

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UMA LINHAGEM DE  
NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO VISANDO O CONTROLE DO  
GORGULHO DA GOIABA (*Conotrachelus psidii*) EM DOIS  
SISTEMAS DE CULTIVO

RAMON SANTOS DE MINAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
JANEIRO - 2012



CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE UMA LINHAGEM DE  
NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO VISANDO O CONTROLE DO  
GORGULHO DA GOIABA (*Conotrachelus psidii*) EM DOIS  
SISTEMAS DE CULTIVO

RAMON SANTOS DE MINAS

“Tese 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 Doutor em Produção Vegetal.”

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

Janeiro – 2012

*“Dedico esta tese à minha amada esposa Rosemeri, por todo o carinho, apoio, respeito e dedicação. Às minhas filhas Lívia e Thaila, que foram testemunhas de meus sacrifícios e penalizadas com minhas constantes ausências. Aos meus pais e irmãs e a todos aqueles que um dia acreditaram em mim e me deram forças para superar os desafios para o desenvolvimento deste trabalho.”*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois com Ele o meu caminho foi mais tranquilo e os obstáculos ficaram mais fáceis;

A universidade dos Açores, ao professor Nelson Simões e aos amigos Ricardo Gamboa, Rose, Vera, Mafalda, Gisela, Bala e Alexandra;

Aos meus pais, pois mesmo estando distantes em suas orações sempre se lembraram de mim e por sempre ter acreditado me dando força quando a desistência era evidente;

À minha esposa Rose que com amor me ajudou a superar os momentos difíceis, e com sabedoria, me fez trilhar os caminhos da vitória;

Às minhas irmãs Letícia, Elaine e Gislane por sempre acreditarem em mim;

À minha amiga, irmã e madrinha Inês que com incentivo em todos os momentos difíceis me fez sempre acreditar que iria valer à pena;

À minha querida amiga Lilica por sua grande amizade e apoio;

Ao amigo de fé e irmão camarada de todas as horas Cezar Vasconcelos;

Ao amigo Roberto pela amizade e boa vizinhança de república;

Ao engenheiro agrônomo e amigo Jâneo Eustáquio da ULBRA (Universidade Luterana do Brasil) por sua enorme boa vontade nos trabalhos de estatística;

Aos amigos André, Luciano Bellini, Omar, Rogério Burla, Fernandinho e Rafael (Zero dois) pela amizade de República;

A UENF, pela oportunidade de realização do curso;

A CAPES por financiar a bolsa que é tão importante para a vida do aluno;

Aos meus professores, Cláudia e Ricardo, pela oportunidade, amizade, confiança e motivação; e acima de tudo pelo profissionalismo com que conduzem os seus orientados;

Aos professores das disciplinas cursadas por contribuírem para o meu futuro profissional;

Aos amigos do curso de Pós-Graduação aqui conquistados;

A todos os funcionários, técnicos e estagiários do LEF, pela amizade;

Aos amigos Juan Carlos, Juan Pablo, Eleodoro, Guilherme Vicente, Max, Kelly, Paulo Victor Denise, Renata, Anália, Thiago, pela grande amizade;

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução desse trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b> -----	ix
	<b>ABSTRACT</b> -----	x
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> -----	1
1.1	Justificativa -----	3
1.2	Objetivos específicos-----	3
2.	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> -----	4
2.1	O cultivo orgânico-----	5
2.2	Certificação da fruticultura orgânica-----	6
2.3	O gorgulho da goiaba-----	6
2.4	Nematoides Entomopatogênicos-----	8
	Biologia e comportamento-----	8
	Identificação morfológica-----	11
	Identificação molecular-----	12
	Produção de Nematoides Entomopatogênicos-----	13
	Produção <i>in vivo</i> -----	14
	Produção <i>in vitro</i> -----	15
	Formulação dos Neps-----	16
	Metodologias de aplicação de NEPs-----	17
3.	<b>TRABALHOS</b> -----	19

**PROGÊNIE, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA DO NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO DA LINHAGEM LPP30 ISOLADA EM CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ** 19

<b>RESUMO</b> -----	19
<b>ABSTRACT</b> -----	20
<b>INTRODUÇÃO</b> -----	21
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	23
Obtenção da linhagem-----	23
Análise morfológica-----	24
Caracterização molecular da linhagem LPP30-----	25
Reconstrução da árvore Filogenética-----	26
Caracterização molecular da bactéria simbiote-----	26
Amplificação e sequenciamento do 16S rDNA-----	27
Reconstrução das árvores filogenéticas da bactéria simbiote.-----	28
Potencial reprodutivo da linhagem LPP30-----	28
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> -----	30
Progênie -----	37
Conclusões-----	39
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	40

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DOSES, TEMPERATURAS E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DE *Heterorhabditis indica* LPP30 NA MORTALIDADE DE LARVAS DO GORGULHO DA GOIABA** 46

<b>RESUMO</b> -----	46
<b>ABSTRACT</b> -----	47
<b>INTRODUÇÃO</b> -----	48
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	50
Teste com diferentes doses de JIs-----	51
Teste com temperatura-----	51
Teste com tempo de exposição-----	52
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> -----	54
<b>CONCLUSÕES</b> -----	61

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	62
<b>MOBILIDADE, PERSISTÊNCIA E MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE</b> 67 <i>Heterorhabditis Indica</i> LPP30 EM DOIS SISTEMAS DE CULTIVO.	
<b>RESUMO</b> .-----	67
<b>ABSTRACT</b> -----	68
<b>INTRODUÇÃO</b> -----	70
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	72
Teste deslocamento longitudinal-----	72
Teste deslocamento vertical. -----	73
Teste com formulações de juvenis. -----	74
Teste de persistência na presença de hospedeiro. -----	76
Teste de persistência na ausência de hospedeiro. -----	77
Análise estatística-----	77
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> . -----	76
Teste deslocamento longitudinal-----	78
Teste deslocamento vertical-----	79
Teste com formulações de juvenis-----	83
Teste persistência na presença de hospedeiro-----	86
Teste de persistência na ausência de hospedeiro-----	88
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> . -----	90
<b>4. RESUMO</b> -----	97
<b>5. CONCLUSÕES</b> -----	99
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	101
<b>7. ANEXOS</b> -----	122

## RESUMO

**MINAS, RAMON SANTOS; DS; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Janeiro, 2012. Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visando o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*) em dois sistemas de cultivo. Orientadora: Professora PhD. Cláudia de Melo Dolinski.**

Conhecer biologicamente um organismo com potencial para o controle biológico de pragas permite utilizá-lo com maior eficiência. Utilizando fragmentos do gene 18s do nematoide entomopatogênico LPP30 e 16s de sua bactéria entomopatogênica, contrastados com fragmento de espécies já identificadas no Gene Bank indicando que o nematoide isolado LPP30 está agrupado ao gênero *Heterorhabditis* e sua bactéria foi identificada como *Photorhabdus luminescens akhurstii*. Medidas morfológicas foram realizadas e os valores comparados com linhagens de *Heterorhabditis indica* já identificadas, demonstrando proximidades e discrepâncias de medidas morfométricas dentro dos limites aceitáveis. Foram feitas multiplicações e contagem dos juvenis infectantes produzidos por lagartas individuais de *Galleria mellonella*, os resultados mostraram picos de produção de 690.320 mil JIs no segundo dia de coleta e 653 JIs no 5º dia. Concentrações de juvenis infectantes (JIs) foram testadas contra larvas de *C. psidii* 10, 100, 200, 350, 650, 850 e 1000 e uma testemunha. Foi observada mortalidade mínima e máxima variando entre 9% e 100%, nas concentrações de 0 e 1000 JIs,

respectivamente. Quando foi testado o efeito das temperaturas 16°C, 20°C, 24°C, 28°C e 32°C, tal fator mostrou ser importante, pois em 28°C e 32°C foram obtidos os maiores índices de mortalidade (83% e 100%) e na menor temperatura 16°C apenas (10%). Ao se estudar tempo de exposição das larvas de *C. psidii* aos JIs de LPP30 1, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, esse fator influenciou no percentual de mortalidade com pico ocorrendo às 72 horas de contato e mortalidade variando entre 98% e 100%. Quando o objetivo foi avaliar a mobilidade vertical e horizontal do nematoide no campo, foram encontrados índices de mortalidade próximos a 90% nos primeiros 10 cm no sentido longitudinal com progressiva queda até próximo 60 cm com mortalidades variando entre 40% e 50% nos sistemas em conversão para orgânico e convencional de cultivo na distância 60 cm. Quando o objetivo foi avaliar o espaço percorrido no sentido vertical as maiores mortalidades ocorreram nos primeiros 5 cm chegando a 100% nos dois sistemas de cultivo com progressiva queda até a profundidade de 20cm. Quando foi avaliado o melhor método de aplicação dos juvenis no campo, a aplicação feita com meio líquido se destacou nos dois sistemas de cultivo com mortalidade variando entre 79% e 85%, seguido pelo método da esponja embebida com 69% e 75%. Ao se avaliar a persistência dos juvenis infectantes no campo na presença de hospedeiro, foi observado que no intervalo de um ano a reciclagem dos nematoides proporcionou mortalidade mínima e máxima entre 80% e 85% no sistema convencional, e mortalidades entre 86% e 89% no sistema em conversão para orgânico. Por outro lado quando o objetivo foi avaliar a persistência na ausência de hospedeiros, foram encontradas mortalidades entre 67% e 79% aos 60 dias de observação e 10% e 12% aos 360 dias de observação no sistema convencional, e no sistema em conversão para orgânico. Assim, conclui-se que o estudo morfológico e molecular proporcionou a identificação da linhagem LPP30 e sua bactéria simbiote, e o estudo dos fatores relacionados à biologia do entomopatógeno, é extremamente importante para se estabelecer metodologia adequada de sua utilização, sendo necessários mais estudos para que os critérios de uso destes agentes sejam mais eficientes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Controle, nematoides entomopatogênicos, Gorgulho da goiaba.

## ABSTRACT

**MINAS, RAMON SANTOS; DS; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. January, 2012. Biological characterization of a lineage of entomopathogenic nematode aiming at the control of gorgulho of guava (*Conotrachelus psidii*) in two systems of PRODUCTION. adviser : PhD teacher. Claudia de Melo Dolinski.**

The knowledge biologically an organism with potential for the biological control of plagues allows to use it with bigger efficiency. Using fragment's of the gene 18s of entomopathogenic nematodes LPP30 and 16s of its entomopathogenic bacterium, contrasted with the fragment species present already in the Bank Gene indicating that the isolated nematode LPP30 is grouped to the *Heterorhabditis* sort and its bacterium was identified as *Photorhabdus luminescens akhurstii*. Morphological measurements were performed and values compared with strains *Heterorhabditis* indicates already identified, showing discrepancies of morphometrics measurements within acceptable limits. Multiplication and counting were made of infective juveniles produced by larvae of *Galleria mellonella*, the results showed a peak of 690.32 million IJs in the second day of harvest and 653 IJs the 5 day. Concentrations of infective juveniles (IJs) were tested against larvae of *C. psidii* 10, 100, 200, 350, 650, 850 and 1000 and a

control. With the mortality observed ranging between 9% and 100% at concentrations of IJs 10 and 1000, respectively. When was tested the effect of temperature 16 ° C, 20 ° C, 24 ° C, 28 ° C and 32 ° C, this factor was important because at 28 ° C and 32 ° C showed the highest mortality rates (83% and 100%) the lowest temperature 16 ° C only (10 %). When studying the exposure time of the larvae of *C. psidii* LPP30 of IJs to 1, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours, this factor influenced the percentage of mortality with a peak occurring at 72 hours of contact and mortality rates ranging between 98% and 100%. When the objective was to evaluate the vertical and horizontal mobility of the nematodes in the field, found mortality rates near 90% in the first 10 cm in the longitudinal direction with gradual decline to near 60 cm with mortality rates ranging between 40% and 50% in systems to organic and conventional culture in 60 cm distance. When the objective was evaluate the space traversed in the vertical direction the highest mortality occurred within the first 5 cm reaching 100% in two cropping systems with a progressive decline to a depth of 20cm. When was rated the best method of application of juveniles in the field, the application made with liquid stood out in both cropping systems with mortality rates ranging between 79% and 85%, followed by the method of sponge soaked with 69% and 75%. When evaluating the persistence of infective juveniles in the field in the presence of host, it was observed the recycling of nematodes provided between 80% and 85% in the conventional system, and mortalities between 86% and 89% in organic system. On the other hand when the objective was to evaluate the persistence in the absence of hosts the mortalities were found between 67% and 79% at 60 days of observation and 10% and 12% after 360 days of observation in the conventional system, and system organic. Thus, we conclude that the morphological and molecular identification of the lineage LPP30 and its symbiotic bacteria, and the study of factors related to the biology of the pathogen, it is extremely important to establish appropriate methodology for their use. More research is needed to establish criteria for the manipulation of these agents more way effective.

**KEYWORDS:** Control, entomopathogenic nematodes, guava weevil.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura da goiabeira (*Psidium guajava* L.) vem se destacando no contexto da fruticultura mundial, e no Brasil encontra-se em crescente expansão (IBGE, 2009). A goiaba é consumida em várias partes do mundo, com destaque para os grandes pólos culinários da Europa como França, Reino Unido e Países Baixos, que são os grandes importadores da goiaba brasileira. Juntos, consomem quase 166 mil quilos da fruta, gerando uma renda de aproximadamente 310 mil dólares, segundo dados de FREITAS (2010).

O Brasil é o maior produtor de goiabas vermelhas do mundo. Em 2008, a goiaba ocupou o 24<sup>o</sup> lugar no *ranking* em valor comercializado, atingindo o patamar de US\$418 mil dólares. Os grandes pólos de produção concentram-se, principalmente, nas regiões Sudeste e Nordeste, sendo os Estados de São Paulo e Pernambuco os maiores produtores com produção estimada em 310 mil toneladas em 19.8 t/ha (IBGE, 2008).

De encontro ao cultivo convencional de frutas, está o cultivo orgânico, que se encontra incipiente, o que resulta em uma oferta irregular de produtos nas prateleiras dos supermercados e nas feiras. Em nível mundial está ocorrendo um grande incremento e interesse pela agricultura orgânica e seus produtos, cujos sistemas de produção levam em consideração a sustentabilidade ambiental. A

agricultura orgânica, tem mercado em franca expansão, crescendo ao ano a taxas entre 5% a 50% dependendo do produto e dos países produtores e consumidores BELTRÃO (2011)

Na pré-colheita e colheita injúrias mecânicas e as causadas por pragas e doenças na pré-colheita, que são os grandes responsáveis pela redução da qualidade dos frutos para a comercialização (CHITARRA & CHITARRA, 2005). Dentre as várias pragas que atacam a goiabeira o gorgulho da goiaba, *Conotrachelus psidii* Marshall tem especial importância pelos danos causados em lavouras de goiaba. A medida de controle convencional do gorgulho é o controle químico com aplicação de inseticidas como fention a 0,10%, Enxofre iniciadas no estágio de frutos ainda verdes, com média de três cm de diâmetro (SOUZA *et al.*, 2003).

A utilização indiscriminada de agrotóxicos no controle de pragas ocasiona um desequilíbrio na cadeia alimentar devido à eliminação de inimigos naturais e ainda problemas de segurança alimentar e quarentenária. Estes problemas têm levado a busca alternativa ecologicamente apropriada como a utilização de agentes biológicos visando ao controle de pragas.

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* Travassos, 1927 e *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (Rhabditida: Steinematidae, Heterorhabditidae) têm sido utilizados como agentes do controle biológico em sistemas agrícolas para controle de insetos-praga. Entre as principais vantagens apresentadas por estes organismos estão a sua resistência aos produtos fitossanitários, a possibilidade de ser aplicado com outros agentes entomopatogênicos, apresentar boa capacidade de adaptação a novos ambientes, a busca por seu hospedeiro e nele se reproduzir. Além destas vantagens, até o momento têm sido inócuos às plantas e a outros animais, inclusive ao homem (BATISTA, 2011).

Muitas espécies têm sido isoladas e descritas em diferentes lugares do mundo relacionados com dados relacionados à biologia, comportamento e identificação. Dessa forma a presente tese teve como objetivos identificar morfológicamente e molecularmente uma linhagem de nematoide entomopatogênico, bem como avaliar o seu potencial como agente de controle biológico do gorgulho da goiaba em um sistema convencional e em conversão para orgânico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O centro de origem da goiabeira encontra-se na América Latina entre México e Peru e estende-se até o Brasil. Essa espécie é cultivada em regiões tropicais e subtropicais, sendo também cultivada no Norte e Sul da África, no Sudeste Asiático, Nova Zelândia e Austrália. (AGRIANUAL, 2008). Dentre as frutas tropicais brasileiras, a goiaba ocupa lugar de destaque, colocando o Brasil na posição de maior produtor de goiabas vermelhas. Quanto à exportação em 2008 ocupou o 24º lugar no ranking em valor, atingindo o patamar de US\$ 418 mil (MDIC/SECEX, 2009).

A produção de goiaba em escala industrial no Brasil iniciou-se na década de 70 (AMARO, 1979). E foi direcionada para o mercado interno e externo na forma de fruta *in natura*, industrializada e desidratada (CHOUDHURY, 2001). Na década de 90, o País alcançou o terceiro lugar como produtor mundial de goiabas (CARRARO e CUNHA, 1997).

O mercado interno absorve quase a totalidade da produção nacional, e vem aumentando nos últimos anos. O Brasil apresenta imensas áreas de clima e solo favoráveis à produção comercial de goiaba, e esse é um aspecto importante para a perspectiva de incremento na produção agrícola, na ampliação, atividade industrial e aumento da exportação (FREITAS, 2010).

Embora a goiabeira seja uma cultura rústica, no entanto oferece respostas positivas em produtividade. Quando se adota manejo adequado, principalmente à poda de frutificação, que pode induzir a planta a produzir durante todo o ano, e o manejo agrônômico do pomar, considerando as exigências da cultura (ROZANE *et al.*, 2009).

A falta de água disponível no solo, na época de elevada necessidade hídrica da goiabeira que é durante o período de intenso florescimento, fixação e desenvolvimento dos frutos, pode resultar em frutos pequenos e menor produção por planta (MANICA *et al.*, 2000). Pesquisas e recomendações sobre a irrigação na cultura da goiabeira são escassas, mas indicam aumentos de produtividade com o aumento da lâmina de irrigação aplicada (CHIRINOS-TORRES *et al.*, 2006). A planta se desenvolve melhor em solos arenosos. Pode até prosperar em solos argilosos pesados, porém não se desenvolve em terras pantanosas ou encharcadas (MANICA *et al.*, 2000).

### **O cultivo orgânico**

A agricultura orgânica é um sistema que visa estabelecer ideologias de produção com base em um conjunto de procedimentos que envolva a planta, solo, condições climáticas e o agricultor, produzindo um alimento sadio e com suas características e sabor originais, que atenda às expectativas do consumidor (PENTEADO, 2000).

O cultivo orgânico de frutas e hortaliças no mundo tem expressado um aumento em área e na produtividade, devido principalmente à demanda por produtos ecológicos. O consumo mundial de produtos orgânicos movimenta mais de US\$ 30 milhões em exportações, US\$ 200 milhões em vendas no Brasil, US\$ 13 bilhões em vendas nos Estados Unidos e US\$ 25 bilhões no mundo (WILLER *et al.*, 2008). A agricultura orgânica é praticada com fins comerciais em 120 países, nos quais ocupa cerca de 31 milhões de hectares, e em 2010 movimentou um mercado de US\$ 40 bilhões, (FAO, 2011).

No Brasil, produção orgânica apresentou um crescimento significativo nos últimos anos passando de 100.000 mil ha no ano de 2000 para 887.637 ha em 2006. Os quatro principais Estados em número de estabelecimentos que fazem uso da agricultura orgânica no Brasil são respectivamente: Bahia (15.194), Minas

Gerais (12.910), Rio Grande do Sul (8.532) e Paraná (7.527). (MDIC / SECEX, 2010). Fator que coloca o Brasil no 2º posto, em nível mundial existindo atualmente cerca de 90.497 estabelecimentos que praticam a agricultura orgânica (WILLER e KILCHER, 2011).

Apesar do constante crescimento na produção orgânica, há necessidade de pesquisas em todo método produtivo, desde melhoramento genético, nutrição, fitossanidade, manejo de irrigação e do solo, até comercialização dos produtos. (WILLER *et al*, 2008).

### **Certificações da fruticultura orgânica**

A certificação da fruticultura orgânica tem base na Instrução Normativa Nº007 e nas diretrizes para o Padrão de Qualidade Orgânico do Instituto Biodinâmico (IBD, 2003). Segue os mesmos procedimentos para a certificação da produção vegetal, estabelecidos em diretrizes e normas de certificadoras credenciadas para essa finalidade.

A conversão de uma lavoura de convencional para orgânica necessita de uma certificação que visa reconstruir ligação de confiança entre o produtor e o consumidor. Assim, foi estabelecido o selo de qualidade com responsabilidade social e ambiental. Dessa forma, para uma empresa ou propriedade ser considerada orgânica, ela deve ter como objetivo não apenas o lucro ou retorno econômico, mas atender às necessidades da sociedade, tanto na oferta de produtos saudáveis como na sustentabilidade ambiental, além de promover o desenvolvimento humano.

### **O gorgulho da goiaba**

O gorgulho da goiaba, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), é juntamente com as moscas-da-fruta *Anastrepha* spp. e *Ceratitis capitata* wied uma das principais pragas que atacam a cultura da goiaba no Brasil, afetando a produção e a qualidade dos frutos, causando perdas econômicas expressivas de até 100%. O gorgulho em seu estágio larval é de difícil controle através de métodos químicos convencionais devido à sua localização dentro dos frutos e no solo.

Esse inseto em sua forma adulta é um pequeno coleóptero de aproximadamente 6 mm de comprimento por 4 mm de largura, de coloração pardo-escura, com peças bucais em forma de rostro e forma alongada. A larva é branca amarelada, com cabeça marrom, corpo enrugado transversalmente, medindo, quando totalmente desenvolvida, 12 mm de comprimento por 4 mm de largura.

As fêmeas, ao iniciarem a postura, procuram os frutos pequenos (3-4 cm) e verdes, cavando com o rostro canais onde depositam, em geral, um ovo por cavidade. Esse local não se desenvolve como o restante do fruto, ficando com uma cicatriz circular, deprimida de coloração negra. Após a eclosão, a larva penetra no fruto e se alimenta da polpa e sementes, deixando o fruto parcialmente destruído, de coloração escura, típica de deterioração (MANICA *et al.*, 2000). Durante esse as larvas se desenvolvem dentro do fruto passando por quatro instares. Os frutos amadurecem, caem e as larvas de quarto instar migram para o solo, onde se transformam em pupa, permanecendo nesse estágio por cerca de três a quatro meses. Após esse período surgem os adultos, que abandonam o solo iniciando um novo ciclo (BAILEZ *et al.*, 2003).

Os métodos de controle mais utilizados são o químico e o cultural, nesse caso o químico tem sido realizado com a aplicação de soluções inseticidas à base de fention a 0,10%, paration metílico a 0,10% ou triclorfon a 0,30%, quando os frutos ainda se encontram verdes (PEREIRA e MARTINEZ JR., 1986). Já o controle cultural, consiste no ensacamento dos frutos quando esses ainda estão pequenos com 3 cm em média . Existe uma prática menos difundida que é a coleta e destruição dos frutos brocados caídos, visando à diminuição do inóculo para o ciclo seguinte.

Os métodos biológicos ainda são pouco utilizados, no entanto indicam uma possibilidade de se ter sucesso no controle dessa praga. As larvas e as pré-pupas são fortes candidatas a serem controladas por nematoides entomopatogênicos (NEPs), já que se encontram no solo. Com referência à espécie *Conotrachelus psidii*, SHAPIRO-ILAN *et al.* (2002) utilizaram *Steinernema feltiae* e *Steinernema riobrave* para o controle de *Conotrachelus nenuphar* Harris, o “gorgulho da ameixa”, onde demonstraram potencial de controle do estágio larval. DOLINSKI *et al.* (2006) testaram diferentes espécies de nematoides entomopatogênicos para o controle de *C. psidii*. DEL VALLE *et al.* (2008)

estudaram a capacidade dispersiva de juvenis infectantes de nematóides *Heterorhabditis baujardi* LPP7, aplicados em cadáveres de larvas de *Galleria mellonella* para o controle de larvas de *C. psidii*, assim como o efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade de *Heterorhabditis baujardi* LPP7. DOLINSKI *et al* (2010)

### **Nematoides Entomopatogênicos**

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) pertencem à Ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea), na qual estão inseridas as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. A família Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* e *Neosteirnenema*, enquanto a família Heterorhabditidae possui o gênero *Heterorhabditis*. Esses nematoides que são capazes de colonizar e matar insetos em 24 a 48 horas possuem adaptações características: são letais a insetos; possuem associação simbiótica com bactérias entomopatogênicas e em terceiro estágio (J3) é livre e infectante no solo (DOWS e PETERS, 2002).

### **Biologia e comportamento**

Espécies de nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, se associam com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus Boemare* e *Photorhabdus Thomas* respectivamente. Essas bactérias são as principais responsáveis pela morte rápida do hospedeiro por septicemia. Os NEPs vêm sendo isolados de solos em diferentes partes do mundo, desde o ártico até os trópicos, apresentando um vasto leque de hospedeiros (POINAR, 1990). Como exemplo, *S. carpocapsae* Weiser, coloniza mais de 250 espécies de insetos pertencentes à aproximadamente 75 famílias de 11 ordens em condições de laboratório, (PETERS, 1996).

Por serem organismos cujo hábitat natural é o solo, sofrem influência de características desse hábitat, como tamanho dos poros, umidade, presença de oxigênio, temperatura e pH (BARBERCHECK, 1992). As interações desses fatores podem alterar desde a sobrevivência até a capacidade de infecção do nematoide. Algumas espécies de NEPs podem tolerar temperaturas extremas, mas é possível que a baixa umidade do solo altere sua capacidade de dispersão

e persistência (KAYA, 1990). O ciclo de vida das espécies do gênero *Steinernema* começa com os juvenis infectantes J1s penetrando no corpo do hospedeiro através de aberturas naturais, como boca, ânus e espiráculos (FORST e CLARKE, 2002).

Após penetrar no inseto, passam à hemocele, onde liberam as bactérias. Essas se multiplicam rapidamente, e após curto período, causam septicemia e morte do hospedeiro. O cadáver fica então preenchido por uma “sopa bacteriana”, composta por bactérias e por tecidos do inseto já desorganizados e decompostos. Os nematoides então, se alimentam dessa “sopa bacteriana” e se desenvolvem, passando para o último estágio (J4) e depois se tornam adultos anfimíticos de primeira geração. Em geral, os juvenis originários desses adultos ainda têm ao seu dispor apreciável quantidade de alimento, conseguindo completar o ciclo e formar os adultos anfimíticos de segunda geração dentro do corpo do hospedeiro (FORST e CLARKE, 2002).

Geralmente, após o surgimento e acasalamento dos adultos da segunda geração, tem-se a formação de uma população de juvenis que se alimenta do resto do cadáver e depois o abandona, indo para o solo em busca de novos hospedeiros. Antes dos nematoides deixarem o cadáver as bactérias simbiontes são novamente apreendidas na vesícula do intestino dos juvenis no terceiro estágio (ADAMS e NGUYEN, 2002).

O ciclo de vida das espécies do gênero *Heterorhabditis* é semelhante às espécies do gênero *Steinernema* com a diferença que no primeiro ciclo dentro do hospedeiro a primeira geração é hermafrodita, e os machos e fêmeas só aparecem na segunda geração (ADAMS e NGUYEN, 2002).

Uma característica adicional que destaca os NEPs dentre os agentes do controle biológico é a sua capacidade de dispersão e busca do hospedeiro. Os NEPs são atraídos pelas atividades fisiológicas do hospedeiro, como a respiração, que ocasiona diferenças de CO<sub>2</sub> (ZUCKERMAN e JANSSON, 1984; GAUGLER *et al.*, 1989).

De acordo com a movimentação e comportamento, os NEPs podem ser classificados em três tipos: “ambusher”, “cruiser” e intermediário. *Steinernema carpocapsae* (Weiser) é um típico “ambusher”, que fica a maior parte do tempo parado sobre a cauda na superfície do solo até a aproximação do hospedeiro. Esse movimento é conhecido como nictação, o qual permite ao nematoide

alcançar outros substratos ou hospedeiros mediante movimentos sincronizados e ondulatórios de seu corpo (ISHIBASHI e KONDO, 1990). *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar e *Steinernema glaseri* são típicos “cruiser”, pois são móveis e respondem notoriamente aos químico-atraentes do hospedeiro (KAYA e GAUGLER, 1993). Os nematoides que procuram o hospedeiro e ainda fazem nictação são considerados intermediários como *Steinernema feltiae* Filipiev.

Os juvenis infectantes dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são morfológica e fisiologicamente adaptados à vida livre no solo. Durante esse estágio, os nematoides não se alimentam, possuem a boca e o ânus fechados e dependem de reservas nutritivas internas até encontrar um hospedeiro. Essas reservas se encontram no intestino, principalmente, na forma de glicogênio (LEWIS, 1992). No terceiro estágio são mais resistentes às condições ambientais adversas, devido à presença da cutícula do segundo estágio sobre a do terceiro estágio. Essa proteção evita a dessecação e ação de antagonistas existentes no solo, como bactérias e fungos (CAMPBELL e GAUGLER, 1991).

Ao se avaliar a eficiência com a qual o complexo nematobacteriano é capaz de matar o seu hospedeiro, observa-se que tal situação varia com a espécie de inseto considerada, com o seu estado imunológico e fisiológico e com a bactéria presente na simbiose (AKHURST e DUNPHY, 1993). Para que possam efetuar a sua multiplicação na hemolinfa as bactérias devem ser capazes de tolerar a resposta defensiva do hospedeiro, evadir-se ao reconhecimento como corpo estranho e/ou suprimir as defesas humorais e celulares. Nos insetos a reação de defesa celular inicial a uma infecção bacteriana é a fagocitose e quando o número de bactérias é muito elevado, é coadjuvada pelo mecanismo de formação de nódulos (DUNPHY e THURSTON, 1990).

Atualmente um grande número de espécies bacterianas produz fatores de virulência com a função explícita de causar alterações na parte fisiológica do hospedeiro ou nos seus mecanismos de defesa, de maneira que possibilitem a proliferação e/ou difusão bacteriana. Esses fatores são, na maior parte, moléculas de natureza protéica e são denominadas toxinas bacterianas (FRENCH-CONSTANT *et al.*, 2000). De fato, a maioria são citotoxinas, citolisinas ou hemolisinas e enzimas, tais como, lipases, fosfolipases e proteases (TURLIN *et al.*, 2006).

## Identificação morfológica de nematoides

Existem descritas 151 espécies de nematoides entomopatogênicos do gênero *Steinernema*, uma do gênero *Neosteirnenema* e 71 do gênero *Heterorhabditis* (NCBI, 2011). No entanto, a escassez de pesquisadores especializados na identificação de nematoides pelo método clássico (morfológico / morfométrico) é um fator que representa dificuldades adicionais ao desenvolvimento de estudos sobre diversidade.

Estudar os caracteres morfológicos e morfométricos envolve observações e medições que possibilitam distinguir os indivíduos. No caso específico dos NEPs, isso pode ser conseguido pela dissecação dos insetos, extração de hermafroditas entre o terceiro e quarto dias para fêmeas anfimíticas e machos, os JIs de terceiro estágio que são obtidos durante os dois primeiros dias após a emergência desses cadáveres dos insetos. Para essa metodologia são comumente usadas larvas de insetos da espécie *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) conhecida como traça-pequena-dos-favos ou *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) (NIELSON, 2005). Em vista de tal perspectiva, existe não só necessidade como também a conveniência da utilização de técnicas moleculares para a identificação taxonômica, uma vez que a consistência da identificação se torna mais consistente.

Tabela 1 Características morfológicas observadas para identificar espécies de nematoides entomopatogênicos.

Juvenis	Fêmeas de 1° e 2° geração	Machos
L = comprimento total do corpo;	L.	L.
W = maior largura do corpo;	W.	W.
NR = distância da extremidade anterior ao anel nervoso;	NR.	NR.
EP = distância da extremidade anterior ao poro excretor;	EP.	EP.
ES = comprimento do esôfago;	ES.	ES.
ABW = largura do corpo na altura do ânus;	ABW.	ABW.
T = comprimento da cauda;	T.	T.
Hyaline = porção entre a cutícula interna e a externa.	STW = largura do estoma.	SP = tamanho do espículo.
Usam-se também os seguintes índices:	STL = comprimento do estoma.	SW = maior largura do espículo.
D (%) = (EP/ES);	V = distância da vulva à extremidade anterior.	GU = comprimento do gubernáculo.
E (%) = (EP/T);	V (%) = distância da porção anterior à vulva/tamanho do corpo x 100.	TR = testículo reflexo.
H/T (%) = (Hyaline/T);	L;	D%;
a = (L/W);	W;	SW (%) = SP/ABW;
b = (L/ES);		GS (%) = GU/SP.
c = (L/T).		L;

### Identificação molecular

O sequenciamento de DNA no caso específico dos nematoides entomopatogênicos, é de extrema importância para a definição de espécies. Com a evolução das pesquisas e a utilização de marcadores em genética molecular foi possível discriminar posições taxonômicas particulares entre várias alternativas possíveis. Os marcadores que têm a maior representação em bases de dados genéticos são os pontos de partida para investigar o status taxonômico de um nematoide entomopatogênico não identificados (LIU *et al.*, 2000). Com base na representação em dados genéticos, o marcador mais popular para identificação de nematoides desconhecidos é a sequência de DNA do 18S ou subunidade ribossômica pequena (SSU) RNA gene (DORRIS *et al.*, 2002).

Quando o objetivo é o estudo de grupos de espécies de *Heterorhabditis* e *Steinernema* o marcador molecular de escolha é a sequência de DNA da região do espaçador interno transcrito do gene ribossomal (ITS rDNA). Esse marcador apresenta variações substanciais entre as espécies de *Heterorhabditis* e *Steinernema* (NGUYEN *et al.*, 2007).

Outro *loci* que prova ser útil para a discriminação em nível da espécie é o citocromo-oxidase (COII)-16S (SZALANSKI *et al.*, 2000) e ND4 (LIU *et al.*, 2001) genes mitocondriais, e as regiões da subunidade 28S ribossomal. Outras

pesquisas têm apresentado como alternativas a utilização de sondas de DNA satélite que são utilizadas como instrumento de diagnóstico para identificar *Heterorhabditis* e *Steinernema*. Esses testes podem rapidamente determinar em que táxon o nematoide em questão pertence. As sondas investigadas até agora parecem ser do tipo espécie específica, porém menos sensíveis do que rDNA ITS ou IGS (espaçadoras intergênicas). Tais sondas de DNA satélite não produzem dados que podem ser usados para recuperar as relações filogenéticas. (ABADON *et al.*, 1998)

Os fragmentos de DNA polimórfico (RAPD) que são amplificados também são usados para explorar a diversidade genética entre as espécies de nematoides entomopatogênicos (HASHMI e GAUGLER, 1998). Semelhante ao conteúdo de informação de RAPD, fragmentos polimórficos amplificados (AFLP) também podem ser uma poderosa ferramenta molecular. Fragmentos polimórficos amplificados têm condições de amplificação mais severas, que melhoram a replicabilidade dos resultados (STACK *et al.*, 2000).

Fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (PCR-RFLP) é uma alternativa rápida de sequenciamento de DNA. Perfis de fragmentos de restrição da região ITS (espaçador transcrito interno) ocorrem para várias espécies de *Heterorhabditis* e *Steinernema*, e também podem ser facilmente gerados a partir das sequências ITS depositadas em bancos de dados públicos, como GenBank. Os nematoides têm seus padrões de bandas resultantes da comparação com aqueles previstos a partir de espécies previamente analisadas. Padrões de bandas idênticos sugerem que eles pertencem à mesma espécie, até que uma análise mais aprofundada indique o contrário (HOMINICK *et al.* 1997).

### **Produção de Nematoides Entomopatogênicos**

Nos últimos anos foram conseguidos avanços na produção em escala comercial de nematoides entomopatogênicos. Por outro lado o aumento da sua utilização em sistemas agrícolas sustentados ou nos sistemas de controle integrado dependente de avanços tecnológicos para produzi-los em escala industrial e a baixo custo de produção.

São três os sistemas que correntemente se usam na produção em massa de nematoides entomopatogênicos: produção *in vivo*, produção *in vitro* em

substrato sólido ou líquido (MOLINARI, 2006). Esses sistemas de produção são capazes de gerar NEPs em pequena, média e larga escala, mas os altos custos do processo ainda constituem um fator limitante para o seu uso em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP). A associação do nematoide com as bactérias simbiontes favorece esse tipo de produção, mas deve-se ressaltar que a bactéria deve estar em condições ótimas para que o nematoide se desenvolva e se multiplique (MOLINARI, 2006).

### **Produção *in vivo***

A produção *in vivo* é o método mais simples e o mais usado para multiplicar NEPs, e consiste na utilização de insetos hospedeiros. A técnica foi desenvolvida pela primeira vez por GLAZER, (1931), mas foi DUTKY, (1964) que obteve pela primeira vez uma grande produção de JIs em larvas de *G. mellonella*. É uma técnica simples, mas o custo de produção pode ser elevado e não permite uma economia de escala. O número de juvenis obtidos depende da suscetibilidade do hospedeiro, e da espécie de nematoide multiplicada (MOLINA *et al.*, 2001). Obtendo-se de 100.000 a 300.000 JIs por larva infectada (POINAR, 1990).

As larvas de insetos são infectadas adicionando-se juvenis infectantes em meio aquoso a um papel absorvente ou submergindo as larvas no mesmo meio. Em geral são utilizados cerca de 100 JIs por larva no primeiro método e 4.000 JIs/mL no segundo, podendo ser submersas nessa solução mais de 400 larvas (SHAPIRO-ILAN *et al.*, 2002).

As larvas adquirem a coloração característica do complexo nematoide-bactéria após 24 a 48 horas de infecção. Depois de ter completado dois a três ciclos do nematoide no hospedeiro (cerca de 5 a 10 dias), já não há alimento disponível e os juvenis infectantes começam a deixar os cadáveres em busca de novos hospedeiros. Essa etapa, chamada de colheita, pode ser feita em diferentes escalas, desde placas de Petri (WHITE, 1927), até em sistemas de colheita para grande volume de nematoides, como o método LOTEK proposto por GAUGLER e HAN, (2002). Depois de coletados, os JIs podem ser armazenados em água, esponja, gel, ou em outros substratos inertes a temperaturas de 4°C a 16°C, por um a três meses.

Cada espécie de nematoide possui tempo e temperatura ótimos de armazenamento (GREWAL, 2002). Podendo haver queda na infectividade dos JIs. O maior custo nesse sistema tem sido a dieta usada na criação das larvas de *G. mellonella*. Essa dieta vem sendo modificada para que se torne mais barata viabilizando a multiplicação dos nematoides. Nos E.U.A, uma larva de *G. mellonella* pode ser comprada por US\$ 0,01; levando em consideração que cada larva produz cerca de 1 a  $3,5 \times 10^5$  JIs (DUTKY, 1964), 25.000 larvas são necessárias para tratar 1 ha, com base em  $2,5 \times 10^9$  JIs/ha. Para baixar ainda mais o custo de produção há necessidade de continuar melhorando outros aspectos da criação das larvas, bem como armazenamento e conservação dos nematoides (FLANDERS, 1996).

### **Produção *in vitro***

A produção em meios artificiais começou 30 anos antes de DUTKY (1964) ter proposto a multiplicação *in vivo*. GLASER (1931) cultivava NEPs em bandejas cobertas com quatro milímetros de um meio composto por vísceras de animais e dextrose-agar. Nesse sistema eram produzidos cerca de 9.000 a 12.000 nematoides/cm<sup>2</sup> de meio de cultura, atingindo 140 milhões de juvenis ao dia. Outros meios foram testados, mas com a descoberta das bactérias simbiotes deixou-se de usar vísceras animais, de contaminação fácil e de manuseio desagradável. Apesar de não conhecer a existência da bactéria simbiote, GLASER (1931) observou que nematoides mantidos *in vitro* por muito tempo perdiam sua infectividade e que, de tempos em tempos, deveria infectar larvas de insetos para recuperá-los. Hoje a produção *in vitro* pode ser feita em meios artificiais sólidos ou líquidos.

O meio sólido de produção utilizado é feito, com o uso de esponja de poliuretano, embebida em meio nutritivo constituído de tecidos animais e óleo como substrato, para permitir a reprodução e o desenvolvimento do complexo nematoide-bactéria. De todas as tentativas de produção *in vitro*, a metodologia de BEDDING (1981) mostrou ser a melhor, proporcionando altas produções de JIs e viabilizando a exploração comercial dos NEPs. Ao invés de bandejas, foram utilizadas garrafas de Erlenmeyers com esponja e substrato, obtendo produções

da ordem de 1,3 milhões de juvenis por 3 kg de meio utilizado. (HUSSAINI *et al.*, 2002).

Essa mudança nos componentes de substrato vem tornando o processo de produção de NEPs mais acessível. A vantagem desse método em relação ao método *in vivo* é a maior produção de JIs em um mesmo espaço de tempo. O método de multiplicação de nematoides utilizando meio sólido, apesar de prático, é considerado laborioso, pois precisam ser autoclavados antes das inoculações. Além do mais, as esponjas não são biodegradáveis e descartar toneladas desse material pode ser dispendioso e danoso ao ambiente. Ainda são necessários ajustes e melhorias nos processos de mistura do meio com o suporte, na inoculação da bactéria simbiote e na colheita dos JIs (FRIEDMAN, 1990). Visando o aumento na produção e o não uso de suporte, surgiu a produção de NEPs *in vitro* em meio líquido, utilizando fermentadores do tipo tanque de 3 a 10.000 L, dessa forma produções da ordem de  $90 \times 10^3$  JIs/mL tornaram-se possíveis.

### **Formulação dos Neps**

Diferentes tipos de formulações têm sido testados para diferentes espécies de nematoides entomopatogênicos com o objetivo de amenizar os fatores abióticos que afetam os JIs. Formulações variam desde esponjas a grânulos solúveis em água. O tipo de formulação depende da forma como os nematoides são produzidos, da disponibilidade do material (GEORGIS, 1990).

Existem vários tipos de formulações que preservam os NEPs no campo tais como: água, esponja, gel (Ágar), insetos cadáveres, vermiculita, alginato de cálcio, pó molhável, grânulos solúveis em água, dentre outros. Alguns nematoides perdem água paulatinamente sem perder a integridade fisiológica e morfológica, fenômeno chamado de anidrobiose. Os NEPs são capazes de entrar em anidrobiose parcial, ou seja, anidrobiose quiescente (WOMERSELY, 1990).

Essa característica foi explorada para gerar formulações com maior tempo de prateleira, como é o caso dos grânulos solúveis em água (GREWAL, 2002). As formulações podem então ser subdivididas em formulações nas quais os nematoides permaneçam ativos, com mobilidade reduzida, ou em anidrobiose

parcial. Existem também as formulações nas quais os nematoides são levados ao campo em insetos cadáveres (DOLINSKI, *et al* 2006).

### **Metodologias de aplicação de NEPs**

O desenvolvimento de métodos de aplicação é um dos desafios para ampliar a utilização desses microrganismos no controle de pragas. De uma maneira geral, NEPs podem ser aplicados por pulverização, por irrigação e por cadáveres de insetos (GREWAL, 2002). A eficácia da aplicação de um inseticida demanda o desenvolvimento de sistemas que integrem o tipo de formulação, o equipamento e o método de aspersão. Igualmente uma dosagem correta e um tamanho de gota adequado são necessários para se realizar uma aplicação correta e em momento oportuno.

O controle fitossanitário da praga alvo depende da qualidade do produto utilizado e da precisão de sua aplicação, tendo sempre em conta a menor contaminação ambiental possível (VILLALBA, 2003). É importante levar em conta que temperaturas do solo entre 12 e 28°C são favoráveis na aplicação de NEPs, (ROHDE, 2007). A microaspersão do nematoide *Heterorhabditis* sp. na superfície do solo foi mais efetiva do que quando adicionada na irrigação por gotejamento. Estudos em campo têm mostrado a necessidade de se aplicar os NEPs com uma maior quantidade de água, para que os mesmos não sofram dessecação (CURRAN, 1992).

A adição de adjuvantes pode melhorar o desempenho de NEPs. SCHROER *et al.* (2005) testaram adjuvantes contra *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), e observaram a eficácia de controle cujo tempo letal médio passou de 40 horas a um período menor que 25 horas, mas em contraposição, essa formulação diminuiu a mobilidade dos JIs.

Atualmente JIs são aplicados em sistemas de irrigação adaptados à aplicação de produtos químicos. Estudos avaliando o controle de pragas foliares mediante aplicação foliar de NEPs são escassos, no entanto em trabalho utilizando os adjuvantes Joint oil<sup>R</sup> e Gotafix<sup>a</sup> aliado a nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e *S. carpocapsae* NCAII, foi observada a mortalidade de larvas da broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* Fabricius Lepidoptera Pyralidae (BELLINI, 2011).

As telas e os filtros dos equipamentos de aspersão devem permitir que os nematoides passem através deles. *S. carpocapsae* pode passar através de telas tão finas como 100 micrômetros de diâmetro, mas telas com aberturas maiores são necessárias para espécies maiores como *Steinernema glaseri* Steiner e *Heterorhabditis megidis* Poinar. Portanto, retirar os filtros e as telas às vezes é recomendado, mas isto requer recalibração do equipamento (GREWAL, 1998). A maioria dos sistemas de aspersão não promove pressão suficiente para causar dano aos nematoides. Em geral, os nematoides não devem ser submetidos a pressões superiores a 300 psi nos tanques dos equipamentos e a temperaturas superiores a 30°C (GREWAL, 1998).

O gorgulho da goiaba tem causado enormes prejuízos em lavouras de goiaba. Medidas de controle baseadas no uso de intensivo de agroquímicos, além de caras, são arriscadas, provocam contaminação ambiental e indução de resistência, selecionando populações menos sensíveis. Diante da dificuldade de controle de *C. psidii* métodos eficazes e aceitáveis ecologicamente precisam ser desenvolvidos. A possibilidade do uso de nematoides entomopatogênicos mostra-se como alternativa adequada. Neste contexto o seu uso será economicamente viável e ecologicamente correto, reduzindo a contaminação pelo uso excessivo de agroquímicos.

### **3. TRABALHOS**

#### **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E ESTUDO DA PROGÊNIE DO NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO LINHAGEM LPP30**

##### **RESUMO**

Espécies de nematóides entomopatogênicos são muitas vezes utilizados para o controle biológico de insetos. Há muitas espécies que ainda não foram identificados e é, portanto, extremamente importante trabalhos envolvendo o estudo da morfologia e caracteres moleculares. Para o estudo morfológico da linhagem originada no LPP30 Campos dos Goytacazes, medidas morfológicas foram realizadas, que são adotados como padrão para este tipo de corpo, notando a semelhança entre a tensão LPP30 em comparação com 11 outras estirpes pertencentes à shows do grupo. A análise molecular das regiões de 16S e 28S bacterianas, e sequências de rDNA 18S do ITS1 completa, e rDNA ITS2 do nemátodo mostraram que a estirpe do gênero *Heterorhabditis* e suas bactérias simbióticas dos *Photorhabdus* gênero. Quando avaliamos o potencial produtivo de juvenis infectantes em lagarta *Galleria mellonella* demonstraram elevado potencial de produção foi observado após 5 dias de avaliação, resultando em um total que

varia entre 1243,30 e 1296,660 de larvas de nematódeos em duas etapas do experimento.

**Palavras-chave:** *Photorhabdus*, *Galleria mellonella*, bactéria.

## **PROGENY, MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES FROM STRAIN LPP30**

### **ABSTRACT**

Entomopathogenic nematode species are often used for biological control of insects. There are many species that have not been identified and are extremely important, involving the study of morphology and molecular characters. For the morphological study of the lineage LPP30 originally from Campos dos Goytacazes, morphological measurements were made that are adopted as standard such body, noting the similarity between the strain LPP30 compared with 11 other strains belonging to group shows. A molecular analysis based on regions of bacteria and 16S rDNA sequences of the 28S and 18S complete ITS1, ITS2 rDNA and showed that the nematode lineage LPP30 belong to the genus *Heterorhabditis* and their symbiotic bacteria belong to the genus *Photorhabdus*. When we evaluate the productive potential of infective juveniles in *Galleria mellonella* caterpillar that showed high production potential was observed after 5 days of evaluation, resulting in a total ranging between 1243.30 and 1296.660 of nematode larvae in two stages of the experiment.

**Keywords:** *Photorhabdus*, *Galleria mellonella*, bactéria.

## INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são parasitas obrigatórios de insetos e são frequentemente usados como agentes de controle biológico de pragas de importância econômica. (ADAMS et al. 2006). Ocupam atualmente o segundo maior segmento do mercado de bioinseticidas nos países industrializados, sendo utilizados contra uma ampla gama de insetos que incluem além das pragas de solo, insetos praga da parte aérea que apresentam parte do seu ciclo de vida no solo, e insetos que habitam ambientes crípticos TAVARES (2010)

Pesquisas têm sido realizadas sobre identificação de nematoides entomopatogênicos no mundo, e no Brasil, a primeira descrição taxonômica de (PEREIRA, 1927) que identificou *Rhabditis* e recentemente ANDALÓ et al. (2006) que fizeram isolamento e identificação de *Heterorhabditis amazonensis* Andaló e DOLINSKI et al. (2008) que isolaram e identificaram *Heterorhabditis baujardi* .

Avanços na área de biologia molecular permitiram o desenvolvimento de técnicas que hoje facilitam os processos de identificação dos nematóides entomopatogênicos (ADAMS et al, 1998; EMELIANOFF et al., 2008). Tais técnicas vem sendo utilizadas com frequência para análises de diferentes tipos diversidade genética de (FABRE et al., 1995; FALEIRO et al., 1998).

A forma repetitiva da organização, desenvolvimento e disposição dos genes na molécula de DNA tornam tais regiões, alvos adequados para a amplificação do DNA por PCR, técnica que permite a amplificação dos fragmentos visando à identificação dos organismos. A proximidade entre regiões conservadas (18S, 16S e 28S em metazoários) as torna úteis, pois são regiões de rDNA usadas como marcadores para aferição da evolução intra-específicas e regiões mais variáveis (GRAUR *et al*, 2001).

A descoberta de novas espécies de nematoides entomopatogênicos pode melhorar o processo de utilização destes organismos em programas de controle biológico e as descrições de espécies que integram dados morfológicos e moleculares podem ser usados para identificar, diagnosticar e delimitar parâmetros para o aperfeiçoamento de identificação das espécies auxiliando as técnicas para resultados mais precisos (POWERS *et al*, 1997).

Os objetivos do trabalho foram caracterizar morfológica e molecularmente a linhagem do nematoide entomopatogênico LPP30, e sua bactéria simbiote isolados na cidade de Campos dos Goytacazes, bem como avaliar e quantificar sua progênie.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção da linhagem

A linhagem LPP30 foi isolada de uma propriedade na cidade de Campos dos Goytacazes-RJ, por meio do método do inseto armadilha (KAYA e STOK, 1997). Foram separadas 200 lagartas vivas de 6<sup>o</sup> instar de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), que em sequência foram acondicionadas aos pares em Eppendorf de 2 ml, previamente perfurados com o auxílio de um garfo aquecido por 5 vezes para proporcionar a entrada de ar. Posteriormente dois Eppendorfs foram enterrados no solo em 100 orifícios com 10 X 10 cm. Após 10 dias os Eppendorfs foram coletados e os que apresentaram lagartas com sintomas de infecção foram levados para o laboratório para isolamento e purificação da população em sucessivas infecções em lagartas de *G. mellonella*.

### Análise morfológica

Para o desenvolvimento dos estudos morfológicos, dois protocolos para a fixação dos nematóides foram estabelecidos, um para microscopia de luz KAYA e

STOCK (1997) que teve o objetivo de fixar os nematóides para aferir medidas morfométricas e outro para microscopia de varredura SEINHORST, (1959)

Na primeira etapa os nematoides foram colocados em um bloco côncavo com 1 mL de soluto de (Ringer) adicionando-se, 4 mL de fixador (TAF) composto de: 2 mL de Trietalomina, 91 mL de água destilada e 7 mL de formalina, 40% foram pré-aquecidos a 60°C e adicionados ao bloco, os nematoides permaneceram nesta solução por 12 horas. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta retirou-se o máximo de TAF e adicionou-se logo em seguida 0,5 mL de Solução 1 (20 partes de álcool a 95%, 1 parte de glicerol, 79 partes de dH<sub>2</sub>O). O bloco foi então distribuído em um dissecador e foi preenchido até metade do fundo deste com 95% de álcool.

Posteriormente o dissecador foi mantido em estufa a 37°C durante 12 horas após o intervalo de 12 horas, o bloco foi retirado do dissecador, e preenchido com solução dois (cinco partes de glicerol, 95 partes de álcool 95%) nessa etapa, o bloco foi colocado em uma placa de Petri e distribuído parcialmente aberto em estufa a 40°C durante três horas e então os nematoides foram colocados em glicerina pura para medições posteriores.

### **Caracterização molecular da linhagem LPP30**

Para a caracterização molecular dos nematoides, o DNA usado na amplificação foi extraído de um grupo de 50 juvenis no estado infectante (JIs) a partir de culturas puras do isolado LPP30. Os JIs depois de lavados três vezes em H<sub>2</sub>O miliQ foram transferidos para o Nitrogênio líquido e homogeneizados.

O homogeneizado foi então recolhido em 500 µl de tampão de lise (200 mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH=8, 50mM EDTA, 0.5% SDS, e 0,2 mg/mL proteinase (K) em um tubo Eppendorff de microcentrífuga de 1,5mL e foi aquecido a 65°C durante duas horas, em seguida mantido à temperatura ambiente. A esse homogeneizado adicionou-se 500 µl de fenol e misturou-se lentamente durante cinco minutos até obter uma emulsão que foi centrifugada a 13. 201 xg, durante oito minutos a 8°C. Recuperou-se a fase aquosa adicionando-se igual volume de uma mistura de clorofórmio/isoamílico álcool (1:1). Mais uma vez a emulsão foi centrifugada nas mesmas condições para recuperar novamente a fase aquosa.

À mistura resultante adicionou-se lentamente 1,1 mL de álcool absoluto e incubando-se a -20°C por cerca de uma hora e meia. Passado este tempo centrifugou-se a 20.625 xg, por sete minutos a 4°C. O decantado foi então lavado cuidadosamente com 1 mL de álcool 60% deixando-o secar a 50°C por cinco minutos. Findo este tempo ressuspendeu-se o extrato em 200 µl de TE e incubou-se com 2 µl de RNAase durante 30 minutos a 37°C. Juntou-se 202 µl de fenol e centrifugou-se a 9.168 xg, durante oito minutos a 24°C. Recuperou-se o sobrenadante ao qual se juntou 8,4 µl de NaCl 5M e precipitou-se em 750 µl de álcool absoluto que foi misturado lentamente. Depois de misturado incubou-se a -20°C por mais uma hora. Posteriormente centrifugou-se a 20.625 xg, durante sete minutos a 4°C e decantou-se lentamente aproveitando o precipitado que foi lavado com 750 µl de álcool 70% e novamente centrifugado. Depois de seco a 50°C durante cinco minutos dissolveu-se em 50 µl de H<sub>2</sub>O miliQ.

Observou-se a qualidade do DNA em um gel de agarose a 0,8% (wt/vol) e quantificou-o com espectrofotometro UV. A amplificação do fragmento e análise molecular do nematoide realizada com base na sequência rDNA constituída por sequências parciais da zona 28S e 18S e pelas sequências completas de ITS1, 5,8S e ITS2. Este fragmento foi amplificado por PCR usando os primers LSU-NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') e R-94 (5'-TTGAACCGGGTAAAAGTCG-3') usando o DNA total dos JIs como molde (STOCK *et al.* 2001).

Cada reação de amplificação foi realizada de acordo com as condições descritas acima utilizando o termociclador Bio-Rad Termociclador C1000 Touch. Houve desnaturação de cinco minutos a 94° C, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos à temperatura de "annealing" de 48,9°C e 40 segundos a 72°C, e um passo final de extensão a sete minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit Purelink™ (Invitrogen™) e sequenciados com os mesmos primers usados na amplificação. Todas as sequências obtidas foram submetidas a uma procura no Genbank (BENSON, 2008) com o algoritmo BLAST (ALTSCHUL 1990) .

### **Reconstrução da árvore filogenética do nematoide**

Uma árvore Bayesian foi reconstruída com um alinhamento de 853 pb do fragmento rDNA sequenciado. As sequências de rDNA de *Heterorhbditis* usadas

nos alinhamentos foram retiradas do Genbank (BENSON 2008). O alinhamento foi realizado com ClustalW (THOMPSON *et al.* 1994) nas condições padrão do programa e editado com o programa BioEdit v.7.0.9.0,. O modelo de substituição nucleotídica HKY+G foi escolhido pelo método estatístico de informação teórica AIC por meio do programa jModelTest v.0.1 (POSADA 1998). A reconstrução Bayesiana da árvore filogenética foi realizada no programa MrBayes v3. 1.2 (RONQUIST *et al.* 2003). Efetuaram-se simultaneamente duas corridas independentes com 5000000 gerações, a cada 100 ciclos de onde foram retiradas a árvore filogenética produzida e eliminaram-se os primeiros 25% das gerações para se obter a árvore consenso. A robustez dos resultados foi atingida através das probabilidades posteriores. As árvores construídas e analisadas foram estabelecidas sem raiz. A representação gráfica da árvore resultante foi desenvolvida no programa MEGA v.4.1 (TAMURA *et al.* 2007).

### **Caracterização molecular da bactéria simbiote**

Para a manipulação genética do isolado da bactéria simbiote, colônias individuais foram isoladas do nematoide no estado juvenil infectante (JIs) segundo o método de BEDDING & AKHURST (1975). As culturas foram mantidas em NBTA (ágar nutritivo com 25 mg bromotimol azul e 40mg cloreto trifeniltetrazólio) a 10°C em uma câmara escura e transferidas semanalmente para um meio novo. Tornou-se tendo havido o cuidado de só transferir as colônias que tinham absorvido o azul de bromotimol, o que é indicativo da fase I ou exponencial da bactéria.

Para o procedimento de extração do DNA, duas colônias individuais em fase I. Inoculou-se as colônias em 10 mL de meio TSYB (30 g caldo de triptona de soja com 5 g de extrato de levedura por litro) e incubou-se num agitador orbital, 200 r.p.m a 28°C durante 24 horas e o DNA foi extraído. Depois de centrifugado, o pellet de células foi lavado duas vezes em 500 µl TE8 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). Ressuspendeu-se em 360 µl de STE (TE + 0.1 M NaCl), 60 µl de SDS a 10% (wt/vol) e 420µl de fenol, homogeneizou-se suavemente e centrifugou-se.

Ao sobrenadante adicionou-se 420 µl de cloroformio + Isoamil álcool (24:1), misturou-se suavemente e centrifugou-se. Precipitou-se com álcool o DNA

dos 400 µl de sobrenadante e ressuspendeu-se em 200µl de TE. O DNA foi tratado com RNase A (GibcoBRL), re-extraído com fenol: cloroformio: Isoamil álcool (25:24:1), precipitado em álcool e ressuspendido em 50 µl de água (Milli-Q) esterilizada. Observou-se a qualidade do DNA em um gel de agarose a 0,8% (wt/vol) e quantificou-se o DNA com espectrofotometria UV. Obteve-se então dois extratos independentes de DNA cromossomal.

### **Amplificação e sequenciamento do 16S rDNA**

Um fragmento interno do 16S rDNA foi amplificado por PCR com dois primers, 16S-For (5'-GAAGAGTTTGATCATGGCTC-3') e 16S-Rev (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') descritos por FISCHER-LE SAUX et al (1999). Cada reacção de amplificação, com um volume de 25 µl, conteve 10 mM de dNTPs (Invitrogen™), 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 160 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 µM de cada primer, 5U Taq DNA polimerase (Biotaq™ DNA Polymerase, Boline Ltd, U.K) e 50 ng de DNA cromossomal. A reacção foi coberta com 25 µl de óleo mineral (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Um controle negativo foi realizado para todas as etapas envolvidas. As reacções realizaram-se em um termociclador Veriti™ (Applied Biosystems). As condições de PCR consistiam em um passo inicial de desnaturação de três minutos a 94 C, seguidos de 25 ciclos de 30 seg a 94 C, 30 segundos   temperatura de annealing de 60 C e 30 seg a 72  C, e um passo final de extensão a sete minutos a 72  C. Os produtos de PCR foram purificados com o kit Purelink™ (Invitrogen™) e sequenciados com os mesmos primers usados na amplifica o. Todas as sequências obtidas foram submetidas a uma procura no Genbank com o algoritmo BLAST para identifica o das mesmas. O alinhamento das sequências foi gerado com o Clustal W v.1.83 implementado no programa BioEdit v.7.0.9.0. A sequência foi depositada no Genbank com o seguinte número de acesso JN200818.

### **Reconstru o das árvores filogenéticas da bactéria simbiote.**

A primeira árvore usada para a identifica o da espécie e subespécie da bactéria resulta de um alinhamento de 31 sequências de 16S rDNA. Após obter-

se a identificação da bactéria, uma segunda árvore, resultante de um alinhamento de 16 sequências de 16rDNA, foi reconstruída para se obter a informação de qual das estirpes dentro da subespécie identificada o isolado obtido a partir da linhagem LPP30 seria mais próximo.

Realizou-se análise filogenética com o método Bayesian. O modelo implementado em cada análise foi escolhido pelo método estatístico de informação teórica Akaike Information Criterion (AIC) no programa jModelTest v.0.1. Cada árvore Bayesian foi reconstruída com o programa MrBayes v3. 1.2., efetuaram-se simultaneamente duas corridas independentes para o número de gerações descrito. A cada 100 ciclos foram retiradas as árvores produzidas e eliminaram-se os primeiros 25% das gerações para se obter a árvore consenso. A robustez foi atingida através das probabilidades posteriores. Todas as árvores analisadas foram reconstruídas sem raiz. A representação gráfica das árvores resultantes foi feita com o programa MEGA v.4.1.

### **Potencial reprodutivo da linhagem LPP30**

O processo de multiplicação dos nematoides foi estabelecido para se determinar, qual a produção de juvenis por lagarta de *G. mellonella*. Um grupo de 30 lagartas vivas de 6º instar foi selecionado com peso variando entre 0.356 a 0,396 gramas/lagartas. Seguindo metodologia de WHITE (1927), o grupo de lagartas foi distribuído em uma placa de Petri forrada na parte inferior com papel filtro. Juntamente com as lagartas foi distribuída uma suspensão de 2 mL contendo 1000 juvenis de nematoides LPP30. A placa foi mantida em câmara climatizada a 26°C e umidade relativa de 80% pelo período de 10 dias. No 11º dia, foram observadas as lagartas que apresentavam sinais de infecção e do grupo foram selecionadas 15 lagartas.

Paralelamente foi montada 15 armadilhas, confeccionadas com placas de 5 cm de diâmetro, contendo no seu interior um anel de PVC, e uma fita de papel filtro de 5 x 1 cm dispostas no fundo. Em cada armadilha, foi colocada uma lagarta sobre o papel e na parte inferior de cada um foram depositados 10 mL de água destilada. Para se obter os valores prolíferos diários da linhagem LPP30 e o seu valor total, foram feitas cinco coletas com intervalos de 48 horas.

Utilizando uma pipeta para cada coleta, os 10 mL de suspensão contendo os juvenis, foram armazenados em garrafas de cultura de células de 50 mL de capacidade. A cada dia de coleta mais 10 ml de água era adicionado, e após a 5<sup>o</sup> e última coleta, as suspensões foram colocadas em um Becker com agito de uma bailarina, e cinco micro-alíquotas de 0.01 mL foram obtidas e depositadas em uma lâmina de vidro e observada em uma lupa com aumento de 20 vezes.

O número de nematoides obtidos, nessa alíquota foi então multiplicado por 10, e posteriormente por 10 novamente. Desta forma obtinha-se o valor total de cada dia de coleta. Após a avaliação de todas as amostras foi estabelecido à média de produção diária e o valor de produção final.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise filogenética permite visualizar a relação filogenética entre o nematoide LPP30 e 13 espécies do gênero *Heterorhabditis*. A sequência do nematóide *Steinernema carpocapsae* Weiser foi usada como “outgroup” na análise filogenética, possibilitando observar que o nematoide LPP30 se agrupa com *Heterorhabditis indica* Poinar N-MD10 formando um ramo com um valor de probabilidade posterior (PP) igual a 100 % e ao mesmo tempo é possível observar que o “outgroup” utilizado, margeia a análise filogenética, com tudo se distingue significativamente do clado onde se encontra o gênero *Heterorhabditis* (Figura-1).

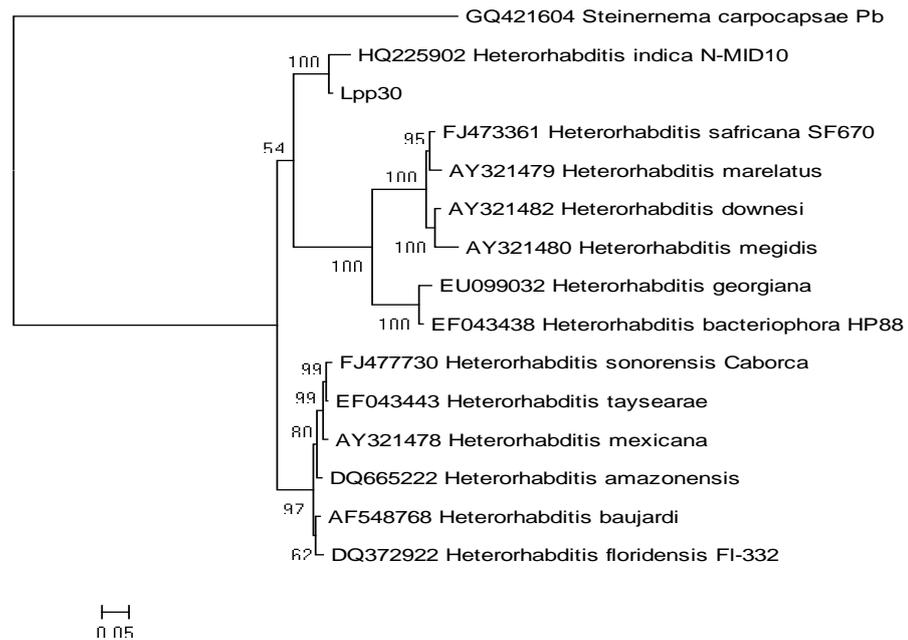


Figura 1. Árvore filogenética resultante do alinhamento do fragmento amplificado rDNA entre estirpes de várias espécies do nematoide do gênero *Heterorhabditis*, baseada em análise *Bayesian*. A barra indica a distância de 0,05 substituições por sítio.

Assim como a caracterização molecular da linhagem LPP30 uma pesquisa sobre nematóides entomopatogênicos no Vietnã produziu um grupo com vários isolados das quais três novas espécies foram descritas por PHAN *et al.* (2001). Em pesquisa realizada pelos mesmos autores, foi identificada uma nova espécie de *Heterorhabditis*, que foi trabalhada como sendo *H. bajardi* sp. A nova espécie foi separada das outras espécies de *Heterorhabditis* por diferenças na morfologia, morfometria e sequências ITS1 PHAN *et al.* (2001). Ao se utilizar a região 18S para o estudo comparativo com espécies já descritas e catalogadas no GeneBank, foi possível observar semelhança de 100% com quatro espécies pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* (Tabela - 1).

Tabela - 1 Contraste entre o fragmento 18S da linhagem LPP30, e acessos de linhagens já identificadas como *Heterorhabditis indica* disponíveis no Genbank.

Nº acesso	Nome da linhagem e fragmento usado	Maximo score	Probabilidade máxima
HQ225902. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -NMID-10	1498	100 %
GQ497737. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> - 95	1498	100 %
GQ497736. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -92	1498	100 %
GQ497735. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -41.1	1498	100 %
HQ225903. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -N-GPS09	1493	99%
HQ225858. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -N-MP11	1493	99%
GQ497734. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -181-3	1493	99%
GU130179. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -21-1	1493	99%
EU363041. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -SPMM7	1493	99%
FJ152545. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -SPS 2009	1493	99%
FJ935792. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -H02	1485	99%
AY321483. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -L Q2003	1485	99%
GQ477939. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -N-MP17	1482	99%
AY321483. 1	<i>Heterorhabditis indica</i> -CHEN-21	1482	99%

Depois de estudar sequências ITS1 (ADAMS *et al.*, 1998) concluíram que a divergência entre espécies apresentou uma alta semelhança, e que apenas o estudo molecular não era suficiente para a diferenciação entre as mesmas, sendo, pois necessário que a diferenciação fossem feitas com base em critérios morfológicos e biológicos.

Com base no trabalho de STOCK (1997) que estudou o grau elevado de ITS1 e falta de caracteres isomórfico, ADAMS *et al.* (1998) sugeriram que *H. indica* pode ser coespecífico com *H. hawaiiensis* Gardner e *H. bacteriophora* Poinar Jr coespecífico com *H. argentinensis* Stok. Ambos os estudos não revelaram diferenças em fragmentos de DNA estudados, o que leva a crer que apesar dos excelentes resultados obtidos por técnicas moleculares, ainda é extremamente importante que se use dados morfológicos para que se faça uma projeção segura da identificação do organismo em questão, mostram isonomia entre a linhagem LPP30 e outras linhagens estudadas da espécie *Heterorhabditis indica* (Tabelas 2, 3, 4).

Tabela 2. Dados morfométricos dos juvenis infectantes da linhagem LPP30 comparadas a diferentes isolados de *Heterorhabditis indica* identificados por POINAR (1992) e PHAN, (2003).

Caracteres	Linhagem LPP30	<i>H. indica</i> H. BB9	<i>H. indica</i> H.CP6	<i>H. indica</i> H.CP8	<i>H. indica</i> H.CP16	<i>H. indica</i> H.HS5	<i>H. indica</i> H. MP11	<i>H. indica</i> H. MP16	<i>H. indica</i> H. NT3	<i>H. indica</i> H. TN48	<i>H. indica</i> Poinar <i>et al.</i> , 1992
n	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
L	573±10 (556-589)	583±20 (547-643)	558±28 (490-614)	575±21 (538-619)	566±17 (511-600)	595±19 (557-626)	590±19 (550-624)	602±15 (578-636)	593±21 (542-638)	563±55 (348-622)	528±26 (479-573)
Maior diâmetro	21±0.64 (20-22)	21±0.9 (20-23)	19±0.9 (18-22)	20±0.7 (18-21)	20±1 (17-22)	20±0.7 (19-22)	20±1 (17-21)	20±0.8 (19-22)	21±0.5 (20-22)	20±0.8 (18-21)	20±6 (19-22)
Comprimento da cauda	97±3.42 (91-102)	99±4.9 (90-109)	96±5.6 (86-105)	98±5.9 (87-109)	96±3.5 (90-102)	101±3.7 (94-107)	98±3.9 (91+106)	100±4.7 (87-109)	100±4.6 (90-108)	99±6.9 (88-112)	101±6 (93-109)
Diâmetro do corpo na altura do anus	13±0.47 (13-12)	13±0.4 (12.5-14)	13±0.8 (11-14)	13±0.7 (11-14)	13±0.7 (11-14)	13±0.7 (12-15)	13±0.6 (12-14)	14±0.9 (11-16)	14±0.5 (13-14)	13±0.6 (11-14)	N/a
Dist. Entre extremidade anterior ao anel nervoso	82±3.26 (87-78)	82±2.4 (79-79)	82±3.4 (75-91)	87±6.1 (78-100)	81±3.7 (74-95)	85±4.1 (79-99)	85±3.2 (80-91)	85±3.7 (77-95)	83±2.4 (79-87)	83±4.5 (75-89)	82±4 (72-85)
Dist. entre extremidade anterior para poro excretor	98±2.67 (93-103)	97±2.4 (92-104)	95±3.5 (90-105)	100±4.8 (92-110)	97±4.8 (86-110)	99±5.0 (92-118)	99±3.4 (91-106)	102±4.3 (92-111)	98±2.8 (91-103)	96±4.6 (88-103)	98±7 (88-107)
Dist. entre extremidade anterior para base da faringe	116±2.21 (113-120)	117±3.1 (111-125)	112±2.4 (108-117)	115±2.2 (111-119)	112±2.4 (108-116)	117±4.5 (99-123)	118±2.8 (113-124)	119±4.4 (122-128)	118±3.2 (111-124)	117±5.4 (108-124)	117±3 (109-123)

Tabela 3. Dados morfométricos das fêmeas hermafroditas e anfimíticas da linhagem LPP30 comparadas a diferentes isolados de *Heterorhabditis indica* identificados por PHAN, (2003) e POINAR (1992).

Caracteres	Linhagem pp30		<i>H. indica</i> (Poinar <i>et al.</i> 1992)		<i>H. indica</i> Bong, Cucphuong, Ninhbinh PHAN 2003	
	Fêmeas Hermafroditas	Fêmeas anfimíticas	Fêmeas Hermafroditas	Fêmeas anfimíticas	Fêmeas Hermafroditas	Fêmeas anfimíticas
N 25						
L	3160 (3500-2546)	1765.6 (1887-1600)	2.700 (2.300-3.100)	1600 (1200-1800)	3647 (3105-4680)	1988 (1710-2385)
Maior diâmetro	127 (146-106)	105 (119-79)	132 (107-145)	95 (76-113)	225 (195-315)	141 (120-165)
Distância entre a extremidade anterior e o anel nervoso	111 (128-99)	102 (121-87)	115 (104-123)	92 (88-96)	114 (92-131)	90 (75-101)
Distância entre a extremidade anterior e o poro excretor	172 (187-164)	117 (141-99)	173 (163-187)	127 (118-138)	163 (119-197)	121 (105-136)
Distancia entre a extremidade anterior para a base do esôfago	185 (198-169)	130 (136-123)	172 (163-179)	131 (120-139)	183 (153-210)	139 (126-152)
Comprimento da cauda	106 (121-93)	74 (85-65)	92 (72-110)	76 (66-88)	99 (90-114)	87 (77-110)
Diâmetro do corpo no anus	46 (52-38)	31 (36-24)	44 (38-51)	26 (22-32)	49 (42-66)	32 (27-36)

Por outro lado, HOMINICK *et al.* (1997) atribuíram também importância aos caracteres morfológicos observados das fêmeas, uma vez que as hermafroditas e as anfimíticas apesar de apresentarem variações muito significativas em tamanho e largura do corpo, apresentam particularidades como tamanho e largura do ovo no corpo, posição da vulva, tamanho da cauda e as distancias entre a cabeça e o poro excretor, e entre a cabeça e a base do esôfago, são também importantes para avaliação taxonômica (Tabela 3).

Tabela 4. Dados morfométricos de machos de LPP30 comparados a diferentes isolados de *Heterorhabditis indica* identificados por PHAN, (2003) e POINAR (1992)

Caractéres	Linhagem LPP30	<i>H. indica</i> H. BB9	<i>H. indica</i> H.CP6	<i>H. indica</i> H.CP8	<i>H. indica</i> H.CP16	<i>H. indica</i> H.HS5	<i>H. indica</i> H. MP11	<i>H. indica</i> H. MP16	<i>H. indica</i> H. NT3	<i>H. indica</i> H.TN48	<i>H. indica</i> Poinar
N	25	15	15	15	15	15	15	15	15	15	12
Comprimento L	766±59 (638-841)	623±59 (550-715)	753±38 (708-847)	786±44 (703-838)	733±48 (638-823)	856±57 (761-936)	706±45 (631-818)	974±51 (929-1046)	815±44 (727-895)	689±81 (506-818)	721±64 (573-768)
Diâmetro do corpo	44±2 (41-47)	45±3 (38-48)	46±2 (43-50)	46±3 (38-50)	38±3 (34-41)	46±3 (38-50)	53±3 (46+58)	47±3 (38-53)	58±6 (53-79)	49±4 (49-4)	42±7 (35-46)
Diâmetro na altura do anus	20± (21-23)	24±2 (24-27)	20±1 (18-22)	26±2 (23-30)	20±2 (18-22)	20±1 (18-23)	18±1 (16-21)	17±1 (15-19)	20±1 (18-22)	24±1 (21-29)	23±1 (19-24)
Distância da cabeça ao poro excretor	85±4 (82-90)	89±6 (80-103)	90±4 (83-97)	92±6 (60-100)	66±5 (58-77)	79±5 (70-88)	86±5 (76-93)	69±5 (64-72)	92±4 (84-97)	71±5 (63-78)	123±7 (109-138)
Distância da cabeça e a base da faringe	97±2.7 (93-102)	101±3 (97-100)	98±3 (93-101)	109±4 (101-114)	94±3 (91-101)	95±6 (86-105)	94±3 (89-99)	99±3 (94-101)	102±3 (97-107)	95±6 (85-6)	101±4 (93-109)
Comprimento da cauda	30±1 (28-31)	30±3 (25-34)	31±3 (26-34)	32±3 (25-42)	31±2 (27-35)	29±3 (25-33)	31±3 (27-40)	30±1 (29-32)	32±2 (30-35)	34±5 (27-1)	28±2 (24-32)
Reflexo do testículo	-	85±7 (72-99)	70±2 (60-80)	99±11 (70-117)	72±13 (45-89)	82±10 (57-95)	82±9 (70-99)	123±14 (108-144)	93±9 (79-11)	97±13 (77-117)	91±26 (35-144)
Tamanho de espículas	-	36±3 (30-40)	36±3 (27-39)	38±3 (33-43)	35±2 (32-38)	38±2 (35-42)	37±3 (32-44)	40±3 (36-42)	43±2 (38-45)	39±3 (39-44)	43±3 (35-48)
Largura de espículas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Largura de gubernaculum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tamanho do gubernaculum	-	19±2 (16-22)	19±1 (17-21)	19±2 (19-23)	18±2 (16-22)	18±2 (16-21)	16±2 (16-21)	17±3 (13-19)	21±1 (19-23)	20±2 (17-24)	21±3 (18-22)

Após análise das variáveis morfométricas da linhagem LPP30, ficou evidenciado que as medidas obtidas apresentam similaridade com o trabalho de PHAN (2003), que avaliou nove linhagens e concluiu através de morfometria e análise molecular como sendo do grupo *indica*. STOCK e KAYA (1996) sugeriram que tanto o comprimento do corpo e comprimento da cauda dos juvenis é importante na discriminação de espécies.

Por outro lado STOCK e KAYA (1996) acenam para a importância do tamanho dos testículos do macho, largura do corpo, comprimento do esôfago e comprimento total que servem como parâmetros para a avaliação morfológica. No presente trabalho as medidas mostraram ser semelhantes e com variações dentro do esperado, no entanto assim como no trabalho de PHAN *et al* (2003), as medidas apresentam variações em relação a outras espécies já identificadas. Esse fator pode estar relacionado ao ambiente e a posição geográfica de origem da linhagem LPP30.

O estudo da morfologia do gubernáculo nos machos é um caráter que tem demonstrado consistência, devido à sua fidelidade morfológica ao longo do tempo, dando sustentação e embasamento às descrições de algumas das espécies que atualmente são estudadas tais como *H. baujardi*, *H. amazonensis*, *H. mexicana*, Nguyen *H. floridensis* Nguyen e *H. indica*. (DOLINSKI, *et al.*, 2008).

No entanto, esse tipo de estudo ainda carece de investigação mais detalhada em outras espécies descritas visando uniformizar as informações morfológicas de cada uma.

A identificação da bactéria foi realizada para confirmar sua inclusão no gênero *Photorhabdus*, uma vez que em testes preliminares foi comprovada emissão de fluorescência de isolados da bactéria. Um único par de primers, 16S-For/-Rev, foi suficiente para amplificar o 16S rDNA da bactéria do isolado LPP30, produzindo um filamento de 1.5 Kbp. Com o sequenciamento e o alinhamento dos fragmentos obteveram-se uma sequência de 1,499 pb. Após o alinhamento representativo das estirpes de comparação, pôde-se observar que a bactéria simbiote da linhagem LPP30 é encontrada entre as estirpes das espécies e subespécies do gênero *Photorhabdus* (Figura 2).

A (Figura-1), mostra ainda a relação entre o isolado originado da linhagem LPP30 e 14 estirpes de bactéria de *Photorhabdus luminescens* Akhurstii. A estirpe de bactéria de *Photorhabdus luminescens* laumondi foi usada como “outgroup”. Das 14 estirpes o isolado LPP30 apresenta um valor de PP de 85 com a estirpe EG2 (AY278644), sendo a segunda estirpe mais próxima a IND (AY278643) com um valor de PP de 99. Desta forma o isolado de bactéria aqui estudado corresponde provavelmente a espécie *Photorhabdus luminescens* akhurstii.

A relação filogenética entre a bactéria simbiote do nemas da linhagem LPP30 e três espécies do gênero *Photorhabdus* estão representadas por nove subespécies. (Figura 3). A espécie *Xenorhabdus nematophila* Poinar, foi usada como “outgroup” para a análise filogenética. O isolado de bactérias da linhagem LPP30 se encontra no cluster formado por estirpes de *Photorhabdus luminescens* Akhurstii, tendo uma probabilidade posterior (PP) de 100 com a estirpe IND (AY278643).

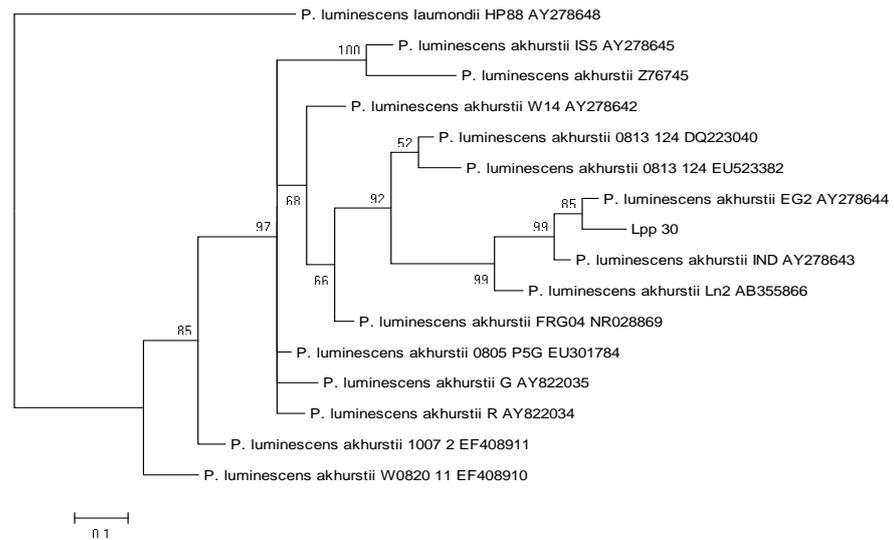


Figura 2. Árvore filogenética do alinhamento do 16S rDNA entre estirpes de várias subespécies de bactérias do gênero *Photorhabdus*, baseada em análise Bayesian. A bactéria do isolado LPP30 encontra-se no cluster compreendido pelas estirpes EG2 e IND. A barra indica a distância de 0,1 substituições por sítio.

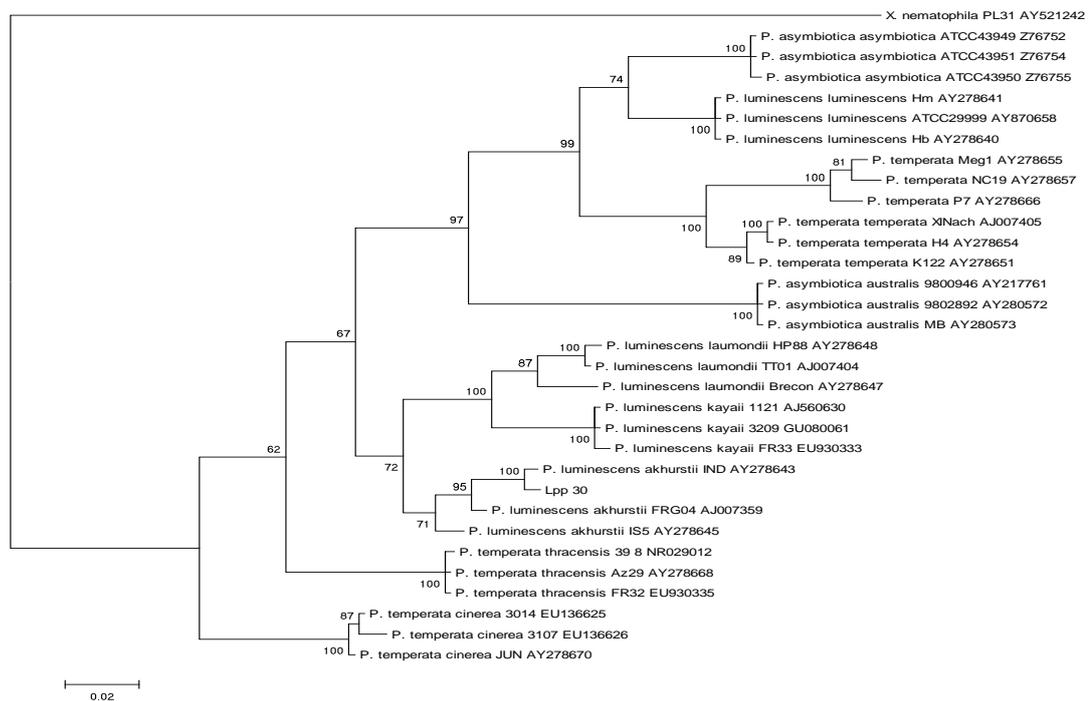


Figura 3. Árvore filogenética resultante do alinhamento do 16S rDNA, entre estirpes de várias espécies e subespécies de bactérias do gênero *Photorhabdus*, baseada em análise Bayesian. A bactéria do isolado LPP30 encontra-se no "cluster" compreendido por *Photorhabdus luminescens akhurstii*.

Para o estudo de identificação da linhagem LPP30, ficou evidente a necessidade de se utilizar as técnicas moleculares e morfológicas, uma vez que a região do genoma estudada depende grandemente do gênero do nematoide em questão, fator que pode direcionar a identificação para falsos resultados. LEE (2004) relata a necessidade de integração entre a taxonomia clássica envolvendo medidas morfométricas, e técnicas avançadas de diagnose. Em conclusão, as técnicas moleculares não devem ser consideradas de maneira isolada, como propôs TAUTZ *et al.* (2003), mas como ferramenta de auxílio para a segura e correta identificação da espécie.

### Progênie

Quando se estudou a capacidade produtiva da linhagem LPP30 foram obtidos valores diários e acumulados, demonstrando que a migração dos juvenis da parte interna para a parte externa da lagarta de *G. mellonella* teve início no 11º dia e se estende até o 21º dia. O primeiro, segundo e terceiro dia de coleta apresentou maiores produtividades de juvenis. Pode-se concluir que devido ao alto número de indivíduos dentro do hospedeiro e a provável escassez de alimento induz ao JIs a migrarem para a parte externa do hospedeiro em busca de alimento (Tabela 5).

Tabela 5 Produtividade de juvenis infectante (JIs) diária e total de *Heterorhabditis indica* linhagem LPP30 em lagarta de *Galleria mellonella* etapas um e dois.

Etapa 1		Etapa 2	
Coleta	Produção	Coleta	Produção
1	202.303	1	190.230
2	645.000	2	690.320
3	366.254	3	390.212
4	29.242	4	25.245
5	421	5	653
<b>Total</b>	<b>1.243,30</b>	<b>Total</b>	<b>1.296.660</b>

Observando a capacidade produtiva de *Heterorhabditis baujardi* DOLINSKI (2007) encontrou produções variando entre 100 e 150 mil juvenis infectantes por larva de *G. mellonella*, os quais são inferiores ao apresentado, no entanto ainda que o gênero de nematoides estudados sejam os mesmos, as espécies são distintas e as diferenças em termos produtivos podem estar relacionadas a diferenças na metodologia.

Avaliando a produção de juvenis infectantes de três linhagens de nematoides entomopatogênicos do gênero *Steinernema* em larvas de *Galleria mellonella*, ACEVEDO et al (2005) encontraram produções variando entre 27.000 e 37.000 mil juvenis durante um ciclo de 19 dias. Já a linhagem LPP30, apresentou um ciclo produtivo maior com 21 dias e a produção de juvenis foi superior quando se comparou com a produção total.

A discrepância em termos produtivos pode estar relacionada ao ciclo biológico de ambos os gêneros, pois o gênero *Steinernema* já na primeira geração produz fêmeas anfimíticas que dão origem aos juvenis, e por serem pequenas produzem menores quantidades, ao passo que no gênero *Heterorhabditis* a primeira geração da origem a fêmeas hermafroditas que chegam ao dobro de tamanho das fêmeas anfimíticas e por isso possuem uma capacidade produtiva superior, EHLERS, (2001).

MOLINA & LOPEZ (2002) testaram a capacidade produtiva de *Steinernema carpocapsae* em *Bombyx mori* L., *Galleria mellonella*, *Spodoptera frugiperda* Lepidoptera Pyralidae e *Tenebrio molitor* e, concluíram que uma produção máxima diária está relacionada com o tipo de hospedeiro obtendo uma produção máxima de 149.212 em três dias de coleta usando lagartas de *G. mellonella*.

De uma maneira geral *G. mellonella* tem sido adotada como modelo, quando o assunto é multiplicação *in vivo* e esta informação pode ser explicada pelo alto volume lipídico disposto na composição desta lagarta, que serve para alimentação e reserva dos juvenis infectantes provenientes das mesmas. GLAZER (2002) em outra pesquisa, ADAMS & NGUYEN (2002) afirmam que a produção de JIs é dependente de forma direta apenas do tamanho do corpo do hospedeiro, já que insetos hospedeiros de tamanhos maiores permitem um maior número de gerações tendo em vista a disponibilidade de alimento. Por outro lado

MOLINA *et al* (2004) demonstraram que não só o tamanho mas também as espécies de nematoides entomopatogênicos afetam a produção de JIs.

### CONCLUSÕES

- 1- A linhagem de nematoides entomopatogênico LPP30 pertence à Espécie *Heterorhabditis*
- 2- A bactéria simbiote desse nematoide pertence ao gênero *Photorhabdus* com indicativo de ser subespécie *Akhurstii*
- 3- A produção de JIs foi expresiva, quando multiplicado em lagartas de *G. mellonella*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, J. P. M., MOINO JR., A., CAVALCANTI, R. S., DOLINSKI, C., CARVALHO, F.A. (2005) Amostragem e avaliação de técnicas para isolamento de nematóides entomopatogênicos nativos obtidos em Lavras, Minas Gerais. *Nematologia Brasileira*, 29: 17-23.

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. BURNELL, A. M., POWERS, T.O. (1998) A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on Internal Transcribed Spacer 1 DNA sequence data. *Journal of Nematology*, 30: 22-39.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.

ALVAREZ I., WENDEL J. F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 29: 417-434.

ANDALÓ, V., NGUYEN, K. B., ALCIDES, M. (2006) *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology*, 8: 853-867.

BABIC, I., FISCHER, L. E., SAUX, M., GIRAUD, E., BOEMARE, N. E. (2000) Occurrence of natural dixenic associations between the symbiont *Photorhabdus luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. In: Tropical entomopathogenic *Heterorhabditis* spp. (Nematoda, Rhabditida). *Microbiology*, 146: 709-718.

BEDDING, R. A., AKHURST, R. J. (1975) A simple technique for the determination of insect parasitic Rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21: 109-110.

BENSON, D. A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J., WHEELER, D. L. (2008) "GenBank" *Nucleic Acids search* 36 (Database): D25-D30. [doi:10.1093/nar/gkm929](https://doi.org/10.1093/nar/gkm929). [PMC 2238942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2238942/). [PMID 18073190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18073190/).

CARDOSO D. O. (2011) *Revisão taxonômica dos gêneros Steinernema e Heterorhabditis (Rhabditida) a partir de 2005*. Monografia de conclusão de curso. Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 63p.

DOLINSKI, C. M., DEL VALLE, E. E., BURLA, R. S., MACHADO, I. R. (2007) Biological traits of two native brazilian entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematologia Brasileira*, 31:180-185.

DOLINSKI, C., KAMITANI, F. L., MACHADO, I. R., WINTER, C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 150-159.

EMELIANOFF, V. L. E., BRUN, N., PAGES, S., STOCK, S. P., TAILLIEZ, P. (2008) Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Herault and Gard (Southern France). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 211-217.

FABRE, J. V., JULIEN, J., PARISOT, D., DRON, M. (1995) Analysis of diverse isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting common bean using molecular markers. *Mycological Research Cambridge*, 99: 429-435.

FALEIRO, F. G., RAGAGNIN, V. A., MESQUITA, A. G. G., VINHADELLI, W. S., PAULA JÚNIOR, T. J., MOREIRA, M. A., BARROS, E. G. (1998) Genetic diversity of isolates of *Uromyces appendiculatus* with the aid of RAPD molecular markers. *Fitopatologia Brasileira*, 23: 386-390.

FISCHER-LE SAUX, M., VIALARD, V., BRUNEL, B., NORMAND, P., BOEMARE, N. (1999) Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescns* subsp. *Luminescens* subsp. nov., *P. Luminescens* subsp. *Akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperate* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 49: 1645-1656.

GRAUR, D., LI, W. H. (2001) *Fundamentals of molecular evolution*. 2. ed. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates Inc, 496 p.

GLAZER, I. (2002) Survival Biology. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic Nematology*. New Jersey: Rutgers University, p. 169-187.

HOMINICK, W. M., BRISCOE, B. R., DEL-PINO, F. G., HENG, J., HUNT, D. J., KOZODOY, E., MRÁČEK, Z., NGUYEN, K. B., REID, A. P., SPIRIDONOV, S., STOCK, P., STURHAN, D., WATURU, C., YOSHIDA, M. (1997) Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology*, 71: 271-298.

KAYA, H. K., STOCK, S. P. (1997) Techniques in insect nematology. *In*: Lacey, L. A. (Ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego, London: Academic Press, p. 281-324.

LEBUHN, M., ACHOUAK, W., SCHLOTTER, M., BERGE, O., MEIER, H., BARAKAT, M., HARTMANN, A., HEULIN, T. (2000) Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2207-2223.

LEE, M. S. Y. (2004) The molecularisation of taxonomy. *Invertebrate Systematics*, 18: 1-6.

TAUTZ, D., P. ARCTANDER, P., MINELLI, A., THOMAS, R. H., VOGLER, A. P. (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 70-74.

MOINO JR, A., SOARES F. M., SILVA M. A. T., MERTZ, N. R. (2011) Compatibilidade do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp. JPM 4 com produtos fitossanitários visando controle de *Quesada gigas* (Hemiptera: cicadidae). *Anais do Simpósio de Controle Biológico*, 126, Lavras-MG .

MOLINA, A. J. P., LÓPEZ, N.J.C. (2002) Producción *in vivo* de três entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes . *Revista Colombiana Entomológica*, 27: 73-78.

MOLINA, J. P. A., A. MOINO Jr, R. S., CAVALCANTI. (2004) Produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. *Arquivos do Instituto Biológico*, 71: 347-354.

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

PEREIRA, C. (1927) *Rhabditis hambletoni* n.sp. nema aparentemente semiparasito da broca do algodoeiro (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Arquivos do Instituto Biológico*, 8: 215- 230.

PHAN L. K., SUBBOTIN S.A., NGUYEN C. N., MOENS M. (2003) *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam with morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology*, 5: 367-382. p. 13

PHAN, Q. S., HA, M. T., HOANG, T. T., T RAN, K. L., MINH, T.D., HONG, T., BAU, L.N., CHAT, N.T., T UAT, N.V., VIEN, N.V., VAN, N.V. (2001). Survey and research yellow symptom disease and control on coffee in Dak Lak. *Vietnamese Ministry of Environment and T echnology*.

POINAR, G.O., 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: 467-472.

POSADA, D., CRANDALL, K.A. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

POWERS, T. O., TODD, T. C., BURNELL, A. M., MURRAY, P. C. B., FLEMING, C.C., SZALANSKI, A.L. ADAMS, B.A., HARRIS, T.S. (1997) The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology*, 29: 441- 450.

RONQUIST, F. (2003). Parsimony analysis of coevolving species associations., *In*: (RDM Page, ed.). *Tangled trees: Phylogeny, cospeciation, and coevolution* University of Chicago Press, Chicago. p. 22-64.

SEINHORST, J. W. (1959) A rapid method for the transference of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4:117-128.

STOCK, S. P., KAYA, H. K. (1996) A multivariate analysis of morphometric characters of *Heterorhabditis* species (Nemata: Heterorhabditidae) and the role of morphometrics in the taxonomy of species of the genus. *Journal of Parasitology*, 82: 806-813.

STOCK, S. P. (1997) *Heterorhabditis hepialius* Stock, Strong & Gardner, 1996 a junior synonym of *H. marelatus* Liu & Berry, 1996 (Rhabditida: Heterorhabditidae) with a redescription of the species. *Nematologica*, 43: 455-463.

TAMURA, K. DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.

TAVARES, F. M. (2010) Formulação de nematóides entomopatogênicos e fomento ao uso desses agentes para o controle biológico de pragas. Pesquisa Inovativa na Pequena e Micro Empresa - PIPE<http://www.bv.fapesp.br/pt/projetos-pipe/5770/formulacao-nematoides-entomopatogonicos-fomento-uso/>.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680.

WHITE, G. F. (1927) A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66: 302-303.

**INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES, TEMPERATURAS E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DE *Heterorhabditis indica* LPP30 NA MORTALIDADE DE LARVAS DO GORGULHO DA GOIABA**

**RESUMO**

O gorgulho da goiaba, *Conotrachelus pisidii*, é uma das principais pragas da goiaba, e nematoides entomopatogênicos vêm sendo utilizados com sucesso em seu controle. Apesar de alcançar altos índices de controle, existe a necessidade de se buscar linhagens mais adaptadas e mais patogênicas. *Heterorhabditis indica* LPP30 foi isolado de um goiabal e nesse trabalho seu potencial como controladora de larvas do gorgulho foi testado. No primeiro experimento foi avaliada a eficiência de juvenis infectantes (JIs) sob diferentes temperaturas (16°C, 20°C, 24°C, 28°C e 32°C) em unidades experimentais formadas por tubos tipo Eppendorfs contendo três larvas do gorgulho cada. Na menor temperatura testada (16°C) a mortalidade das larvas foi de 10%. Por outro lado nas temperaturas entre 20°C e 32°C foi possível observar as maiores mortalidades variando entre 50% e 100%. A eficiência dos juvenis infectantes em diferentes doses (0, 10, 100, 200, 450, 650, 850 e 1000 JIs/mL) sendo observado que existe uma correlação positiva entre a mortalidade e a dose de juvenis, com a mortalidade variando de 12% com 100 JIs a 100% usando 1000 JIs/unidade experimental. Ao se estudar a influência de diferentes tempos de exposição (1,

12, 24, 48, 60 e 72 horas) dos juvenis infectantes também em unidades experimentais, observou-se uma mortalidade crescente entre o menor tempo e o maior tempo com pico de mortalidade de 100% em 72 horas de exposição.

**Palavras-chave:** controle, *Conotrachelus psidii*, nematoides entomopatogênicos.

**INFLUENCE OF DIFFERENT DOSES, TEMPERATURES, AND TIME  
EXPOSURE OF *Heterorhabditis indica* LPP30 IN THE MORTALITY OF  
GUAVA WEEVIL LARVAE**

**ABSTRACT**

The *Conotrachelus psidii* weevil is a pest of guava, and can cause losses of 100% in a season. The entomopathogenic nematodes have been used successfully in your control. While achieving high levels of control, there is a need to seek ever more pathogenic strains. Indicates LPP30 *Heterorhabditis* was isolated in this study and its potential as a driver of beetle larvae was tested. In the first experiment was to evaluate the efficiency of infective juveniles (IJs) at different temperatures (16 ° C, 20 ° C, 24 ° C, 28 ° C and 32 ° C) with experimental units formed by three tubes containing eppendorfs weevil larvae each. The lower temperatures tested (16 ° C) larvae mortality was 10%. Moreover, at temperatures between 20 ° C and 32 ° C was observed the higher mortality ranging from 50% to 100%. The efficiency of infective juveniles at different concentrations (0, 10, 100, 200, 450, 650, 850 and 1000 IJs / ml) and also a correlation between mortality and amount of juveniles, mortality ranging from IJs 12% 100 to 100% using 1000 IJs / experimental unit. By studying the influence of different exposure times (1, 12, 24, 48, 60 and 72 hours) with the maximum mortality was 100% with time of 72 hours.

**Keywords:** control, *Conotrachelus psidii*, entomopathogenic nematodes.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo. Em 2008 obteve uma produção que superou 43 milhões de toneladas, dados que representam 5% da produção mundial. Com esse saldo, o país fica atrás apenas da China e da Índia. Existe hoje um mercado externo potencialmente acessível à fruticultura brasileira de 28,3 milhões de toneladas (IBRAF, 2010).

Dentre as frutas produzidas no Brasil tem-se a goiaba que é originária das Américas Central e do Sul e é caracteristicamente uma fruta tropical, porém altamente adaptável a vários tipos de clima. Além disso, é uma fruta que vem conquistando o paladar das famílias estrangeiras e brasileiras, por seu sabor agradável e suas propriedades nutritivas. É por esta razão que se observa o aumento no consumo interno e um crescimento das exportações nesta década (FREITAS, 2010).

Uma das principais pragas da cultura da goiaba é o gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), e juntamente com as mosca-das-frutas são capazes de devastar pomares de goiaba, afetando a qualidade dos frutos e o rendimento da cultura. Em sua fase jovem *C. psidii* danifica a polpa dos frutos, de onde migra para o solo se transformando em pupa e posteriormente em adultos (BAILEZ *et al.*, 2003).

O controle dessa praga pode ser feito de maneira preventiva, ao primeiro sinal de ataque, efetuando-se pulverizações com inseticidas fosforados. Esse controle é um dos métodos de controle do gorgulho. No entanto, apresenta sérios efeitos sobre organismos não alvos devido à contaminação da água, aos resíduos encontrados em alimentos e ao desenvolvimento de resistência em insetos-praga (BARBOSA e LIMA, 2010).

Os produtos biológicos têm sido desenvolvidos e empregados no Manejo Integrado de Pragas (MIP). Porém, a expansão do uso dos bioinseticidas é limitada por diversos fatores dentre eles: o desconhecimento da etiologia e epizootiologia das pragas, a influência dos fatores ambientais na eficiência dos entomopatógenos, o maior conhecimento dos agentes de controle e em relação à dificuldade de produção, em escala comercial, a custos competitivos em comparação aos inseticidas químicos em formulações comerciais (MOSCARDI, 2004).

Entre os vários métodos de controle existentes, o controle biológico utilizando nematoides entomopatogênicos (NEPs) tem apresentado bons resultados no controle de várias pragas da agricultura. DUNCAN *et al.*, 2003 testaram *Steinernema riobrave* no controle de *Diaprepes abbreviatus*; TOLEDO, (2005) testou *H. bacteriophora* no controle de *A. ludens*; DOLINSKI *et al.*, (2007) testaram *H. baujardi* no controle de *C. psidii*; TAVARES (2010) testou *Steinernema carpocapsae* no controle de *Bradysia mabiusi*. Esses nematoides são parasitas de insetos associados a bactérias simbiotes que causam morte da praga hospedeira por septicemia, no entanto, cada nematoide possui suas particularidades que favorecem sua utilização como controladores biológicos (KAYA & STOCK, 1997).

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência de concentrações, da temperatura e tempo de exposição de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* LPP30 e a sua influência mortalidade de larvas do gorgulho-da-goiaba em condições de laboratório.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção e multiplicação de *C. psidii*

Larvas de *C. psidii* no 4º instar foram retiradas de frutos provenientes de pomares localizados em Cachoeiras de Macacu, RJ. Juvenis infectantes foram multiplicados *in vivo* em lagarta de *Galleria mellonella* L. (Lepidóptera: Pyralidae), criadas com a metodologia de LINDEGREN *et al.*, (1993).

### Teste com concentrações de JIs

O experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com sete doses de JIs de *H. indica* LPP30: 10, 100, 200, 350, 650, 850 e 1000 e uma testemunha com dez repetições cada. Tubos de ensaio de 3 cm de diâmetro por 8 cm de altura. Os tubos foram esterilizados e preenchidos com 15 g de solo previamente autoclavado por 2 horas, seco em estufa a 100°C por 24 horas posteriormente foram umedecidos a 40% com água destilada. As suspensões com as concentrações de JIs a serem testadas de JIs foram obtidas utilizando-se o método volumétrico, onde eram depositadas 5 alíquotas com 10 µl cada de uma suspensão contendo JIs em uma lamina de Peters. O número de

juvenis foi então contado e somado, utilizando lupa com aumento de 20 X. E na suspensão inicial adicionou-se ou retirou-se água, visando-se obter os volumes nas concentrações desejadas.

Os tubos foram distribuídos com a dose do respectivo tratamento em bandejas de isopor com sustentação de alumínio. Três larvas do gorgulho da goiaba no 4<sup>o</sup> instar foram adicionadas a cada tubo. O controle seguiu os mesmos parâmetros usados para os demais tratamentos, porém sem a adição de JIs. Os tubos foram então fechados com filme plástico e levados para câmara climatizada 28°C com UR a 80%. (Figura 1). A avaliação da mortalidade das larvas do gorgulho nos tratamentos foi realizada 16 dias após o estabelecimento do experimento, retirando-se os tubos e observando a mudança de cor das larvas de *C. psidii*, cuja coloração quando está avermelhada, é indicativo de infecção por nematoides do gênero heterorhabditís.



Figura - 1. Esquema experimental para avaliação de diferentes concentrações de JIs de LPP30 na infectividade de larvas do gorgulho da goiaba *Conotrachelus psidii*.

## Teste com temperatura

O experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco temperaturas 16°C, 20°C, 24°C, 28°C e 32°C com 10 repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi constituída por 10 tubos Eppendorf preenchidos com 1,5 g de solo proveniente do sítio Aeroporto no km 51 localizado no município de Campos dos Goytacazes-Rj. O solo foi previamente autoclavado por 2 horas, seco em estufa por 24 horas e umedecido com água destilada a 40% na proporção 400 mL de água para 1 kg de solo. Os Eppendorfs foram distribuídos em fileiras de dez sobre folhas de isopor (2 cm de altura). Foi adicionado em cada tubo duas larvas no 4º instar de *C. psidii* e 0,3 mL de uma suspensão de água destilada contendo 450 JIs de *H. indica* linhagem LPP30. Os tubos foram mantidos em câmaras previamente reguladas nas temperaturas dos tratamentos e UR 80% com fotoperíodo de 12 horas.

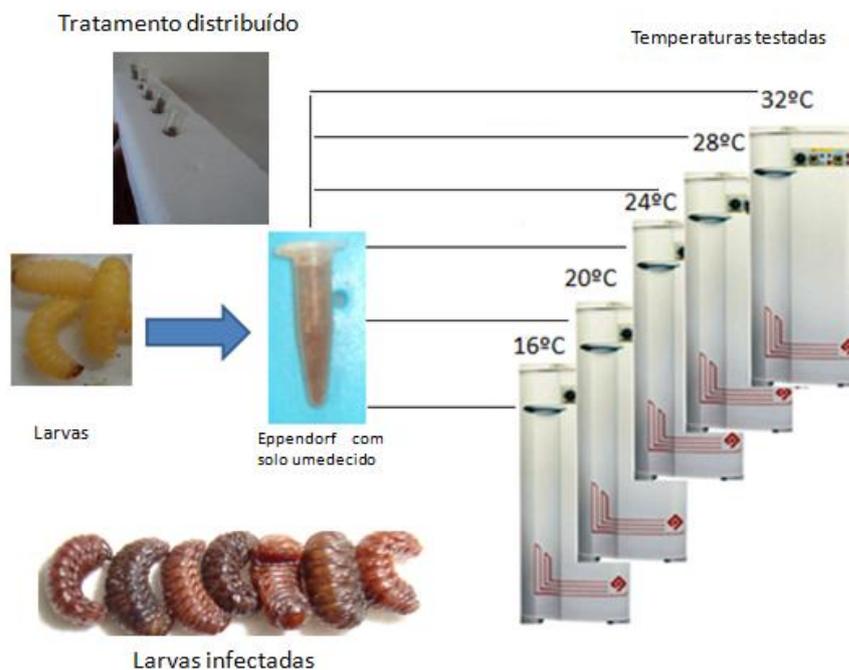


Figura – 2. Esquema experimental para avaliação de diferentes temperaturas na infectividade de larvas do gorgulho da goiaba *Conotrachelus psidii* por *Heterorhabditis indica*.

### **Teste com tempo de exposição**

Esse experimento foi montado com sete tratamentos representados pelos tempos de exposição das larvas de 4<sup>o</sup> instar de *C. psidii* a JIs de *H. indica* linhagem LPP30 sendo eles: 1, 12, 24, 48, 60 e 72 horas. Cada tratamento foi composto por 10 repetições, e cada unidade experimental foi constituída por três larvas de 4<sup>o</sup> instar de gorgulho as quais foram colocadas em tubos de ensaio de 3 cm de diâmetro por 8 cm de altura, previamente esterilizados e preenchidos com 15 g de solo coletado e preparado de forma idêntica ao descrito no item anterior.

O solo usado no experimento foi esterilizado em estufa a 100°C por 48 horas e posteriormente umedecido a 40% com água destilada na proporção de 400 mL de água destilada para um 1kg de solo. Aos tubos foram adicionados suspensões com 450 JIs. Quando então foram fechados com filme plástico e distribuídos em bandejas de alumínio forradas com isopor, quando posteriormente, foram levados à câmara climatizada regulada a 28°C e UR a 80%. Após cada tempo de exposição, as larvas foram transferidas para tubos estéreis e sem solo, porém identificados com o respectivo tratamento e armazenada em BOD a 28°C. A mortalidade das larvas de *C. psidii* nos tratamentos foi avaliada no 16<sup>o</sup> dia, retirando as larvas dos tubos e averiguando se possuíam cor avermelhada homogênea e odor característico.

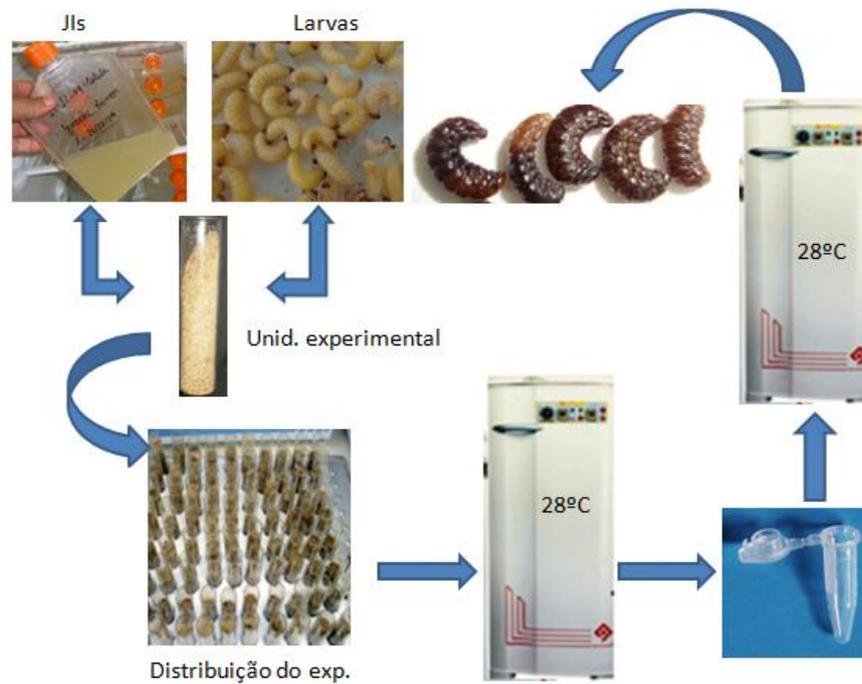


Figura - 3. Esquema experimental para avaliação de diferentes tempos de exposição na infectividade de larvas do gorgulho da goiaba *Conotrachelus psidii* por *Heterorhabditis indica*.

### Análise estatística

Todos os experimentos foram repetidos no tempo um ano após a realização do primeiro. Para cada variável analisada, foram feitas análises de variância e desdobramento em regressão, utilizando o programa SISVAR (2008) com probabilidade de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se fazer a análise de variância e de regressão para avaliar a influência de diferentes concentrações de juvenis infectantes da linhagem LPP30, foi possível observar que esse fator teve efeito significativo e correlação positiva entre as concentrações de JIs e o percentual de mortalidade das larvas do gorgulho apresentando  $F=124,5290$ ,  $gl=7$  e  $p<0,01$  (Figura 1). A dose 10 juvenis, mostrou-se a menos efetiva para o controle, no entanto foi possível observar que nas concentrações entre 100 e 1000 JIs a mortalidade variou entre 50% e 100%, (Figura 4 e 5)

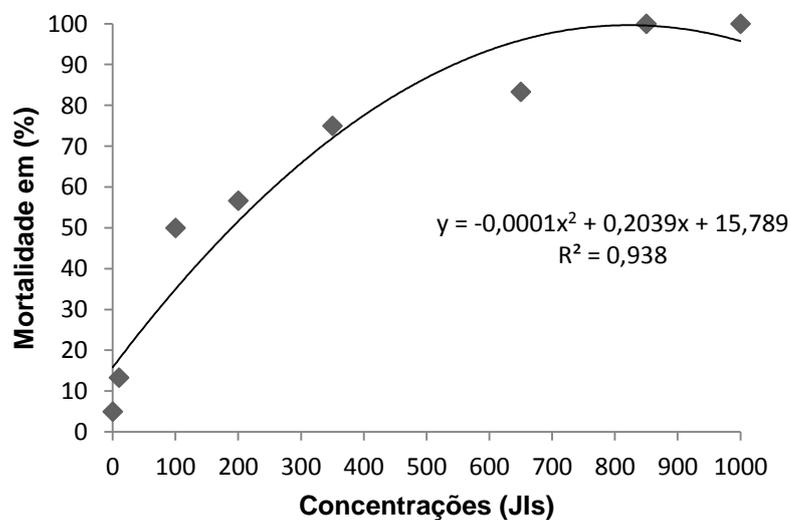


Figura 4. Relação entre as concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* linhagem LPP30 e a mortalidade das larvas *Conotrachelus psidii*.

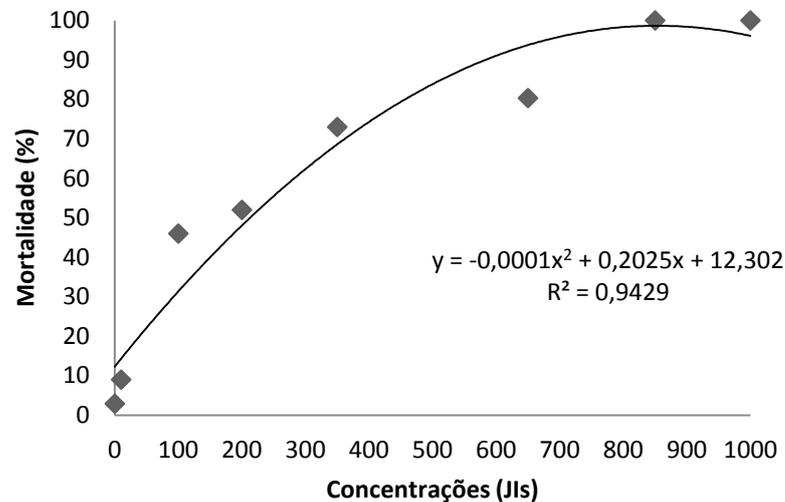


Figura 5. Relação entre as concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* linhagem LPP30 e a mortalidade das larvas *Conotrachelus psidii*.

Em pesquisa visando quantificar a importância da dose de juvenis, DEL VALLE *et al.*, (2005) encontraram mortalidade superior à de 80% das larvas de gorgulho quando adicionados 500 JIs de *H. baujardi* linhagem LPP7 por larva. Tal informação corrobora com as obtidas no presente trabalho, quando foi utilizada a dose 650 juvenis. No entanto, pode-se dizer que a linhagem LPP30 se mostrou superior, pois na dosagem de 650 JIs/ml conseguiu matar em média 83,33%, com unidades experimentais contendo três larvas.

Aplicando 1000 e 2000 JIs de *H. baujardi* linhagem LPP7 em suspensão aquosa DOLINSKI *et al.*, (2006) obtiveram 30 e 58% de mortalidade de larvas do gorgulho da goiaba, número inferior aos apresentados no presente trabalho, no entanto, as diferenças de metodologia e de material biológico usado podem justificar tal discrepância embora, por se tratar de linhagens pertencentes ao mesmo gênero de nematoide pode-se observar a superioridade da linhagem LPP30, entretanto em estudos subsequentes, DEL VALLE *et al.*, (2008) mediante o enterro de larvas de *G. mellonella* infectadas encontraram 51% de mortalidade e utilizando *H. baujardi* linhagem LPP7 contra larvas de *C. psidii*.

Avaliando a virulência dos nematoides entomopatogênicos *Steinernema brazilense*, *Heterorhabditis indica* e *Heterorhabditis sp.* IBCB n24 contra o gorgulho da goiaba CANESIN *et al.*, (2008) utilizando 50, 175 e 612 JIs/inseto encontraram mortalidades variando entre 22,4 e 31,4%, ao passo que quando testaram as concentrações 2000, 4000 e 6000 JIs/inseto encontraram mortalidades variando entre 76,7 a 83,3%. Comparando com os resultados obtidos no presente trabalho, utilizando a linhagem LPP30 observa-se que os resultados obtidos destoam nas pequenas concentrações, e mesmo em grandes concentrações os resultados são inferiores aos da presente pesquisa.

Avaliando a virulência de *H. bacteriophora* sobre larvas de *Anastrepha ludens* (Loew), TOLEDO *et al.*, (2005) encontraram mortalidade variando entre 47% e 76% utilizando 115 JIs/cm<sup>2</sup>. Em um estudo semelhante visando determinar qual a dose ideal de uma linhagem de nematoide, RODHE e MOINO Jr. (2007), testaram o controle de larvas de *Ceratitis capitata* wid (Díptera Tephritidae) utilizando *Steinernema carpocapsae* e obtiveram 99,49% de mortalidade sob dose de 274 JIs/larva e controle de 69,88% utilizando *Heterorhabditis sp.* RSC01 com a dose de 293 JIs/larva. Por outro lado, MINAS, (2008) testando concentrações de *Heterorhabditis baujardi* linhagem LPP7 no controle de larvas de mosca-das-frutas do 3º estágio obteve mortalidade de 100% utilizando 100 JIs por larva de *C. capitata*. LEITE *et al.*, (2003), conseguiram taxas de controle em torno de 80% da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar (*Mahanarva fimbriolata*) mediante a utilização do nematoide *Heterorhabditis sp.*, isolado CCA em condições de laboratório.

Os com *Heterorhabditis indica* LPP30 foram feitos em laboratório, porém, sabe-se que os NEPs possuem potencial para controle de pragas em campo, no entanto, deve-se considerar a dose em que os mesmos são aplicados (DEL VALLE *et al.*, 2008). Desta forma é importante conhecer o possível hospedeiro e seus hábitos, bem como a capacidade infectiva do nematoide entomopatogênico a ser utilizado.

Ao se estudar a capacidade de infecção dos juvenis de *H. indica* em função da temperatura, observou-se que esse fator é significativo e que exerce influência no percentual de mortalidade apresentando ( $F=40,855$   $gl=4$  e  $p<0,01$ ). (Figura 6). Na temperatura 16°C observou-se que a mortalidade das larvas de *C. psidii* não ultrapassou 10%, fator que está relacionado com a temperatura de

origem da linhagem LPP30, que possui uma amplitude maior. No entanto, nas temperaturas 20, 24, 28 e 32°C que são mais próximas da realidade do local de origem da linhagem LPP30 foi possível observar mortalidade variando entre 62% e 100%.

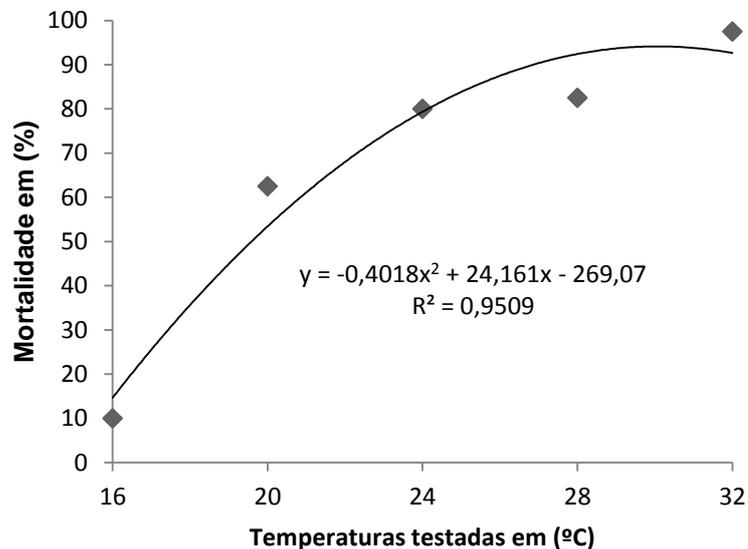


Figura 6. Relação entre mortalidade de larvas do gorgulho-da-goiaba utilizando por juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* linhagem LPP30 em diferentes temperaturas.

Os nematoides entomopatogênicos são extremamente dependentes da temperatura para sobreviverem no solo (GLAZER, 2002). E essa capacidade tem sido avaliada em diversos estudos: JAGDALE e GREWAL, (2003), TOMALAK *et al.*, (2005); ANDALÓ *et al.*, (2006); ROHDE, (2007); MINAS, (2008) sempre com a finalidade de selecionar isolados que possam estar adaptados às adversidades climáticas de cada região. Portanto, o estudo das melhores condições ambientais para os JIs, é importante para aumentar a persistência destes no solo e favorecer sua atuação no campo em programas de controle biológico.

A amplitude da temperatura, que conduz ao aproveitamento máximo das potencialidades dos NEPs como agentes de controle biológico é estreita e sua capacidade de infecção e persistência no solo é afetada em temperaturas superiores a 30°C ou inferiores a 15°C (KAYA, 1990). Semelhante ao descrito pelo autor foi observado no presente trabalho, dando um destaque para as temperaturas mais altas 28° e 32°, pois foi onde ocorreram as maiores taxas de mortalidade, variando entre 80% e 100%.

Tal resultado induz a pensar no simples fato de a linhagem LPP30 ser originária da cidade de Campos dos Goytacazes - RJ onde a temperatura oscila entre 28°C a 33°C durante todo o ano, influencia diretamente os aspectos biológicos da mesma, tornando-a mais eficiente nessa condição de temperatura. Contudo, em um trabalho visando a obtenção de temperaturas ideais de desenvolvimento, em condições de laboratório, DEL VALLE *et al.*, (2005) observaram, populações *H. baujardi* linhagem LPP7 tolerantes a partir de 30°C. Esta linhagem foi submetida à pressão de seleção e se mostrou mais virulenta a essa temperatura em relação à população original. Desta forma, pode-se afirmar que há intervalos de temperaturas ideais para cada espécie de nematoide.

Geralmente, a atividade inseticida dos NEPs é mais eficiente na faixa de temperatura entre 18°C e 28°C (AKHURST, 1986). Corroborando com essa afirmativa, pode-se observar a linhagem LPP30 nas temperaturas 20°C, 28°C e 32°C os nematoides demonstraram também maior eficiência patogênica (Figura 6). GLASER, (2002) informou em seu trabalho que juvenis infectantes de heterorhabditídeos são afetados por baixa temperatura, diminuindo a proporção de juvenis infectantes e a habilidade para procurar hospedeiros.

WESTERMAN, (1999) em testes de laboratório observou que na temperatura de 9°C *Heterorhabditis* sp. foi menos infectante a *Otiorynchus sulcatus* e a *G. mellonella* do que a 20°C. Esse fato para uma possível adaptabilidade em termos de temperaturas diferentes das vivenciadas do ambiente natural, mas que para cada nematoide, existe um limite mínimo e máximo dessa temperatura, onde sua virulência fica comprometida, informação que corrobora com o presente trabalho onde na temperatura 16°C a mortalidade não ultrapassou 15% (Figura 6).

### **Teste com tempo de exposição**

Quando foi avaliado o efeito tempo de exposição das larvas de *C. psidii* aos NEPs, foi observado que esse fator é significativo apresentando: ( $F= 88, 7390$   $gl=5$  e  $p<0,01$ ). (Figura 7) Para essa variável, foi possível observar que o aumento da mortalidade está relacionado com o aumento do tempo de exposição. O tempo de contato de uma hora causou apenas 10% de mortalidade, demonstrando, ser insuficiente para promover o controle, no entanto o comportamento da curva de

regressão em relação aos pontos, mostra que existe uma correlação positiva entre o fator tempo e o percentual de mortalidade. E que a partir de 12 horas de exposição, foi possível observar mortalidade variando entre 45% com 12 horas de contato e 100% com 72 horas de contato.

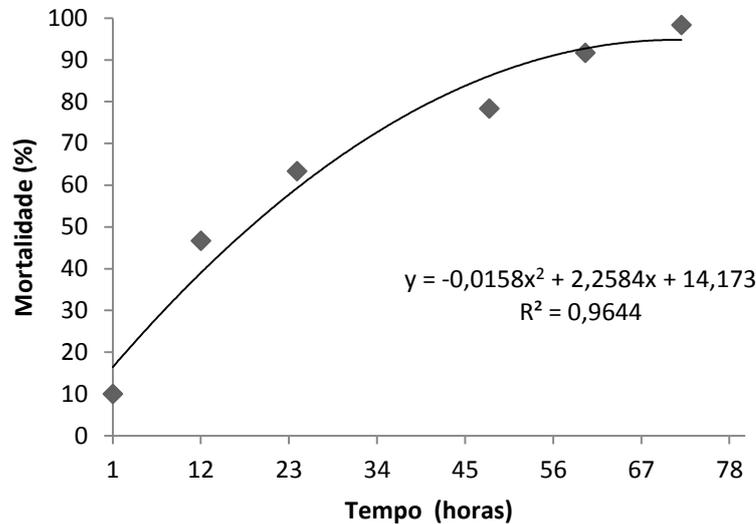


Figura - 7. Relação entre mortalidade e o tempo de exposição de larvas do gorgulho da goiaba a juvenis infectantes de *Heterorhabditis indica* linhagem LPP30.

O tempo de exposição JIs tem influência na mortalidade, fator que está relacionado com o estágio em que se encontra a larva, no caso de *Conotrachelus psidii*. TOLEDO *et al.*, (1999). De uma maneira geral, pode-se afirmar que entre isolados de nematoides entomopatogênicos ocorrem sensíveis diferenças no processo de busca pelo hospedeiro e tais diferenças estão ligadas ao método de penetração, estratégia de forrageio, busca morfológica e fisiológica, e influenciam na sua ação e eficiência (LEWIS *et al.*, 2006).

Nos tempos de exposição das larvas ao JIs de 62 e 72 horas foram obtidas as maiores mortalidades variando entre 90% e 100%. E por outro lado nos tempos de contato entre 1 e 12 horas, a mortalidade de 10% e 48% respectivamente, demonstrando que em um curto espaço de tempo pode haver o contato e o início da infecção, mais que este contato, deve se estender visando possibilitar o processo infectivo completo com a entrada do nematoide e liberação das bactérias.

Utilizado o nematoide *S. carpocapsae* contra *Dysmicoccus texensis* ANDALÓ *et al.*, (2004) encontraram mortalidade de 78% entre o terceiro e o

quinto dia após a aplicação do nematoide. Os resultados se assemelham aos obtidos com *Heterorhabditis indica* LPP30, com mortalidade de *C. psidii* variando entre 89% e 100%. O uso de *Heterorhabditis bacteriophora* no controle da cochonilha *Planococcus* sp causou 100% de mortalidade, em 48 horas RODRÍGUEZ *et al.*, (1997). Contrariamente a essa informação, o percentual de mortalidade 100%, só foi alcançado após o tempo de exposição de 72 horas. No entanto, essa diferença pode ser explicada pelo uso de hospedeiros distintos e ainda pela espécie do nematoide usado no controle.

Em um processo infectivo o índice de mortalidade do hospedeiro pode aumentar se este se encontrar em fase jovem, uma vez que o tempo de contato entre os nematoides e o hospedeiro se torna maior TOLEDO *et al.*, (1999). Tal afirmação pode ser confirmada, pois as larvas do gorgulho estavam no 4º instar, e o processo infectivo de contato foi iniciado mais cedo permitindo aos JIs um maior tempo de busca e penetração. DEL VALLE, (2004) utilizando *H. baujardi* linhagem LPP7 em testes com colunas de areia, relatou que o tempo em horas necessário para *H. baujardi* linhagem LPP7 causa mortalidade de 50 e 90% a larvas de *C. psidii* em 48 horas.

Observou-se que existe uma relação significativa entre as variáveis tempo de exposição e mortalidade. Isso permite afirmar que quanto maior o tempo disponível para tal ação maior será a eficiência em causar infecção ao hospedeiro. Assim pode-se dizer que os nematoides entomopatogênicos apresentam potencial para uso no controle biológico de larvas do Gorgulho-da-goiaba *C. psidii*.

## CONCLUSÕES

1- O fator concentração de juvenis infectantes demonstrou ser decisivo no percentual de mortalidade com destaque para a concentração 850 JIs responsável por 100% de mortalidade.

2- As maiores temperaturas 28°C e 32°C foram onde ocorreram os maiores índices de mortalidade com pico de 100%, ao passo que na temperatura 16°C o percentual foi bastante reduzido.

3- O tempo de exposição das larvas de *C. psidii* a juvenis de *H. indica*, influenciou na capacidade infectiva, demonstrando que 72 horas de contato é suficiente para que ocorra 100% de mortalidade de *C. psidii*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHURST, R.J. (1986) Controlling insects in soil with entomopathogenic nematodes. *in*: SAMSON R. A., VLAK, J. M., PETERS, D. (eds.) *Fundamental applied aspects of invertebrate pathology*. Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, The Netherlands, 82: p. 265-267.

ANDALÓ, V., MOINO JUNIOR, A., SANTA-CECILIA, L.V.C., SOUZA, G.C. (2004) Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). *Arquivos do Instituto Biológico*, 71: 181-187.

ANDALÓ, V., NGUYEN, K. B., MOINO JR, A. (2006) *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brasil. *Nematology*, 8: 853-867.

BAILEZ, O.E., BAILEZ, A.M.M.V., DE LIMA, J.O.G., MOREIRA, D.D.O. (2003) Life history of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. *Neotropical Entomology*, 32: 203-207.

BARBOSA, F.R., LIMA, M.F. (2010) A cultura da goiaba. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 180p.

CANESIN, A., LEITE, L.G., SCHMIDT, F.S., TAVARES, F.M., HONÓRIO, R.S., DELL, R. Virulência de nematóides entomopatogênicos contra pré-pupas do gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). Anais do XXII Congresso Brasileiro De Entomologia.

DEL VALLE, E.E. (2004) Avaliação e pressão de seleção de nematóides entomopatogênicos tolerantes a altas temperaturas visando o controle do Gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii*) Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 63p.

DEL VALLE, E.E., DOLINSKI, C., SOUZA, R.M., SAMUELS, R.I. (2005) Avaliação de Metodologias de Seleção para Tolerância a Elevadas Temperaturas em *Heterorhabditis baujardi* (Nematoda: Rhabditida). *Nematologia Brasileira*, 29: 207-214.

DEL VALLE, E.E., DOLINSKI, C.M., SOUZA, R.M. (2008) Dispersal of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied to the soil as infected host cadavers. *International Journal Pest Managament*, 54: 115 -122.

DOLINSKI C.M., DEL VALLE E.E., STUART, R.J. (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*, 38: 422-427.

DOLINSKI C., DEL VALLE E.E., STUART R.J. (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*, 38: 422-427.

DOLINSKI, C., E.E. DEL VALLE, BURLA, R.S., MACHADO, I.R. (2007). Biological traits of two native Brazilian entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Nematologia Brasileira*, 31: 180-185.

DUNCAN, L.W., GRAHAM, J.H., DUNN, D.C., ZELLERS, J, MCCOY C.W., NGUYEN, K. (2003) Incidence of endemic entomopathogenic nematodes following application of *Steinernema riobrave* for control of *Diaprepes abbreviatus*. *J. Nematology*, 35: 178-186.

EFRON, D., NESTEL, D., GLAZER, I. (2001) Spatial analysis of entomopathogenic nematodes and insect hosts in a citrus grove in a semi-arid region in Israel. *Environment Entomology*, 30: 254-261.

FERREIRA, D.F. (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, 6: 36-41.

FREITAS, G.A. (2010) Informe Rural Etene, Produção e área colhida de goiaba no nordeste, Ano IV Dezembro de 2010 AEPA Nº 24, p 18.

GLAZER, I. (2002) Survival Biology. *In: GAUGLER, R. (Ed). Entomopathogenic Nematology*. New Jersey: Rutgers University, p. 169-187.

GRANT, J.A., VILLANI, M.G. (2003). Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. *Environ. Entomology*, 32: 80–87.

INSTITUO BRASILEIRO DE FRUTAS (2010) Retrospectiva Analítica 2010 da Cadeia Produtiva das Frutas. São Paulo: Disponível em 27 de dezembro de 2011. <http://www.ibraf.org.br/>.

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

KAYA, H.K., STOCK, P. (1997) Techniques in insect nematology. *In*: LACEY, L. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. San Diego: Academic Press. p. 281-324.

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

KAYA, H.K. Soil ecology. *In*: GAUGLER, R., KAYA, H.K. (ed.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton: CRC, p. 93-111.

LEITE, L.G., MACHADO, L.A. AGUILLERA M.M., RODRIGUES, R.C.D., NEGRISOLI JR, A.S. (2003). Patogenicidade de *Steinernema* spp. E *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Rhabditida) à ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata*. *Revista Agrícola*, 78: 139-148.

LEWIS, E.D., CAMPBELL, J., GRIFFIN, C., KAYA, H., PETERS, A. (2006) Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 38: 66-79.

LINDEGREN, J.E., VALERO, K.A., MACKAY, B.E. (1993) Simple *in vivo* production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. *Journal of Nematology*, 25: 193-197.

MINAS, R. S. (2008) Potencial dos nematóides entomopatogênicos como agentes de controle biológico da mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro–UENF, 89p.

MOSCARDI, F. (2004) Situação atual e perspectivas de uso de entomopatógenos (vírus, fungos e bactérias). Disponível em: <<http://www.ferobio.ufv.br/relatorio/situaent.htm>>. Acesso em: 12 de abril de 2004.

RODHE, C., MOINO JUNIOR, A. (2007) Avaliação de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) para o controle da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Díptera: Tephritidae). Dissertação de Mestrado em Agronomia/ Entomologia – Lavras, Minas Gerais – Universidade Federal de Lavras, 74p.

RODRÍGUEZ, M.G., SÁNCHEZ, L., MARTÍNEZ, M., DE LOS, A. (2007) Efectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditidae: Heterorhabditidae) sobre *Chinches harinosas* del cafeto (Homoptera: Pseudococcidae). *Revista Proteccion Vegetable*, 12: 119-122.

SHAPIRO-ILAN D.I., GOUGE, D.H., PIGGOTT, S.J., FIFE, J.P. (2006) Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control*, 38: 124–133.

TOLEDO, A.J., PEREZ, C.M., LIEDO, P.Y.L. BARRA, (1999) Parasitismo de larvas de *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) por *Steinernema feltiae* (Rhabditidae: Steinernematidae): Efecto del tipo de suelo y profundidad del huesped. Memorias del XXXIV. Anais Congreso Nacional de Entomología Aguascalientes. México, p. 466-471.

TOLEDO, J., RASGADO, M.A., IBARRA, J.E., GÓMEZ, A., LIEDO, P., WILLIAMS (2005) T. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 15: 627-634.

TOMALAK, M., PIGGOTT, S., JAGDALE, G.B. (2005) Glasshouse Application. In: GREWAL, P.S., EHLERS, R.U., SHAPIROILAN, D.I. (eds.) *Nematodes as biocontrol agents*. Cambridge: CABI Publishing, p.147-166.

WESTERMAN, P.R. (1999) Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20° C and effects on efficacy. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 206-213.

## **MOBILIDADE, PERSISTÊNCIA E MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE *Heterorhabditis indica* LPP30 EM DOIS SISTEMAS DE CULTIVO**

### **RESUMO**

Os nematoides entomopatogênicos vêm sendo estudados como controladores de pragas de hábitos crípticos há muito tempo e avaliação de aspectos inerentes à sua biologia torna-se importante. Os objetivos do trabalho foram verificar a mobilidade dos juvenis infectantes (JIs) da linhagem LPP30 em função das larvas de *C. Psidii*, determinar qual a melhor técnica de aplicação dos juvenis e a persistência dos mesmos na presença e ausência de hospedeiro. Foram estabelecidas 5 distâncias a serem avaliadas em função de um ponto de soltura dos juvenis: 10, 25, 30, 45 e 60 cm. A locomoção foi avaliada, e a mortalidades de *C. psidii* em cada uma das distâncias foi observada. Valores de mortalidade entre 90% na área convencional e 100% na área orgânica nos primeiros 10 cm foram detectados. Para observar o potencial de deslocamento vertical da linhagem LPP30 nos dois sistemas de cultivo, foram testadas 10 repetições com 4 profundidades (5 cm, 10 cm, 15 cm e 20 cm) onde foi observado que nos primeiros 5 cm a eficiência dos juvenis infectantes é variável entre 87% na área convencional e 100% na área orgânica. Ao se avaliar a melhor técnica de aplicação dos nematoides visando controle das larvas de *C. psidii* em 5

tratamentos (meio líquido esponja embebida, lagartas infectadas, lagartas encapsuladas e uma testemunha). Observou-se que o meio líquido se destacou frente aos outros métodos com mortalidade variando entre 81% no sistema convencional e 83% no sistema orgânico. Ao se avaliar a persistência dos juvenis infectantes na presença do hospedeiro *Galeria mellonella*, observou-se que a opção hospedeiro disponível possibilitou a manutenção da população de juvenis constante e infectiva com mortalidade variando entre 80% na área convencional e 90% na área orgânica. Quando a avaliação foi feita visando observar a persistência dos JIs na ausência do hospedeiro, observou-se que a mortalidade variou entre 55% e 70% na área convencional e 65% e 80% na área orgânica na primeira avaliação aos 60 dias. No entanto, foi observada uma queda acentuada no final das avaliações com mortalidade próxima a 20% com 360 dias de avaliação. Dessa forma pode-se recomendar o uso da linhagem LPP30 como agente de controle biológico do gorgulho-da-goiaba *C. psidii*.

**Palavras-chave:** *Galeria mellonella*, *Conotrachelus psidii*, sistema de cultivo

## **MOBILITY, PERSISTENCE AND APPLICATION METHODS OF *Heterorhabditis indica* LPP30 IN TWO SYSTEMS**

### **ABSTRACT**

The entomopathogenic nematodes have been studied as pest controllers' cryptic habits over time and evaluate aspects of their biology becomes important. The objectives were to verify the mobility of infective juveniles (IJs) in the control strain LPP30 larvae of *C. psidii*, estimate the best technique and persistence of juveniles in the presence and absence of hosts. Was evaluated five distances provided with a release point of juvenile 10, 25, 30, 45 and 60 cm. The locomotion was evaluated, and the mortality of *C. psidii* was observed at each distance values with 90% mortality in the conventional and 100% organic in the first 10 cm were detected. To observe the vertical displacement of the line of LPP30 in two cropping systems were tested 10 repetitions with four depths (5 cm, 10 cm, 15 cm and 20 cm), where it was observed that the efficiency in the first 5 inches of infective juveniles and variable with mortality between 87% and 100% in the area

conventional and organic respectively. In assessing the best application technique for the control of larvae of *C. psidii* were used five treatments (foam liquid medium, the infected larvae, the larvae encapsulated and a witness). It was observed that the was highlighted liquid medium in relation to other methods with mortality rates ranging between 81% and 83% in system conventional and organic. In evaluating the persistence of infective juveniles in the presence of *Galleria mellonella*, it was noted that the option is available host enabled the maintenance of the population of infective juveniles constant with mortality rates that vary from 80% to 90% in the system conventional organic respectively. When the assessment was conducted to observe the persistence of the IJs in the absence of the host, it was found that mortality ranged between 55% and 70% in the conventional 65% and 80% organic in the evaluation in the first 60 days. However, there was a sharp drop at the end of evaluations with a mortality rate of about 20% after 360 time intervals. Thus, we recommend the use of strain LPP30 as a biological control agent of the weevil-Guava *C. psidii*.

**Keywords:** *Galleria mellonella*, *Conotrachelus psidii*, culture system.

## INTRODUÇÃO

A goiabeira (*Psidium guajaba* L.) é uma cultura que oferece bons resultados, comerciais no mercado interno, e também, no mercado externo, apresenta boas perspectivas de negócios com a América do Norte, Dinamarca, Canadá, Suécia, Holanda, Alemanha e, principalmente, Inglaterra e França que já vêm importando goiabas brasileiras para o consumo “*in natura*”. (CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS, 2010). Essa é uma das culturas de maior importância e potencial de crescimento da fruticultura nacional, (FREITAS, 2010). O cultivo vem adquirindo grande destaque no setor econômico da fruticultura no Brasil, constituindo-se no principal produtor comercial de goiabas vermelhas do mundo (FNP CONSULTORIA & COMERCIO, 2008).

Várias pragas atacam a cultura da goiaba e entre elas o gorgulho da goiaba, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), é a principal praga dos pomares, pois afeta a qualidade dos frutos e, por conseguinte, o rendimento da cultura podendo causar perdas de 100%. Esta praga passa por distintos estágios e o estágio larval é o que causa maiores danos e, por consequência, é o estágio que apresenta maior dificuldade de ser controlado por métodos químicos convencionais devido à sua localização dentro dos frutos e no solo (CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS, 2010).

Os defensivos agrícolas são eficientes contra os mais diversos tipos de pragas, no entanto, são necessárias aplicações repetidas, o que representa grandes quantidades lançadas no ambiente e um alto custo. Esses produtos químicos podem propiciar uma alta produtividade, mas podem ter efeitos negativos sobre o solo, o clima, a vegetação, as águas, os animais e o homem, provocam a seleção de resistentes, resultantes, pressão, seleção (WILLER e YUSSEFI, 2007).

Nematoides entomopatogênicos podem ser uma alternativa no controle de *C. psidii* cuja utilização poderá desencadear uma estratégia mais racional de combate a esta praga (DOLINSKI *et al.*, 2006). Diferentes trabalhos têm sido feitos, visando avaliar a capacidade de locomoção, a persistência no solo e a melhor maneira de se aplicar nematoides entomopatogênico no controle de pragas, visando uniformizar seu uso (GLAZER, 2002, LEITE, 2007, DEL VALLE, *et al* 2008, DOLINSKI 2010).

A capacidade de locomoção dispersiva horizontal e vertical de JIs de nematoides entomopatogênicos pode ser estudada visando determinar a sua eficiência como agente de controle biológico, (JANSSON *et al.*, 1993). A tecnologia de aplicação de nematoides como agentes de controle biológico tem sido pesquisada, contudo o principal método de aplicação tem se resumido à pulverização, (GREWAL, *et al.*, 2005). E os nematoides entomopatogênicos são extremamente dependentes da quantidade de lipídios armazenada no seu organismo para sobreviverem no solo por longos períodos (PATEL & WRIGHT, 1997)

Desta forma o objetivo do trabalho foi avaliar a mobilidade dos juvenis infectantes de *H. indica* linhagem LPP30 na posição vertical e horizontal, a persistência no solo na presença e ausência do hospedeiro *Galleria mellonella*, e também avaliar uso de diferentes técnicas de aplicação desses juvenis, em dois sistemas de cultivo no controle do gorgulho-da-goiaba.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Teste de deslocamento longitudinal do NEPs

O presente trabalho foi conduzido em dois pomares comerciais de goiabas nos sistemas (convencional e em conversão para orgânico), localizados no Sítio Aeroporto km 51, no município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro.

Para o estabelecimento do experimento 1, foram selecionadas uma parcela contendo 10 árvores de goiaba com ausência física de sintomas de doença em cada um dos pomares. Larvas de 4<sup>o</sup> instar de *Conotrachelus psidii* foram coletadas no campo em frutos *in natura* na cidade de Cachoeiras-do-Macacu Rj e mantidas viáveis em pedaços maduros de goiaba. Utilizando frascos de cultura de células com capacidade de 200 mL, foram estabelecidos 20 volumes com 100 mL de água destilada de uma suspensão contendo 20.000 juvenis por mL totalizando dois milhões de juvenis por garrafa.

As árvores dos dois sistemas foram marcadas com uma sacola plástica amarrada na base visando determinar a localização das mesmas, dentro dos pomares. Dez calhas de cano PVC de 75 mm com dimensões de 90 cm foram cortadas e enterradas a 45 cm da base de cada árvore, sendo posteriormente

preenchidas com solo. Sobre o solo de cada calha foram feitos cinco grupos de cinco orifícios com 1 cm de diâmetro, distantes do ponto inicial de soltura dos JIs: (10, 25, 35, 45 e 60 cm) no sentido longitudinal. Dentro de todos os orifícios e em todas as árvores foram depositados individualmente um tubo tipo Eppendorf contendo três larvas de 4<sup>o</sup> instar de *C. psidii*.

Foram feitas cinco avaliações do percentual de mortalidade com intervalos de 7 dias. Os tubos foram retirados e as larvas observadas se haviam sintomas de infecção, caracterizada pela cor avermelhada que é típica da infecção por heterorhabditídeos. Com o resultado positivo ou não de infecção, os mesmos eram retirados das calhas para evitar a reciclagem. Para efeito de contagem do deslocamento dos nematoides, foram considerados os índices de mortalidade nas distâncias percorridas, sendo os dados do experimento anotados para posterior análise estatística.(Figura 1)

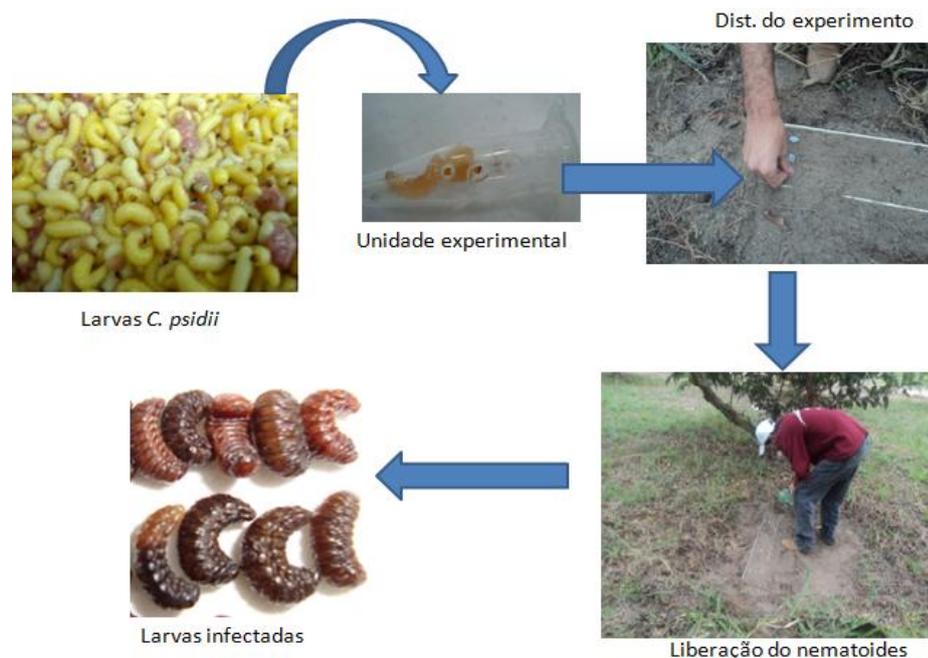


Figura – 1. Esquema do experimento que avaliou a mobilidade longitudinal dos JIs de *Heterorhabditis indica* LPP30 em função de larvas de *C. psidii* utilizadas como atrativo no sentido horizontal.

### Teste de deslocamento vertical

A segunda parte desse experimento foi feita visando observar a capacidade de deslocamento de *Heterorhabditis indica* linhagem LPP30 em sentido vertical em busca do hospedeiro. 20 Tubos de PVC, com 30 mm de

diâmetro, foram cortados em pedaços simétricos de 30 cm, em cada pedaço foram feitos quatro furos de 1cm de diâmetro com espaçamento de 5 cm entre eles, utilizando-se uma furadeira Bosch.

Nos furos de cada cano, foi colocado um tubo Eppendorf com três larvas de *C. psidii*. Posteriormente os tubos foram preenchidos com solo, e enterrados a 50 cm de distância de cada árvore, nos sistemas convencional e em conversão para orgânico e sobre eles depositado individualmente, uma suspensão com 50 mL de suspensão contendo 20.000 JIs/mL totalizando 1 milhão de JIs. Após 15 dias, os tubos foram desenterrados, e os dados de mortalidade nas distintas profundidades anotados em uma planilha. (Figura 2)

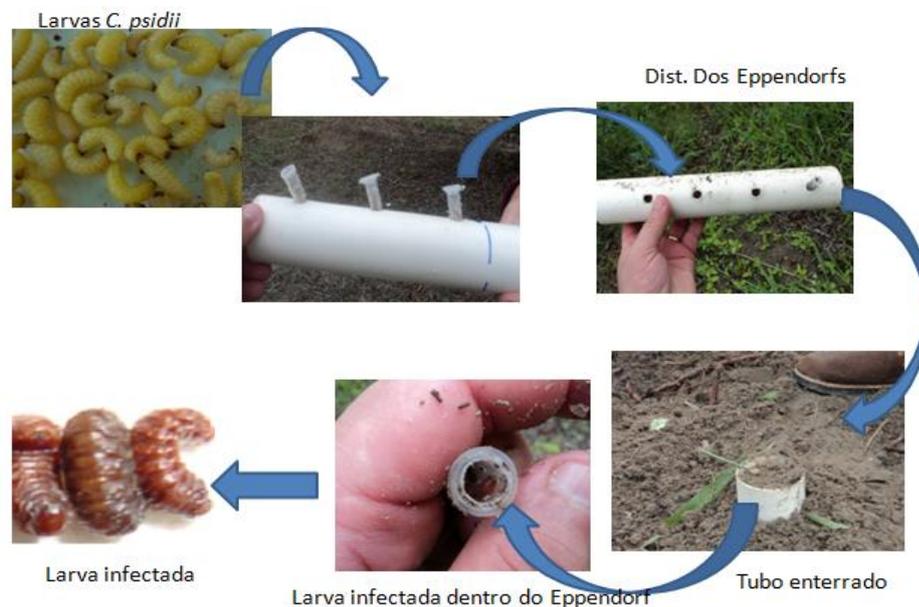


Figura – 2. Esquema do experimento que avaliou a mobilidade vertical dos JIs de *Heterorhabditis indica* LPP30 em função de larvas de *C. psidii* utilizadas como atrativo.

### Teste com formulações de juvenis

O experimento foi montado seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos representados pelas formulações: (suspensão aquosa, esponja embebida com juvenis infectantes, lagartas de *Galeria mellonella* infectadas com juvenis, lagartas infectadas com juvenis e recobertas com cápsula de gelatina e uma testemunha).

Para o estabelecimento do experimento 1.200 lagartas de *G. mellonella* foram infectadas com *Heterorhabditis indica* linhagem LPP30 e após a constatação da infecção foram separadas somente as lagartas que realmente apresentavam coloração avermelhada típica. Posteriormente, foram montados 5 grupos distintos: No grupo 1, 100 lagartas infectadas foram submetidas à armadilha de White, (1927), para uso dos juvenis em meio líquido. No grupo 2, 100 lagartas foram submetidas à armadilha de (White, 1927), no entanto os juvenis infectantes foram utilizados na confecção do meio utilizando esponjas de poliuretano. No Grupo 3, 100 lagartas infectadas foram recobertas com cápsulas de gelatina. No Grupo 4, 100 lagartas foram mantidas na forma infectada. E no grupo 5, 100 lagartas *G. mellonella* sem estarem infectadas foram separadas e utilizadas como testemunha.

De posse de cada formulação, as mesmas foram levadas ao pomar de goiabas em “conversão para orgânico”, onde um grupo de 25 árvores foi selecionado, e no solo embaixo de cada árvore foram feitos 5 furos (10 X 10 cm) em média distantes entre si 0,75 m. Dentro de cada um dos furos, foram colocados três Eppendorfs, com três larvas de 4<sup>o</sup> instar de *C. psidii*. No primeiro grupo de cinco árvores, foram distribuídos também dentro de cada um dos furos 6,5 milhões de JIs em média utilizando uma suspensão de 300 mL de água destilada, aplicados com um pulverizador (Jacto 3,5 litros). No segundo grupo de cinco árvores, foram enterrados dois pedaços de esponja de (6 x 6 cm) embebidos em 150 mL de água com 6,5 milhões de JIs. No terceiro grupo de árvores foram enterradas cinco lagartas infectadas de *G. mellonella* recobertas com uma cápsula de gelatina em cada furo. No quarto grupo foram colocadas 5 lagartas infectadas e no quinto grupo foram enterradas junto a cada furo 5 lagartas de *G. mellonella* sem infecção que serviram de testemunha. O mesmo procedimento metodológico foi repetido no grupo de 25 árvores disponível na área convencional. Está metodologia foi realizada pela primeira vez em janeiro de 2010 e repetida em fevereiro de 2011. (Figura 3)



Figura- 3. Esquema do experimento que avaliou metodologias de aplicação de JIs de *H.indica* LPP30 no controle de larvas de *C. psidii*.

### Teste de persistência na presença de hospedeiro

O experimento foi realizado em campo também no sistema em conversão para orgânico e no sistema convencional. Para o estabelecimento do mesmo, um grupo de 200 lagartas 5º instar de *G. mellonella* de, foi infectado com juvenis da linhagem LPP30 de *Heterorhabditis indica*. Um trado, foram feitos dois furos de 10 X 5 cm no solo a 50 cm da base de dez plantas de goiaba no sistema orgânico, e dez no sistema convencional de cultivo.

Utilizando uma pinça, foram distribuídas 10 lagartas infectadas com juvenis em cada furo. O local foi marcado amarrando-se uma sacola plástica nas árvores utilizadas, e a cada 30 dias novos grupos de 200 lagartas foram distribuídos de maneira semelhante, no entanto os novos grupos não estavam infectados. Para facilitar a avaliação, as lagartas foram colocadas individualmente em Eppendorfs, visando à identificação da infecção ocorrida no campo e a reciclagem da população mediante a opção de hospedeiro disponível.

Após a constatação da infecção pelo nematoide, as lagartas eram retiradas dos tubos Eppendorf e colocadas no solo, distante 10 cm de onde foram depositadas anteriormente e novos grupos de lagartas foram colocados seguindo

metodologia supracitada. Tal procedimento foi repetido por 12 intervalos de 30 dias no ano de 2008 e repetido de forma idêntica em 2009.



Figura- 4. Esquema do experimento que avaliou a persistência dos JIs de *Heterorhabditis indica* LPP30 no solo em função da presença do hospedeiro *G. mellonella*.

### Teste de persistência na ausência de hospedeiro

Uma segunda etapa do experimento foi feita utilizando-se a mesma metodologia do experimento anterior quanto ao número de lagartas e árvores. E com adição de novas lagartas a cada 60 dias. Após a avaliação observando a infecção, as mesmas eram retiradas e levadas ao laboratório visando evitar a reciclagem dos nematoides. Os experimentos foram realizados na primeira etapa em 2009 totalizando 12 meses de observação e repetidos integralmente em uma segunda etapa no ano de 2010 com mais 12 meses de observação.

### Análise estatística

Para o experimento um e três foi feita análise de variância e desdobramento por regressão para o experimento envolvendo técnicas de aplicação, também foi feita a análise de variância, e posteriormente o teste de Tukey a 5%. SISVAR, (2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Teste deslocamento longitudinal

Após capacidade dispersiva longitudinal dos juvenis da linhagem LPP30, em função dos sistemas de cultivo da goiabeira foi significativa no sistema convencional apresentando ( $gl=4$ ,  $F=40.6360$ ,  $p<0.01$ ) e no sistema orgânico ( $gl=4$ ,  $F=41.6090$ ,  $p<0.01$ ). A fonte de variação analisada foi desdobrada por regressão, sendo o modelo quadrático o que melhor explicou a mortalidade em função da distância nos dois sistemas.

A mortalidade variou entre 90% e 100% nos primeiros 10 cm, resultado que pode estar relacionado à maior quantidade de indivíduos infectivos que chegaram às larvas e as infectam. Por outro lado foi possível observar na curva de regressão que o percentual de mortalidade diminui à medida que a distância aumenta com mortalidades de 53% na distância 60 cm do ponto inicial. Dando um indicativo que durante o processo de locomoção, fatores externos tais como: temperatura do solo, umidade, dissecação da cutícula ou esgotamento das reservas impedem os JIs de serem tão eficientes como nos primeiros centímetros.

Ao se observar eficiência infectiva dos juvenis nos dois sistemas foi observado que existe semelhança, no entanto, o percentual de mortalidade na

área orgânica foi superior com destaque para os primeiros 10 cm apresentando 100% de mortalidade na área orgânica e 91% na área convencional. (Figura 5).

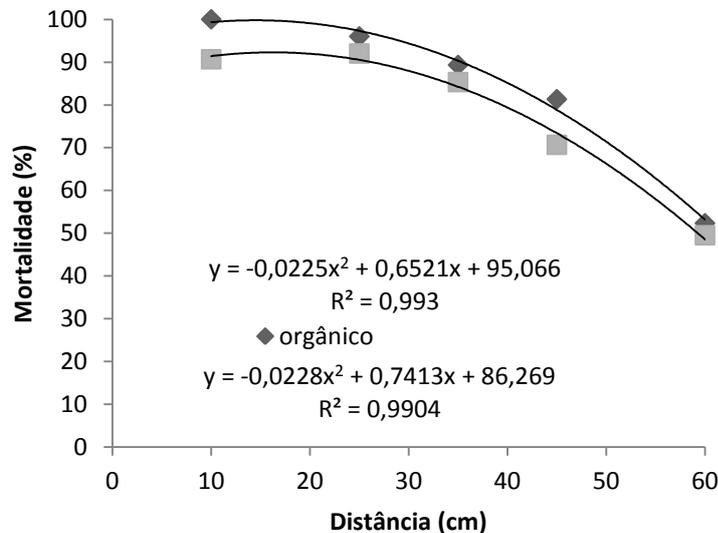


Figura 5. Locomoção horizontal de juvenis da linhagem LPP30 em diferentes distâncias, no eixo (Y) mortalidade em (%) de larvas de *C. psidii* utilizadas como atrativo. No eixo (X) a distância percorrida nos dois sistemas de cultivo.

DEL VALLE *et al.*, (2008) em trabalho visando medir a capacidade dispersiva horizontal de *Heterorhabditis baujardi* linhagem LPP7 observaram a presença de juvenis infectantes a uma distância de 90 cm do ponto de soltura 5 semanas depois de iniciar o experimento. No presente trabalho os resultados seguem a mesma tendência, tendo a linhagem LPP30 demonstrado a capacidade de locomover-se por 60 cm ao fim de 35 dias.

Em avaliação sobre o deslocamento horizontal de *S. carpocapsae* observaram que ocorre uma maior mobilidade lateral quando os JIs se movimentavam em substratos com textura arenosa GEORGIS e POINAR (1983). Esse pode ser um fator interessante para se determinar no ambiente ao se aplicar o nematoide, pois o ambiente onde foi desenvolvido o experimento tem características arenosas. No entanto, é interessante salientar que as maiores mortalidades foram encontradas na área em conversão para orgânica atingindo o máximo de 100%.

PORTILLO-AGUILAR *et al.*, (1999) estudando a locomoção horizontal de *Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis sp. H. bacteriophora*, e *Steinernema glaseri* verificaram que essas espécies apresentaram maior eficiência na

locomoção em solos arenosos e justificaram que os espaços entre as partículas do solo facilitavam o processo de locomoção.

Utilizando dosagens superestimadas de 2 milhões de juvenis por repetição, foi observado que o desempenho foi bastante satisfatório com mortalidade variando entre 91% e 100% nos primeiros 10 cm, nas áreas convencional e em conversão para orgânica, respectivamente. Segundo SMITS, (2001) a dispersão é maior quando os JIs estão em altas densidades e quando são mais jovens. Esse acontecimento pode estar relacionado com o fato dos juvenis, geralmente terem mais reservas, e um grande número populacional possibilita maiores chances de sucesso de algum membro da população chegar ao alvo hospedeiro.

### **Teste deslocamento vertical**

Ao realizar análise de variância visando entender a interação da variável deslocamento vertical em função do sistema de cultivo, foi possível observar que essa fonte de variação é influenciada em função do sistema apresentando ( $F=33, 2570, gl=3$  e  $p<0.01$ ) no sistema convencional e ( $F=26, 5640, gl=3, e p<0.01$ ) no sistema orgânico. Desta forma as variáveis estudadas foram desdobradas em análise de regressão sendo o modelo linear capaz de explicar o comportamento. Para essa mesma análise, foi observado que a mortalidade é maior nos primeiros 5 cm de solo, com mortalidade variando entre 83% e 100% nas áreas convencional e orgânica quando o experimento foi realizado em 2008 (Figura 6), e com resultados variando entre 90% e 100% na repetição do experimento no ano de 2009 (Figura 7).

No mesmo experimento, observou-se a queda da mortalidade proporcionalmente ao aumento da profundidade do solo, o que pode estar relacionado com a diminuição do oxigênio devido à densidade do solo que é menor nas camadas inferiores e também pelas reservas nutricionais que são esgotadas no processo de busca do hospedeiro (Figura 6 e 7).

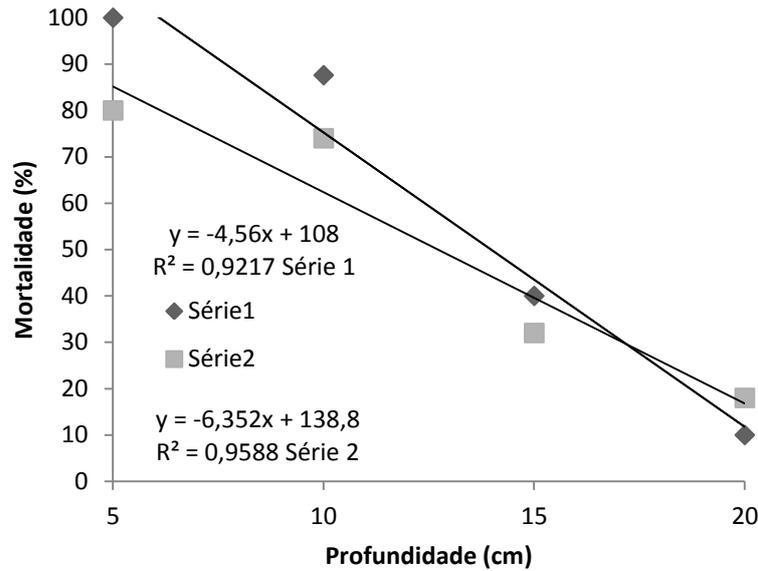


Figura - 6. Locomoção vertical de juvenis da linhagem LPP30. Em função da mortalidade de larvas de *C. psidii* utilizadas como atrativo no sentido vertical em dois sistemas de cultivo convencional e orgânico no ano de 2008.

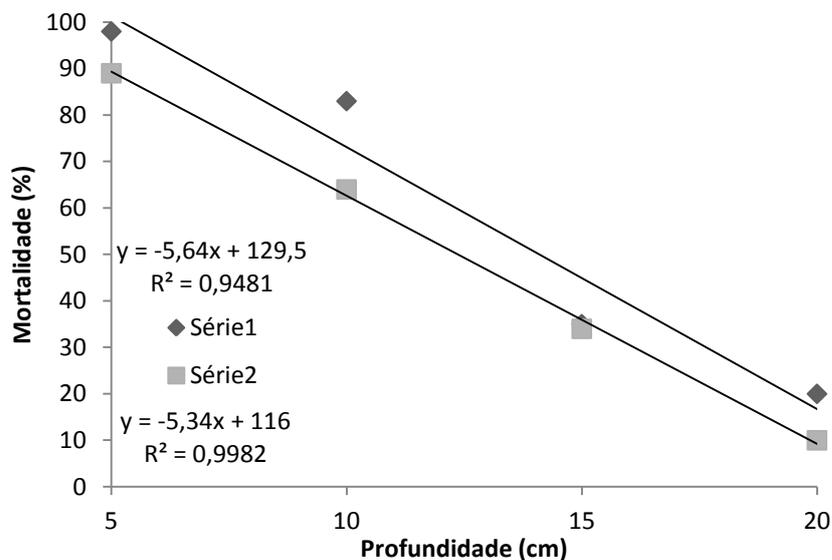


Figura - 7. Locomoção vertical de juvenis da linhagem LPP30. Em função da mortalidade de larvas de *C. psidii* utilizadas como atrativo no sentido vertical em dois sistemas de cultivo convencional e orgânico no ano de 2009.

A capacidade do JIs de se estabelecer no solo em diferentes camadas favorece o controle de pragas que possuem parte do seu ciclo de vida no solo. No entanto, segundo a escolha do local onde se estabelecer pode expor os JIs a

variações ambientais de temperatura e umidade no interior do solo afetando a densidade populacional, movimentação e infectividade DEL VALLE, (2008). Para a linhagem LPP30 de *H. indica* ficou evidenciado que apesar de nas camadas superficiais acontecerem maiores variações, o desempenho não foi afetado, sendo os primeiros 5 cm de solo o local onde ocorreram as maiores mortalidades nos dois sistemas, com destaque para a área orgânica, com (98% e 100%) seguida da área convencional com (87% e 90%).

ALVES & MOINO JR., (2008) utilizando colunas de areia observaram que os isolados (CCA e JPM3) foram eficientes no deslocamento vertical, causando mortalidade mínima de 72% e máxima de 92%. O presente trabalho mostrou eficiência semelhante, no entanto, KUNG *et al.*, (1990) realizando experimento no campo em solo relataram que a grande maioria de solos argilo-arenosos possuem baixos níveis de aeração e aliado à microporosidade excessiva e à presença de pequenas partículas, tem como resultado um baixo percentual de sobrevivência e eficiência de NEPs.

Observou-se que maiores índices de mortalidade nos cinco primeiros centímetros de profundidade e percentuais de mortalidade variando entre 30% e 40% na profundidade 15 cm nos dois sistemas de cultivo. Isso pode ser um indicativo da adaptabilidade da linhagem LPP30 em migrar para as partes mais profundas do solo em busca de hospedeiros, uma vez que mesmo na profundidade 20 cm foram observadas mortalidades que variaram entre 5% e 20%.

Em trabalho visando observar o deslocamento de nematoides entomopatogênicos, CABANILLAS e RAULSTON, (1994), recuperaram maior número de JIs nos primeiros 10 cm do solo. Também foi observado esse comportamento, no entanto, houve hospedeiros infectados até os 20 cm de profundidade, o que pode ser uma vantagem em relação às pragas que migram para partes mais profundas do solo.

Ainda que diferentes obstáculos possam influenciar na eficiência dos nematoides entomopatogênicos na busca por um hospedeiro, uma das grandes vantagens desses agentes, é que os nematoides na ausência de condições favoráveis umidade, temperatura e presença de outro hospedeiro, podem persistir dentro do hospedeiro, ou em estado de anidrobiose esperando por condições adequadas para sua emergência. (LEWIS, 2002). Pode-se concluir que diante dos

resultados apresentados existe uma forte indicação de que a linhagem LPP30 possui estratégia “cruiser” de busca, uma vez que foi capaz de se locomover em busca dos hospedeiros tanto longitudinalmente como verticalmente.

### **Teste com formulações de juvenis**

A análise de variância das variáveis: meio líquido, lagartas infectadas, lagartas infectadas revestidas e esponja para o controle de *C. psidii* apresentou interação significativa tanto no sistema convencional quanto em conversão para orgânico, com ( $F=225.7080$ ,  $gl=4$  e  $p>0.01$ ) e ( $F=209.9030$ ,  $gl=4$  e  $p>0.01$ ) respectivamente. A partir dessa informação foi realizada uma análise de comparação de médias, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para distinguir a melhor técnica em cada sistema.

A linhagem LPP30 demonstrou eficiência em buscar o hospedeiro em todas as técnicas de aplicação. No entanto, quando foi utilizada a água como veículo de transporte foi obtido resultado superior em relação aos outros métodos, com mortalidade entre 86% e 87% nas áreas convencionais e orgânicas, respectivamente (figura 8). O segundo melhor método foi a utilização de esponjas embebidas com nematoides ocasionando mortalidade das larvas de *C. psidii* variando entre 71% e 73% nas áreas orgânica e convencional. A utilização de lagartas somente infectadas também apresentou bons resultados. No entanto, quando essa técnica foi usada com lagartas recobertas com cápsula de gel, diferiram estatisticamente das outras técnicas nos dois sistemas de cultivo (Figura 8).

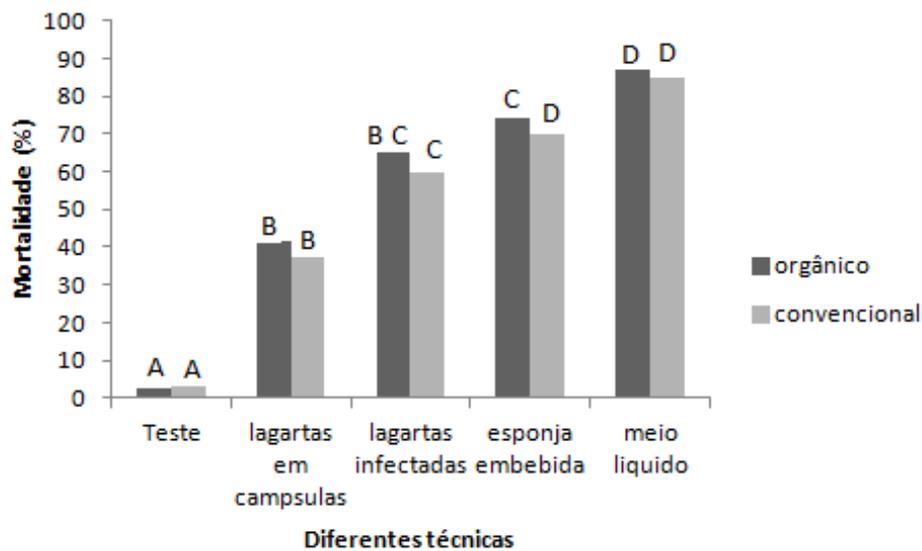


Figura- 8. Mortalidade de larvas do gorgulho em função de diferentes técnicas de aplicação de juvenis de *H. indica* linhagem LPP30 em dois sistemas de cultivo. As barras seguidas pela mesma letra não se diferenciam pelo teste de Tukey a 5%.

Quando sistema de aplicação utilizado é a pulverização, o diluente mais usado é a água (VILLALBA, 2003). Esse método de distribuição vem sendo usado como forma eficiente de aplicação de juvenis infectantes no solo. Dessa forma ficou evidenciado que dentre o métodos de aplicação testados foi o que apresentou melhor resultado (Figura 8) No entanto, a capacidade de dispersão dos JIs em suspensões aquosas, pode ser afetada pelo tempo de armazenamento (LEWIS *et al.* 2006). Por isso formulações líquidas de NEPs devem ser aplicadas no máximo 48 horas após serem diluídas, ou permanecerem em agitação contínua para evitar a dessecação e perdas de virulência (GEORGIS *et al.*, 1994). No entanto, os juvenis utilizados no presente trabalho ficaram em garrafas de cultura de células, estáticas em câmara climatizada por tempo superior a 72 horas, e mesmo assim apresentaram resultados satisfatórios, nos dois sistemas de cultivo com médias de mortalidade parecidas.

No presente trabalho foi observado o mesmo comportamento patogênico com apresentação de mortalidades satisfatórias nos dois sistemas de cultivo e em se tratando de um experimento de campo onde as condições do ambiente não foram controladas, foram obtidas mortalidades com valores próximos aos valores

encontrados por, ALVEZ & MOINO Jr (2009). Estes em trabalho visando identificar melhores metodologias de aplicação, verificaram que o isolado JPM3 foi mais eficiente para a cochonilha *D. texensis* usando JIs em meio líquido e lagartas infectadas com JIs, obtendo mortalidades de 84% e 60% respectivamente.

As formulações também são uma alternativa para aumentar a eficiência dos JIs. Alguns NEPs apresentam a capacidade de entrar em anidrobiose parcial (quiescência). Esta característica foi pesquisada e permitiu desenvolver formulações com maior tempo de armazenamento, como no caso do pó molhável e grânulos solúveis em água (GREWAL, 2002). Além disso, os insetos-cadáveres podem ser envolvidos por talco, amido e argila (SHAPIRO-ILAN *et al.*, 2003). Esse procedimento confere ao inseto-cadáver que será adicionado ao solo, maior rigidez e durabilidade.

DEL VALLE *et al.* (2008) observaram que um grande número de insetos-cadáveres foi removido por duas espécies de formigas. E dentre os tratamentos, cápsulas em gelatina não foram removidas pelas formigas, o que permitiu verificar que mesmo sendo uma tecnologia simples, este tipo de formulação apresentou potencial de uso. Contrariamente ao que ocorreu no trabalho de DEL VALLE *et al.* (2008), a utilização de cápsulas de gel para encobrir o vetor *Galleria mellonella*, demonstrou ser um dos tratamentos menos eficientes, com mortalidade variando entre 38% e 48% na área convencional e em conversão para orgânica respectivamente, contudo tal resultado pode ser explicado pela ausência de pluviosidade bem como de irrigação, no estabelecimento do experimento no campo no mês de janeiro de 2010 e em sua repetição na segunda quinzena de janeiro de 2011.

Sabe-se que as cápsulas de gel necessitam de água pra se dissolver e possibilitar a saída dos juvenis infectantes, e desta forma constituir-se em metodologia eficaz. Foi observada uma diferença de aproximadamente 10% de eficiência patogênica no tratamento em questão na área em conversão para orgânico, o que pode estar relacionado a um melhor equilíbrio na estrutura do solo, bem como menores diferenças de temperatura e umidade, propiciando condições mais favoráveis à locomoção e procura ao alvo.

O tratamento com esponjas de poliuretano foi o segundo melhor em termos percentuais de mortalidade média variando entre 70% e 72%, No entanto, tal tratamento esbarra no efeito ambiental, tendo em vista que a esponja é

classificada como de decomposição indeterminada, o que não seria ecologicamente correto ao ambiente, no caso de se colocar toneladas de esponja para tratar grandes áreas. Desta forma, o tratamento com esponja é eficiente, pois mantém umidade, temperatura, porém ainda necessita do desenvolvimento de técnicas sustentáveis para a sua utilização no campo.

A utilização de nematoides entomopatogênicos na agricultura tem encontrado como barreira, o tempo de prateleira em que o produto comercial existente é capaz de persistir viável para o uso. Estudar esta capacidade tem induzido diferentes pesquisadores atingir tal objetivo, no entanto estudar o tempo de persistência no solo com a presença ou ausência do hospedeiro é importante para se estabelecer critérios na formulação de produtos comerciais.

### Teste de persistência na presença de hospedeiro

Após realização da análise de variância sobre o fator persistência dos JIs de *H. indica* no solo na presença de hospedeiro em dois sistemas de cultivo, foi possível observar que a variável persistência dos JIs é significativa em função da presença do hospedeiro tanto no sistema convencional quanto em conversão para orgânico, apresentando ( $F=7, 2200, gl=11$  e  $p<0.01$ ) na área convencional e ( $F=7, 4160, gl=11$  e  $p<0.01$ ) na área orgânica. As fontes de variação foram desdobradas nos dois sistemas optando-se pelo modelo de regressão polinomial. (Figuras 9 e 10).

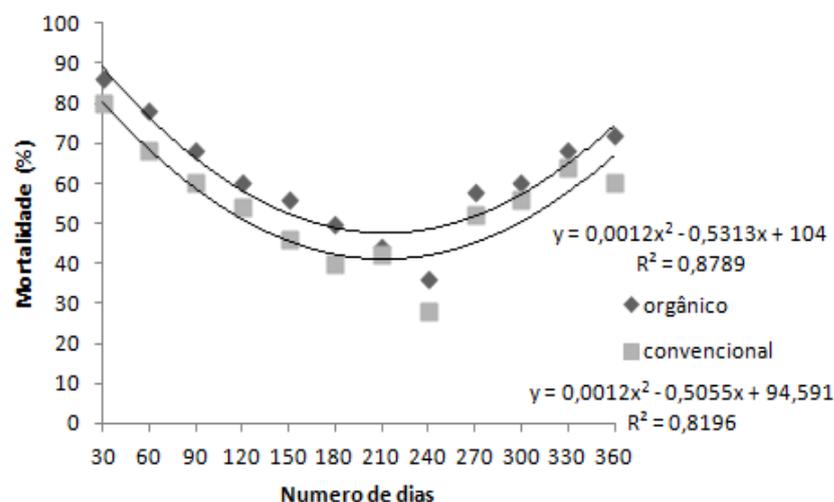


Figura – 9. Persistência de *Heterorhabditis indica* LPP30 em dois sistemas de cultivo na presença do hospedeiro *Galleria mellonella* após 12 meses de observações no ano de 2008.

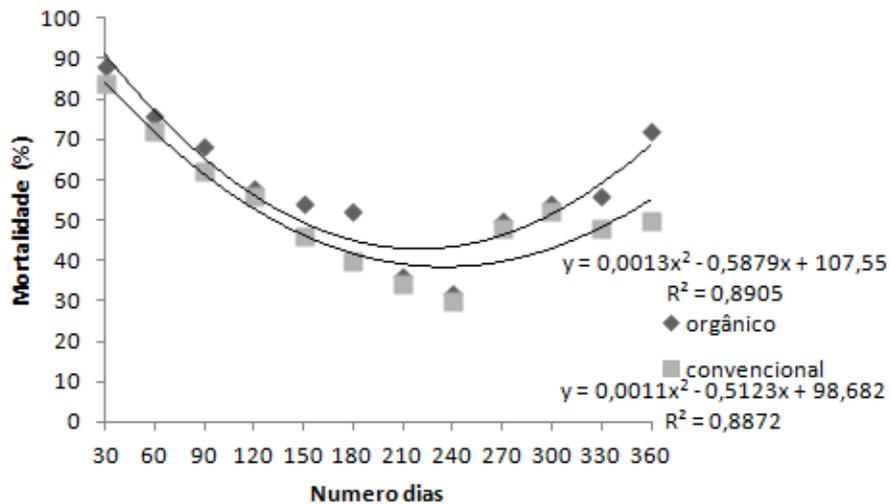


Figura – 10. Persistência de *Heterorhabditis indica* LPP30 em dois sistemas de cultivo na presença do hospedeiro *Galleria mellonella* após 12 meses de observações. Com intervalos de 30 dias, no ano de 2009.

A presença do inseto hospedeiro é um dos principais fatores responsáveis pela manutenção de altas populações de nematoides entomopatogênicos no ambiente JAGDALE *et al.* (2004). É relevante observar que, a reposição de novos hospedeiros proporcionará condições ideais para a manutenção e persistência do nematoide no campo. E esse fator aliado ao crescente nível de matéria orgânica com um aumento médio de 10g/d<sup>3</sup> de solo entre os anos de 2009 e 2010 bem como, o índice pluviométrico que oscilou entre 120 e 165 mm/cm<sup>2</sup>, e à disposição facilitada dos hospedeiros, proporcionaram obtenção de bons índices de mortalidade na área orgânica. A mesma destacou-se em relação à área convencional. Nos meses de junho e julho de 2009 e 20010 quando a precipitação observada foi de (24.35 mm/cm<sup>2</sup>, 20,19 mm/cm<sup>2</sup> e 17.47 mm/cm<sup>2</sup> e 13.97 mm/cm<sup>2</sup> respectivamente, foi possível observar que a ausência de água influenciou na capacidade dos juvenis de LPP30 causar a mortalidade às lagartas. Quando voltou a chover houve retomada dessa capacidade.

A mortalidade observada após 30 dias foi de 80% na área convencional e 90% na área orgânica. No entanto, observou uma diminuição da mesma ao longo

do experimento, até os meses de julho e agosto, período em que a chuva foi escassa nos anos de 2009 e 2010. Já no experimento realizado simultaneamente na área em conversão para orgânico, os números foram bastante semelhantes em relação ao primeiro período de 30 dias e ao longo do experimento, onde se observou que no sistema orgânico de cultivo, houve mortalidades superiores de lagartas de *G. mellonella* em pelo menos 10%.

### Persistência na ausência de hospedeiro

Na ausência do hospedeiro ficou evidenciado que o fator persistência é dependente da presença do hospedeiro apresentando ( $F= 29, 7150$ ,  $gl=5$ , e  $p<0.01$ ) na área convencional e ( $F=32, 7290$ ,  $gl=5$  e  $p<0.01$ ) na área orgânica. (Figuras 11)

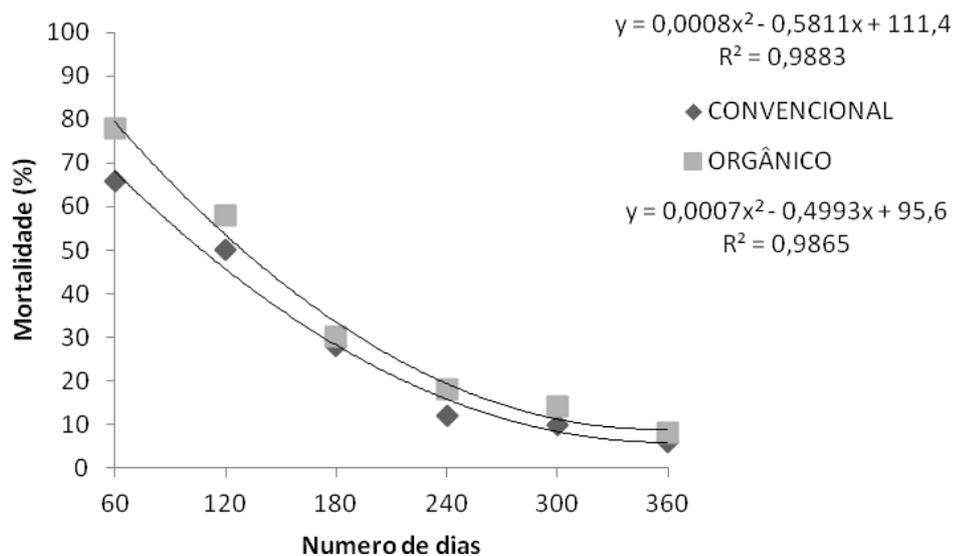


Figura 11- Persistência de *Heterorhabditis indica* em dois sistemas de cultivo na ausência do hospedeiro *Galleria mellonella* após 12 meses de observações. No eixo (X) o número de dias observados, no eixo (Y) a mortalidade em (%) ao longo das observações ano 2008.

Quando se estudou a capacidade de sobreviver no solo sem a presença de um hospedeiro disponível a persistência foi bastante diminuída, com valores entre 80% e 65% nas áreas orgânica e convencional, respectivamente no ano de 2008 e valores entre 65% e 70% na área convencional e orgânica no ano de 2009. Tal informação serve também para contrastar a importância entre a

presença e ausência de um hospedeiro dando *indicativo*, que a presença do hospedeiro será sempre um dos fatores mais determinantes na sobrevivência do nematoide no solo proporcionando a sua reciclagem.

## CONCLUSÕES

1- O estudo da mobilidade revelou, que a linhagem LPP30 possui capacidade de se deslocar em busca do hospedeiro, no sentido vertical em profundidades que vão de 5cm a 20 cm, e no sentido longitudinal, até 60 cm no período de tempo avaliado.

2- A avaliação da persistência no solo, na ausência e presença de um hospedeiro demonstrou que a linhagem LPP30, é capaz de se reciclar e permanecer no solo com a população infectiva e viável por períodos de 12 meses. Ao passo que na ausência de hospedeiro ocorre o declínio da população infectiva.

3- No estudo dos métodos de aplicação da linhagem LPP30, foi possível observar que o meio líquido, se destacou na capacidade de causar morte em relação aos outros métodos avaliados, e que a metodologia, utilizando lagartas infectadas e protegidas por cápsula de gelatina, para a situação do trabalho não apresentou resultado eficiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, V.S., MOINO JR, A., SANTA-CECILIA, L.V.C., ANDALÓ, V., SOUZA, G.C. (2009) Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a cochonilha-daraiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.76, n.1, p.67-73.

ALVES, S. B. J. E. M., ALMEIDA, A., MOINO JR., ALVES, L. F. A. (1998) Técnicas de laboratório. *In: ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ-USP, 1163 p.

BOFF, M. I. C., SMITS, P. H. (2001) Effects of density, age and host cues on the dispersal of *Heterorhabditis megidis*. *Biocontrol Science and Technology*, 11: 505-514.

CABANILLAS, H. E., RAULSTON, J. R. (1994c) Evaluation of the spatial pattern of *Steinernema riobravis* in corn plots. *Journal of Nematology*, 26: 25-31.

CAPINERA, J. L., PELISSIER, D., MENOUT, G. S., EPSKY, N. D., (1988) Control of black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae), with entomogenous nematodes (Nematoda: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 427-435.

CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS (2010) Goiaba, fruta tropical que se destaca entre as demais. Disponível em <http://www.cpt.com.br/rtigos/goiaba-fruta-tropical-destaca-demais>.

DEL VALLE, E.E., DOLINSKI, C.M., SOUZA, R.M. (2008) Dispersal of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied to the soil as infected host cadavers. *International Journal of Pest Management*, 54: 115-122.

DOLINSKI C., DEL VALLE E.E., STUART R.J. (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*, 38: 422–427.

FERREIRA, D.F., (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, 6: 36-41.

FNP CONSULTORIA e COMÉRCIO. Goiaba. In: *Agriannual* (2008): Anuário da *Agricultura brasileira*. São Paulo, 2008. p. 335-338.

FREITAS, G.A. (2010) Informe Rural Etene, Produção e área colhida de goiaba no nordeste, Ano IV Dezembro de 2010. AEPA Nº 24, p 18.

GEORGIS R, POINAR JR., G.O. (1983) Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 15: 308–311.

GEORGIS, R., POINAR JR., G.O. (1994) Nematodes as bioinsecticides in turf and ornamentals. In: Leslie, A.R. (ed.) *Handbook of integrated pest management for turf and ornamentals*. p. 477-489.

GEORGIS, R., WOJCIECH, W.F., SHETLAR, D.J. (1989) Use of *Steinernema feltiae* in abait for the control of black cutworms (*Agrotis ipsilon*) and tawny mole crickets (*Scapteriscus vicinus*). *Florida Entomology*, 72: 203–204.

GLAZER, I. (2002) Survival Biology. *In*: GAUGLER, R. (ed.). *Entomopathogenic Nematology*. New Jersey: Rutgers University, p. 169-187.

GREWAL, L.P.S. (2002) Formulation and application technology. *In*: GAUGLER, R. (ed.). *Entomopathogenic Nematology*. CABI, Wallingford (U.K.) p. 266-284.

GREWAL, P.S., EHLERS, R.U., SHAPIRO-ILAN, D.I., 2005. Nematodes as Biocontrol Agents. CABI.

JAGDALE, G.B., MILDRED, L.C., GREWAL, P.S., LINDQUIST, R.K. (2004) Application rate and timing, potting medium, and host plant effects on the efficacy of *Stinernema feltiae* against the fungus gnat, *Bradysia coprophila*, in floriculture. *Biological Control*, 29: 296-305.

JANSSON, R.K., LECRONE, S.H., GAUGLER, R. (1993) Field efficacy and persistence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) for control of sweetpotato weevil (Coleoptera: Apionidae) in Southern Florida. *Journal of Economy Entomology*, 86: 1055-1063.

KAYA, H.K., NELSEN, C.E., (1985) Encápsulation of steinernematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology*, 14: 572–574.

KUNG, S.P., GAUGLER, R., KAYA, H.K. (1990) Influence of soil pH and oxygen on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Nematology*, 22: 440-445.

LEITE, L.G., TAVARES, F.M., GINARTE, C.M.A., CARREGARI, L., BATISTA FILHO, A. (2007) Nematoides entomopatogênicos no controle de pragas. *In*:

PINTO, NAVA, A.S., ROSSI, D.E., M.M.; MALERBO-SOUZA, D. T. (Eds.). *Controle Biológico de Pragas na Prática*. Piracicaba: CP 2, p. 45-53.

LEWIS E.E. (2002) Behavioral Ecology. *In*: Gaugler R, (ed.). Entomopathogenic nemathology. Wallingford: CABI, p. 205-224.

LEWIS, E.D., CAMPBELL, J., GRIFFIN, C., KAYA, H., PETERS, A. (2006) Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 38: 66-79.

NAVON, A., NAGALAKSHMI, V.K., LEVSKI, S., SALAME, L., GLAZER, I. (2002) Effectiveness of entomopathogenic nematodes in an alginate gel formulation against lepidopteran pests. *Biocontrol Science and Technology*, 12: p.737-746.

PATEL, M.N., WRIGHT, D.J. (1997) Fatty acid composition of neutral lipid energy reserves from infective juveniles of entomopathogenic nematodes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118B: 341-348.

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

PORTILLO-AGUILAR, C.M.G., VILLANI, M.J. TAUBER, C.A., TAUBER & J.P. NYROP. (1999). Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. *Environmental Entomology*, 28: p.1021-1035.

SHAPIRO-ILAN, D.I., LEWIS, E.E., TEDDERS, W.L. (2003) Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspensions. *Journal Invertebrate Pathology*, 83: 270-272.

VILLALBA, G.D.A. (2003) Tecnología y equipos de aspersión para el control de La broca del café. *In: Curso Tecnología y Equipos de aspersión para El control de la broca del café. Chinchiná (Colombia), p. 400-450.*

WHITE, G.F. (1927) A method for obtaining infective nematode larvae from culture. *Science*, 66: 302-303.

WILLER, H., YUSSEFI, M. (2007) The world of organic agriculture: *Statistics Andemerging trends*. 9. ed. Bonn: IFOAM, 259

#### 4. RESUMO

Conhecer biologicamente um organismo entomopatogênico com potencial para o controle biológico de pragas permite desenvolver metodologias para seu uso mais eficiente. Utilizando fragmentos do gene 18s do nematoide LPP30 e 16s da bactéria entomopatogênica, contrastados com fragmento de espécies já identificadas no Gene Bank chegando-se à conclusão que a bactéria do isolado LPP30 encontra-se no cluster compreendido por *Photorhabdus luminescens akhurstii* e, a linhagem de nematoide LPP30 está agrupada ao gênero *Heterorhabditis*. Medidas morfológicas foram realizadas e o valor comparado com linhagens de *Heterorhabditis indica* já identificadas, demonstrando proximidades e discrepâncias de medidas morfométricas dentro dos limites aceitáveis. Foram feitas multiplicações e contagem dos juvenis infectantes produzidos por lagartas individuais de *Galleria mellonella*, os resultados mostraram picos de produção de 690.320 mil JIs no segundo dia de coleta e 653 JIs no 5º dia. Foram testadas diferentes concentrações de juvenis infectantes (JIs) contra larvas de *C. psidii* 0,10, 100, 200, 350, 650, 850 e 1000. Foi observada mortalidade mínima e

máxima variando entre 9% e 100%, nas concentrações de 0 e 1000 JIs, respectivamente. Quando foi testado o efeito das temperaturas 16°C, 20°C, 24°C, 28°C e 32°C, tal fator mostrou ser importante, pois nas duas maiores temperaturas foram obtidos os maiores índices de mortalidade (100%) e na menor temperatura 16°C apenas. Ao se estudar tempo de exposição das larvas de *C. psidii* aos JIs de LPP30 1, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, esse fator influenciou no percentual de mortalidade com pico ocorrendo às 72 horas de contato e mortalidade variando entre 98% e 100%. Quando o objetivo foi avaliar a mobilidade vertical e horizontal do nematoide no campo, foram encontrados índices de mortalidade próximos a 90% nos primeiros 10 cm no sentido longitudinal com progressiva queda até próximo 60 cm com mortalidades variando entre 40% e 50% nos sistemas de cultivo na maior distância. Quando o objetivo foi avaliar o espaço percorrido no sentido vertical as maiores mortalidades ocorreram nos primeiros 5 cm chegando a 100% nos dois sistemas de cultivo com progressiva queda até a profundidade de 20cm. Quando foi avaliado o melhor método de aplicação dos juvenis no campo, a aplicação feita com meio líquido se destacou nos dois sistemas de cultivo com mortalidade variando entre 79% e 85%, seguido pelo método da esponja embebida com 69% e 75%. Ao se avaliar a persistência dos juvenis infectantes no campo na presença e ausência de hospedeiro foi observado que no intervalo de um ano com a presença de hospedeiro a reciclagem dos nematoides proporcionará mortalidade entre 60% e 80% no sistema convencional, e mortalidades entre 70% e 90% no sistema em conversão para orgânico. Por outro lado quando o objetivo foi avaliar a persistência na ausência de hospedeiros, foram encontradas mortalidades entre 60% como máxima aos 60 dias de observação e 10% aos 360 dias de observação no sistema convencional, e no sistema em conversão para orgânico foram encontradas mortalidades entre 79% máxima aos 60 dias de observação e 10% aos 360 dias. Assim, conclui-se que o estudo de diferentes fatores relacionados à biologia de um entomopatógeno, é extremamente importante para se estabelecer metodologia adequada de sua utilização, sendo necessários mais estudos para que os critérios de uso destes agentes sejam mais eficientes tanto em laboratório como a campo.

## 4.1 CONCLUSÕES

4- A linhagem LPP30, pertence ao gênero *Heterorhabditis* e a espécie *indica* e a bactéria simbiote da linhagem LPP30 pertence ao gênero *Photorhabdus*.

5- Os caracteres morfológicos de *H. indica* LPP30, condizem com os de outros *Heterorhabditis indica*.

6- A produção acumulada de Jis 1.296.660, foi expressiva, dando indicativo de que o nematoide aqui estudado possui potencial para ser usado em controle biológico.

7- As maiores mortalidades ocorreram nas temperaturas 28°C e 32° A concentração 850 e 1000 Jis foi capaz de controlar 100% das larvas de *C.psidii*. O tempo de exposição das larvas de *C. psidii* ao JIs de *Heterorhabditis indica* foi 60 horas e 72 horas. De uma maneira geral os fatores estudados, interferem no processo infectivo, sendo necessário observá-los, ao se optar pelo uso da linhagem LPP30 no controle biológico de *C.psidii*.

8- O estudo da mobilidade revelou, que a linhagem LPP30 possui capacidade de se deslocar em busca do hospedeiro, no sentido vertical em profundidades que vão de 5cm a 20 cm, e no sentido longitudinal, até 60 cm no período de tempo avaliado.

9- A avaliação da persistência no solo, na ausência e presença de um hospedeiro demonstrou que a linhagem LPP30, é capaz de se reciclar e permanecer no solo com a população infectiva e viável por períodos de 12 meses. Ao passo que na ausência de hospedeiro ocorre o declínio da população infectiva.

10- No estudo dos métodos de aplicação da linhagem LPP30, foi possível observar que o meio líquido, se destacou na capacidade de causar morte em relação aos outros métodos avaliados, e que a metodologia, utilizando lagartas infectadas e protegida por cápsula de gelatina, para a situação do trabalho não apresentou resultado eficiente.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADON, M., GRENIER, E., LAUMOND, C., ABAD, P. (1998) A species-specific satellite DNA from the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica*. *Genome*, 41: 148-153.

ACEVEDO, J.P.M., MOINO JR., A., CAVALCANTI, R.S., DOLINSKI, C., CARVALHO, F.A. (2005) Amostragem e avaliação de técnicas para isolamento de nematóides entomopatogênicos nativos obtidos em Lavras, Minas Gerais. *Nematologia Brasileira*, 29: 17-23.

ADAMS, B.J. BURNELL, A.M., POWERS, T.O. (1998) A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on Internal Transcribed Spacer 1 DNA sequence data. *Journal of Nematology*, 30: 22-39.

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, New York. Press, p. 1-33.

AGRIANUAL, (2008). Anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2009. 325 p.

AKHURST, R., DUNPHY, G.B. (1993) Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematode, and their insect hosts. *In*: Beckage, N., Thompson, S., Federici, B. (eds.). *Parasites and Pathogens of Insects*. Academic Press, New York, p. 1-23.

AKHURST, R.J. (1986) Controlling insects in soil with entomopathogenic nematodes. *In*: SAMSON R. A., VLAK, J. M., PETERS, D. (eds.) *Fundamental applied aspects of invertebrate pathology*. Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, The Netherlands, p. 265-267.

AKHURST, R.J., BOEMARE, N.E. (1990) Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. *In*: Gaugler, R., Kaya, H.K. (ed.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton, p. 75–90.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.

ALVAREZ I., WENDEL J.F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular. Phylogenetic Evolution*, 29: 417-434.

ALVES, S.B.J.E.M., ALMEIDA, A., MOINO JR., ALVES, L.F.A. (1998) Técnicas de laboratório. *In*: Alves, S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ-USP, 1163 p.

ALVES, V.S., MOINO JR, A., SANTA-CECILIA, L.V.C., ANDALÓ, V., SOUZA, G.C. (2009) Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a Cochonilha-da-

raizdo-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.76, n.1, p.67-73.

AMARO, A. (1979) O mercado interno de frutas in natura. *In: Congresso Brasileiro de Fruticultura*, Pelotas, Brasil, p.1172-1186.

ANDALÓ, V., MOINO JUNIOR, A., SANTA-CECILIA, L.V.C., SOUZA, G.C. (2004) Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). *Arquivos do Instituto Biológico*, 71: 181-187.

ANDALO, V., NGUYEN, K. B., ALCIDES, M. (2006) *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology*, 8: 853-867.

BABIC, I., FISCHER, L.E., SAUX, M., GIRAUD, E., BOEMARE, N.E. (2000) Occurrence of natural dixenic associations between the symbiont *Photorhabdus luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. *In: Tropical entomopathogenic Heterorhabditis* spp. (Nematoda, Rhabditida). *Microbiology*, 146: 709-718.

BAILEZ, O.E., VIANA-BAILEZ, A.M.M. DE LIMA, J.O.G., MOREIRA, D.D.O. (2003) Life-history of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), under laboratory conditions. *Neotropical Entomology*, 32: 203-207.

BARBERCHECK, M.E. (1992) Effects of soil physical factors on biological control agents of soils insect pests. *Florida Entomologist*, 75: 539-548.

BARBOSA, F.R., LIMA, M.F. (2010) A cultura da goiaba. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 180p.

BATISTA, E.S., DEP, AUAD, A.M., FRIAS M.P., MONTEIRO C.M.(2011) Nematoides entomopatogênicos infectam ovos e adultos cigarrinha-das-pastagens *Arquivos do Instituto Biológico* ,78: 475-478.

BEDDING, R.A. (1981) Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica*, 27: 109-114.

BEDDING, R.A., AKHURST, R.J. (1975) A simple technique for the determination of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21: 109-110.

BELTRÃO, N. E. M. (2011) Agricultura orgânica e seu potencial como estratégia de Produção p,1 Disponível em <http://www.emepa.org.br/anais/volume2/av204.pdf>

BELLINI L.L. (2011) Avaliação de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* Fabr. e de fitonematóides em cana-de-açúcar. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-113p.

BENSON, D.A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J., WHEELER, D.L. (2008) "GenBank" *Nucleic Acids search* 36 (Database): D25-D30. [doi:10.1093/nar/gkm929](https://doi.org/10.1093/nar/gkm929). [PMC 2238942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2238942/). [PMID 18073190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18073190/).

BOFF, M.I.C., SMITS, P.H. (2001) Effects of density, age and host cues on the dispersal of *Heterorhabditis megidis*. *Biocontrol Science and Technology*, 11: 505-514.

CABANILLAS, H.E., RAULSTON, J.R. (1994c) Evaluation of the spatial pattern of *Steinernema riobravis* in corn plots. *Journal of Nematology*, 26: 25-31.

CAMPBELL, L.R., GAUGLER, R. (1991a) Mechanisms for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *International Journal of Parasitology*, 21: 219-224.

CANESIN, A., LEITE, L.G., SCHMIDT, F.S., TAVARES, F.M., HONÓRIO, R.S., DELL, R. Virulência de nematóides entomopatogênicos contra pré-pupas do

gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). Anais do XXII Congresso Brasileiro de Entomologia.

CAPINERA, J.L., PELISSIER, D., MENOUT, G.S., EPSKY, N.D., (1988) Control of black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae), with entomogenous nematodes (Nematoda: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 52: 427-435.

CARDOSO D.O. (2011) *Revisão taxonômica dos gêneros Steinernema e Heterorhabditis (Rhabditida) a partir de 2005*. Monografia de conclusão de curso. Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 63p.

CARRARO, A.F., CUNHA, M.M. (1994) Manual de exportação de frutas. Brasília, FRUPEX/IICA da Secretaria Desenvolvimento Rural do MARA, p. 20-21.

CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS (2010) Goiaba, fruta tropical que se destaca entre as demais. Disponível em <http://www.cpt.com.br/rtigos/goiaba-fruta-tropical-destaca-demais>.

CHIRINOS-TORRES, D., LARREAL, M.M., PALMAR, C.G., LARA, C. (2006) Crecimiento y producción de plantas de guayabo (*Psidium guajava* L.) bajo riego e incidencia de frutos enfermos. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 23: 60-69.

CHITARRA, M.I.F., CHITARRA, A.B. (2005) *Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio*. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA.

CHOUDHURY, M. M. (2001) Goiaba: pós-colheita. Petrolina: Embrapa Semi-árido, 45p.

CURRAN, J. (1992) Influence of application method and pest population size on the field efficacy of entomopathogenic nematodes. *Supplement to Journal of Nematology*, 24: 631-636.

DEL VALLE, E.E. (2004) Avaliação e pressão de seleção de nematóides entomopatogênicos tolerantes a altas temperaturas visando o controle do Gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii*) Tese (Mestrado em Produção Vegetal)– Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 63p.

DEL VALLE, E.E., DOLINSKI, C., SOUZA, R.M., SAMUELS, R.I. (2005) Avaliação de Metodologias de Seleção para Tolerância a Elevadas Temperaturas em *Heterorhabditis baujardi* (Nematoda: Rhabditida). *Nematologia Brasileira*, 29: 207-214.

DEL VALLE, E.E., DOLINSKI, C.M., SOUZA, R.M. (2008) Dispersal of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied to the soil as infected host cadavers. *International Journal of Pest Management*, 54: 115-122.

DOLINSKI, C. M. (2006) Uso de nematóides entomopatogênicos no controle de pragas agrícolas. In: VENZON, M., JUNIOR, T. J. P., PALLINI, A. (eds.) *Pragas e doenças* 1.ed. Viçosa: EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais.

DOLINSKI C., DEL VALLE E.E., STUART R.J. (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*, 38: 422–427.

DOLINSKI, C., E.E. DEL VALLE, BURLA, R.S., MACHADO, I.R. (2007). Biological traits of two native Brazilian entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Nematologia Brasileira*, 31: 180-185.

DOLINSKI, C., KAMITANI, F.L., MACHADO, I.R., WINTER, C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 150-159.

DOLINSKI, C., MOINO JÚNIOR, A. (2006) Utilização de nematóides entomopatogênicos nativos ou exóticos: o perigo das introduções. *Nematologia Brasileira*, 30: 139-149.

DOLINSKI, C., PINTO, C.C.S., Robaina, R.R., BELLINI, L.L. (2010) Efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Nematologia Brasileira*, 34: 123-128.

DOLINSKI, C.M., DEL VALLE, E.E., BURLA, R.S., MACHADO, I.R. (2007) Biological traits of two native brazilian entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematologia Brasileira*, 31:180-185.

DORRIS, M., VINEY, M.E., BLAXTER, M.L. (2010) Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *International Journal of Parasitology*, 32: 1507-1517.

DOWDS, B.C.A., PETERS, A. (2002) Virulence Mechanisms. In: GAUGLER, R. (ed.) *Entomopathogenic nematology*. 1.ed. New York: CABI Publishing, p.79-98.

DUNCAN, L.W., GRAHAM, J.H., DUNN, D.C., ZELLERS, J, MCCOY C.W., NGUYEN, K. (2003) Incidence of endemic entomopathogenic nematodes following application of *Steinernema riobrave* for control of *Diaprepes abbreviatus*. *Journal of Nematology*, 35: 178–186.

DUNPHY, G.B., THURSTON, G.S. (1990) Insect immunity. In: Gaugler,R., Kaya, H.K. (Eds.) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 301-323.

DUTKY, S.R., THOMPSON, J.V., CANTWELL, G.W. (1964) A technique for the propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology*, 6: 417- 422.

EFRON, D., NESTEL, D., GLAZER, I. (2001) Spatial analysis of entomopathogenic nematodes and insect hosts in a citrus grove in a semi-arid region in Israel. *Environment Entomology*, 30: 254–261.

EHLERS, R.U. (2001) Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology Biotechnology*, 56: 623-633.

EMELIANOFF, V.L.E., BRUN, N., PAGES, S., STOCK, S. P., TAILLIEZ, P. (2008) Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Herault and Gard (Southern France). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 211-217.

FABRE, J.V., JULIEN, J., PARISOT, D., DRON, M. (1995) Analysis of diverse isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting common bean using molecular markers. *Mycological Research Cambridge*, 99: 429-435.

FALEIRO, F.G., RAGAGNIN, V.A., MESQUITA, A.G.G., VINHADELLI, W.S., PAULA JÚNIOR, T.J., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. (1998) Genetic diversity of isolates of *Uromyces appendiculatus* with the aid of RAPD molecular markers. *Fitopatologia Brasileira*, 23: 386-390.

FAO (2011) Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação Disponível em: <https://www.fao.org.br/>.

FERREIRA, D.F., (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, 6: 36-41.

FFRENCH-CONSTANT, R. H., WATERFIELD, N., BURLAND, V., PEMA, N. T., DABORN, P. J., BOWEN, D., BLETTNER, F.R.A. (2000) Genomic sample sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* W14: potential implications for virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3310-3329.

FISCHER-LE SAUX, M., VIALARD, V., BRUNEL, B., NORMAND, P., BOEMARE, N. (1999) Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of

new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperate* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int Journal System Bacteriology*, 49: 1645-1656.

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

FNP CONSULTORIA e COMÉRCIO. Goiaba. *In: Agriannual (2008): anuário da Agricultura brasileira*. São Paulo, 2008. p. 335-338.

FORST, S., CLARKE, D. (2002) Bacteria-Nematode Symbiosis *In: Gaugler, R. (ed.) FREITAS, G.A. (ed.) Informe Rural Etene, Produção e área colhida de goiaba no nordeste, Ano IV Dezembro de 2010 AEPA Nº 24*, p. 18.

FREITAS, G.A.D.E (2010) Produção e área colhida de goiaba no nordeste. INFORME RURAL ETENE Nº 1, Jan 2010 disponível em: [http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/etene/etene/docs/ire\\_ano4\\_n24.pdf](http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/etene/etene/docs/ire_ano4_n24.pdf).

FRIEDMAN, M.J. (1990) Commercial production and development. *In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA*, p. 153-172.

GAUGLER, R., CAMPBELL, J.F., MCGUIRE, T.R. (1989) Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54: 363 – 372.

GAUGLER, R., HAN, R. (2002) Production technology. *In: GAUGLER, R. (ed.) Entomopathogenic nematology*. New Jersey: Rutgers University, p. 289-310.

GEORGIS R, POINAR JR., G.O. (1983) Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 15: 308–311.

GEORGIS, R., (1990) Formulation and application technology. *In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic nematodes in biological control.* Boca Raton: CRC Press 173-191.

GEORGIS, R., POINAR JR., G.O. (1994) Nematodes as bioinsecticides in turf and ornamentals. *In: Leslie, A.R. (ed.) Handbook of integrated pest management for turf and ornamentals.* p. 477-489.

GEORGIS, R., WOJCIECH, W.F., SHETLAR, D.J. (1989) Use of *Steinernema feltiae* in abait for the control of black cutworms (*Agrotis ipsilon*) and tawny mole crickets (*Scapteriscus vicinus*). *Fla. Entomology*, 72: 203–204.

GLAZER, I. (2002) Survival Biology. *In: GAUGLER, R. (ed.). Entomopathogenic Nematology.* New Jersey: Rutgers University, p. 169-187.

GLAZER, R.W. (1931). The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science*, 73: 614-615.

GRANT, J.A., VILLANI, M.G. (2003). Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. *Environmental Entomology*, 32: 80–87.

GRAUR, D., LI, W.H. (2001) *Fundamentals of molecular evolution.* 2. ed. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates Inc, 496 p.

GREWAL, L.P.S. (2002) Formulation and application technology. *In: GAUGLER, R. (ed.). Entomopathogenic Nematology.* CABI, Wallingford (U.K.) p. 266-284.

HASHMI, G., GAUGLER, R. (1998). Genetic diversity in insect-parasitic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 72: 185-189.

HOMINICK, W.M., BRISCOE, B.R., DEL-PINO, F.G., HENG, J., HUNT, D.J., KOZODOY, E., MRÁČEK, Z., NGUYEN, K.B., REID, A.P., SPIRIDONOV, S., STOCK, P., STURHAN, D., WATURU, C., YOSHIDA, M. (1997) Biosystematics of

entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology*, 71: 271-298.

HUSSAINI, S.S., SINGH, S.P., Nagesh, M. (2002) In vitro and field evaluation of some indigenous isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis indica* against shoot and fruit borer, *Leucinodes orbonalis*. *Indian Journal of Nematology*, 32: 63-65.

IBGE. (2011) .Produção Agrícola Municipal. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso: 20 ago 2009.

INSTITUTO BIODINÂMICO. Diretrizes para o Padrão de Qualidade Orgânico Instituto Biodinâmico. 11ª edição revisada, 2003. 80p.

IHA, S.M. (2008) Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 387-393.

INSTITUO BRASILEIRO DE FRUTAS (2010) Retrospectiva Analítica 2010 da Cadeia Produtiva das Frutas. São Paulo: Disponível em 27 de dezembro de 2011. <http://www.ibraf.org.br/>.

ISHIBASHI, N., KONDO, E. (1990) Behavior of infective juveniles. *In*: R. Gaugler and H.K. Kaya, eds. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 139-150.

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

JAGDALE, G.B., MILDRED, L.C., GREWAL, P.S., LINDQUIST, R.K. (2004) Application rate and timing, potting medium, and host plant effects on the efficacy of *Stinernema feltiae* against the fungus gnat, *Bradysia coprophila*, in floriculture. *Biological Control*, 29: 296-305.

JANSSON, R.K., LECRONE, S.H., GAUGLER, R. (1993) Field efficacy and persistence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) for control of sweetpotato weevil (Coleoptera: Apionidae) in Southern Florida. *Journal of Economy Entomology*, 86: 1055-1063.

KAYA, H. K., STOCK, S. P. (1997) Techniques in insect nematology. *In*: Lacey, L.A. (Ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego, London: Academic Press, p. 281-324.

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

KAYA, H.K. 1990. Soil Ecology. *In*: Gaugler, R.; Kaya, H.K. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton: CRC Press, p. 93-116.

KAYA, H.K., GAUGLER, R. (1993) Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*. 38: 181-206.

KAYA, H.K., NELSEN, C.E., (1985) Encapsulation of steinernematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology*, 14: 572–574.

KAYA, H.K., STOCK, P. (1997) Techniques in insect nematology. *In*: LACEY, L. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. San Diego: Academic Press. p. 281-324.

KUNG, S.P., GAUGLER, R., KAYA, H.K. (1990) Influence of soil pH and oxygen on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Nematology*, 22: 440-445.

LEBUHN, M., ACHOUAK, W., SCHLOTTER, M., BERGE, O., MEIER, H., BARAKAT, M., HARTMANN, A., HEULIN, T. (2000) Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2207-2223.

LEE, M.S.Y. (2004) The molecularisation of taxonomy. *Invertebrate Systematics*, 18: 1-6.

LEITE, L.G., MACHADO, L.A. AGUILLERA M.M., RODRIGUES, R.C.D., NEGRISOLI JR, A.S. (2003). Patogenicidade de *Steinernema* spp. E *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Rhabditida) à ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata*. *Revista Agrícola*, 78: 139-148.

LEITE, L.G., TAVARES, F.M., GINARTE, C.M.A., CARREGARI, L., BATISTA FILHO, A. (2007) Nematoides entomopatogênicos no controle de pragas. *In*: PINTO, NAVA, A.S., ROSSI, D.E., M.M.; MALERBO-SOUZA, D. T. (Eds.). *Controle Biológico de pragas: na prática*. Piracicaba: CP 2, p. 45-53.

LEWIS E.E. (2002) Behavioral Ecology. *In*: Gaugler R, (ed.). Entomopathogenic nemathology. Wallingford: CABI, p. 205-224.

LEWIS, E.D., CAMPBELL, J., GRIFFIN, C., KAYA, H., PETERS, A. (2006) Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 38: 66-79.

LEWIS, E.E., GAUGLER, R., HARRISON, R. (1992) Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*, 105: 103-107.

LIMA,R.K. CARDOSO, M.G. ANDRADE, M.A., NASCIMENTO, E.A., MORAIS, S.A.L., NELSON, D.L. (2010) Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20: 41-44.

LINDEGREN, J.E., VALERO, K.A., MACKAY, B.E. (1993) Simple *in vivo* production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. *Journal of Nematology*, 25: 193–197.

LIU, J., BERRY, R. E., BLOUIN, M.S. (2001) Identification of symbiotic bacteria (Photorhabdus and Xenorhabdus) from the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema oregonense* based on 16S rDNA sequence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 87-91.

LIU, Z., STEWARD, R., LUO, L. (2000) Drosophila Lis1 é necessário para a proliferação de neuroblastos, elaboração dendríticas e transporte axonal. *Natural Biologia Celular*, 2 : 776-78.

MANICA, I., ICUMA, I.M., JUNQUEIRA, N.T.V., SALVADOR, J.O., MOREIRA, A., MALAVOLTA, E. (2000). Goiaba. Porto Alegre: Cinco continentes, 374p.

MANTOVANI, J.R., CORRÊA, M.C.M., CRUZ, M.C.P., FERREIRA, M.E., NATALE, W. (2004) Uso fertilizante de resíduo da indústria processadora de goiabas. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 26: 339-342.

MDIC/SECEX (2009) Sistema de análise das informações de comércio exterior (ALICE). Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em: 6 nov. 2009.

MDIC/SECEX. (2010) Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio/ Secretaria de Comércio Exterior. Exportação de produtos orgânicos – agosto de 2006 a junho de 2010. Disponível em <<http://www.mdic.gov.br>> Acesso em agosto de 2010.

MINAS, R. S. (2008) Potencial dos nematóides entomopatogênicos como agentes de controle biológico da mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro– UENF, 89p.

MOINO JR, A., SOARES F.M., SILVA M.A.T., MERTZ, N.R. (2011) Compatibilidade do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp. JPM 4 com produtos fitossanitários visando controle de *Quesada gigas* (HEMIPTERA: CICADIDAE). Anais do Simpósio de Controle Biológico, 126, Lavras-MG .

MOLINA, A.J.P., LÓPEZ, N.J.C. (2002) Producción *in vivo* de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes . *Revista Colombiana Entomológica*, 27: 73-78.

MOLINA, C.H.D., MOLINA, C.H.C., MOLINA, E.J.D., MOLINA, J.P.D., NAVAS, AP. (2001) Advances in the implementation of high tree-density silvopastoral systems. In: IBRAHIM, M. *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SILVOPASTORAL SYSTEMS; CONGRESS ON AGROFORESTRY AND LIVESTOCK PRODUCTION IN LATIN AMERICA*, San José. Anais, San José, Costa Rica, CATIE, p. 299-302.

MOLINA, J.P.A., A. MOINO Jr, R.S., CAVALCANTI. (2004) Produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. *Arquivos do Instituto Biológico*, 71: 347-354.

MOSCARDI, F. (2004) Situação atual e perspectivas de uso de entomopatógenos (vírus, fungos e bactérias). Disponível em: <<http://www.ferobio.ufv.br/relatorio/situaent.htm>>. Acesso em: 12 de abril de 2004.

NAVON, A., NAGALAKSHMI, V.K., LEVSKI, S., SALAME, L., GLAZER, I. (2002) Effectiveness of entomopathogenic nematodes in an alginate gel formulation against lepidopteran pests. *Biocontrol Science and Technology*, 12: p.737-746.

NGUYEN, K.B., HUNT, D.J. (2007) Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts. Boston, MA, U.S.A.: Brill, 832 pp.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION- NCBI (2011) in <http://fr.wikipedia.org/wiki/Steinernema>

NIELSEN, E.M., SKOV, M.N., MADSEN, J.J., LODAL, J., JESPERSEN, J.B., BAGGESEN D.L.E. (2004) Verocytotoxin produtoras de *Escherichia coli* em aves selvagens e roedores nas proximidades de fazendas. *Applied. Environmental. Microbiology*, 70: 6944-6947.

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

PATEL, M.N., WRIGHT, D.J. (1997) Fatty acid composition of neutral lipid energy reserves from infective juveniles of entomopathogenic nematodes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118B: 341-348.

PENTEADO, S. R. (2000) *Introdução à Agricultura Orgânica: Normas e técnicas de cultivo*. Campinas: Editora Grafimagem, 110p.

PEREIRA, C. (1927) *Rhabditis hambletoni* n.sp. nema aparentemente semiparasito da broca do algodoeiro (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Arquivos do Instituto Biológico*, 8: 215- 230.

PEREIRA, F.M., MARTINEZ J.R., M. (1986) *Goiabas para industrialização*. Jaboticabal: Legis Suma, 142p.

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

PETERS, A. (1996) The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci. Technol*, 6: 389-402.

PHAN L.K., SUBBOTIN S.A., NGUYEN C.N., MOENS M. (2003) *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam with morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology*, 5: 367-382.

PHAN, Q.S., HA, M.T., HOANG, T.T., T RAN, K.L., MINH, T.D., HONG, T., BAU, L.N., CHAT, N.T., T UAT, N.V., VIEN, N.V., VAN, N.V. (2001). Survey and research yellow symptom disease and control on coffee in Dak Lak. *Vietnamese Ministry of Environment and Technology*.

POINAR Jr., G.O. (1990) Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, Boston: CRC Press. 25. p. 23–62.

POINAR, G.O., 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: 467-472.

POINAR, J.R., GAUGLER. KAYA, R.; KAYA, H.K (1990) Biology and taxonomy of Steinernematidae, and Heterorhabditidae. *In: Entomopathogenic nematodes. Biocontrol Science and Technology*, 6: 477-480.

PORTILLO-AGUILAR, C., VILLANI, M.G., TAUBER, M.J., TAUBER, C.A., NYROP, J.P. (1999) Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. *Environmental Entomology*, 28:1021–1035.

POSADA, D., CRANDALL, K.A. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

POWERS, T.O., TODD, T.C., BURNELL, A.M., MURRAY, P.C.B., FLEMING, C.C., SZALANSKI, A.L. ADAMS, B.A., HARRIS, T.S. (1997) The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology*, 29: 441–450.

RODHE, C., MOINO JUNIOR, A. (2007) Avaliação de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) para o controle da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Díptera: Tephritidae). Dissertação de Mestrado em Agronomia/ Entomologia – Lavras, Minas Gerais – Universidade Federal de Lavras, 74p.

RODRÍGUEZ, M.G., SÁNCHEZ, L., MARTÍNEZ, M., DE LOS, A. (2007) Efectividad de *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditidae: Heterorhabditidae) sobre *Chinches harinosas* del cafeto (Homoptera: Pseudococcidae). *Revista de Proteccion. Vegetable*, 12: 119-122.

RONQUIST, F. (2003). Parsimony analysis of coevolving species associations., *In:* (RDM Page, ed.). *Tangled trees: Phylogeny, cospeciation, and coevolution* University of Chicago Press, Chicago. p. 22-64.

ROZANE, D.E., NATALE, W., PRADO, R.M., BARBOSA, J.C. (2009) Tamanho da amostra foliar para avaliação do estado nutricional de goiabeiras com e sem irrigação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 13: 233-239.

SCHROER, S., ZIERMANN, D., EHLERS, R.U. (2005) Mode of action of a surfactant-polymer formulation to support performance of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). *Bioscience and Technology*, 15: 601-613.

SEINHORST, J. W. (1959) A rapid method for the transference of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4:117-128.

SHAPIRO-ILAN D.I., GOUGE, D.H., PIGGOTT, S.J., FIFE, J.P. (2006) Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control*, 38: 124–133.

SHAPIRO-ILAN, D.I., GOUGE, D.H., KOPPENHÖFER, A.M. (2002). Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI, New York, NY, pp. 333–356.

SHAPIRO-ILAN, D.I., LEWIS, E.E., TEDDERS, W.L. (2003) Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspensions. *Journal of Invertebrat. Pathology*, 83: 270-272.

SOUZA, J.C., HAGA, A., SOUZA, M.A. (2003) *Pragas da goiabeira*. Boletim Técnico71. Epamig. 60 pp.

STACK, C.M., EASWARAMOORTHY, S.G., MET HA, U.K., DOWNES, M.J., GRIFFIN, C.T., BURNELL, A.M. (2000) Molecular characterisation of *Heterorhabditis indica* isolates from India, Kenya, Indonesia and Cuba. *Nematology*, 2: 477-487.

STOCK, S.P. (1997) *Heterorhabditis hepialius* Stock, Strong & Gardner, 1996 a junior synonym of *H. marelatus* Liu & Berry, 1996 (Rhabditida: Heterorhabditidae) with a redescription of the species. *Nematologica*, 43: 455-463.

STOCK, S.P., GRIFFIN, C.T., CHERANI, R. (2004) Morphological and molecular characterization of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. *Nematology*, 6: 401-412.

STOCK, S.P., KAYA, H.K. (1996) A multivariate analysis of morphometric characters of *Heterorhabditis* species (Nemata: Heterorhabditidae) and the role of morphometrics in the taxonomy of species of the genus. *Journal of Parasitology*, 82: 806-813.

SZALANSKI, A.L., SIKES, D.S., BISCHOF, R., FRITZ, M. (2000) Population genetics and phylogenetics of the endangered American burying beetle, *Nicrophorus americanus* (Coleoptera: Silphidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93: 589- 594.

TAMURA K, DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-1599.

TAUTZ, D., P. ARCTANDER, P., MINELLI, A., THOMAS, R.H., VOGLER, A.P. (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 70-74.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673–4680.

TOLEDO, A.J., PEREZ, C.M., LIEDO, P.Y.L. BARRA, (1999) Parasitismo de larvas de *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) por *Steinernema feltiae* (Rhabditidae: Steinernematidae): Efecto del tipo de suelo y profundidad del huésped. Memorias del XXXIV. Anais Congreso Nacional de Entomología Aguascalientes. México, p. 466 – 471.

TOLEDO, J., RASGADO, M.A., IBARRA, J.E., GÓMEZ, A., LIEDO, P., WILLIAMS (2005) T. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophaga* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 15: 627-634.

TOMALAK, M., PIGGOTT, S., JAGDALE, G.B. (2005) Glasshouse Application. In: GREWAL, P.S., EHLERS, R.U., SHAPIROILAN, D.I. (eds.) *Nematodes as biocontrol agents*. Cambridge: CABI Publishing, p.147-166.

VILLALBA, G.D.A. (2003) Tecnología y equipos de aspersión para el control de La broca del café. In: Curso Tecnología y Equipos de aspersión para El control de la broca del café. Chinchiná (Colombia), p. 400-450.

WESTERMAN, P.R. (1999) Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20° C and effects on efficacy. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 206-213.

WHITE, G.F. (1927) A method for obtaining infective nematode larvae from culture. *Science*, 66: 302-303.

WILLER H., YUS, S.E.F.I., MENZLER, M., SORENSEN, N. (2008) The world of Organic Agriculture: Statistics and Emerging Trends 2008. Disponível em: [http://www.soel.de/fachthemen/oekolandbau\\_welt.html#1](http://www.soel.de/fachthemen/oekolandbau_welt.html#1). Acessado em 20 de fevereiro de 2010.

WILLER, H. (2008) The World of Organic Agriculture – statistics and emerging trends 2008, IFOAM, SOEL, FIBL, Frick, Suíça.

WILLER, H., KILCHER, L. (2011) The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends, IFOAM, Bonn, p.32.

WILLER, H., YUSSEFI, M. (2007) The world of organic agriculture: statistics and emerging trends. 9. ed. Bonn: IFOAM, 259 p.

WOMERSLEY, H.B.S. (1990) Biogeography of Australasian marine macroalgae, Chapter 16, *In*: M.N. Clayton and R.J. King (eds). *Biology of Marine Plants*. Longman Cheshire, Melbourne, p. 367-38.

ZUCKERMAN, B.M., JANSSON, H.B. (1984) Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host-prey recognition. *Annual Review of Phytopathology*, 22: 95 - 113.

## ANEXOS

Relação de tabelas com análise de variância de todos os experimentos

Tabela 1. Análise de variância para variável mortalidade sob diferentes temperaturas

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Época	1	225, 000	225, 000	0, 399	0, 529
Temperatura	4	92150, 000	23037, 500	40, 855	0, 000
<i>Reg. Linear</i>	1	76050, 000	76050, 000	134, 867	0, 000
<i>Reg. Quad.</i>	1	11571, 429	11571, 429	20, 521	0, 000
<i>Desvio</i>	2	4528, 571	2264, 286	4, 015	0, 021
Época*temperatura	4	2150, 000	537, 500	0, 953	0, 437
Erro	90	50750, 000	563, 889		
Total	99	145275,000			
CV(%)			35,71		

Tabela 2. Análise de variância para variável mortalidade sob diferentes tempos de exposição

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Época	1	9, 2796	9, 2796	0, 0380	0, 8450
Horas	5	107273, 3983	21454, 6797	88, 7390	0, 0000
<i>Reg. Linear</i>	1	97107, 7695	97107, 7695	401, 6500	0, 0000
<i>Reg. quad</i>	1	6342, 8869	6342, 8869	26, 2350	0, 0000
<i>Desvio</i>	3	3822, 7419	1274, 2473	5, 2700	0, 0020
Horas*época	5	601, 8426	120, 3685	0, 4980	0, 7772
Erro	108	26111, 3560	241, 7718		
Total	119	133995, 8766			
CV (%)			24,02		

Tabela 3. Análise de variância para variável mortalidade sob diferentes concentrações

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Época	1	1000,1000	1000, 1000	4, 6960	0, 0319
Concen.	7	185645,0780	26520, 7254	124, 5290	0, 0000
<i>Reg. Linear</i>	1	154761,4579	154761, 4579	726, 6900	0, 0000
<i>Reg. quad</i>	1	19369,2018	19369, 2018	90, 9490	0, 0000
<i>Desvio</i>	5	11514,4182	2302, 8837	10, 8130	0, 0000
Concen*época	7	889, 0445	127, 0064	0, 5960	0, 7581
erro	144	30667, 3339	212, 9676		
Total	159	218201,5564			
CV(%)			24,15		

## Anova para profundidade

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Sistema	1	222,2444	222,2444	0,6280	0,4312
Época	1	1388,9444	1388,9444	3,9220	0,0520
Sistema*época	1	55,5444	55,5444	0,1570	0,6934
Profundidade (Sistema)	6	63558,6446	10593,1074	29,9100	0,0000
Profundidade (Conven.)	3	35334,9334	11778,3111	33,2570	0,0000
Reg. quad	1	28800,4800	28800,4800	81,3190	0,0000
Reg. quad	1	5445,2223	5445,2223	15,3750	0,0000
Desvio	1	1089,2311	1089,2311	3,0750	0,0840
Profundidade (Org.)	3	28223,7112	9407,9037	26,5640	0,0000
Reg. quad	1	27223,3111	27223,3111	76,8660	0,0000
Reg. quad	1	444,7556	444,7556	1,2560	0,2670
Desvio	1	555,6444	555,6444	1,5690	0,2150
Época*profundida(Sistema)	6	777,7556	129,6259	0,3660	0,8978
Erro	64	22666,5336	354,1646		
Total	79	88669,6671			
CV(%)			27,54		

## Anova para Distancia

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Sistema	1	2116,2760	2116,2760	41,0540	0,0000
Ano		483,9560	483,9560	9,3880	0,0030
Sistema*Ano	1	235,1009	235,1009	4,5610	0,0358
Distância (Sistema)	8	46536,3130	5817,0391	112,8470	0,0000
Distância (Convencional)	4	33375,7218	8343,9305	161,8670	0,0000
Reg. Linear	1	29742,9271	29742,9271	576,9930	0,0000
Reg. Quad	1	2094,6884	2094,6884	40,6360	0,0000
Desvio	2	1538,1064	769,0532	14,9190	0,0000
Distância (Orgânico)	4	13160,5911	3290,1478	63,8270	0,0000
Reg. Linear	1	10660,9117	10660,9117	206,8150	0,0000
Reg. Quad	1	2144,8486	2144,8486	41,6090	0,0000
Desvio	2	354,8309	177,4154	3,4420	0,0370
Ano*Distância(Sistema)	8	138,6187	17,3273	0,3360	0,9494
Erro	80	4123,8494	51,5481		
Total	99	53634,1140			
CV(%)				9,41	

## Anova para persistência 30 dias

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>F
Sistema	1	67,5000	67,5000	0,3510	0,55
Época	1	5740,8333	5740,8333	29,8800	0,00
Sistema*época	1	9540,8333	9540,8333	49,6580	0,00
Dias (sistema)	22	30931,6667	1405,9848	7,3180	0,00
Dias (conve)	11	15258,3333	1387,1212	7,2200	0,00
Reg. Linear	1	64,6504	64,6504	0,3360	0,56
Reg. quad	1	9109,0926	9109,0926	47,4110	0,00
Desvio	9	6084,5904	676,0656	3,5190	0,00
Dias (org)	11	15673,3333	1424,8485	7,4160	0,00
Reg. Linear	1	308,9510	308,9510	1,6080	0,20
Reg. quad	1	11048,5781	11048,5781	57,5060	0,00
Desvio	9	4315,8042	479,5338	2,4960	0,00
Época*dias (sistema)	22	4578,3333	208,1061	1,0830	0,36
Erro	432	83000,0000	192,1296		
Total	479	133859,1667			
CV(%)			22,90		

## Anova para persistência

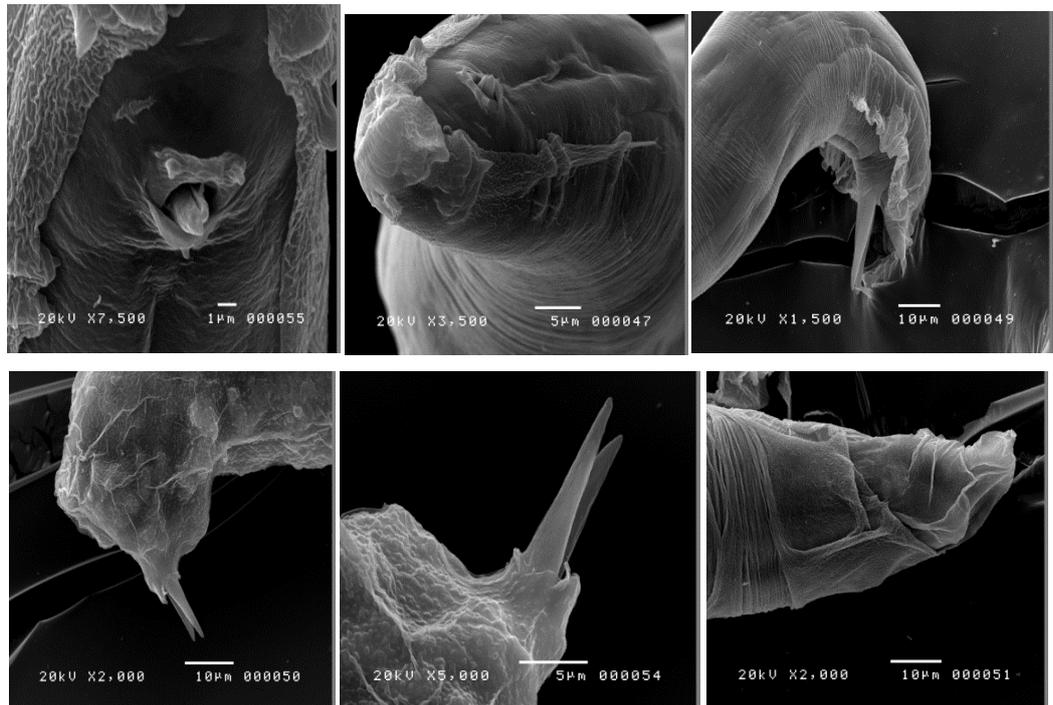
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Sistema	1	2041,6667	2041,6667	5,9800	0,0153
Ano	1	2343,7500	2343,7500	6,8640	0,0094
Ano*Sistema	1	93,7500	93,7500	0,2750	0,6008
Dias (Sistema)	10	106604,1667	10660,4167	31,2220	0,0000
Dias (Convencional)	5	50729,1667	10145,8333	29,7150	0,0000
Reg. Linear	1	49801,7857	49801,7857	145,8600	0,0000
Reg. Quad.	1	95,2381	95,2381	0,2790	0,5980
Desvio	3	832,1429	277,3810	0,8120	0,4880
Dias (Orgânico)	5	55875,0000	11175,0000	32,7290	0,0000
Reg. Linear	1	53444,6429	53444,6429	156,5290	0,0000
Reg. Quad.	1	2263,3929	2263,3929	6,6290	0,0110
Desvio	3	166,9643	55,6548	0,1630	0,9220
Ano*dias (Sistema)	10	2000,0000	200,0000	0,5860	0,8248
Erro	216	73750,0000	341,4352		
Total	239	186833,3333			
CV(%)			51,57		

## Anova para persistência 60 dias

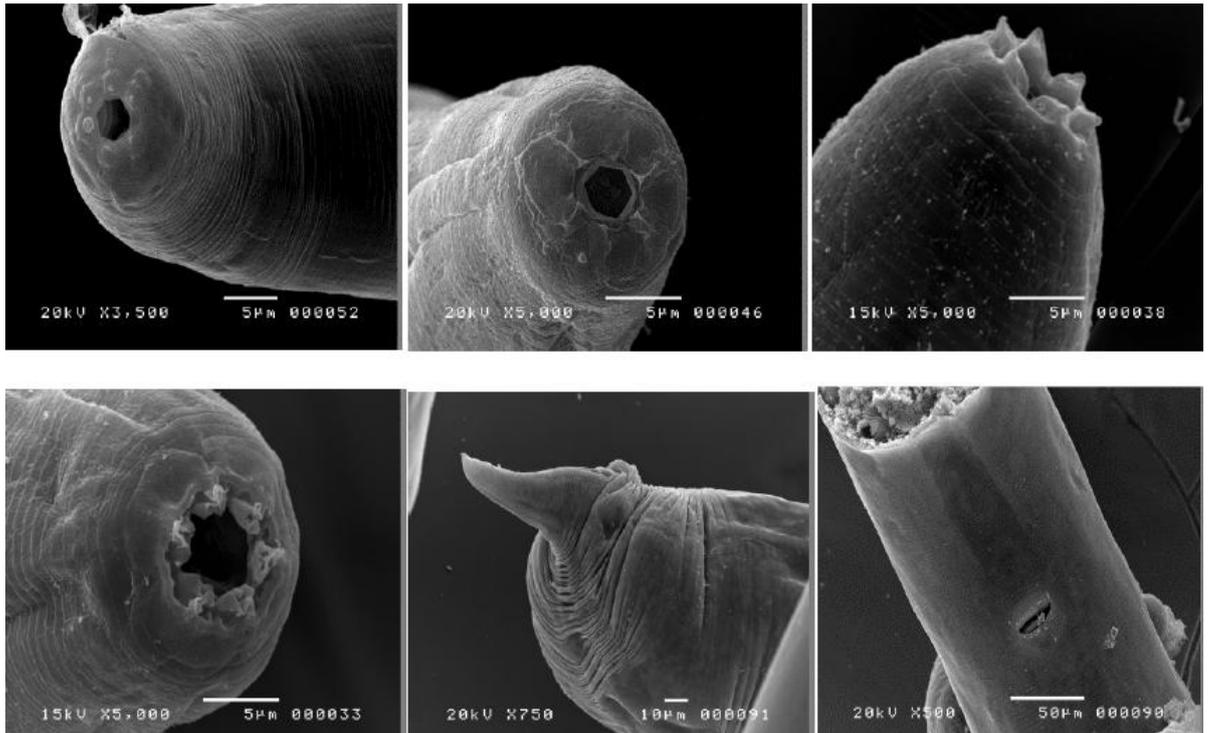
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Sistema	1	2041,6667	2041,6667	5,9800	0,0153
Ano	1	2343,7500	2343,7500	6,8640	0,0094
Ano*Sistema	1	93,7500	93,7500	0,2750	0,6008
Dias (Sistema)	10	106604,1667	10660,4167	31,2220	0,0000
Dias (Convencional)	5	50729,1667	10145,8333	29,7150	0,0000
<i>Reg. Linear</i>	1	49801,7857	49801,7857	145,8600	0,0000
<i>Reg. Quad.</i>	1	95,2381	95,2381	0,2790	0,5980
<i>Desvio</i>	3	832,1429	277,3810	0,8120	0,4880
Dias (Orgânico)	5	55875,0000	11175,0000	32,7290	0,0000
<i>Reg. Linear</i>	1	53444,6429	53444,6429	156,5290	0,0000
<i>Reg. Quad.</i>	1	2263,3929	2263,3929	6,6290	0,0110
<i>Desvio</i>	3	166,9643	55,6548	0,1630	0,9220
Ano*dias (Sistema)	10	2000,0000	200,0000	0,5860	0,8240
Erro	216	73750,0000	341,4352		
Total	239	186833,3333			
CV(%)			51,57		

## ANEXO 2

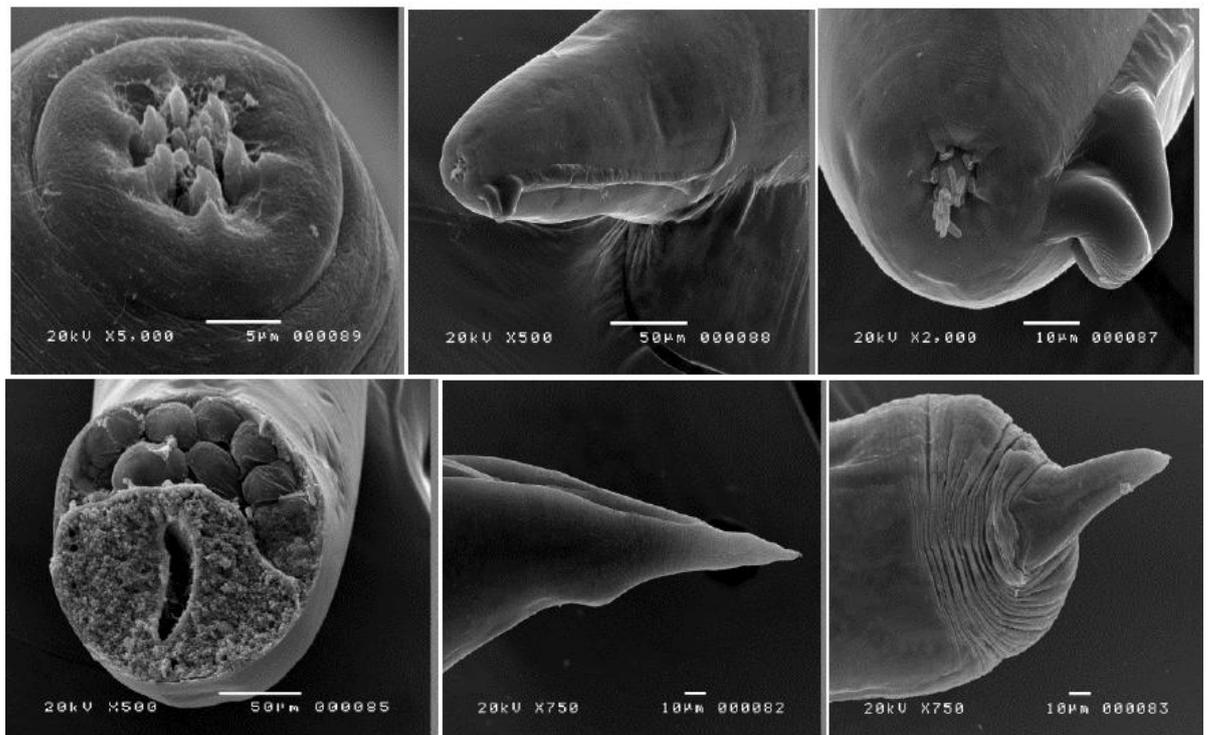
Fotos de macho em microscopia de varredura



Fotos de fêmeas hermafroditas em microscopia de varredura



Fotos de fêmeas anfiticas em microscopia de varredura



Fotos de juvenis em microscopia de varredura

