campo Francisco Luiz Rangel Manhães, pela ajuda durante a coleta e a solarização dos substratos e pela agradável convivência;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela oportunidade de realização do curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Nematoides entomopatogênicos (NEPs) .....	4
2.2. Comportamento e estratégias utilizadas pelos NEPs .....	5
2.3. Características de <i>S. carpocapsae</i> e <i>H. indica</i> .....	6
2.4. Os fungos nematófagos .....	7
2.5. Gênero <i>Arthrobotrys</i> .....	9
2.6. Atratividade .....	11
2.7. Aspectos da interferência dos fungos nematófagos sobre os NEPs .....	13
3. OBJETIVOS .....	15
3.1. Objetivo Geral .....	15
3.2. Objetivos Específicos .....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1. Obtenção e manutenção dos insetos, nematoides e fungos .....	17
4.1.1. Criação de <i>Galleria mellonella</i> .....	17

4.1.2. Multiplicação de Nematoides Entomopatogênicos (NEPs).....	18
4.1.3. Cultivo de Fungos Nematófagos .....	18
4.2. Experimentos.....	19
4.2.1. Agressividade <i>in vitro</i> de fungos nematófagos .....	19
4.2.2. Suscetibilidade <i>in vitro</i> de NEPs a fungos nematófagos.....	20
4.2.3. Desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de fungos nematófagos.	21
4.2.4. Suscetibilidade de NEPs a fungos nematófagos cultivados <i>in vitro</i> em diferentes fontes nutritivas.....	22
4.3. Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1. Agressividade <i>in vitro</i> de fungos nematófagos .....	29
5.2. Suscetibilidade <i>in vitro</i> de NEPs a fungos nematófagos.....	31
5.3. Desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de fungos nematófagos.....	34
5.4. Suscetibilidade de NEPs a fungos nematófagos <i>in vitro</i> em diferentes fontes nutritivas.....	39
5.5. Dispersão de NEPs em substrato areia e solo argiloso.....	41
6. RESUMO E CONCLUSÕES .....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
APÊNDICE.....	53

## RESUMO

ARÊDES, Anália, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2014. Interação de fungos nematófagos com os nematoides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae* NCALL e *Heterorhabditis indica* LPP30 (Rhabditida). Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Cláudia de Melo Dolinski.

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são importantes no controle biológico de pragas. Contudo, a sobrevivência dos NEPs pode ser afetada por fungos nematófagos (FNs). Por isso, objetivou-se estudar interações entre os FNs *Arthrobotrys oligospora* AM2, *Arthrobotrys musiformis* AM4, *Arthrobotrys* sp. CO7, *Arthrobotrys* sp. CC7 e os NEPs *Heterorhabditis indica* LPP30 e *Steinernema carpocapsae* NCALL e o desenvolvimento dos FNs em diferentes fontes nutritivas. A linhagem *H. indica* LPP30 foi isolada de uma propriedade rural na cidade de Campos dos Goytacazes-RJ e a linhagem *S. carpocapsae* NCALL, isolada na Carolina do Norte, E.U.A. Repicagem dos FNs ocorreu a partir de discos (1 cm) da colônia para o centro de placas de Petri (9 cm) com ágar-água. Realizou-se 5 ensaios experimentais: 1. Agressividade e 2. Susceptibilidade: Adicionando-se JIs de NEPs ao redor dos discos e avaliando os NEPs capturados nas armadilhas dos FNs; 3. Desenvolvimento vegetativo e reprodutivo: Foi avaliado em placas de Petri contendo diferentes fontes nutritivas, Aguar-água (AA); Ágar-milho (AM); Batata-Dextrose-ágar (BDA); Extrato-de-solo (ES), Suco-V8 (V8) e Meio Concentrado de NEPs (AAN), efetuando-se medições diárias da colônia e contagens dos esporos em câmara de Neubauer, que foram retirados com auxílio de um pincel; 4. Susceptibilidade: Foram utilizadas placas de Petri com as mesmas fontes nutritivas

do ensaio 3, adicionou-se JIs ao redor dos discos com FNs e avaliou-se os NEPs sobreviventes.5. Dispersão: Avaliada em pedaços de canos de PVC, unidos por fita crepe e cada conjunto desses foi conectado a outro conjunto igual por um conector de cano. Em cada extremidade do conjunto de tubos foi colocada uma placa de Petri contendo FN. De um lado desse conjunto foi colocado areia e no outro solo. Fez-se um orifício no conector, onde os JIs foram adicionados. Os substratos foram processados para contagem dos JIs. *A. musiformis* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 foram mais agressivos contra *H. indica* LPP30. *S. carpocapsae* NCAll foi menos capturado por *A. musiformis* AM4, e *Arthrobotrys* sp. CO7 nas primeiras 24 horas quando comparado com *H. indica*. Depois de 48h a média de dispersão das duas espécies se igualou. Para *H. indica* não houve efeito ( $P < 5$ ) do tempo. *A. musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 tiveram maior crescimento micelial nos tratamentos ES, BDA e AM, que foram superiores aos tratamentos V8, AA e AAN. A maior esporulação ocorreu para ambos os fungos *Arthrobotrys* sp. CO7 e *A. musiformes* AM4 nos tratamentos V8 e BDA. Os JIs de ambas as espécies, *H. indica* LPP30 e *S. carpocapsae* NCALL, foram menos recuperados no meio Ágar-água (AA) (controle) para ambos os fungos. Tanto em areia quanto em solo argiloso, *Arthrobotrys* sp. CO7 não apresentou efeito ( $p < 5$ ) na dispersão de *H. indica* LPP30. Entretanto, este fungo, apresentou efeito ( $p < 5$ ) na dispersão de *S. carpocapsae* na areia a 15 cm, indicando haver ação repelente do fungo para esse NEP.

## ABSTRACT

ARÊDES, Anália, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2014. Interaction of nematophagous fungi with entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* NCALL and *Heterorhabditis indica* LPP30 (Rhabditida). Advisor: Prof<sup>a</sup>. Cláudia de Melo Dolinski.

Entomopathogenic nematodes (NEPs) are important in biological control of pests. However, the survival of NEPs can be affected by nematophagous fungi (NF). The objective is studying interactions between NFs *Arthrobotrys oligospora* AM2, *Arthrobotrys musiformis* AM4, *Arthrobotrys* sp. CO7, *Arthrobotrys* sp. CC7 and NEPs *Heterorhabditis indica* LPP30 and *Steinernema carpocapsae* NCALL and the development of NFs with different nutritional sources. The line *H. indica* LPP30 was isolated in a rural property in the city of Campos dos Goytacazes-RJ and *S. carpocapsae* NCALL, isolated in North Carolina, USA. Pricking of NFs occurred from discs (1cm) from the colony to the center of Petri dishes (9 cm) with agar-water. Was performed 5 experimental tests: 1. Aggression and 2. Susceptibility: Added to JIs of NEPs around the disks and was evaluated NEPs caught in the traps of NF; 3. Vegetative growth e reproductive: Used to Petri dishes containing different nutrient sources, Agar-water (AA); Agar-maize (AM), Potato-Dextrose-agar (BDA); Stratum to ground (ES), Juice-V8 (V8) and Part Concentrate NEPs (AAN), made up daily measurements of the colony and removal of spores was done brushing over the plate and they counted in a Neubauer chamber; 4. Susceptibility: Used to Petri dishes with the same nutrient sources test 3, was added JIs around the discs and

NFs was evaluated NEPs survivors; 5. Dispersion: It used pieces of PVC pipe, two pieces were joined together by duct tape and each set of these was connected to another set equal for a connector pipe. At each end of the tube assembly was placed a Petri dish containing FN. On one side of this assembly was placed sand and other soil. There was a hole in the connector, which occurred added of JIs. The substrates were processed for counting of JIs. *A. musiformis* AM4 and *Arthrobotrys* sp. CO7 were more aggressive against *H. indica* LPP30. *S. carpocapsae* NCALL were less captured by *A. musiformis* AM4, and *Arthrobotrys* sp. CO7 the first 24 hours than *H. indica*, after 48h average of the two species equaled. *H. indica* there was no effect ( $P < 5$ ) weather. *A. musiformes* AM4 and *Arthrobotrys* sp. CO7 had higher mycelial growth in ES, BDA and AM treatments, which were higher than the V8, AA and AAN treatments. Most sporulation occurred for both fungi *Arthrobotrys* sp. CO7 and *A. musiformes* AM4 in V8 and BDA treatments. The JIs of both species, *H. indica* LPP30 and *S. carpocapsae* NCALL were recovered at least half-water agar (AA) (control) for both fungi *A. musiformes* AM4 and *Arthrobotrys* sp. CO7. While *S. carpocapsae* were recovered at least half AAN for fungus *Arthrobotrys* sp. CO7 and among AA to *A. musiformes* AM4. Both in sand and in clay soil, *Arthrobotrys* sp. CO7 had no effect ( $p < 5$ ) in the spread of *H. indica*. However this fungus had an effect ( $p < 5$ ) in the spread of *S. carpocapsae* in the sand to 15 cm, indicating there repellent action of this fungus to NEP.

## 1. INTRODUÇÃO

Os insetos que podem causar prejuízos na quantidade e qualidade dos produtos agrícolas quando atacam as culturas são comumente chamados de pragas. Os métodos para o controle dessas pragas devem ser selecionados com base na sua eficácia, viabilidade econômica, adaptabilidade ao usuário e preservação do meio ambiente e da saúde humana (Picanço, 2010).

Nos últimos anos cresceram as buscas por novos agentes do controle biológico de pragas que possam ser incorporados ao manejo integrado de pragas (MIP). Um bom instrumento de controle biológico de insetos pragas é a utilização dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Steinematidae, Heterorhabditidae), pois estes não colaboram para o surgimento de resistência das pragas, com a destruição de organismos não alvos e com a contaminação do solo e da água com resíduos químicos.

Os NEPs dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são cosmopolitas em sua distribuição e têm sido recuperados a partir de amostras de solo em todo o mundo (Hominick *et al.* 1996). A larva da *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) conhecida como traça da cera é a “isca-viva” mais comumente usada para capturar esses nematoides. Vários países, incluindo o Brasil, têm utilizado nematoides entomopatogênicos para controlar pragas com resultados satisfatórios (Grewal *et al.*, 2001). Pesquisas realizadas no Japão, EUA e Europa proporcionaram o desenvolvimento de produtos comerciais, existem mais

de 60 empresas produzindo e distribuindo NEPs para o controle de insetos pragas (Caamano *et al.*, 2008; Voss *et al.*, 2009).

Estes organismos matam os insetos hospedeiros entre 24 e 48 horas. Esta morte rápida faz com que o parasita e hospedeiro não criem uma relação de especificidade altamente adaptada. Isto permite aos nematoides explorar uma gama maior de hospedeiros que se estende por quase todas as ordens de insetos, o que confere uma vantagem sobre qualquer outro agente de controle microbiano (Grewal *et al.*, 2001; Kaya e Gaugler, 1993). Esta gama de hospedeiros extraordinária é um dos principais motivos para o grande interesse na utilização desses nematoides para o controle biológico. Além disso, eles possuem outras vantagens: possuem quimiorreceptores e são móveis; podem ser facilmente cultivados *in vitro* e têm um elevado potencial reprodutivo (Kaya e Gaugler, 1993).

Geralmente, esses nematoides são fáceis para manusear e não requerem equipamentos especializados para a sua aplicação, nem máscaras ou outros equipamentos de segurança, podendo ser aplicados nas culturas em suspensões aquosas através da irrigação e pulverização ou ainda através de insetos cadáveres (Shapiro-Ilan *et al.*, 2013).

Os insetos que habitam ou que passam alguma fase do seu ciclo de vida no solo são os alvos mais apropriados aos NEPs, uma vez que o seu terceiro estágio infectante (JI) vive livremente no solo. Entretanto, a permanência e a sobrevivência desses nematoides no solo, podem ser afetadas por fatores abióticos e bióticos. Dentre os fatores abióticos estão umidade, temperatura, textura e o pH do solo, enquanto que os fatores bióticos estão os inimigos naturais, tais como alguns invertebrados e microrganismos, como as bactérias e os fungos nematófagos (Kaya, 2002; Andaló *et al.*, 2008).

Os fungos nematófagos vivem na matéria orgânica do solo, onde desenvolvem relações parasíticas ou predatórias com os nematoides (Giroto *et al.*, 2008). Muitas vezes produzem substâncias químicas que podem atrair os nematoides (EL-Borai *et al.*, 2011). A atratividade pode ser influenciada pela morfologia e a capacidade saprofítica/paratítica do fungo. Eles são usados constantemente em diversas pesquisas devido ao seu potencial no controle biológico contra fitonematoides e nematoides parasitas de animais, e têm despertado fascínio dos pesquisadores devido às suas adaptações morfológicas

para capturar os nematoides, além de ser um bom modelo para estudos de interação, devido à facilidade de serem cultivados em laboratório (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006). No entanto, existem poucos trabalhos publicados sobre a influência negativa desses organismos afetando a eficiência dos NEPs como controladores de insetos pragas.

Contudo, este trabalho analisa a interação entre isolados de fungos nematófagos *Arthrobotrys* spp. com duas espécies de NEPs, *Heterorhabditis indica* Poinar *et al.*, 1992 LPP30 (Rhabditida: Heterorhadtidae) e *Steirnenema carpocapsae* Weiser, 1955 NCALL (Rhabditida: Steinematidae). Assim como, avalia o desenvolvimento desses fungos em diferentes fontes nutritivas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Nematoides entomopatogênicos (NEPs)

Os nematoides entomopatogênicos pertencem à ordem Rhabditida do filo Nematoda, onde estão localizadas as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. A família Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, 1994, enquanto que a família Heterorhabditidae possui apenas o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976. Segundo Adams *et al.*, (2006) existem reconhecidas 40 espécies do gênero *Steinernema*, uma espécie do gênero *Neosteinernema* e 10 espécies do gênero *Heterorhabditis*.

Os nematoides entomopatogênicos possuem três fases de desenvolvimento: ovo, juvenil e adulto (machos e fêmeas). Sendo que a fase juvenil é composta por quatro estádios: J1, J2, J3 ou JI (Juvenil Infectante) e J4 (Dolinski, 2006). O estádio J3, que corresponde ao JI, é o único estádio em que o nematoide se encontra livre no solo (Dolinski e Moino Jr. 2006).

Os juvenis infectantes vivem em associação simbiote com bactérias, o *Steinernema* com bactérias do gênero *Xenorhabdus* Thomas e Poinar, 1979, e o *Heterorhabditis* com bactérias do gênero *Photorhabdus* Boemare *et al.*, 1993, essas bactérias são patogênicas aos insetos quando inseridos em sua hemolinfa (Boemare, 2002).

O ciclo de vida dos NEPs se inicia quando os juvenis infectantes penetram no corpo do inseto hospedeiro. Juvenis infectante invadem os insetos através de suas aberturas naturais do corpo (ânus, boca e espiráculos), contudo no caso dos

nematoides do gênero *Heterorhabditis* a penetração pode ocorrer também através da cutícula, utilizando-se um intumescimento da cutícula na região labial. Quando os JIs penetram no corpo do hospedeiro, as bactérias são liberadas em sua hemolinfa e se multiplicam rapidamente, causando septicemia e morte do hospedeiro em 24 a 48 horas (Grewal *et al.*,2001).

Os JIs de *Steinernema* spp. quando entram no hospedeiro passam ao último estágio juvenil (J4) e posteriormente a adultos de primeira geração (machos e fêmeas). Já nos *Heterorhabditis* spp. os adultos da primeira geração são hermafroditas e a progênie destes hermafroditas é composta de machos e fêmeas (Adams e Nguyen, 2002). Os nematoides se desenvolvem e se reproduzem dentro do cadáver do inseto, alimentando-se das bactérias e dos tecidos degradados (Poinar e Grewal, 2012). Dentro do inseto cadáver, ocorrem cerca de duas a três gerações de nematoides e quando as reservas de alimentos estão exauridas, a reprodução é cessada e os nematoides se desenvolvem em JIs resistentes que saem do inseto cadáver e são capazes de sobreviver no ambiente em busca de novos hospedeiros (Grewal *et al.*,2001).

Nesta associação simbiote, o nematoide depende da bactéria para matar o inseto hospedeiro. A bactéria cria um ambiente adequado para o seu desenvolvimento através da produção de antibióticos que inibem o crescimento de outros microrganismos, decompõem os tecidos do hospedeiro em nutrientes e servem como uma fonte de alimento para os nematoides. Enquanto que, os nematoides conferem proteção às bactérias do ambiente externo, a penetração na hemocele do hospedeiro, e, possivelmente, inibição de proteínas antibacterianas do hospedeiro (Kaya e Gauler, 1993).

## **2.2. Comportamento e estratégias utilizadas pelos NEPs**

Os nematoides entomopatogênicos procuram e localizam os seus hospedeiros pelo CO<sub>2</sub>. Entretanto, o CO<sub>2</sub> é um metabólito volátil inespecífico, uma vez que pode ser produzido por raízes e outros organismos do solo, bem como por insetos. Portanto, a resposta dos NEPs para este composto sozinho não pode explicar a adaptação pelo inseto hospedeiro. Sendo assim, JIs certamente respondem a outros compostos, como odores adicionais dos hospedeiros, como

por exemplo, produtos de excreção, além de gradientes de temperatura e substâncias voláteis liberadas por plantas atacadas por insetos (Kaya e Gauler, 1993; van Tol *et al.*, 2001; Rasmann *et al.*, 2005).

A movimentação e estratégia de busca dos JIs pelo hospedeiro variam entre as espécies de nematoides entomopatogênicos e podem ser classificadas como “ambusher” (que fica esperando os hospedeiros de tocaia) ou “cruiser” (que busca os hospedeiros pelo solo). Os NEPs que apresentam comportamento “ambusher” são mais sedentários e possuem um movimento próprio chamado nictação, no qual os JIs ficam retos e apoiados apenas pela ponta da cauda. A parte anterior do nematoide fica livre aguardando para saltar em direção ao hospedeiro quando ele se aproxima, por isso são mais adaptados a localizar hospedeiros altamente móveis na superfície do solo. Enquanto que, os NEPs com estratégia “cruiser” procuram ativamente seus hospedeiros pelo solo, provavelmente atraídos por substâncias voláteis e CO<sub>2</sub>, sendo mais adaptados para hospedeiros sedentários no solo. Existem também algumas espécies que apresentam um comportamento intermediário entre “ambusher” e “cruiser” à medida que se aproximam do hospedeiro (Kaya e Gauler, 1993; Dolinski e Moino Jr., 2006; Poinar e Grewal, 2012).

### **2.3. Características de *S. carpocapsae* e *H. indica***

*S. carpocapsae* é a espécie mais estudada entre os nematoides entomopatogênicos. São de fácil produção em massa e podem ser formulados em estado parcialmente dessecado, o que fornece vários meses de vida útil, à temperatura ambiente. Esta espécie possui comportamento do tipo “ambusher”, ficam nictando de “pé” sobre a cauda na posição vertical próximo à superfície do solo esperando o hospedeiro passar. São eficazes contra larvas de lepidópteros, especialmente quando aplicado contra insetos altamente móveis adaptados a superfície, embora alguns insetos abaixo do solo também possam ser controlados por esse nematoide. *S. carpocapsae* é mais eficaz a temperaturas que variam de 22 a 28 °C (Shapiro-Ilan *et al.*, 2013). A linhagem *S. carpocapsae* NCALL foi isolada na Carolina do Norte, E.U.A.

*H. indica* é considerado um nematoide tolerante ao calor podendo infectar insetos com temperatura superior a 30°C. Este nematoide produz rendimentos elevados em sua produção in vivo e *in vitro*, mas sua vida útil é geralmente mais curta do que a maioria das outras espécies de nematoides (Shapiro-Ilan *et al.*, 2013). Esta espécie possui os menores tamanhos de juvenis infectantes conhecidos, que os separam de todas as outras espécies de *Heterorhabditis* descritos (Poinar *et al.*, 1992).

A linhagem *H. indica* LPP 30 foi isolada de uma propriedade rural localizada no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, utilizando-se como armadilha lagartas vivas de *G. mellonella*. Esta linhagem possui capacidade de se deslocar em busca do hospedeiro em experimentos realizados para o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii* Marshall). Deslocando-se no sentido vertical em profundidades que vão de 5 cm a 20 cm, e no sentido longitudinal, até 60 cm no período de tempo avaliado (15 dias) e é capaz de se reciclar e permanecer no solo com a população infectiva e viável por períodos de 12 meses, todavia, na ausência de hospedeiro ocorre o declínio da população de JIs. A produção acumulada de JIs é expressiva chegando a produzir 1.296.660 JIs em larvas de *G. mellonella*, de acordo com Poinar (1990), pode-se obter de 100 a 300 mil JIs por larva infectada. Sendo assim, a linhagem *H. indica* LPP 30 se destaca pelo seu potencial, podendo ser utilizado como agente no controle biológico, apresentando maiores mortalidades nas temperaturas entre 28° C e 32° C. Em concentração de 850 e 1000 JIs, o *H. indica* LPP30 foi capaz de controlar 100% das larvas de *C. psidii*, considerando tempo de exposição das larvas de *C. psidii* aos JIs de 60 e 72 horas (Minas, 2012).

#### **2.4. Os fungos nematófagos**

Os fungos nematófagos são inimigos naturais dos nematoides, conhecidos por sua capacidade de capturar, matar e digerir-los. Compreendem mais de 200 espécies encontradas em todos os principais grupos taxonômicos de fungos e estão distribuídos em todos os tipos de solo, tendo sido encontrados em todas as regiões do mundo, desde os trópicos até a Antártida, em solos agrícolas, de jardim e florestas, sendo mais abundantes em solos ricos em matéria orgânica (Nordbring

- Hertz *et al.*, 2006). Existem três principais grupos de fungos nematófagos: predadores, endoparasitas e parasitas de ovos.

O grupo dos fungos predadores desenvolve estruturas em suas hifas comumente chamadas de armadilhas, que são responsáveis pela captura e destruição dos nematoides (Mota *et al.*, 2003). Essas armadilhas apresentam características particulares de acordo com a espécie de fungo, podendo ser: hifas adesivas não modificadas; hifas adesivas tridimensionais; nódulos adesivos; anéis constritores e anéis não constritores (Figura 1). Sendo os principais gêneros de fungos predadores *Arthrobotrys* Corda, 1839 (Moniliales: Moniliaceae) e *Monacrosporium* Oudem, 1885 (Moniliales: Moniliaceae) (Ferraz *et al.*, 2010).

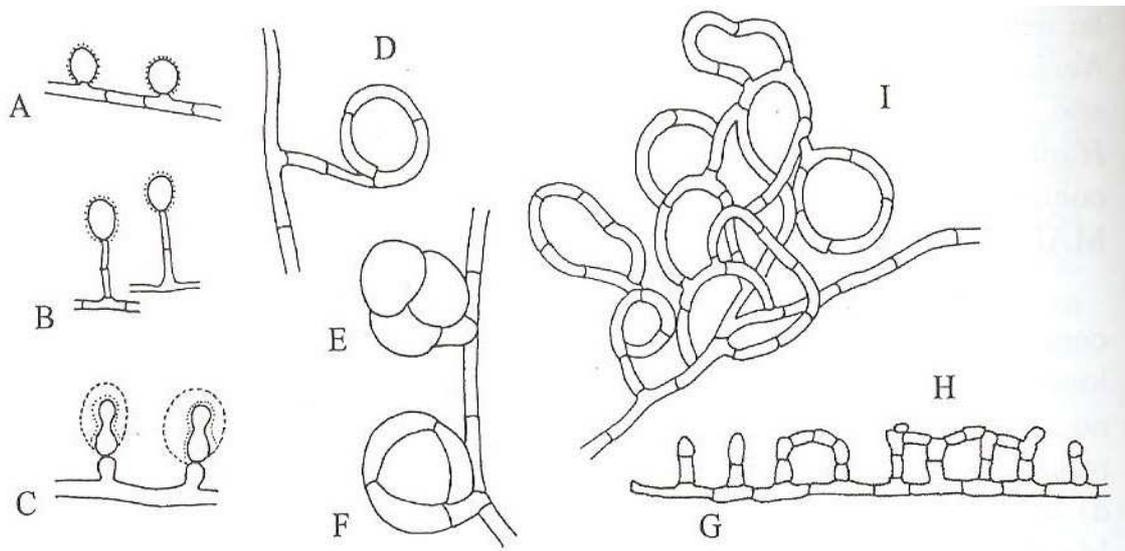


Figura 1. Órgãos de captura de fungos predadores: nódulos adesivos sésseis (A); nódulos adesivos em talos (B); nódulos adesivos com formato de ampulheta (C); anel não constritor (D); anel constritor fechado (E) e aberto (F); ramificações adesivas (G); rede adesiva bidimensional (H); e rede adesiva tridimensional (I) (Fonte: Ferraz *et al.*, 2010).

Os fungos pertencentes ao grupo dos endoparasitas são capazes de infectar através de conídios, que podem aderir à cutícula dos nematoides ou serem engolidos por eles. Estes fungos após penetrarem no corpo do nematoide desenvolvem hifas vegetativas responsáveis pela absorção do seu conteúdo

interno, porém não as produzem para fora do corpo do hospedeiro, somente hifas férteis ou conidióforos contendo conídios (Mota *et al.*, 2003; Nordbring - Hertz *et al.*, 2006).

Os fungos parasitas de ovos como o *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams. 2001, por exemplo, produzem uma porção achatada nas pontas das suas hifas denominada apressórios, que são estruturas responsáveis pela sua adesão à superfície do ovo, providenciando ancoragem para a sua invasão. Após a penetração na casca do ovo o conteúdo interno é digerido pelo fungo (Nordbring - Hertz *et al.*, 2006). A Tabela 1, demonstra as estruturas de infecção de algumas espécies de fungos nematófagos e como estes fungos estão distribuídos nos principais grupos taxonômicos.

No solo, estes fungos podem sobreviver como saprófitas, contudo a capacidade de usar os nematoides como uma fonte adicional de nutrientes é vantajosa. Eles introduzem a sua fase parasítica quando mudam sua morfologia ao formarem armadilhas ou conídios, diferindo na sua capacidade saprofítica e parasítica. Embora muitos dos fungos predadores e parasitas de ovos possam sobreviver como saprófitas no solo, os endoparasitas são na sua maioria mais dependentes dos nematoides como fonte de nutrientes, sendo considerados parasitas obrigatórios (Nordbring - Hertz *et al.*, 2006).

## **2.5. Gênero *Arthrobotrys***

No gênero *Arthrobotrys* está inserido um grande número de espécies de fungos nematófagos. Este gênero foi descrito em 1839 por Corda a partir de amostras de solo, no entanto, nesta ocasião não foi mencionada a capacidade de predação de nematoides. Os fungos deste gênero formam conídios blásticos de até três septos, com formato ovoide, proliferando-se na extremidade dos conidióforos e todos os isolados do gênero são capazes de produzir armadilhas na presença de nematoides de vida livre (Mota *et al.*, 2003).

As espécies de fungos nematófagos do gênero *Arthrobotrys* são comuns na maioria dos solos, sendo mais frequente em regiões temperadas a espécie *A. oligospora* Fresen, 1850 e em regiões tropicais a espécie *A. musiformis* Drechsler,

1937, embora essas duas espécies sejam abundantes e cosmopolitas (Nordbring - Hertz *et al.*, 2006).

Tabela 1. Diferentes estratégias de captura de algumas espécies de fungos nematófagos e seus respectivos grupos taxonômicos

<b>Estruturas de infecção</b>	<b>Espécies</b>	<b>Classificação taxonômica</b>
Redes adesivas	<i>Arthrobotyrs oligospora</i>	Deuteromycetes
	<i>A. conoides</i>	
	<i>A. musiformis</i>	
	<i>A. superba</i>	
	<i>Duddingtonia flagrans.</i>	
Ramos adesivos	<i>Monacrosporium gephyropagum</i>	Deuteromycetes
Botões adesivos	<i>M. elliposporum</i>	Deuteromycetes
	<i>M. haptotylum</i>	
Anéis constritores	<i>A. Dactyloides</i>	Deuteromycetes
	<i>A. brochopaga</i>	
Botões adesivos e esporos adesivos	<i>Nematoctomus concurrens</i>	Basidiomycetes
Esporos adesivos	<i>N. leiosporus</i>	Basidiomycetes
	<i>Drechmeria coniospora</i>	Deuteromycetes
	<i>Hirsutella rhossoliensis</i>	
Esporos ingeridos	<i>Harposporium anguillulae</i>	Deuteromycetes
Zoósporos	<i>Catenaria anguillulae</i>	Chytridiomycetes
	<i>Haptoglossa dickii</i>	Oomycetes
Hifas adesivas	<i>Stylopaga hadra</i>	Zygomycetes
	<i>Cystopaga cladospora</i>	
Gotas tóxicas	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Basidiomycetes
Apressório	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Deuteromycetes

Fonte: Adaptado de Nordbring - Hertz *et al.* (2006)

A maioria das espécies de *Arthrobotrys* é caracterizada pela formação de armadilha de rede adesiva. Esta armadilha pode consistir de um único anel ou uma rede tridimensional completamente desenvolvida. Muitos dos *Arthrobotrys* spp. não formam armadilha espontaneamente, sua formação depende das condições ambientais e especialmente da presença de nematoides para induzi-los à formação. Estruturas de captura de outros fungos tais como botões adesivos e anéis de constrição, podem ser formadas espontaneamente, indicando uma maior necessidade dos nematoides como fonte de nutrientes. Enquanto os endoparasitas e os formadores de armadilhas espontâneas apresentam uma elevada capacidade parasítica, os outros fungos como *Arthrobotrys* spp. são mais saprófitas, tendo uma capacidade única de mudar a sua morfologia e de aumentar a sua habilidade parasitária (Nordbring - Hertz *et al.*, 2006).

## 2.6. Atratividade

Os micélios dos fungos predadores ou os conídios de endoparasitas muitas vezes produzem substâncias químicas que podem atrair vários tipos de nematoides, como micófagos, fitófagos e bacteriófagos quando testadas em placas de ágar (El-Borai *et al.*, 2011).

Os nematoides são atraídos para o micélio dos fungos e podem induzir a formação de armadilhas, embora eles sejam mais atraídos por conídios e armadilhas já desenvolvidas. A atração desses nematoides se deve aos compostos libertados a partir do micélio e de armadilhas de fungos predadores e de conídios de endoparasitas. Tanto a morfologia e conseqüentemente a capacidade saprofítica / parasítica influenciam fortemente a atratividade dos fungos. Fungos que são mais parasitários parecem ter uma atração mais forte do que os fungos mais saprófitas, ou seja, as espécies de endoparasitas que infectam nematoides com conídios são mais eficazes na atração de nematoides do que as espécies mais saprófitas com diferentes tipos de armadilhas de captura (Nordbring - Hertz *et al.*, 2006).

De acordo com a capacidade predatória e saprofítica, Jansson e Nordbring - Hertz (1979) dividiram os fungos nematófagos em três grupos ecológicos. No

grupo 1, foram colocados os fungos predadores mais saprófitas que possuem um rápido crescimento, cujas armadilhas produzidas são as redes adesivas formadas normalmente quando induzidas por nematoides ou quimicamente. No grupo 2, estão os fungos mais predadores, que possuem um crescimento mais lento e que geralmente produzem suas armadilhas espontaneamente (botões adesivos, ramos adesivos, anéis não constritores e anéis constritores). No grupo 3, estão os fungos endoparasitas, os quais infectam os nematoides com os seus conídios, sendo a maioria desses fungos parasitas obrigatórios. Estudos sobre a atração de nematoides para estes fungos indicam que a capacidade dos fungos para atrair nematoides aumentou com o aumento da dependência dos fungos nematófagos sobre nematoides como fonte nutricional (Grupo 1 < Grupo 2 < Grupo 3) (Jansson e Nordbring - Hertz, 1979; Jansson, 1982).

Segundo Jansson e Nordbring - Hertz (1979), quando os fungos foram mortos por radiação UV, a atração dos fungos do grupo 1 foi completamente abolida. Enquanto que os fungos dos grupos 2 e 3 continuaram atraindo, embora um pouco menos. Isto sugeriu que uma substância volátil, ou de um pequeno composto com rápida difusão, produzido continuamente, foi responsável pela atração para os fungos de crescimento rápido. Já para os fungos dos grupos 2 e 3, sugere-se que uma substância de maior dimensão ou menos volátil, ou que compostos com difusão mais lenta pode ser responsável pela atração. No entanto, as substâncias responsáveis pela atração dos nematoides permanecem desconhecidas.

Para avaliar o papel das armadilhas para a intensidade de atração, Jansson (1982) utilizou o fungo *A. oligospora* como um organismo modelo, estudando a atração tanto na fase saprófita quanto na fase predatória, no qual utilizou um peptídeo para induzir a formação de armadilha. Na presença de armadilhas houve um aumento considerável na capacidade do fungo em atrair os nematoides. Entretanto, a presença de armadilhas não necessariamente causa a atração, segundo Jansson e Nordbring - Hertz (1979) no fungo *Arthrobotrys arthrobotryoides* (Berl.) Lindau, 1906 as armadilhas repeliram os nematoides. Além disso, os fungos *Arthrobotrys ductyloides* Drechsler, 1937 e *Dactylaria gracilis* Duddington, 1951 cujas armadilhas são anéis de constrição foram neutras, ou seja, nem repeliram e nem atraíram os nematoides.

Jansson e Nordbring - Hertz (1979) sugeriram que a composição do substrato e a adição de indutores de armadilhas, como extratos de nematoides e soro de cavalo, por exemplo, poderia afetar a atratividade dos fungos, entretanto, os nematoides poderiam ser atraídos por partículas desses produtos, e não, necessariamente, pelas armadilhas formadas.

De acordo com El-Borai *et al.*, (2011), os JIs de nematoides entomopatogênicos podem ser atraídos, repelidos ou serem neutros em testes de escolha para fungos ativados previamente com nematoides e fungos não ativados. Os seus resultados indicam haver uma complexidade potencial, ou seja, respostas mistas ou movimento de agregação em grupo, e certa especificidade nas respostas das espécies de NEPs aos fungos. Os dados obtidos demonstram que os resultados em ágar podem diferir significativamente daqueles na areia, e salientam a importância potencial da utilização de substratos naturais para avaliar adequadamente o papel dos semioquímicos nas interações entre nematoides e fungos. Os autores relacionam os resultados ao fato dos JIs dos nematoides diferirem sua percepção e orientação em ágar e areia, somados com as diferenças nos gradientes formados por semioquímicos em uma placa de Petri com ágar daqueles formados em um tubo com areia úmida.

## **2.7. Aspectos da interferência dos fungos nematófagos sobre os NEPs**

Os nematoides entomopatogênicos são suscetíveis a serem infectados e conseqüentemente serem mortos por diversos fungos nematófagos presentes no solo (Poinar e Jansson, 1986a, 1986b; Timper e Kaya, 1989; Koppenhofer *et al.*, 1996; Andaló *et al.*, 2008; El Borai *et al.*, 2009). Assim, antes de se aplicar os nematoides em solos ricos em húmus, é prudente fazer um levantamento de fungos nematófagos que possam estar presentes (Poinar & Grewal, 2012).

Timper e Kaya (1989) relataram que NEPs do gênero *Steinernema* são mais susceptíveis à infecção por conídios de fungos endoparasitas do que nematoides do gênero *Heterorhabditis*, devido à presença da cutícula do segundo estágio dos JIs de *Heterorhabditis* que fica retida como uma capa protetora. Assim, pode-se sugerir que as espécies do gênero *Heterorhabditis* podem ser mais eficientes como agentes de controle biológico do que espécies do gênero

*Sterneinema* em solos onde esses fungos são abundantes (Timper e Kaya, 1992; Timper e Kaya,1989).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Estudar as interações de fungos nematófagos com os nematoides entomopatogênicos *H. indica* LPP30 e *S. carpocapsae* NCALL.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar dois isolados fúngicos mais agressivos a partir de testes *in vitro*, entre *Arthrobotrys oligospora* AM2, *Arthrobotrys musiformis* AM4, *Arthrobotrys* sp. CO7 e *Arthrobotrys* sp. CC7, contra *Heterorhabditis indica* LPP30;

- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *H. indica* LPP30 e *S. carpocapse* NCALL aos isolados de fungos nematófagos *A. musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7;

- Observar o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo *in vitro* dos isolados *A. musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 em diferentes fontes nutritivas;

- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *H. indica* LPP30 e *S. carpocapse* NCALL aos isolados *A. musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 usando diferentes fontes nutritivas;

- Verificar a dispersão dos nematoides *H. indica* LPP30 e *S. carpocapse* NCALL na presença do fungo *Arthrobotrys* sp. CO7 em solo argiloso e arenoso.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, campus Leonel Brizola, município de Campos dos Goytacazes, RJ.

### 4.1. Obtenção e manutenção dos insetos, nematoides e fungos

#### 4.1.1. Criação de *Galleria mellonella*

Lagartas da espécie *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) foram utilizadas para a multiplicação de NEPs, as quais foram obtidas da criação mantida artificialmente no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia/ Setor de Nematologia/ CCTA/ UENF, de acordo com metodologia descrita por Woodring e Kaya (1988). Os adultos foram mantidos em potes cilíndricos de vidro de 20 cm de altura e 14 cm de diâmetro com tampa plástica perfurada. Em cada frasco foi colocada metade de uma folha de papel A4, para permitir a postura de ovos pelas fêmeas. Os pedaços de papel contendo os ovos foram recortados e transferidos para potes plásticos de 20 cm de comprimento, 10 cm de altura e 18 cm de largura, forrados com papel A4, contendo dieta artificial (Apêndice). Periodicamente os papéis que forravam os potes foram substituídos para evitar excesso de umidade e proliferação de micro-organismos, seguido de adição da dieta artificial para a manutenção das lagartas até serem utilizadas para a

multiplicação dos NEPs. Os adultos emergidos frequentemente eram recolhidos e transferidos para os potes de vidro, para a manutenção da criação.

#### **4.1.2. Multiplicação de Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)**

Juvenis infectantes (JIs) de *H. indica* LPP30 e *S. carpocapsae* NCALL foram obtidos do banco de nematoides entomopatogênicos do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia/ Setor de Nematologia/ CCTA/ UENF.

As espécies foram multiplicadas separadamente em larvas de *G. mellonella*. Para tanto, dez lagartas no último ínstar foram colocadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo um disco de papel filtro. Onde, foi adicionado 1 mL de suspensão de água destilada contendo aproximadamente 1.000 JIs/mL. As placas foram mantidas em câmara de germinação do tipo BOD sob temperatura de 25°C no escuro. Após sete dias, os cadáveres de *G. mellonella* foram colocados em armadilhas “de White” modificadas para a coleta dos JIs (White, 1927). Para este procedimento foram utilizadas placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo um anel de PVC (2,5 cm de diâmetro) com um pedaço de papel filtro sobre o mesmo, no qual foram colocados os insetos cadáveres. Foi acrescentada água destilada na parte inferior da placa, as quais foram mantidas em BOD a 25°C até que os JIs começassem a emergir dos insetos- cadáveres, ocasião em que foram coletados com auxílio de uma pipeta e a suspensão concentrada armazenada em frascos com tampa à temperatura de 16°C em BOD por até uma semana para serem utilizados nos testes (Figura 2).

#### **4.1.3. Cultivo de Fungos Nematófagos**

Foram utilizados quatro isolados do fungo nematófago predador *Arthrobotrys*: *Arthrobotrys oligospora* (AM2), *Arthrobotrys musiformis* (AM4), *Arthrobotrys* sp. (CO7) e *Arthrobotrys* sp. (CC7). Os dois primeiros foram isolados de solo da Mata do Carvão que corresponde a um fragmento da Mata Atlântica localizada no município de São Francisco do Itabapoana/RJ. Os outros dois foram isolados de pomar de goiabeira instalado na área experimental da Unidade de

Apoio à Pesquisa do Centro de Tecnologias Agropecuárias da UENF, Campus Leonel Brizola, município de Campos dos Goytacazes/RJ.

Repicagens periódicas foram realizadas para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura ágar-milho 1,7%, seladas com filme plástico e mantidas em câmara de germinação tipo BOD a 25°C no escuro, por no máximo uma semana antes da sua utilização. O armazenamento por longo período de tempo ocorreu através do método de Castellani, onde pequenos discos (5 mm de diâmetro) das colônias dos fungos cultivados em ágar-milho, foram adicionados à água destilada esterilizada contida em pequenos frascos, estes foram lacrados para evitar contaminação e evaporação da água e mantidos em BOD a 25°C no escuro.

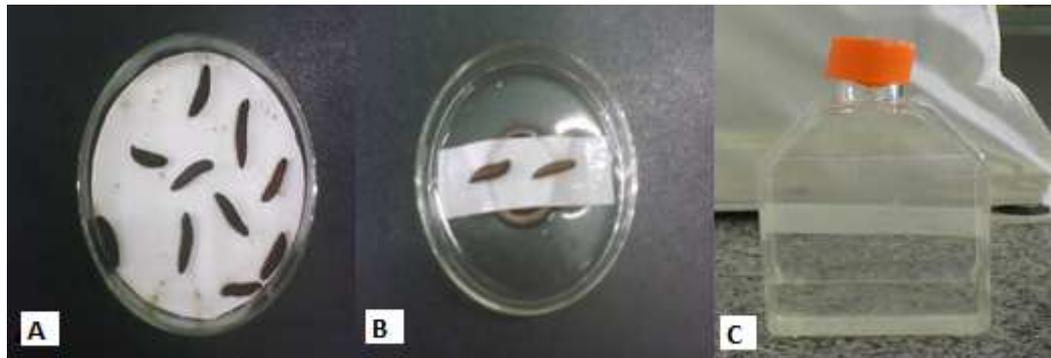


Figura 2. Multiplicação de nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* LPP30 e *Steinernema carpocapsae* NCALL em larvas de *Galleria mellonella*. A) Larvas sobre papel filtro infectadas por nematoides entomopatogênicos; B) Armadilha de White, modificada, com cadáveres de *G. mellonella*, utilizada para a captura de juvenis infectantes; C) Garrafa de cultura de células (50 mL) com suspensão de juvenis infectantes.

## 4.2. Experimentos

### 4.2.1. Agressividade *in vitro* de fungos nematófagos

O experimento foi conduzido em laboratório, utilizando-se a linhagem de NEP LPP30 e os isolados de fungos AM2, AM4, CO7 e CC7. Foram feitos 5 tratamentos: LPP30 + AM2; LPP30 + AM4; LPP30 + CO7; LPP30 + CC7; LPP30

(tratamento controle). O tratamento controle foi composto apenas pela adição de JIs de LPP30 no meio, sem a presença de fungo. O ensaio consistiu de 5 repetições/ tratamento, sendo cada placa de Petri uma unidade experimental.

Em cada placa (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura ágar-água 2% foi repicado um disco (1 cm de diâmetro) da colônia de FN em crescimento, cultivado em meio de cultura ágar-milho 1,7% (Figura 3).

As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em BOD a 25° C, no escuro. Após quatro dias de incubação foram adicionados 0,5 mL de suspensão contendo 50 JIs de *H. indica* LPP30. As placas foram novamente vedadas e incubadas. A avaliação da agressividade dos FN foi realizada através de observações sob microscópio estereoscópico, contando-se o número de NEPs apreendidos pelos FN, após 48 horas da adição dos JIs.

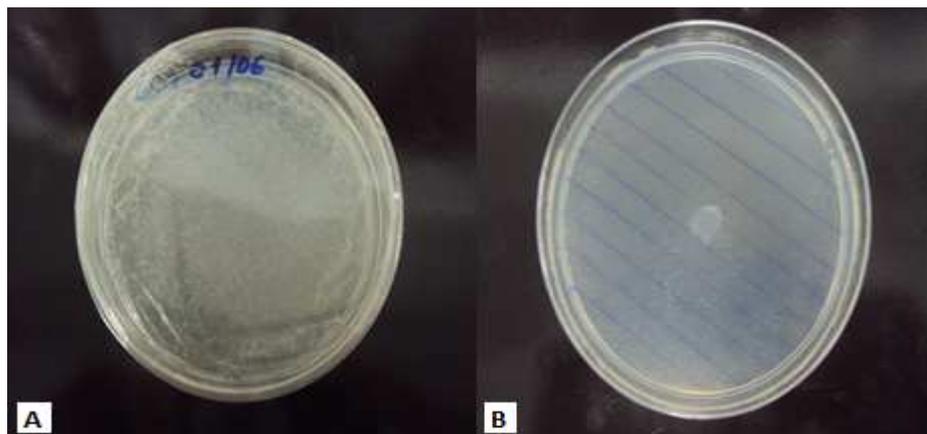


Figura 3. Fungo nematófago cultivado em meio de cultura ágar-milho utilizado para realizar ensaios de agressividade; A) Colônia com 7 dias de crescimento; B) Disco de colônia repicado para o centro da placa de Petri contendo meio de cultura ágar-água.

#### 4.2.2. Suscetibilidade *in vitro* de NEPs a fungos nematófagos

Foram utilizadas duas linhagens de NEPs: LPP30 e NCALL, contra dois isolados de FNs: AM4 e CO7, considerados os mais agressivos aos nematoides no primeiro experimento. Assim, este ensaio consistiu de 6 tratamentos: LPP30 + AM4;

LPP30 + CO7; NCALL + AM4; NCALL + CO7; LPP30 (controle I); NCALL (controle II). O controle I, foi composto somente por JIs de LPP30 e o controle II composto apenas de JIs de NCALL. Dessa forma, obteve-se um total de 10 repetições/tratamento.

Os fungos previamente crescidos em meio ágar-milho 1,7%, foram repicados por meio de um disco de 0,5 cm da colônia para placas de Petri (5 cm de diâmetro) contendo meio ágar-água 2%, em um total de 20 placas por isolado. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara do tipo BOD com temperatura de 25°C, no escuro.

Após dois dias de incubação, foram adicionadas 0,1 mL de suspensão contendo 500 JIs de *H. indica* LPP30 e 500 JIs de *S. carpocapsae* NCALL, separadamente, ao redor do disco previamente repicado, com auxílio de uma pipeta. Posteriormente, as placas foram novamente vedadas e incubadas em câmara do tipo BOD com temperatura de 25°C, no escuro.

A avaliação da suscetibilidade dos NEPs foi realizada por meio de observações sob microscópio estereoscópico, contando-se o número de JIs apreendidos nas armadilhas dos fungos, após 24 e 48 horas de adição dos nematoides.

#### **4.2.3. Desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de fungos nematófagos**

Avaliaram-se o crescimento micelial e a esporulação dos fungos nematófagos sobre diferentes meios nutritivos. Para tanto, discos de colônias de 1 cm de diâmetro dos isolados AM4 e CO7, previamente crescidos em meio ágar-milho 1,7%, foram repicados separadamente para o centro de placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo os seguintes meios: ágar-água (AA) : 20 g de ágar + 1L de água destilada; ágar-milho (AM): 17 g de ágar-milho + 1 L de água destilada; batata-dextrose-ágar (BDA): 39 g de batata-dextrose-ágar + 1 L de água destilada; suco V8-ágar (V8): 200 mL de suco V8 + 3 g de CaCO<sub>3</sub> + 20 g de ágar + 1 L de água destilada; extrato de solo (ES) : 1 Kg de solo + 1 L de água (autoclavado durante 1 h, depois de autoclavado, filtrou-se o extrato com papel de filtro). 100 mL do líquido filtrado + 900 mL de água destilada + 1 g de dextrose + 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 20 g de ágar; meio ágar-nematoides (AAN): 20 g de ágar + 1 L de água destilada +

aproximadamente 250 mL de solução muito concentrada de JIs de LPP30 (Figuras 4 e 5). As placas foram mantidas a 25 ° C em BOD, no escuro.

Assim, foram feitos 12 tratamentos: AM4 + AA; AM4 + BDA; AM4 + V8; AM4 + ES; AM4 + AAN; AM4 + AM (controle); CO7 + AA; CO7 + BDA; CO7 + V8; CO7 + ES; CO7 + AAN; CO7 + AM (controle). Os ensaios experimentais consistiram de 6 repetições/tratamentos.

O meio de cultivo Ágar-milho AM (Corn Meal Ágar CMA) foi utilizado como tratamento controle Stevens (1981) *apud* Naime (2009). O crescimento micelial foi avaliado medindo-se a cada 24 h o diâmetro da colônia (cm) em dois eixos perpendiculares até que um dos tratamentos atingisse o crescimento máximo na placa de Petri, ou seja, a borda da placa (Figura 6).

A avaliação da esporulação foi realizada aos 7 dias de crescimento, recolhendo-se os esporos produzidos, por pincelamento da superfície da colônia em suspensão de água destilada esterilizada. A contagem dos esporos totais foi realizada em câmara de Neubauer.

#### **4.2.4. Suscetibilidade de NEPs a fungos nematófagos cultivados *in vitro* em diferentes fontes nutritivas**

Para avaliar a suscetibilidade dos NEPs LPP30 e NCALL aos isolados fúngicos AM4 e CO7, foram repicados separadamente, discos de colônias de 1 cm de diâmetro dos isolados previamente crescidos em meio ágar-milho 1,7%, para o centro de placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo os seguintes meios: ágar-água (AA) : 20 g de ágar + 1L de água destilada; ágar-milho (AM): 17 g de ágar-milho + 1 L de água destilada; batata-dextrose-ágar (BDA): 39 g de batata-dextrose-ágar + 1 L de água destilada; suco V8-ágar (V8): 200 mL de suco V8 + 3 g de CaCO<sub>3</sub> + 20 g de ágar + 1 L de água destilada; extrato de solo (ES) : 1 Kg de solo + 1 L de água (autoclavado durante 1 h, depois de autoclavado, filtrou-se o extrato com papel filtro). 100 mL do líquido filtrado + 900 mL de água destilada + 1 g de dextrose + 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 20 g de ágar; meio ágar-nematoides (AAN): 20 g de ágar + 1 L de água destilada + aproximadamente 250 mL de solução muito concentrada de JIs de LPP30. As placas foram mantidas a 25° C em BOD, no escuro.

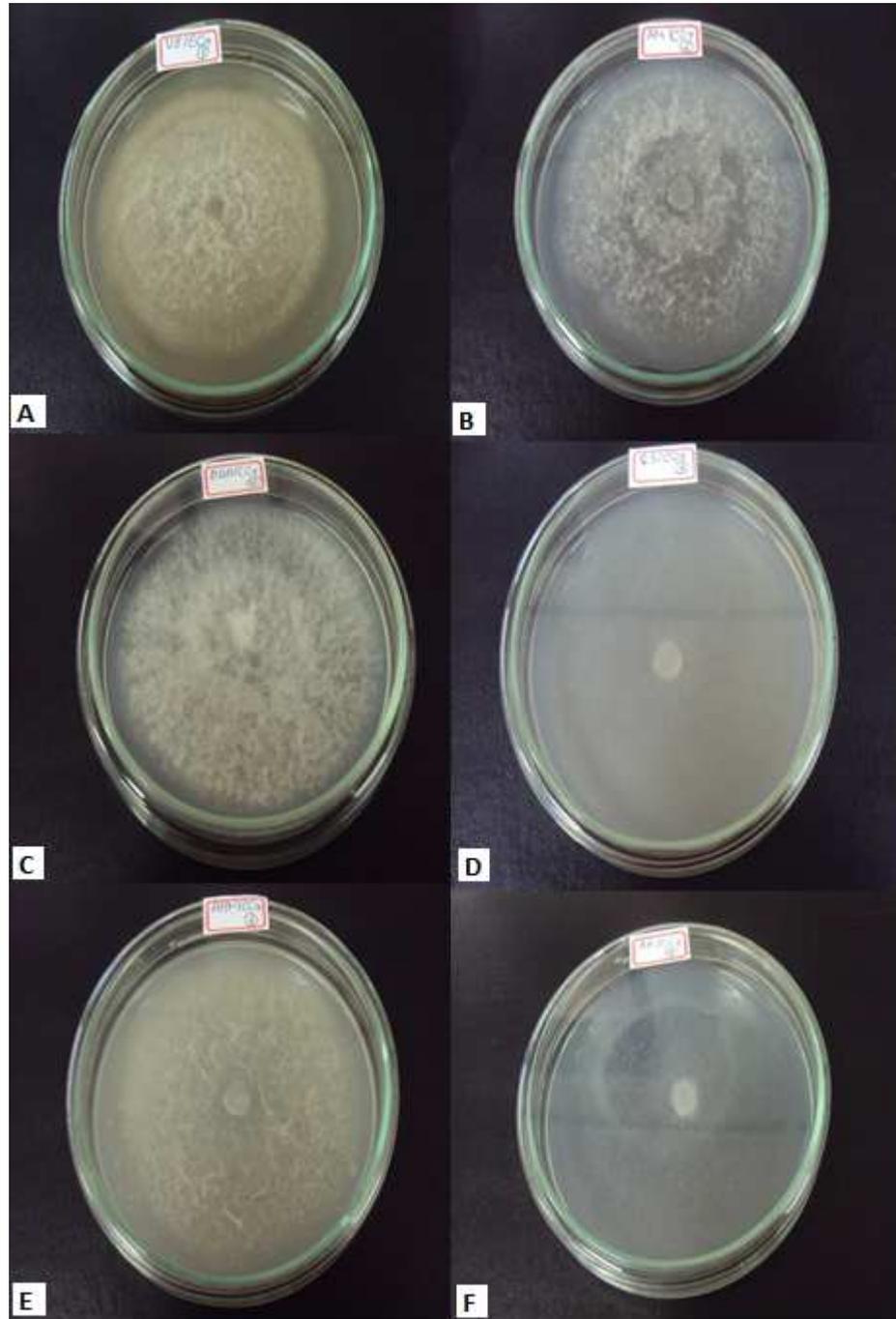


Figura 4. Aspecto da colônia do fungo nematófago *Arthrobotrys* sp. (isolado CO7), cultivado em diferentes fontes nutritivas. A) Suco V8-Ágar; B) Ágar-milho; C) Batata-dextrose-ágar; D) Extrato de solo; E) Ágar-nematoides e F) Ágar-água.

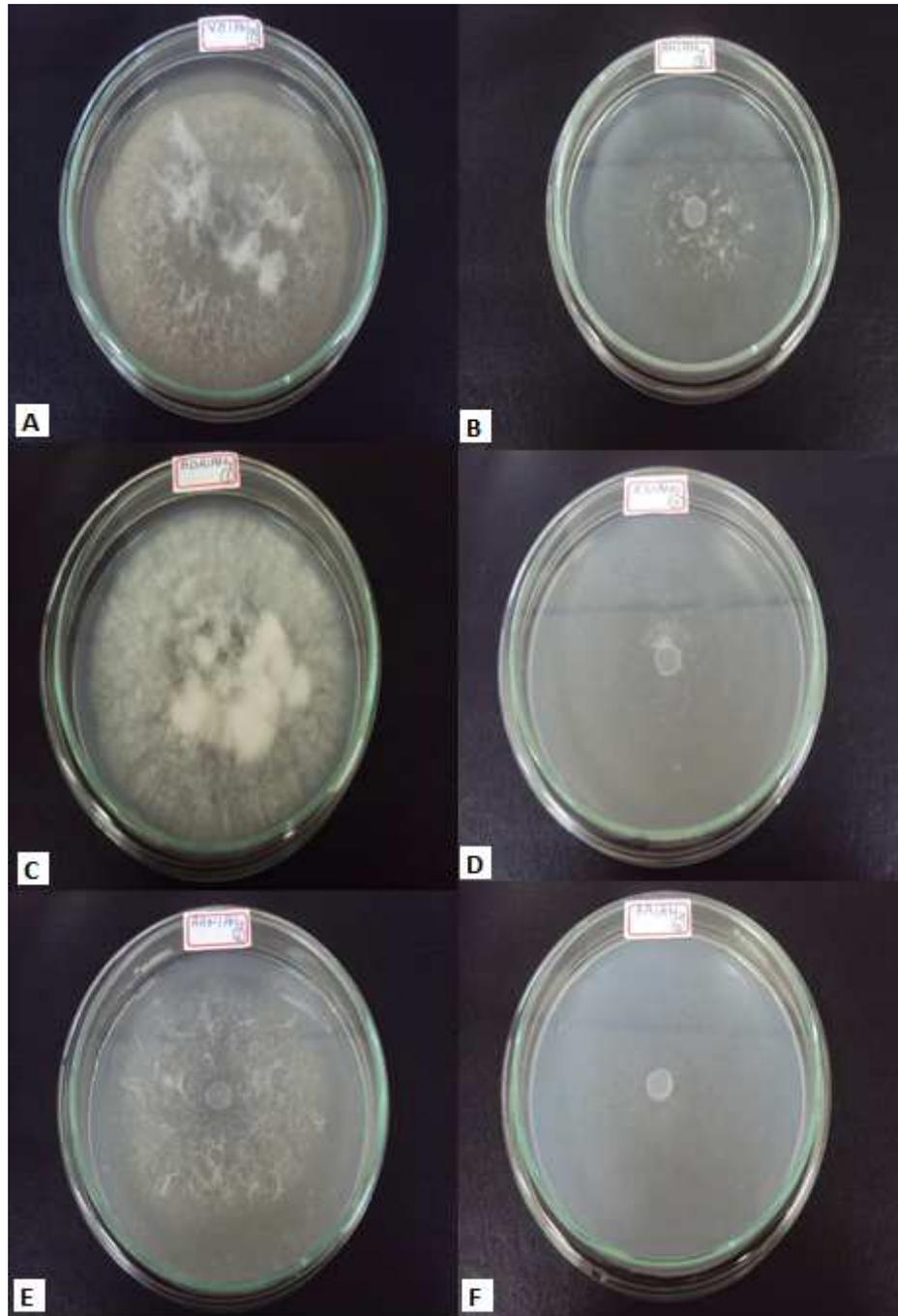


Figura 5. Aspecto da colônia do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado AM4), cultivado em diferentes fontes nutritivas. A) Suco V8-Ágar; B) Ágar-milho; C) Batata-dextrose-ágar; D) Extrato de solo; E) Ágar-nematoides e F) Ágar-água.

Assim, foram feitos 24 tratamentos: AM4 + BDA + LPP30; AM4 + V8 + LPP30; AM4 + ES + LPP30; AM4 + AAN + LPP0; AM4 + AM + LPP30; AM4 + AA + LPP30 (controle); AM4 + BDA + NCALL; AM4 + V8 + NCALL; AM4 + ES + NCALL; AM4 + AAN + NCALL; AM4 + AM + NCALL; AM4 + AA + NCALL (controle); CO7 + BDA + LPP30; CO7 + V8 + LPP30; CO7 + ES+ LPP30; CO7 + AAN + LPP30; CO7 + AM+ LPP30; CO7 + AA + LPP30 (controle); CO7 + BDA + NCALL; CO7 + V8 + NCALL; CO7 + ES + NCALL; CO7 + AAN + NCALL; CO7 + AM + NCALL; CO7 + AA + NCALL (controle). Os ensaios experimentais consistiram de 4 repetições/tratamentos.

Após sete dias de crescimento dos fungos, foram adicionados às placas, cerca de 0,1 mL de suspensão contendo 1000 JIs de cada nematoide, separadamente.

A avaliação da agressividade dos fungos foi realizada após 72 h de semeio dos NEPs. Nesse caso, as placas de Petri foram lavadas, com auxílio de uma pipeta, com cerca de 10 ml de água destilada e a suspensão recolhida em tubos de ensaios. Posteriormente, os nematoides recuperados foram quantificados sob câmara de Peters.

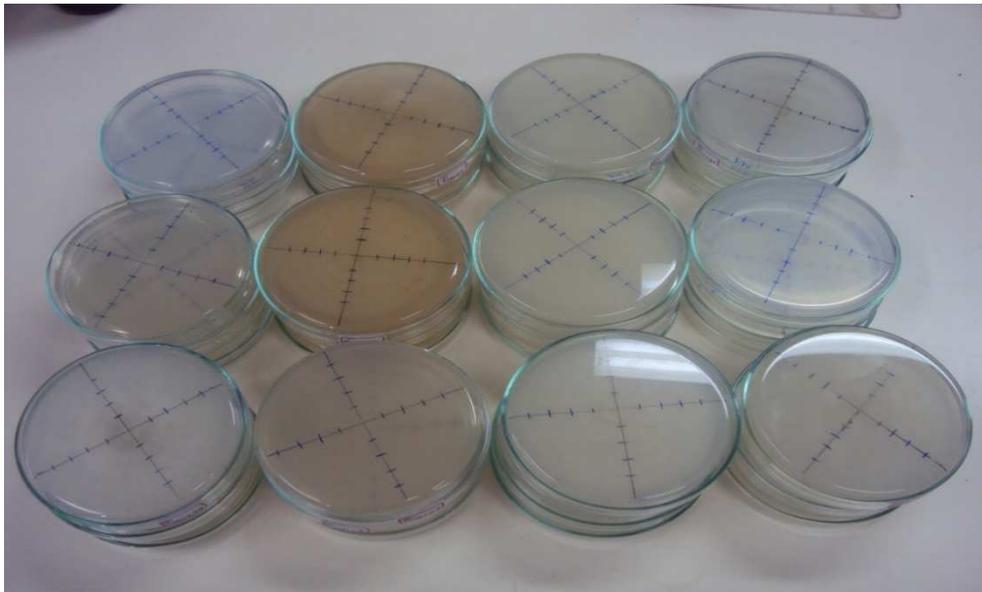


Figura 6. Marcação em fundos de placa de Petri, devido à avaliação de medição do crescimento micelial de colônias de *Arthrobotrys musiformis* (isolado AM4) e *Arthrobotrys* sp. (isolado CO7) em diferentes fontes nutritivas.

#### 4.2.5. Dispersão de NEPs em substrato areia e solo argiloso

O experimento foi conduzido em laboratório, utilizando-se o isolado *Arthrobotrys sp.* CO7 (uma vez que este foi obtido de pomar de goiabeiras assim como o nematoide *H. indica* LPP30), e duas linhagens de NEPs, *H. indica* LPP30 e *S. carpocapse* NCALL, sob temperatura média de 25° C. Assim, foram feitos 4 tratamentos: CO7 + LPP30; LPP30 (Controle I); CO7 + NCALL; NCALL (Controle II), nos tratamentos controle não foram adicionados fungos. Os ensaios consistiram em 10 repetições/ tratamento.

Para avaliação da capacidade de dispersão dos nematoides na presença do fungo nematófago, montou-se um aparato constituído por pedaços de canos PVC com 15 cm de comprimento x 6 cm de diâmetro. Dois pedaços foram unidos um ao outro por fita crepe e cada conjunto desses foi conectado a outro conjunto igual por um conector de cano de mesmo diâmetro, porém com 8 cm de comprimento (figura 7). Em cada extremidade do conjunto de tubos foi colocada uma placa de Petri contendo o fungo repicado em meio de cultivo ágar-água 2%. O controle constituiu apenas da placa de Petri contendo meio de cultivo sem o fungo.

Em um dos lados desse conjunto foi colocado cerca de 1200 g de areia e do outro lado, 1200 g de solo argiloso. Após 48 horas do fungo ter sido colocado nas extremidades do aparato, foi feito um orifício no centro do conector, por onde ocorreu o semeio de suspensão aquosa na concentração de 10.000 JIs/ml (Figura 8). Os pedaços de canos unidos por fita crepe serviram para avaliar a distância de 15 a 30 cm percorrida pelos nematoides. Obteve-se um total de 10 repetições/tratamento.

Os substratos foram anteriormente submetidos a análises químicas e físicas, onde a areia apresentou, 0,7% de argila, 99,3% de areia, pH 6,1 e 1,9 g/dm<sup>3</sup> de matéria orgânica, e o solo argiloso apresentou, 46,7% de argila, 7,7% de areia, 45,6% de silte, pH 5,8 e 12,6 g/dm<sup>3</sup> de matéria orgânica. Os substratos foram esterilizados em coletor solar por três dias consecutivos a aproximadamente 70° C e umidade ajustada a 10% (massa/volume).

Os tubos foram mantidos na posição horizontal e lacrados com filme plástico com pequenas perfurações para promover oxigenação do tubo e evitar perdas por evaporação. Após 10 dias, o tubo foi desmontado e o solo argiloso e a

areia foram retirados dos pedaços de canos e processados individualmente para a contagem dos JIs livres (Jenkins,1964).



Figura 7. Aparato desenvolvido para a avaliação da dispersão de nematoides no solo, composto por canos de PVC e Placas de Petri contendo colônias de fungos nas extremidades opostas.



Figura 8. Peça central (conector) do aparato para avaliar a dispersão de nematoides no solo, com detalhe do orifício para semente dos juvenis de nematoides entomopatogênicos.

### 4.3. Análise estatística

Nos experimentos de suscetibilidade *in vitro* de NEPs a fungos nematófagos e no desenvolvimento vegetativo dos fungos nematófagos, as variáveis foram testadas para a homogeneidade de variância (teste de Cochran e Bartlett) e normalidade dos erros (teste de Lilliefors), em 5% de probabilidade. Quando estes pressupostos não foram cumpridos, os dados foram transformados por log da equação  $(x + 1)$  e os pressupostos da análise de variância reavaliados. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Para os experimentos de, agressividade dos fungos nematófagos, desenvolvimento reprodutivo dos fungos nematófagos, suscetibilidade de NEPs a fungos nematófagos cultivados *in vitro* em diferentes fontes nutritivas e de dispersão de NEPs em substrato areia e solo argiloso, os resultados foram submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis em 5% de probabilidade. Todos os experimentos foram repetidos uma vez.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Agressividade *in vitro* de fungos nematófagos

Todos os quatro fungos testados foram capazes de predação JIs de *H. indica* LPP30. Os valores médios de JIs apreendidos por *A. musiformis* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 foram significativamente superiores em relação aos outros tratamentos *Arthrobotrys* sp. CC7, *A. oligospora* AM2 e o controle (sem fungo), no ensaio 1 e no ensaio 2 (figura 9). A média de JIs apreendidos no ensaio 1, em geral, foi superior à média no ensaio 2. Com exceção para o isolado AM2, que teve sua média de apreensão maior no ensaio 2 do que no ensaio 1.

Em uma análise conjunta dos dados, também houve diferença significativa entre os tratamentos. Os fungos *A. musiformis* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 foram os mais agressivos, apreendendo 48,72% e 38,57% dos JIs, respectivamente. Enquanto que o *Arthrobotrys* sp. CC7 apreendeu 9,47% e *A. oligospora* AM2 3,24% dos JIs adicionados às placas (Figuras 10 e 11). Estes dados são corroborados por aqueles obtidos por El-Borai *et al.*, (2009), onde *A. musiformis* reduziu JIs de *H. indica* enquanto *A. oligospora* não teve efeito ( $p < 5$ ) sobre esses NEPs, reforçando a hipótese de especificidade entre isolados fúngicos x NEPs.

Desta forma, tornou-se adequado desenvolver estudos mais aprofundados envolvendo os isolados *A. musiformis* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7, em outros ensaios experimentais do presente trabalho.

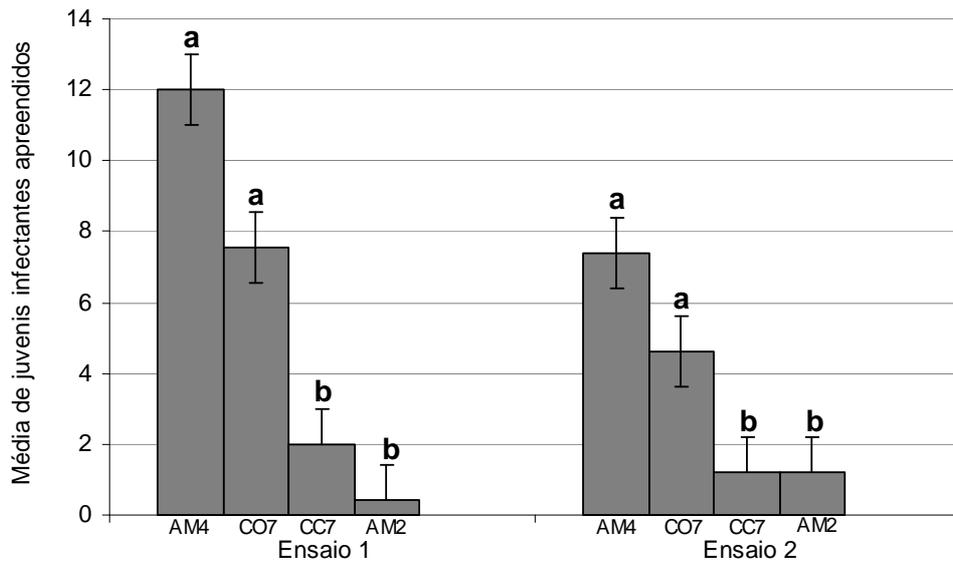


Figura 9. Média de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP30 apreendidos pelos isolados fungicos *Arthrobotrys oligospora* AM2, *Arthrobotrys musiformis* AM4, *Arthrobotrys* sp. CO7 e *Arthrobotrys* sp. CC7. Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 5$ ). No controle não foram observados juvenis apreendidos.

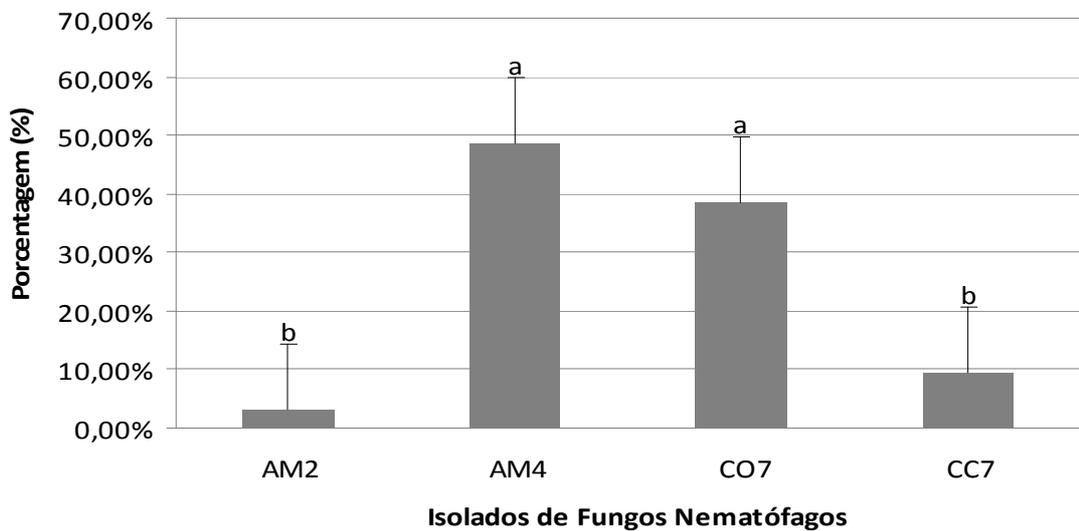


Figura 10. Porcentagem de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP30 apreendidos pelos isolados fúngicos *Arthrobotrys oligospora* AM2, *Arthrobotrys musiformis* AM4, *Arthrobotrys* sp. CO7 e *Arthrobotrys* sp. CC7 em testes *in vitro*. Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P < 5$ ). No controle não foram observados juvenis apreendidos.

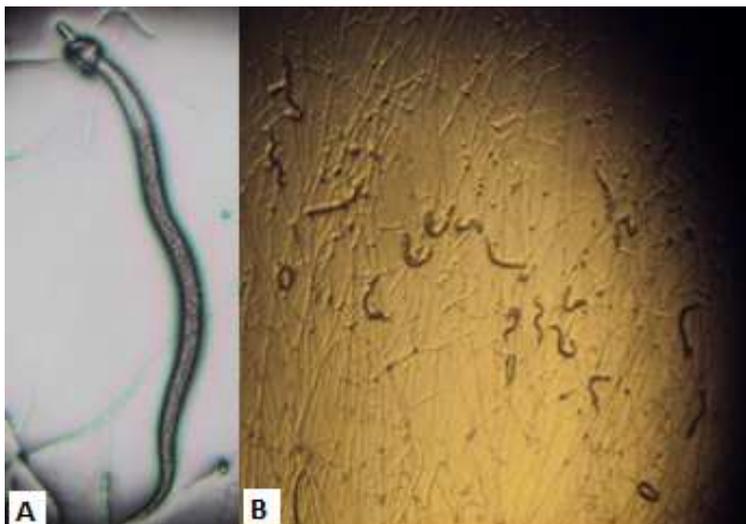


Figura 11. Juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP30 capturados pelo fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* AM4. A) Juvenil apreendido pela extremidade anterior; B) Indivíduos capturados em colônia crescida em meio de cultivo ágar-água.

## 5.2. Suscetibilidade *in vitro* de NEPs a fungos nematófagos

Os JIs de *S. carpocapsae* NCALL foram menos susceptíveis a ambos os fungos *A. musiformis* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 nas primeiras 24 horas. Já os JIs de *H. indica* LPP30 não sofreram efeito ( $P < 5$ ) do tempo em ambos os ensaios 1 e 2 (Tabelas 2 e 3).

Observou-se ainda, que no ensaio 1, os JIs de *S. carpocapsae* NCALL foram menos susceptíveis aos isolados *Arthrobotrys* sp. CO7 do que JIs de *H. indica* LPP30 nas primeiras 24 horas. No ensaio 2, observou-se que os JIs de *S. carpocapsae* NCALL foram menos susceptíveis a ambos os isolados *A. musiformis* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 do que JIs de *H. indica* LPP30 nas primeiras 24 horas. Contudo, depois de 48 horas as médias de JIs capturados pelos fungos se igualaram estatisticamente tanto no ensaio 1 quanto no ensaio 2 (Tabelas 2 e 3).

El Borai *et al.*, (2009) observaram em ensaios experimentais com areia, que JIs de *Steinernema diaprepesi* Nguyen e Duncan, e *Steinernema glaseri* Steiner não foram afetados por *A. musiformis*, *A. oligospora* e *Arthrobotrys dactyloides* Drechsler. Entretanto, o fungo *A. musiformis* reduziu JIs de *Steinernema riobrave*

Cabanillas, Poinar e Raulston, *H. indica* e *Heterorhabditis zealandica* Poinar. Já o fungo *A. oligospora* reduziu somente JIs de *S. riobrave* e *H. zealandica*. Sendo, JIs de *S. riobrave* mais suscetíveis que JIs de *H. indica* e *H. zealandica* para os fungos *A. musiformis* e *A. oligospora* no 14<sup>o</sup> dia de inoculação. Os autores sugerem que os JIs de maiores tamanhos (como *S. diaprepesi*, e *S. glaseri*) têm maior força podendo permitir o escape com mais facilidade dos órgãos de captura dos fungos predadores.

Tabela 2. Juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP30 e *Steinernema carpocapse* NCALL apreendidos pelos fungos *Arthrobotrys musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7, 24 e 48 horas após a inoculação dos juvenis (Ensaio 1)

Tratamentos	Tempo	
	24 horas	48 horas
AM4 + LPP30	78,7 Aab	95,9 Aab
CO7 + LPP30	63,3 Bb	89,2 Aab
AM4 + NCALL	58,0 Bb	139,7 Aa
CO7 + NCALL	29,4 Cc	104,4 Aa
LPP30 (Controle I)	0 Dd	0 Dd
NCALL (Controle II)	0 Dd	0 Dd

C.V.(%) = 10,1%

Para análise estatística os dados de juvenis infectantes apreendidos foram transformados por  $\log(x+1)$ . Médias seguidas da mesma letra minúscula, na mesma linha e médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Tabela 3. Juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP30 e *Steinernema carpocapse* NCALL apreendidos pelos fungos *Arthrobotrys musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7, 24 e 48 horas após a inoculação dos juvenis (Ensaio 2)

Tratamentos	Tempo	
	24 horas	48 horas
AM4 + LPP30	126,0 Bab	127,8 Bab
CO7 + LPP30	116,6 Bab	121,7 Bab
AM4 + NCALL	55,8 Dc	150,8 Bab
CO7 + NCALL	78,3 Cc	214,7 Aa
LPP30 (Controle I)	0 Dd	0 Dd
NCALL (Controle II)	0 Dd	0 Dd

C.V.(%) = 14,4%

Para análise estatística os dados de juvenis infectantes apreendidos foram transformados por  $\log(x+1)$ . Médias seguidas da mesma letra minúscula, na mesma linha e médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

No primeiro momento (24 horas) os JIs de *S. carpocapsae* NCALL mostraram-se menos suscetíveis ao isolado *Arthrobotrys* sp. CO7 do que JIs de *H. indica* LPP30, sugerindo que os JIs de maior tamanho poderiam escapar com mais facilidade das armadilhas dos fungos predadores, como observado por El-Borai *et al.*, (2009), uma vez que JIs de *S. carpocapsae* NCALL (Comprimento: 558  $\mu\text{m}$  (438-650); diâmetro: 25  $\mu\text{m}$  (20-30)) são maiores que *H. indica* LPP30 (Comprimento 528  $\mu\text{m}$  (479-573); diâmetro = 20  $\mu\text{m}$  (19-22)) .

No entanto, em um segundo momento (48 horas) não ocorreu diferença significativa no número de JIs capturados para ambas as espécies de nematoides, ou seja, os JIs de *H. indica* LPP30 não tiveram aumento significativo de captura, enquanto que, JIs de *S. carpocapsae* NCALL tiveram um aumento no número de nematoides capturados, igualando as médias de captura de ambas as espécies. Isto sugere que o tipo de comportamento dos NEPs em estudo, poderia estar sendo influenciado pela captura dos fungos, uma vez que *H. indica* LPP30 é do tipo “cruiser”. Assim, após as 48 horas eles poderiam ter se dissipado mais pela placa de Petri e conseguido escapar com mais facilidade dos órgãos de captura do fungo,

enquanto que o *S. carpocapsae* NCALL, por ter comportamento do tipo “ambucher”, poderia ter permanecido por mais tempo estático na placa, proporcionando um aumento de nematoides capturados. Durante todo o experimento, foi possível observar intensa movimentação dos JIs de *H. indica* LPP30 (devido ao seu comportamento de busca “cruiser”), por toda a placa de Petri, inclusive nas bordas e na tampa das placas. No entanto, ainda não está elucidado se o tipo de comportamento de busca ou a morfologia (tamanho) dos NEPs poderia influenciar a suscetibilidade destes organismos aos fungos predadores. Tornando-se necessários estudos com diferentes tipos de substratos e condições experimentais que busquem recriar o ambiente natural desses organismos, uma vez que, na natureza fatores como comportamento de busca pelo hospedeiro e respostas dos NEPs aos semioquímicos dos fungos nematófagos poderiam de alguma forma proteger os NEPs no ambiente em um grau maior do que o permitido observar nestes ensaios experimentais.

Além disso, o tempo de avaliação dos ensaios foi curto (apenas dois dias), devido à dificuldade de observação direta dos NEPs capturados na placa de Petri, pois eles se decompõem rapidamente depois de capturados e o micélio dos fungos crescerem rapidamente por toda a placa dificultando a observação. Assim, torna-se adequado novos estudos com estes organismos por tempo mais prolongado. Contudo, seria melhor utilizar a técnica de funil de Baermann, para recuperação dos JIs, assim como fez El borai *et al.*, (2009) e não a observação direta dos NEPs na placa de Petri através de microscópio estereoscópio como foi realizado no presente trabalho, devido à grande dificuldade de observação.

Poucos trabalhos envolvendo a susceptibilidade de NEPs aos fungos nematófagos estão disponíveis, mas os dados do presente trabalho são consistentes com a hipótese de que estes fungos podem afetar negativamente a eficiência dos NEPs como agentes no controle biológico de insetos pragas.

### **5.3. Desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de fungos nematófagos**

Todos os meios de cultura testados se apresentaram aptos ao desenvolvimento micelial dos fungos. A última avaliação ocorreu ao quinto dia após a inoculação dos isolados, quando alguns tratamentos atingiram crescimento

máximo na placa de Petri. Nesta ocasião, ambos os fungos avaliados *A. musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7, apresentaram maior diâmetro micelial nos tratamentos Estrato de solo (ES), Batata-dextrose-ágar (BDA) e ágar-milho (AM) (Controle), que foram superiores aos tratamentos Suco-V8 (V8) e Meio com NEPs (AAN) para o isolado CO7 e superiores ao tratamento Meio com NEPs (AAN) para o isolado AM4, no ensaio 1 (Tabela 4). Enquanto que, no ensaio 2, os tratamentos Estrato de solo (ES), Batata-dextrose-ágar (BDA) e Ágar-milho (AM) (Controle), foram superiores aos tratamentos Ágar-água (AA) para o isolado CO7 e superiores ao tratamento Suco-V8 (V8) e Ágar-água (AA) para o isolado AM4 (Tabela 5).

Tabela 4. Crescimento radial das colônias de *Arthrobotrys musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 em diferentes meios de cultura (Ensaio 1)

Tratamentos	<i>Arthrobotrys</i> sp. CO7	<i>A. musiformes</i> AM4
BDA	9,0 a	9,0 a
AM (Controle)	9,0 a	8,9 a
ES	9,0 a	9,0 a
V8	7,8 b	8,4 ab
AA	8,5 ab	8,0 ab
AAN	7,8 b	7,4 b
C.V.(%)	6,2%	7,2%

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Tabela 5. Crescimento radial das colônias de *Arthrobotrys musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 em diferentes meios de cultura (Ensaio 2)

Tratamentos	<i>Arthrobotrys</i> sp. CO7	<i>A. musiformes</i> AM4
BDA	9,0 a	9,0 a
AM (Controle)	8,7 ab	8,7 a
ES	8,5 abc	8,7 a
V8	7,6 bcd	7,6 b
AA	7,1 d	7,6 b
AAN	7,3 cd	8,0 ab
C.V.(%)	9,7%	7,4%

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

De acordo com Stevens (1981) *apud* Naime (2009), o meio de ágar-milho é o melhor meio para cultivo de fungos, por promover equilíbrio de desenvolvimento entre crescimento micelial e esporulação. Enquanto que, o meio de cultivo Batata-dextrose-ágar BDA permite o crescimento de uma gama de microrganismos, não oferecendo a seletividade e o equilíbrio de desenvolvimento que o meio AM proporciona.

Soares *et al.*, (2008) também observaram crescimento micelial máximo para os fungos *A. musiformis* e *A. oligospora* nos meios de cultivo AM e BDA. Estes resultados sugerem que os fungos nematófagos se desenvolvem melhor em meios de cultivo como os de ES, AM e BDA. Não foi encontrado na literatura estudo envolvendo o desenvolvimento de fungos nematófagos em meio de cultivo ES ou AAN. Neste trabalho, os isolados tiveram crescimento micelial máximo no meio ES, que foi utilizado com objetivo de recriar *in vitro* o ambiente natural desses organismos. Já no meio AAN, era esperado um maior crescimento dos fungos, uma vez que se utilizou nematoides como fonte de nutrientes, entretanto, os isolados tiveram pequeno crescimento, isso talvez pudesse ser explicado pelo modo como foi preparado o meio, uma vez que os NEPs foram autoclavados juntamente com o ágar. Assim, os compostos dos nematoides dos quais os fungos se nutrem poderiam não estar mais disponíveis aos fungos e/ou, com a autoclavagem, os

NEPs poderiam ter resultado em alguma substância de inibição do crescimento dos isolados. O meio V8 é um meio rico em nutrientes e não possibilitou o desenvolvimento pleno dos fungos, enquanto que, o meio AA por ser um meio “mais pobre”, poderia não estar favorecendo o crescimento dos fungos.

Todos os meios de culturas testados se mostraram aptos também para a produção de esporos dos fungos *Arthrobotrys* sp. CO7 e *A. musiformis* AM4. Sendo que, a maior produção de esporos ocorreu para *Arthrobotrys* sp. CO7 tanto no ensaio 1 quanto no ensaio 2 (Tabelas 6 e 7). No ensaio 1, a maior esporulação para *Arthrobotrys* sp. CO7 ocorreu no meio BDA e a menor no meio ES e AA, enquanto que, para *A. musiformis* AM4, a maior esporulação ocorreu no meio V8 e a menor no meio AA. No ensaio 2, *Arthrobotrys* sp. CO7 teve maior esporulação no meio V8 e menor no meio AA, para *A. musiformis* AM4, a maior esporulação ocorreu no meio BDA e menor no meio AA.

Tabela 6. Produção de esporos por *Arthrobotrys musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 em diferentes meios de cultura (Ensaio 1)

Tratamentos	Nº de esporos (x 10 <sup>4</sup> esporos/mL)	
	<i>Arthrobotrys</i> sp. CO7	<i>A. musiformes</i> AM4
V8	14,6 ab	7,2 a
BDA	25,1 a	1,7 ab
AM (Controle)	11,2 ab	1,0 ab
AAN	5,0 ab	1,4 ab
ES	0,4 b	1,7 ab
AA	0,93 b	0,33 b

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pela análise estatística de Kruskal-Wallis em 5% de probabilidade.

Tabela 7. Produção de esporos por *Arthrobotrys musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 em diferentes meios de cultura (Ensaio 2)

Tratamentos	Nº de esporos (x 10 <sup>4</sup> esporos/mL)	
	<i>Arthrobotrys</i> sp. CO7	<i>A. musiformes</i> AM4
V8	60,6 a	5,2 ab
BDA	36,0 ab	9,4 a
AM (Controle)	29,4 ab	1,5 ab
AAN	5,9 ab	1,7 ab
ES	1,7 ab	0,5 ab
AA	0,2 b	0,3 b

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pela análise estatística de Kruskal-Wallis em 5% de probabilidade.

Segundo Soares *et al.*, (2008), o meio AM propiciou máxima esporulação para *A. oligospora*, mas não para *A. musiformis*. Dias e Ferraz (1993) observaram que, para diferentes espécies de *Arthrobotrys*, entre elas *A. musiformis*, os meios BDA e AM propiciaram esporulação adequada dos isolados testados.

Assim como no estudo feito por Maciel *et al.*, (2006), o meio de cultivo AA apresentou menor produção de esporos em relação a outros meios como BDA e AM, para *Arthrobotrys robusta*, *Monacrosporium thaumasium* e *Duddingtonia flagrans*.

Dias e Ferraz (1993) observaram intensa produção de micélio por diversos isolados de *Arthrobotrys* spp. entre eles *A. musiformis*, em milho triturado e arroz utilizados como substratos. Porém, a esporulação foi muito pequena ou não ocorreu, portanto, as exigências para a produção de esporos não são as mesmas para o crescimento vegetativo.

No geral, os melhores meios para o crescimento micelial e a esporulação de *A. musiformis* AM4, no estudo em questão, também foram os melhores para *Arthrobotrys* sp. CO7. Todavia, alguns meios que se destacaram para esporulação de *Arthrobotrys* sp. CO7 não foram eficazes para a esporulação de *A. musiformis*, indicando que o isolado de *A. musiformis* estudado é mais exigente que o de *Arthrobotrys* sp. CO7, corroborando com estudos feitos por Soares *et al.*, (2008).

Os dados obtidos no presente estudo confirmaram que os meios adequados para o crescimento micelial dos fungos não necessariamente favoreceram a esporulação e vice-versa, conforme também foi observado por Dias e Ferraz (1993) e Soares *et al.*, (2008).

Para se desenvolverem, os fungos necessitam de condições ambientais favoráveis, como aeração, luz, umidade e temperatura, contudo, o meio de cultivo é o fator que mais influencia no crescimento do fungo. Com isso, um bom meio de cultivo, permite grande esporulação e pequeno crescimento micelial, sendo que, geralmente, a esporulação é favorecida pela escassez de nutrientes, o que é uma condição contrária ao crescimento vegetativo (Dhingra e Sinclair, 1995; Maciel *et al.*, 2006).

#### **5.4. Suscetibilidade de NEPs a fungos nematófagos *in vitro* em diferentes fontes nutritivas**

Os JIs de ambas as espécies de NEPs, *H. indica* LPP30 e *S. carpocapsae* NCALL, foram menos recuperados no meio ágar-água (AA) (controle) para ambos os fungos *A. musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp CO7 no ensaio 1 e no ensaio 2 (Tabelas 8 e 9).

O meio de cultivo AA, foi utilizado como tratamento controle, uma vez que os fungos nematófagos não necessitam de meios complexos para seu desenvolvimento (Araújo *et al.*, 2004). Normalmente os ensaios experimentais são realizados em meio AA adicionando-se nematoides de vida livre como o *Panagrellus* spp. (Araújo *et al.*, 1993, 1994).

Maciel *et al.*, (2006) constataram a viabilidade dos fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* na predação de larvas infectantes de *Ancylostoma* spp., não havendo perda de eficácia na captura independente do meio de cultivo (AA, AM, BDA) do qual se originaram os esporos.

Tabela 8. Juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP30 e *Steinernema carpocapsae* NCALL recuperados de diferentes meios de cultivo colonizados por *Arthrobotrys musiformes* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 (Ensaio 1)

Meios	LPP30		NCALL	
	CO7	AM4	CO7	AM4
AA (Controle)	137.5 b	125.0 a	375.0 b	137.5 b
AM	312.5 ab	475.0 a	775.0 ab	487.5 ab
BDA	425.0 ab	212.5 a	600.0 ab	425.0 ab
V8	312.5 ab	275.0 a	887.5 a	687.5 a
ES	475.0 a	187.5 a	787.5 ab	737.5 a
AAN	387.5 ab	125.0 a	725.0 ab	312.5 ab

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pela análise estatística de Kruskal-Wallis em 5% de probabilidade.

Tabela 9. Juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP30 e *Steinernema carpocapsae* NCALL recuperados de diferentes meios de cultivo colonizados por *Arthrobotrys musiformis* AM4 e *Arthrobotrys* sp. CO7 (Ensaio 2)

Meios	LPP30		NCALL	
	CO7	AM4	CO7	AM4
AA (Controle)	25.0 b	25.0 b	450.0 a	287.5 b
AM	262.5 ab	500.0 a	725.0 a	712.5 ab
BDA	412.5 a	175.0 ab	862.5 a	362.5 ab
V8	287.5 ab	162.5ab	850.0 a	600.0 ab
ES	62.5 ab	162.5 ab	625.0 a	837.5 a
AAN	62.5 ab	62.5 b	662.5 a	462.5 ab

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pela análise estatística de Kruskal-Wallis em 5% de probabilidade.

Os resultados do presente trabalho, indicam não haver relação direta do crescimento micelial e a esporulação com a agressividade dos fungos aos nematoides, uma vez que no meio AA ambos os fungos tiveram as menores taxas

de crescimento micelial e esporulação, entretanto, foi o meio que mais possibilitou a ação predatória do fungo e conseqüentemente maior suscetibilidade dos NEPs. Isto sugere que, em meios mais pobres em nutrientes esses fungos tendem a ser mais agressivos em função de dependerem mais dos nematoides como fonte de nutrientes, embora estes fungos possam viver como saprófitas, tendo capacidade de mudar a sua morfologia e de aumentar a sua habilidade parasitária de acordo com suas necessidades fisiológicas (Nordbring - Hertz *et al.*, 2006).

### **5.5. Dispersão de NEPs em substrato areia e solo argiloso**

Tanto em areia quanto em solo argiloso, o fungo *Arthrobotrys* sp CO7 não apresentou efeito ( $p < 5$ ) na dispersão dos JIs de *H. indica* LPP30. Mas, este mesmo fungo, apresentou efeito ( $p < 5$ ) na dispersão de *S. carpocapsae* NCALL na areia a distância de 15cm, onde as médias ficaram abaixo do tratamento controle, indicando haver uma possível ação repelente do fungo para essa espécie de nematoide entomopatogênico no ensaio 1 e no ensaio 2 (Tabelas 10 e 11).

Esses resultados demonstram que existe especificidade nas respostas de NEPs a fungos nematófagos, assim como foi observado por El-Borai *et al.* (2011), onde todos os NEPs (*Steinernema diaprepesi*, *Steinernema glaseri*, *Steinernema riobrave*, *Heterorhabditis zealandica* e *Heterorhabditis indica*) foram repelidos por *Arthrobotrys gephyropaga*, mas foram atraídos para os fungos endoparasitas *Myzocyttium* sp. e *Catenaria* sp. Exceto o *H. Indica*, que permaneceu neutro para *Myzocyttium* sp., e *S. glaseri*. neutro para *Catenaria* sp. em colunas de areia. Entretanto, em placas de Petri com meio ágar-água todas as espécies de NEPs foram atraídas pelos fungos nematófagos, exceto *S. riobrave*.

Tabela 10. Dispersão de *Heterorhabditis indica* LPP30 e *Steinernema carpocapsae* NCALL em areia e solo argiloso a distância de 15 e 30 cm na presença do fungo *Arthrobotrys* sp. CO7 (Ensaio 1)

Tratamentos	Areia		Solo argiloso	
	15cm	30cm	15cm	30cm
LPP30 + CO7	97.1 ab	25.3 a	45.1 b	35.4 ab
LPP30 (Controle I)	141.5 a	22.0 a	28.7 b	15.2 b
NCALL + CO7	43.9 b	20.3 a	241.3 a	16.9 ab
NCALL (Controle II)	153.6a	16.9 a	212.0 a	40.3 a

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pela análise estatística de Kruskal-Wallis em 5% de probabilidade.

Tabela 11. Dispersão de *Heterorhabditis indica* LPP30 e *Steinernema carpocapsae* NCALL em areia e solo argiloso a distância de 15 e 30 cm na presença do fungo *Arthrobotrys* sp. CO7 (Ensaio 2)

Tratamentos	Areia		Solo argiloso	
	15cm	30cm	15cm	30cm
LPP30 + CO7	105.4 ab	27.0 a	71.9 ab	28.6 a
LPP30 (Controle I)	156.6 a	15.2 a	37.0 b	28.7 a
NCALL + CO7	52,1 b	13.6 a	238.6 a	13.5 a
NCALL (Controle II)	176,8 a	23.7 a	166.6 a	37.0 a

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si, pela análise estatística de Kruskal-Wallis em 5% de probabilidade.

Os resultados deste estudo demonstram que os JIs de NEPs podem ser repelidos ou mostrar respostas neutras para *Arthrobotrys* sp. CO7 em testes de escolha com diferentes substratos e distâncias. Assim como observado por El Borai *et al.*, (2011), os resultados indicam haver uma especificidade e um movimento de agregação de grupo nas respostas dos NEPs ao fungo, sendo de suma importância

utilizar diferentes substratos para avaliar adequadamente o papel dos semioquímicos nas interações entre nematoides e fungos.

Robinson e Jaffee (1996) demonstraram que o nematoide fitoparasita *Meloidogyne incognita* foi repelido pelo fungo *A. gephyropaga* em ensaios com areia, enquanto que Jansson e Nordbring-Hertz (1979) relataram anteriormente que este fungo atraiu *M. incognita* em placas de Petri com meio ágar-água. Estes resultados demonstram que o substrato utilizado pode ser um fator importante, sendo fundamental utilizar substratos que se assemelham aos que existem nos ambientes naturais desses organismos durante os ensaios experimentais.

A repelência de *S. carpocapsae* ao isolado *Arthrobotrys* sp. CO7 sugere que estes NEPs apresentam capacidade de evitar este fungo altamente agressivo, pelo menos sob determinadas circunstâncias. Ainda não ficou claro se as respostas de atratividade dos NEPs aos fungos têm relação direta com a sua susceptibilidade, tornando-se necessários estudos mais detalhados.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são importantes no controle biológico de insetos pragas. Contudo, a sobrevivência e a permanência dos NEPs no solo, podem ser afetadas negativamente por fungos nematófagos (FNs). Assim, objetivou-se estudar interações entre os FNs *Arthrobotrys oligospora* AM2, *Arthrobotrys musiformis* AM4, *Arthrobotrys* sp. CO7, *Arthrobotrys* sp. CC7 e os NEPs *Heterorhabditis indica* LPP30 e *Steinernema carpocapsae* NCALL e o desenvolvimento dos FNs em diferentes fontes nutritivas.

Para isto, avaliou-se a agressividade destes fungos contra o LPP30, a susceptibilidade de NCALL e LPP30 aos fungos considerados mais agressivos (AM4 e CO7), o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo dos fungos AM4 e CO7 em diferentes fontes nutritivas, a susceptibilidade de NCALL e LPP30 aos fungos AM4 e CO7 em diferentes fontes nutritivas e a dispersão dos NEPs NCALL e LPP30 em solo argiloso e areia.

Todos os quatro fungos testados *A. musiformis* AM4, *A. oligospora* AM2, *Arthrobotrys* sp. CO7 e *Arthrobotrys* sp. CC7, foram capazes de predação de JIs de *H. indica* LPP30. Sendo que, os valores médios de JIs apreendidos por AM4 e CO7 foram significativamente superiores em relação aos outros tratamentos CC7, AM2 e o controle (sem fungo). Isto sugere que, AM4 e CO7 são isolados fúngicos mais agressivos do que AM2 e CC7, pelo menos aos JIs de *H. indica* LPP30.

Os JIs de *S. carpocapsae* NCALL foram menos susceptíveis à ambos os isolados AM4 e CO7 nas primeiras 24 horas. Já os JIs de *H. indica* LPP30 não

sofreram efeito ( $P < 5$ ) do tempo em ambos os ensaios 1 e 2. Pôde-se observar ainda, que no ensaio 1, os JIs de NCALL foram menos susceptíveis ao CO7 do que JIs de LPP30 nas primeiras 24 horas. Já no ensaio 2, observou-se que os JIs de NCALL foram menos susceptíveis a ambos os isolados AM4 e CO7 do que JIs de LPP30 nas primeiras 24 horas. Contudo, depois de 48 horas as médias de JIs capturados pelos fungos se igualaram estatisticamente em ambos os ensaios.

Todos os meios de cultura testados se apresentaram aptos ao desenvolvimento micelial e à produção de esporos pelos fungos. Ambos os fungos avaliados AM4 e CO7, apresentaram maior diâmetro micelial nos tratamentos Estrato de solo (ES), Batata-dextrose-ágar (BDA) e ágar-milho (AM) (Controle), que foram superiores aos tratamentos Suco-V8 (V8), ágar-água (AA) e Meio com NEPs (AAN). A maior esporulação ocorreu para o isolado CO7. Sendo que, no ensaio 1, a maior esporulação para CO7 ocorreu no meio BDA e a menor no meio ES e AA, enquanto que, para AM4, a maior esporulação ocorreu no meio V8 e a menor no meio AA. Já no ensaio 2, CO7 teve maior esporulação no meio V8 e menor no meio AA, para AM4, a maior esporulação ocorreu no meio BDA e menor no meio AA.

Os JIs de ambas as espécies de NEPs, *H. indica* LPP30 e *S. carpocapsae* NCALL, foram menos recuperados no meio ágar-água (AA) (controle) para ambos os isolados fúngicos AM4 e CO7.

Tanto em areia quanto em solo argiloso, o fungo CO7 não apresentou efeito ( $p < 5$ ) na dispersão dos JIs de *H. indica* LPP30. Entretanto, este mesmo fungo, apresentou efeito ( $p < 5$ ) na dispersão de *S. carpocapsae* NCALL na areia a distância de 15cm, onde as médias ficaram abaixo do tratamento controle, indicando haver uma possível ação repelente do fungo para essa espécie de nematoide entomopatogênico.

Contudo, pode-se concluir que, ainda não ficou totalmente esclarecido se a morfologia dos NEPs, o comportamento de busca ou as respostas de atratividade, poderiam estar influenciando na suscetibilidade destes organismos aos fungos predadores, tornando-se necessário estudos mais detalhados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams B.J., Fodor, A., Koppenhöfer, H.S., Stackebrandt, E., Stock, S.P., Klein, M.G. (2006) Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control*, 37:32-49.
- Adams, B. J., Nguyen, K.B. (2002) Taxonomy and systematics. *In*: Gaugler, R. (Ed.) *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, p 1-33.
- Andaló V., Moreira G. F., Maximiniano C., Moino Jr. A., Campos V. P. (2008) Suscetibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) a Fungos Predadores de Nematóides. *Nematologia Brasileira*, 32(3):177-184.
- Araújo, D. D. de. (2009) Manejo de *Meloidogyne incognita* raça 1 em *Passiflora morifolia*, Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Santa Cruz, 66 p.
- Araújo, J.V., Mota, M.A., Campos, A.K. (2004) Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13 (1):165-170.

- Araújo, J.V., Santos, M.A., Ferraz, S., Maia, A.S. (1994) Biological control “*in vitro*” of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 46 (3): 197-204.
- Araújo, J.V., Santos, M.A., Ferraz, S., Maia, A.S. (1993) Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. *Journal of Helminthology*, 67 (3): 136-138.
- Boemare N. (2002) Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler R. (Ed.) *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, p 35-56. Disponível em <http://books.google.com.br/books?id=h0F-h4vP9coC&lr=&hl=pt-BR>  
Acesso: 12 de novembro de 2012.
- Caamano E. X., Cloyd R.A., Solter L.F., Fallon D. J. (2008) Quality Assessment of Two Commercially Available Species of Entomopathogenic Nematodes: *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis indica* *Hort Technology*, 18(1): 84-89.
- Dias W. P., Ferraz S. (1993) Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* spp. em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura. *Nematologia Brasileira*, 17 (2): 168-181.
- Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. (1995) *Basic Plant Pathology Methods*, CRC Press, Flórida, 434 p.
- Dolinski, C., Moino Jr. A. (2006) Utilização de nematoides entomopatogênicos nativos ou exóticos: O perigo das Introduções. *Nematologia Brasileira*, 30 (2): 139-149.
- Dolinski, C. (2006) Nematoides como agentes do controle biológico de insetos. In: Oliveira Filhos, E. C., Monnerat, R.G. (Ed.) *Fundamentos para regulação*

de semioquímicos inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. *Embrapa*, 4: 73-101.

El-Borai, F.E., Campos-Herrera, R., Stuart, R.J., Duncan, L.W. (2011) Substrate modulation, group effects and the behavioral responses of entomopathogenic nematodes to nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 347–356.

El-Borai, F.E., Bright, D.B., Graham, J.H., Stuart, R.J., Cubero, J., Duncan L.W. (2009) Differential susceptibility of entomopathogenic nematodes to nematophagous fungi from Florida citrus orchards. *Nematology*, 11: 231-241.

Ferraz, S., Freitas, L.G., Lopes E. A., Dias-Arieira, C.R., (2010) Manejo sustentável de fitonematoides. Editora: UFV, Viçosa, MG, 306 p.

Giroto, M. J., Aquino, L. F. B., Perez, R. B., Neves, M. F., Sacco, S. R. (2008) O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: Revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*.10: 1-7.

Grewal P. S., De Nardo E. A. B., Aguilera M. M. (2001) Forum: Entomopathogenic Nematodes: Potential For Exploration and Use in South America. *Neotropical Entomology*, 30(2): 191-205.

Grewal, P. S., Lewis, E. E.; Campbell, J. F., Gaugler, R. (1994) Host finding behavior as a predictor of foraging strategy for entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, 108:207–215.

Jansson H. B. (1982) Predacity by Nematophagous Fungi and Its Relation to the Attraction of Nematodes, *Microbial Ecology*, 8:233-240.

- Jansson H. B., Nordbring-Hertz B. (1979) Attraction of Nematodes to Living Mycelium of Nematophagous Fungi. *Journal of General Microbiology*, 112: 89-93.
- Hominick, W.M., A.P. Reid, D.A. Bohan & B.R. Briscoe. 1996. Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 317-331.
- Jenkins W R. (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reports*, 48:692.
- Kaya, H.K. (2002) Natural enemies and other antagonists. *In*: Gaugler R (Ed.) *Entomopathogenic nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 189–203 p. Disponível em <http://books.google.com.br/books?id=h0F-h4vP9coC&lr=&hl=pt-BR> Acesso em: 15 de abril de 2013.
- Kaya H. K.; Gaugler R. (1993) Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38:181-206.
- Koppenhofer, A.M., Jaffee, B.A., Muldoon, A.E., Strong, D.R., Kaya, H.K. (1996) Effect of Nematode-Trapping Fungi on an Entomopathogenic Nematode Originating from the Same Field Site in California. *Journal of Invertebrate Pathology*, 68, 246–252.
- Maciel A. S., Araujo J. V., Campos A. K. (2006) Viabilidade sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* após esporulação em diferentes meios de cultura, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 15(1): 182-187.
- Martinelli, P. R. P. (2008) Estudos do controle biológico dos nematóides dos citros no Estado de São Paulo, Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual

Paulista “Júlio de Mesquita” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 131 p.

Minas, R.S. (2012). Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visnado o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*) em dois sistemas de cultivo. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 138 p.

Mota M.A., Campos A.K., Araújo J.V. (2003) Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 23: 93-100.

Naime, M. F., (2009) Isolamento de fungos com atividade nematofágica em solo paranaense, Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 66 p.

Nordbring-Hertz, B., Jansson, H., Tunlid, A. (2006) Nematophagous Fungi. In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0004293].

Picanço M. C. (2010) Manejo Integrado de Pragas. Disponível em: [http://www.ica.ufmg.br/insetario/images/apostilas/apostila\\_entomologia\\_2010.pdf](http://www.ica.ufmg.br/insetario/images/apostilas/apostila_entomologia_2010.pdf) . Acesso em: 04 de março de 2013.

Poinar G. O. Jr; Grewal P.S. (2012) History of Entomopathogenic Nematology. *Journal of Nematology*, 44(2):153–161.

Poinar G. O. Jr., Karunakar G. K., David H. (1992) *Heterorhabditis indicus* n. sp.(Rhabditida: Nematoda) from India: separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. *Fundamental and Applied Nematology* 15(5) 467-472.

- Poinar, G. O., Jr. (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. 23-62 p.
- Poinar, G. O. Jr., Jansson, H. B. (1986a) Susceptibility of *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis heliothidis* to the endoparasitic fungus *Drechmeria coniospora*, *Journal of Nematology* 18:225–230.
- Poinar, G. O., Jr., Jansson, H. B. (1986b) Infection of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* (Rhabditida: Nematoda) with the predatory fungi, *Monacrosporium elliposporum* and *Arthrobotrys oligospora* (Moniliales: Deuteromycetes), *Revue du Nematologie* 9:241–244.
- Rasmann S., Köllner T.G., Degenhardt J., Hiltbold I., Toepfe S., Kuhlmann U., Gershenson J., Turlings T.C.J. (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* (434): 732– 737.
- Robinson, A.F., Jaffee, B.A. (1996). Repulsion of *Meloidogyne incognita* by alginate pellets containing hyphae of *Monacrosporium cionopagum*, *M. elliposporum*, or *Hirsutella rhossiliensis*. *Journal of Nematology* , 28: 133–147.
- Santos M. A. dos., Ferraz S., Muchovej J. J. (1991) Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. *Nematlogia Brasileira* 15: 121 – 134.
- Soares P. L. M., Nozaki M. H., Barbosa B. F. F., Santos J. M., Barbosa J. C. (2008) Crescimento e esporulação de duas espécies de *Arthrobotrys* Corda em diferentes meios de cultura e dois ambientes. *Bioscience Journal*, 25 (2): 63-74.
- Shapiro-Ilan, D. I., Byron, G. A., Gaugler, R. (2013) Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae & Heterorhabditidae). Disponível em:

<http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/nematodes.html>.

Acesso em: 07 de março de 2013.

Timper P., Kaya H.K. (1992) Impact of a Nematode-parasitic Fungus on the Effectiveness of Entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 24: 1-8.

Timper P., Kaya H.K. (1989) Role of the second-stage cuticle of entomogenous nematodes in preventing infection by nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54: 314 - 321.

Van Tol R. W. M., Van Der Sommen A.T.C., Boff M. I. C., Van Bezooijen J., Sabelis M, W., Smits P. H. (2001) Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. *Ecology Letters*, 4: 292-294.

Voss, M., Andaló, V., Negrisoni Júnior, A. S., Barbosa- Negrisoni, C. R. (2009) Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos. Embrapa Trigo - *Documentos Online*, 119, 44 p.

White, C.F. (1927) A method for obtaining larvae from culture. *Science*, 66: 302-303.

Woodring L., Kaya HK. (1988) Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas. Series Bulletin, 331, 30 p.

**APÊNDICE**

Composição da dieta artificial utilizada na criação de lagartas de *G. Mellonella*

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Farelo de trigo	400 g
Leite em pó desnatado	200 g
Levedo de cerveja	120 g
Gérmen de trigo	200 g
Mel	153 ml
Glicerina	82 ml