

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA) DO MANGUEZAL DO
ESTUÁRIO DO RIO PARAÍBA DO SUL, RJ

FELIPE DA SILVA COSTA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 2014

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA) DO MANGUEZAL DO
ESTUÁRIO DO RIO PARAÍBA DO SUL, RJ

FELIPE DA SILVA COSTA

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

Orientadora: Prof. Cláudia de Melo Dolinski

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 2014

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA) DO MANGUEZAL DO
ESTUÁRIO DO RIO PARAÍBA DO SUL, RJ

FELIPE DA SILVA COSTA

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

Comissão Examinadora:

Prof. Ricardo Moreira de Souza (PhD, Fitopatologia) – UENF

Prof. Vicente Martins Gomes (Dr., Fitopatologia) – UENF

Prof^a. Inês Ribeiro Machado (Dr., Fitopatologia) – UFOPA

Prof^a. Cláudia de Mello Dolinski (PhD, Fitopatologia) – UENF

Orientadora

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 078/2014

Costa, Felipe da Silva

Isolamento e caracterização biológica de nematoides entomopatogênicos (*Rhabditida*) do manguezal do estuário do Rio Paraíba do Sul, RJ / Felipe da Silva Costa. – 2014.

45 f. : il.

Orientador: Cláudia de Melo Dolinski.

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

Bibliografia: f. 40 – 45.

1. Nematoda 2. Salinidade 3. Progenie 4. Biodiversidade 5. *Heterorhabditis* I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 592.57

Dedico este trabalho aos meus pais, José Freitas e Célia Costa pelo incentivo aos estudos e por acreditar no verdadeiro amor e recuperar a fé. Dedico a Deus por sempre estar presente em minha vida, me dar saúde, iluminação, força nos momentos difíceis e proteção nas estradas por todos os dias, me fortalecendo com a força da fé.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

A UENF, pela oportunidade de realização do curso e a Capes pela concessão da bolsa;

A minha família, pais e irmãos Davi, Giselle, Fabiane e Josielle;

Aos meus professores, Cláudia e Ricardo, pela oportunidade, amizade, motivação e confiança;

Aos amigos do curso de Pós – Graduação, especialmente do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia;

Aos amigos do laboratório de Nematologia, Alexandre, Thiago, Karla, Vicente, Denise, Renata, Rafael e Lívia, pela amizade e os ótimos momentos vividos;

A todos os funcionários, técnicos e estagiários do LEF;

Aos amigos Inês, Liliana, Anália, Letícia, Carlos Augusto, Lucas, Silas, Maria Fernanda e Schineider;

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	09
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Manguezais.....	11
2.2 Nematoides.....	14
2.2.1 Nematoides Entomopatogênicos (Neps).....	14
2.2.1.1 Família Steinernematidae (Chitwood e Chitwood).....	16
2.2.1.2 Família Heterorhabditidae (Poinar).....	17
2.3 Identificação e Isolamento de Nematoides Entomopatogênicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Local.....	19
3.2 Criação de <i>Galleria mellonella</i>	20
3.3 Colocação das Armadilhas a Campo e Caracterização das Áreas.....	20
3.4 Isolamento dos Nematoides Entomopatogênicos.....	21
3.5 Análise da Progênie dos isolados.....	22
3.6 Teste de Salinidade com diferentes concentrações da solução Tampão M9.....	23
3.7 Sobrevivência de Neps isolados em substrato de manguezal.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Isolamento dos Nematoides Entomopatogênicos.....	25
4.2 Análise da Progênie dos isolados.....	27
4.3 Teste de Salinidade com diferentes concentrações de NaCl em solução Tampão M9.....	29
4.4 Sobrevivência de Neps isolados e capacidade de Infecção em solo de manguezal.....	32
5. CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

COSTA, FELIPE SILVA; M.Sc. Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2014. **Isolamento e Caracterização biológica de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida) do manguezal do estuário do Rio Paraíba do Sul, RJ.** Orientador: Prof^a Cláudia de Melo Dolinski. Professores conselheiros: Ricardo Moreira de Souza; Dr. Vicente Martins Gomes e Dra. Inês Ribeiro Machado.

Os manguezais possuem uma fauna e flora associada típica, formando ambientes altamente diversos e de elevada importância ecológica e socioeconômica. Para caracterizar biologicamente as espécies nativas de nematoides entomopatogênicos (NEPs) em áreas de manguezais do Norte Fluminense, foram realizados quatro experimentos. O primeiro constou no isolamento de NEPs a partir de colocação de armadilhas grade de aço com 20 larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) no solo a 5 cm de profundidade em 10 pontos distribuídos em zonação para cada uma das cinco áreas amostradas ao longo do manguezal. Foram isolados quatro NEPs (*Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39 e *Heterorhabditis* sp. LPP40). As linhagens de nematoides entomopatogênicos isolados pertencem ao gênero *Heterorhabditis* por apresentar como primeira geração no hospedeiro a forma hermafrodita e JIs com presença de uma projeção na extremidade anterior. Foram realizados também testes de salinidade em solução M9 com diferentes

concentrações de NaCl em placas de Petri com solo. Os NEPs utilizados neste experimento foram os quatros isolados do manguezal e a espécie *H. bacteriophora* HP88. Houve diferenças significativas de médias de sobrevivência quando a espécie de *H. bacteriophora* HP88 foi submetida a uma concentração de 18g de NaCl. Foram analisadas também as médias de sobrevivência dos isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39 e *Heterorhabditis* sp. LPP40 e da espécie *H. bacteriophora* HP88 em solos esterilizados provenientes de cinco áreas do manguezal de Gargaú. A variável número de NEPs da espécie *H. bacteriophora* HP88 apresentou diferenças significativas das médias por redução de sobrevivência quando submetido em solos típicos de manguezais. Foi avaliada também a média de produção de juvenis infectantes (JIs) por emergência de cadáveres de larvas de *Galleria mellonella* em 20 repetições com médias de 247.900 para *Heterorhabditis* sp.LPP37, 116.200 para *Heterorhabditis* sp. LPP38, 34.650 para *Heterorhabditis* sp. LPP39, 137.050 para *Heterorhabditis* sp. LPP40 e 139.070 para *H. bacteriophora* HP88. A produção de JIs foi expressiva, houve diferenças significativas entre as médias dos isolados quando multiplicados em larvas de *G. mellonella*.

Palavras-chave: Nematoda, salinidade, progênie, biodiversidade, *Heterorhabditis*.

ABSTRACT

COSTA, FELIPE SILVA ;M.Sc. Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2014. **Biological characterization and isolation of entomopathogenic nematodes (Rhabditida) of mangrove of river estuary Paraíba do Sul, RJ** . Advisor: Prof. Dr. Vicente Martins Gomes and Dr. Inês Ribeiro Machado.

Mangroves have a typical associated fauna and flora forming a highly diverse, ecological and socioeconomic important environment. To biologically characterize the native species of entomopathogenic nematodes (EPNs) in mangrove areas in North part of Rio de Janeiro state, four experiments were performed. The first consisted in isolating EPNs by placing steel grid traps with 20 larvae of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) at 5 cm depth in the soil in 10 points distributed in the five zoning for each of the five areas sampled along the mangrove. Four EPNs (*Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39 and *Heterorhabditis* sp. LPP40) were isolated. The isolated strains of entomopathogenic nematodes belonged to *Heterorhabditis* genus since they presented hermaphrodite in the first generation infecting the host and their infective juveniles had a tooth in the anterior end. Tests of salinity in M9 buffer solution with different NaCl concentrations in Petri dishes with soil were also conducted. EPNs used in this experiment were the four isolates from the

mangrove and the species *H. bacteriophora* HP88. There were significant differences in the average survival when *H. bacteriophora* HP88 was subjected to a concentration of 18g NaCl. The average survival of *Heterorhabditis* sp. isolates were also analyzed in sterile soils from five areas of Gargaú mangrove. *H. bacteriophora* HP88 showed significant difference on average survival when subjected to typical mangrove soils. The average production of infective juveniles (IJs) was also evaluated. The average number of IJs, significant differences between the means of the isolated in *Galleria mellonella* larvae. 247.900 for *Heterorhabditis* sp. LPP37, 116.200 for *Heterorhabditis* sp. LPP38, 34.650 *Heterorhabditis* sp. LPP39, 137.050 for *Heterorhabditis* sp. LPP40 and 139.070 for *H. bacteriophora* HP88. Significant differences between the means of production.

Keywords: Nematoda, salinity, progeny, Biodiversity, *Heterorhabditis*.

1. INTRODUÇÃO

O ecossistema de manguezais possui elevada importância ecológica e socioeconômica. Este ecossistema representa 8% de toda a linha de costa do planeta e um quarto da linha de costa da zona tropical, perfazendo um total de 181.077 km² (Souza Filho, 2005). O Brasil é o segundo país em extensão de áreas de manguezais (13.400 km²), atrás apenas da Indonésia, que apresenta cerca de 42.550 km² distribuídos ao longo de seus arquipélagos (Spalding *et al.*, 1997).

Os manguezais possuem uma fauna e flora típicas associadas, criando ambientes altamente específicos. Os mangues desempenham um importante papel ecológico nas costas tropicais e proporcionam fonte de renda para diversos pescadores e catadores de crustáceos. Ao mesmo tempo, os manguezais são considerados berço de diversas espécies de animais, porque oferecem refúgio e alimento nas etapas iniciais do ciclo de vida de muitas espécies, etapas essas essenciais para a manutenção das espécies (Lara-Domínguez & Yáñez-Arancibia, 1999).

No ecossistema de manguezais há pouca diversidade de espécies vegetais, mas apesar desta característica, esta baixa diversidade de flora contribui com a composição paisagística típica de mangue o que, segundo Ukpong (1995), parece estar relacionada com determinadas características químicas e granulométricas dos solos nesse ecossistema.

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) são representados por dois gêneros, *Heterorhabditis* Poinar e *Steinernema* Travassos. Ambos são patógenos obrigatórios de insetos. Esses nematoides possuem uma associação simbiótica com bactérias patogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* Thomas & Poinar e *Photorhabdus* Boemare, Louis & Kuhl, associadas respectivamente aos

nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Poinar, 1990). Os NEPs possuem habilidade de localizar e entrar no corpo de insetos hospedeiros através de aberturas naturais ou até mesmo através da perfuração de sua cutícula.

A variabilidade de fatores ambientais em manguezais oferece inúmeros nichos disponíveis para diferentes espécies, compostos por diferentes níveis tróficos e características morfológicas, demonstrando uma forte relação entre a diversidade morfológica e a plasticidade ecológica (Pinto *et al.*, 2012). Há uma grande variedade de estudos e pesquisas relacionadas à diversidade de nematoides de vida livre em diferentes microambientes de manguezais, mas não há relatos e dados de NEPs em áreas de mangue.

É fundamental conhecer a diversidade de espécies de NEPs nativos, visto que para estudos de controle de pragas na agricultura, estes já estão adaptados às características locais. O manejo biológico de pragas com NEPs pode ser uma alternativa para substituir o uso de inseticidas, visto que NEPs são extremamente virulentos a diferentes espécies de insetos praga, não são patogênicos a outros animais e também não causam impacto ao ambiente (Glaugler & Han, 2002).

Assim sendo, o objetivo do trabalho foi conhecer um pouco da diversidade de NEPs em áreas de manguezais do Norte Fluminense, bem como caracterizar a presença destes nematoides com os fatores abióticos (nível de pH, matéria orgânica, porcentagem de carbono e granulometria do solo) específicos de manguezais. Objetivou-se também isolar os NEPs e caracterizar alguns aspectos da sua biologia, como seu potencial reprodutivo e sua sobrevivência em diferentes concentrações de salinidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Manguezais

O ecossistema de manguezais consiste em um habitat particular. Ele representa uma unidade morfofuncional, componente de um sistema costeiro de áreas tropicais e subtropicais de suma importância pelas diversas funções que desempenham, como a manutenção das características físicas da costa, a prevenção de erosões e suas estruturas. Desempenha também um papel de alta importância na diversidade biológica por sua alta produtividade e proteção de diferentes espécies (Lara-Domínguez & Yáñez-Arancibia, 1999).

Os manguezais são áreas de sedimentos lamosos não consolidados, com pouca declividade e em geral associados às baías, às lagunas, aos estuários e aos deltas. O substrato do manguezal apesar de ser rico em matéria orgânica e nutriente, é hipersalino e hipóxico. Assim, as plantas desenvolveram adaptações para esse ambiente, como as lenticelas que possibilitam trocas gasosas diretamente com o ar, raízes radiais e de suporte para dar sustentabilidade no sedimento lamoso, viviparidade para assegurar o sucesso reprodutivo e adaptações fisiológicas para suportar a grande variação de salinidade (Schaeffer-Novelli, *et al.*, 2004). Em todo território brasileiro estes ecossistemas são caracterizados por zonas de elevada produtividade biológica, fertilizando as águas costeiras pela transformação da serapilheira produzidas nestes bosques em partículas de detritos, os quais são exportados para sistemas costeiros adjacentes e utilizados como alimento por um grande número de organismos (Adaime, 1987).

A grande diversidade de vegetação de manguezais se desenvolve sobre solos caracterizados por uma grande variabilidade granulométrica de sedimentos, o que tem aumentado o interesse de pesquisadores a respeito da relação dessa vegetação com as propriedades físico-químicas do solo (Ukpong, 1994; Ukpong & Areola, 1995).

No Brasil, existem três espécies principais de vegetais de manguezais, o *Rhizophoramangle* ou mangue-vermelho, característico de solos lodosos, com raízes aéreas. O *Laguncularia racemosa* ou mangue-branco, encontrado em terrenos mais altos, de solo mais firme, associado a formações arenosas. O terceiro tipo é representado pela *Avicennia schaueriana* ou mangue-preto. Assim como a *Laguncularia*, possui raízes radiais, mas com pneumatóforos (estruturas que auxiliam na troca gasosa) mais desenvolvidos e em maior número (Schaeffer-Novelli, et al, .2004). Há outras vegetações instaladas ao longo do manguezal não nativas.

Segundo Schaeffer-Novelli *et al.* (2004), as espécies de vegetais de manguezais estão distribuídas em zonas distintas, desde uma região mais alagada à mais elevada (Figura 1).

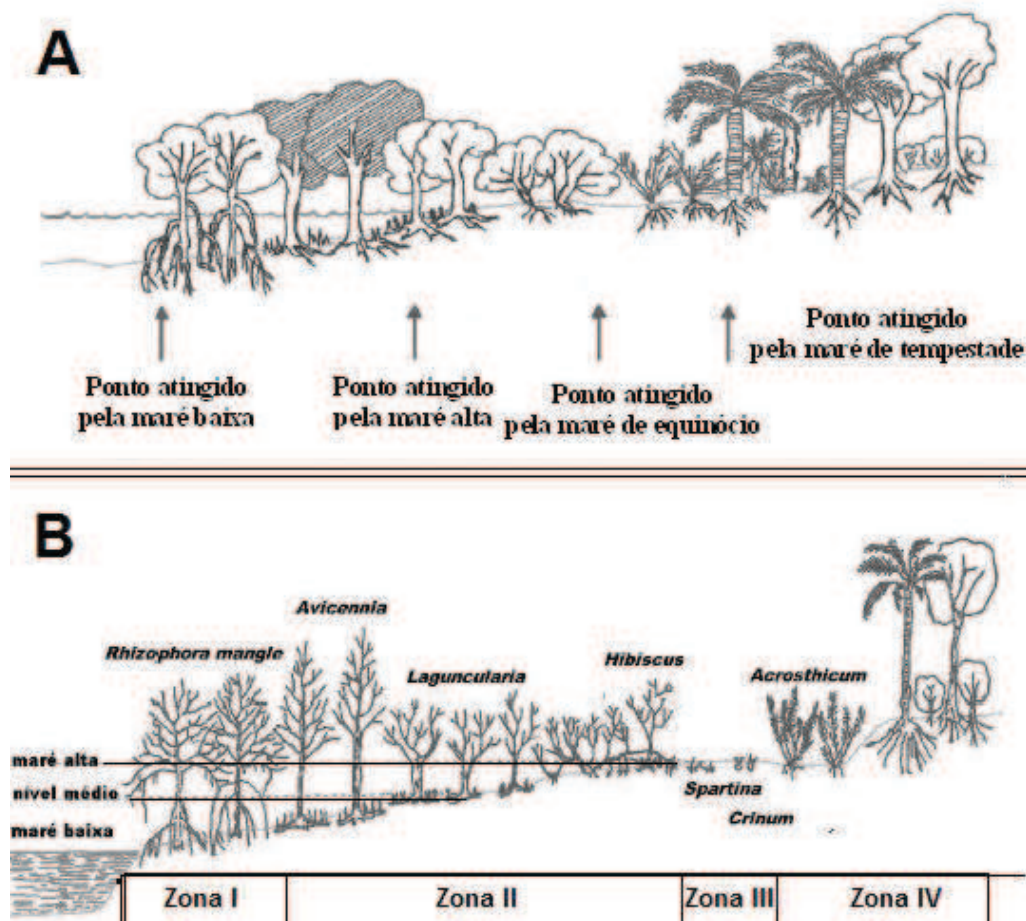


Figura 1. Desenho esquemático da zonação horizontal de um manguezal. Em A, Pontos de baixa e alta maré. Em B, vegetação de manguezal distribuídas em zonas I, II, III e IV. Fonte: Adaptado de Lim et al. (2001)

A zona I ou zona externa sofre inundação frequente de marés. O sedimento é areno-lodoso com grande quantidade de matéria orgânica. Nessa faixa se encontra predominantemente o mangue-vermelho. A zona II ou zona interna é dominada pelas espécies de mangue-preto e mangue-branco com sedimentos mais arenosos, e a zona III ou zona de apicum é atingida somente em marés com grande amplitude, como as de sizígia que ocorrem nas luas nova e cheia, quando os efeitos lunares e solares reforçam uns aos outros, produzindo as maiores marés altas e as menores marés baixas. O sedimento é arenoso e hipersalino, por isso é desprovida de vegetação. Na zona IV ou zona de transição é o limite entre o ecossistema de manguezal e o terrestre. A salinidade tende a zero, é um terreno mais alto que não sofre inundação pela ação das marés e com sedimento arenoso. Essa zona apresenta características mistas entre o manguezal e o continente (Schaeffer-Novelli, 2004).

O fluxo das marés em manguezais é considerado semidiurno, com subida e descida que ocorrem duas vezes ao dia durante um período de aproximadamente 6,2 horas. Inclui também um sistema de macromarés (4 a 5 metros de altura máxima) com o ciclo total de 24,5 horas (Schweudenmann, 1998). Segundo Figueira (2002), a temperatura do ar oscila entre 25 e 30°C ao longo do ano. O mesmo ocorre para os valores de pH do solo que variam, entre 6 e 7. A salinidade apresenta maior flutuação, atingindo valores de 5 a 35 g/kg.

Ao contrário do que ocorre com os vegetais, a fauna de mangues não é restrita, sendo composta por mamíferos, aves, peixes, crustáceos, insetos e moluscos de diversas espécies. Por conta do stress devido à força das marés, o ambiente de manguezais não apresenta grande diversidade, em contrapartida tem uma alta produtividade primária, abundância e biomassa (Schaeffer-Novelli, 2004).

O manguezal de Gargaú, juntamente com o de Atafona, é considerado um dos maiores da região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, com aproximadamente 800 hectares, constituído por *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa* e *Rizophora mangle* (Bernini & Rezende, 2004). Entretanto, as espécies de vegetais nos manguezais do rio Paraíba do Sul não possuem padrão de zonação definidos e nem desenvolvimento estrutural significativo em relação aos outros manguezais do litoral fluminense (Bernini, *et al.*, 2003).

2.2. Nematoides

Os nematoides estão incluídos no filo Nematoda, também chamado Nemata, que reúne animais triblásticos, pseudocelomados, com simetria bilateral, de corpo cilíndrico, alongado e afilado nas extremidades. O tamanho pode variar de menos de um milímetro de comprimento a mais de 12 metros. Diversas espécies são endoparasitas de plantas e de animais. A maioria dos nematoides, no entanto, é de “vida livre” e habita ambientes diversos como solos úmidos e ricos em matéria orgânica, rios, lagos e oceanos. Há mais de 24 mil espécies desse Filo descritas na literatura. Isso coloca o Filo Nematoda em segundo lugar no número de espécies, à frente dos moluscos e atrás apenas dos artrópodes (Amabis & Martho, 2009). Estima-se que existam 10^6 espécies de nematoides, dentre as quais somente 26.000 são conhecidas atualmente (Blaxter, 2003).

2.2.1. Nematoides Entomopatogênicos (NEPs)

Os NEPs pertencem aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* e são considerados parasitas obrigatórios de insetos. Estes gêneros de nematoides apresentam associação simbiótica com bactérias patogênicas, gênero *Xenorhabdus* sp. associado a *Steinernema* e *Photorhabdus* sp. a *Heterorhabditis* (Poinar, 1990). Esses nematoides possuem forma cilíndrico-alongada, sem segmentação e ausência de apêndices, são patógenos obrigatórios capazes de colonizar alguns invertebrados. Apresentam certas adaptações como: ser letais a insetos, possuir associação simbiótica com bactérias entomopatogênicas e o seu terceiro estágio (J3), também chamado de juvenil infectante (JI), ter a capacidade de penetrar nos insetos e de sobreviver no solo por tempo limitado (Akhurst & Boemare, 1990; Sudhaus, 1993). Os JIs, considerados como única fase de vida livre dos NEPs, entram no hospedeiro a partir das suas aberturas naturais, boca, ânus e espiráculos, mas em algumas situações, estes juvenis também podem

perfurar a cutícula. Assim que os JIs atingem a hemocele do inseto, ocorre a liberação das bactérias simbiotes que causarão infecção e morte do hospedeiro. Estas mesmas bactérias após proliferarem servem de base para a nutrição dos nematoides e para defesa contra invasores secundários (Poinar, 1990). O ciclo de vida dos NEPs se inicia quando os juvenis infectantes (J3) penetram no corpo do inseto hospedeiro, em seguida as bactérias são liberadas em sua hemolinfa e se multiplicam rapidamente, causando septicemia e morte do hospedeiro (Grewal *et al.*, 2001).

Ao penetrarem no hospedeiro os JIs de *Steinernema* spp. passam ao último estágio juvenil (J4) e posteriormente a adultos de primeira geração (machos e fêmeas). Enquanto que, nos *Heterorhabditis* spp. os adultos da primeira geração são hermafroditas e a progênie destes hermafroditas é composta de machos e fêmeas (Adams & Nguyen, 2002). Dentro do inseto cadáver, ocorrem de duas a três gerações e quando as reservas de alimentos se extinguem, os nematoides se desenvolvem em JIs, que saem do corpo do inseto cadáver e vão para o ambiente em busca de novos hospedeiros (Grewal *et al.*, 2001). Antes dos JIs deixarem o cadáver, as bactérias simbiotes são apreendidas na vesícula especializada nos NEPs do gênero *Steinernema*, já para as espécies pertencentes ao gênero *Heterorhabditis*, as bactérias simbiotes são apreendidas e armazenadas na região anterior do intestino dos JIs, que não possui vesícula (Adams & Nguyen, 2002). Outra característica apresentada pelos NEPs de suma importância está relacionada à sua capacidade de dispersão e busca pelo hospedeiro. Estes nematoides são atraídos por subprodutos das atividades metabólicas do hospedeiro, como a respiração, que ocasiona em diferentes teores de CO₂ (Zuckerman & Jansson, 1984; Gaugler *et al.*, 1989). Em relação ao tipo de movimento e comportamento, os NEPs classificam-se em “ambusher” ou “cruiser”. Um exemplo típico “ambusher”, *Steinernema carpocapsae* Weiser, caracteriza-se por ficar parado sobre a cauda na superfície do substrato, aguardando a aproximação do hospedeiro. Este tipo de comportamento é conhecido como nictação, que permite aos NEPs alcançarem outros substratos ou hospedeiros mediante movimentos sincronizados e ondulatórios do corpo (Ishibashi & Kondo, 1990). *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar e *Steinernema glaseri* Steiner são exemplos típicos de “cruiser”, pois são

móveis e buscam os hospedeiros em resposta aos fatores químio-atraentes (Kaya & Gaugler, 1993).

Em relação à busca por NEPs em áreas de manguezais, que é um ambiente extremamente críptico, é importante conhecer seu comportamento e tolerância. Os NEPs, por serem natural do solo, sofrem influência de características deste habitat, como tamanho dos poros, umidade, concentração de gás oxigênio, temperatura e pH (Barbercheck, 1992). As relações de todos estes fatores abióticos podem afetar desde a sobrevivência até a capacidade de infecção dos NEPs (Kaya, 1990). Alguns NEPs podem apresentar tolerância a temperaturas extremas, mas há possibilidade que a baixa taxa de umidade do solo altere sua capacidade de deslocamento e persistência (Kung *et al.*, 1991).

2.2.1.1 Família Steinernematidae (Chitwood e Chitwood)

Segundo Kaya & Gaugler (1990), Steiner descreveu o primeiro NEP obtido na Alemanha em 1923, como *Aplectana kraussei*. Em 1927, Travassos estabeleceu o gênero *Steinernema* para abrigar esta espécie. Então, Steiner (1929) *apud* Gaugler e Kaya (1990) criou o gênero *Neoaplectana*, mas não estabeleceu características que o distinguisse claramente do gênero *Steinernema*. Filipjev, em 1934, observando a semelhança entre os dois gêneros, criou a subfamília denominada Steinernematinae, que logo depois foi elevada à condição de família por Chitwood & Chitwood, em 1937. Os dois gêneros foram admitidos como válidos, mas as espécies até então descritas já estavam incluídas em *Neoaplectana*. Isso prevaleceu por décadas. Em estudos posteriores concluíram não existir diferenças em relação a *Neoaplectana* quanto ao número e arranjo das papilas labiais e, em razão disso, propuseram que *Neoaplectana* passasse a ser considerado sinônimo de *Steinernema* (Wouts et al., 1982). Este tipo de preposição proporcionou inevitável confusão no âmbito dos estudos envolvendo esse grupo de NEPs. Atualmente, os especialistas utilizam o gênero *Steinernema* para classificar as espécies de Steinernematidae (Ferraz, 1998).

2.2.1.2 Família Heterorhabditidae (Poinar)

A família Heterorhabditidae Poinar 1976 contém um único gênero, *Heterorhabditis*, com a espécie tipo *H. bacteriophora*.

Segundo Adams & Nguyen (2002), o ciclo de vida das espécies do gênero *Heterorhabditis* é semelhante aos representantes do gênero *Steinernema*, a diferença ocorre quando no primeiro ciclo dentro do hospedeiro a primeira geração formada é hermafrodita, e os machos e as fêmeas só aparecem na segunda geração.

2.3. Identificação e isolamento de nematoides entomopatogênicos

Há diversas pesquisas e trabalhos publicados relacionados com a distribuição dos nematoides de vida livre em estuários de manguezais. Os nematoides de manguezais, em especial são marinhos, dominam a meio-fauna, constituindo cerca de 80% da fauna, distribuídos em predadores, onívoros, alimentadores de vegetais, dendritos e depósitos (Coull, 1985). Atualmente não há dados e pesquisas relacionados à presença de nematoides entomopatogênicos em áreas de manguezais.

As espécies de NEPs estão distribuídas em uma grande diversidade de áreas geográficas, de solos e em diferentes ambientes, adaptadas a grandes números de hospedeiros por coevolução. Os NEPs têm sido isolados de solos em diferentes ecossistemas do mundo, desde árticos até tropicais, apresentando um vasto leque de hospedeiros (Poinar, 1990; Hominick *et al.*, 1996). No Brasil, a primeira identificação e descrição taxonômica de um isolado similar a *Heterorhabditis* foi realizada por Pereira, (1927) que o identificou como *Rhabditis hambletoni*. Contudo, nunca foi aceito como *Heterorhabditis*, apesar do artigo descrever em detalhes seu ciclo de vida e ser muito similar a *Heterorhabditis*. Este era o único registro até recentemente, quando *H. amazonensis* proveniente

do Amazonas foi descrito por Andaló *et al.*, (2006). O interesse por nematoides entomopatogênicos ressurgiu no Brasil como uma alternativa no controle biológico de pragas de solo. Vários isolamentos do gênero *Heterorhabditis* foram realizados por Molina (2005) em Lavras-MG no Campus universitário UFLA. Também foram isolados NEPs provenientes do solo de Monte Negro (RO), linhagens de nematoides que foram identificadas como pertencentes a duas espécies do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida): *Heterorhabditis baujardi* e *Heterorhabditis indica* (Dolinski *et al.*, 2008). Todas essas linhagens foram isoladas a partir do uso de armadilhas com hospedeiros vivos no solo (Woodring & Kaya, 1988). Outra espécie isolada no Brasil foi *Steinernema brasiliensis* Leite, proveniente de uma reserva natural em Porto Murtinho, MT.

Também foram isolados e identificados nematoides entomopatogênicos da espécie *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David, 1992, a linhagem *H. indica* LPP 30. A linhagem *H. indica* LPP 30 foi isolada de uma propriedade localizada no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, utilizando-se como armadilha lagartas vivas de *Galleria mellonella* L. de 6º instar (Lepidoptera: Pyralidae) (Kaya e Stok, 1997; Minas, 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Este estudo foi desenvolvido no estuário secundário do Rio Paraíba do Sul, no norte do Estado do Rio de Janeiro, mais especificamente em Gargaú, comunidade situada no município de São Francisco de Itabapoana ($21^{\circ}36'00''\text{S}$ e $41^{\circ}03'00''\text{W}$), onde se localiza o maior manguezal do norte fluminense. O clima predominante é do tipo Aw (quente e úmido com chuvas de verão), com temperatura média mínima de 18°C e média máxima de 24°C . A precipitação média anual encontra-se entre 1.000 e 1.250 mm (SILVA, 2001) (Figura 2).

Os experimentos de isolamento e identificação dos NEPs foram conduzidos no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), pertencente ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ.

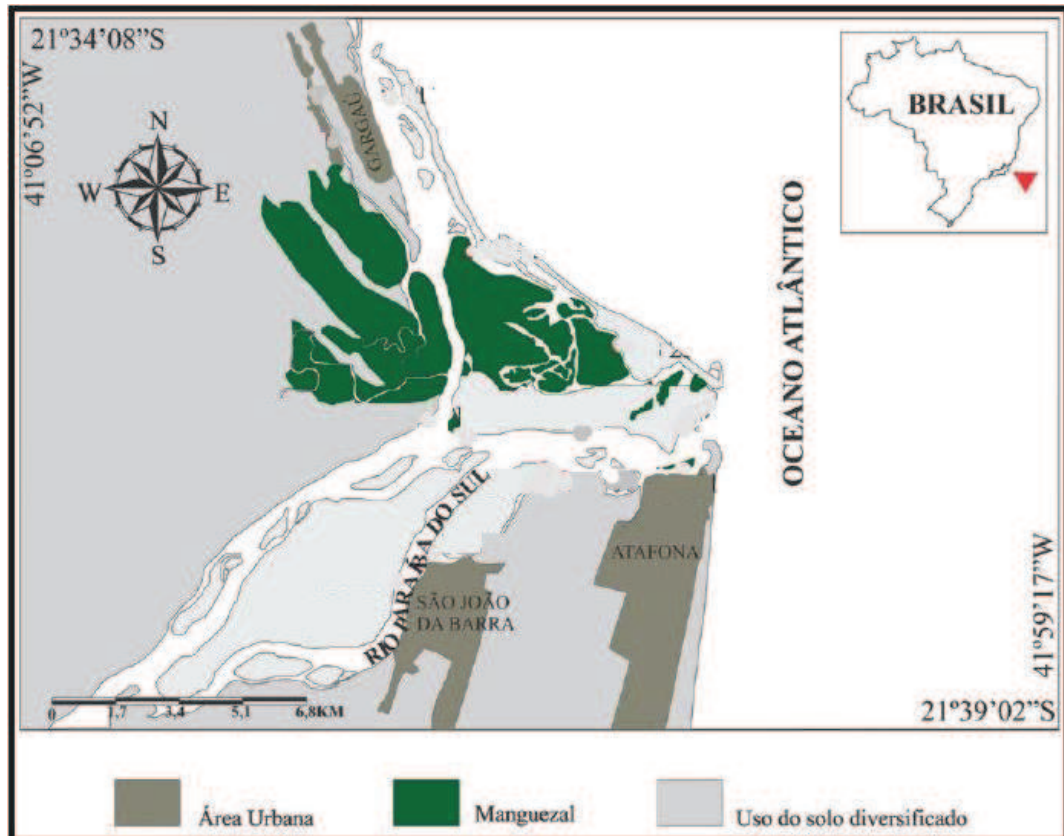


Figura 2. Mapa da imagem aérea do Delta Paraíba do Sul localizado no município de São Francisco de Itabapoana. Áreas de manguezais. Fonte: Silva, 2011.

3.2 Criação de *Galleria mellonella*

Larvas de *G. mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) foram criadas em laboratório a partir de dieta artificial (400 g de farelo de trigo, 200 g de leite em pó desnatado, 120 g de levedo de cerveja, 200 g de gérmen de trigo, 153 mL de mel e 82 mL de glicerina) e mantidas em temperatura controlada a 30° C. Na fase adulta, os insetos foram mantidos em potes cilíndricos de vidro (20 cm de altura X 14cm de diâmetro) com tampa de PVC. Na base da tampa de cada recipiente, foi adicionado papel (Formato: 105 x 148 mm. Gramatura: 75mg/m) para ovoposição. Os pedaços de papel contendo os ovos foram recortados e transferidos para potes plásticos com capacidade de 1000 mL, forrados com papel filtro (Whatman N°1) umedecido com água destilada. Após este procedimento, os potes foram transferidos para câmara de germinação (BOD) a 25°C, 80% UR por 24 horas. Depois deste período, os pedaços de papel recortados foram transferidos para potes plásticos (20 cm de comprimento X 10 cm de altura X 18 cm de largura) forrados com papel A4 (75mg/m) contendo dieta artificial para manutenção dos insetos, desde a eclosão até a fase imago (desenvolvimento holometábolo). Larvas de *G. mellonella* no sétimo instar foram coletadas para multiplicação dos NEPs. Os adultos foram recolhidos e transferidos para potes de vidro, para manutenção da criação dos insetos.

3.3 Colocação das armadilhas a campo e caracterização das áreas

Foram estabelecidos 12 pontos distribuídos para cada área na Zona II do manguezal. Foram escolhidas cinco áreas separadas por 1,5 km ao longo do manguezal. Estes pontos foram distribuídos a partir de um esquema de amostragem ao longo de um transecto, marcados, numerados e posicionados geograficamente desde o nível de baixa e alta maré (ponto onde há inundação) até um plano mais alto dos bosques dos manguezais (ponto não inundado). A colocação das armadilhas não foi adicionada na Zona I devido à constância de alagamento, no que decorre na morte das larvas de *G. mellonella* no interior das armadilhas. A verificação da altura das marés e fase lunar foram analisadas pelo

Banco Nacional de dados Oceanográficos da Marinha do Brasil (BNDO) no dia das colocações e coletas das armadilhas. As lagartas de *G. mellonella* no sétimo instar foram colocadas em um envelope de grade em aço (malha 1 mm x 1 mm, com 10 cm de altura e 7 cm de largura) baseado em Lara (2006). Em cada armadilha foram adicionadas 20 larvas de *G. mellonella* com massa média de 250 mg. Estas armadilhas foram colocadas no solo a 5 cm de profundidade no centro de cada parcela e cobertas por solo. Após 48 horas da adição das armadilhas, as mesmas foram retiradas, acondicionadas em sacos plásticos (modificado a partir de Kaya & Stock, 1997) e transportadas para o laboratório de Nematologia da UENF para isolamento de nematoides entomopatogênicos. Em cada ponto aplicado, foram recolhidas amostras de solo (300g) e enviadas ao Centro de Análise do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) para análise granulométrica e química (teor de matéria orgânica, porcentagem de carbono e pH).

3.4 Isolamento dos nematoides entomopatogênicos.

Após 48 horas da colocação das armadilhas com larvas de *G. mellonella* no manguezal, as larvas mortas foram retiradas das armadilhas e observadas buscando-se cadáveres com a coloração uniforme característica de infecção por NEPs. Em seguida, os cadáveres foram lavados em uma solução de hipoclorito de sódio (1%), em seguida em uma solução de sulfato de cobre (1%) e água destilada para prevenção de contaminação por outros nematoides ou por fungos existentes na cutícula do cadáver. Os cadáveres recolhidos foram mantidos em placas de Petri (5 cm de diâmetro) com papel filtro no fundo, por três dias, em câmara de germinação (BOD) a 25°C e 80% UR. Para as amostras que foram positivas para o isolamento de NEPs (vide resultados). Após este período, os cadáveres foram transferidos para placas de coleta de nematoides denominadas “armadilhas de White modificada” (White, 1927), constituídas por placas de Petri de 9 cm de diâmetro com uma argola de PVC (2,5 cm de diâmetro X 8 mm de altura) e, sobre esta, um pedaço de papel filtro 2,0 x 8,0 cm (Whatman N°1). O papel de filtro foi moldado de modo que suas bordas ficassem em contato com a água destilada contida na placa de Petri e, sobre esta, uma larva cadáver de *G.*

melonella. Após cerca de sete dias, JIs (juvenis infectantes) começaram a migrar para a água contida na placa de Petri e foram coletados com pipeta e mantidos em garrafas de cultura de células (CORNING) de 50 mL em câmara de germinação a 16°C (Kaya & Stock, 1997). Os nematoides obtidos a partir dos cadáveres foram utilizados para infectar novas larvas para confirmação de agentes etiológicos e manter-se isolados em laboratório.

3.5 Análise da progênie dos isolados

Para cada isolado NEPs obtidos: *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39, *Heterorhabditis* sp. LPP40 e *H. bacteriphora* HP88, utilizando-se como inseto hospedeiro uma larva de *Galleria mellonella* com massa média de 250 mg para cada placa de Petri (9 cm de diâmetro) foram realizadas 20 repetições. Foram adicionadas em cada placa 200 JIs com papel filtro no fundo, por três dias em câmara de germinação (BOD) a 25°C, 80% UR. Após este período, os cadáveres foram transferidos para placas de coleta de nematoides denominadas “armadilhas de White modificada” (White, 1927), que consiste em placas de Petri de 9 cm de diâmetro com uma argola de PVC (2,5 cm de diâmetro X 8 mm de altura) e, sobre esta, uma fita de papel filtro 2,0 x 8,0 cm (Whatman N°1) foi adicionado de modo que suas bordas ficassem em contato com a água destilada contida na placa de Petri e, sobre esta, um cadáver de *G. mellonella*. Durante sete dias, JIs migraram para a água contida na placa de Petri, e foram coletados com pipeta diariamente durante sete dias e totalizando um volume final padrão para todas as coletas de 70 mL mantidos em Becker de 250 mL (BOD) a 25°C, 80% UR. Para contagem dos JIs total ou progênie, foram utilizadas pipetas para coleta de alíquota de 0,1 mL em três repetições visualizadas em microscópio óptico invertido em lâminas de Peters.

Para a análise estatística, as variáveis foram testadas quanto à homogeneidade das variâncias (testes de Cochran & Bartlett) e à normalidade dos erros (teste de Lilliefors), em 5% de probabilidade, utilizando-se o Sistema de Análises estatísticas (SAEG, 1990). A seguir, os dados foram submetidos à Anova e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Todo o experimento foi repetido duas vezes, tendo-se feito uma análise conjunta das repetições no tempo.

3.6. Teste de salinidade com diferentes concentrações da solução Tampão M9.

Foram utilizadas 10 placas de Petri de 9 cm para adição dos isolados junto a uma larva de *G. mellonella*. Foi adicionada em cada placa 120 g de areia solarizada pela técnica de Sottomayor (1996), que se compreende na cobertura do solo previamente molhado com polietileno transparente exposto à radiação solar, que eleva a temperatura entre 35 e 55°C durante três dias. Foram adicionadas também, em cada placa, 10 mL de diferentes soluções salinas (KH_2PO_4 – 3g, Na_2HPO_4 – 6g, NaCl – 5g, MgSO_4 1M – 1mL e H_2O – 1 Litro) com concentrações de NaCl de 6 g, 9 g, 12 g, 15 g e 18 g em solução tampão M9. Em cada placa foi adicionada também uma concentração de 200 JIs dos NEPs *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39, *Heterorhabditis* sp. LPP40 e *H. bacteriphora* HP88. As placas foram armazenadas por sete dias em câmara de germinação (BOD) a 25°C, 80% UR. Foram realizados testes de pH nas diferentes concentrações. A análise de sobrevivência foi realizada por observação de nematoides vivos ou mortos em sua maioria em placa de Petri ao microscópio estereoscópio após o processamento de solo pelo método de Jenkins (1964). Amostra de areia utilizada no experimento foi enviada para o Centro de Análise do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) para análise granulométrica e química.

Para a análise estatística, as variáveis foram testadas quanto à homogeneidade das variâncias (testes de Kruskal-Wallis) e à normalidade dos erros (teste de Lilliefors), em 5% de probabilidade. A seguir, os dados foram submetidos à Anova e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Todo o experimento foi repetido uma vez, tendo-se feito uma análise conjunta das repetições no tempo.

3.7 Sobrevivência de NEPs isolados em substrato de manguezal

Foram realizadas 10 repetições para cada isolado *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39, *Heterorhabditis* sp. LPP40 e *H. bacteriphora* HP88 em placas de Petri (9 cm de diâmetro) com cinco amostras (1, 2, 3, 4 e 5) de solos provenientes de áreas de manguezal onde foram isolados NEPs. Foram adicionadas em cada placa 100 g de solo solarizado pelo método de Sottomayor (1996). Para cada placa foi adicionado também 200 JIs de cada isolado. As placas foram armazenadas por sete dias em câmara de germinação (BOD) a 25°C, 80% UR. A análise de sobrevivência de NEPs e infecção das larvas foram realizadas por observações de nematoides vivos ou mortos em placas de Petri ao microscópio estereoscópio após o processamento de solo pelo método de Jenkins (1964). Amostras de solo foram coletadas diretamente no manguezal e enviadas para o Centro de Análise do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) para análise granulométrica e química.

Para a análise estatística, as variáveis foram testadas quanto à homogeneidade das variâncias (testes de Kruskal-Wallis) e à normalidade dos erros (teste de Lilliefors), em 5% de probabilidade. A seguir, os dados foram submetidos à Anova e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Todo o experimento foi repetido uma vez, tendo-se feito uma análise conjunta das repetições no tempo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento dos nematoides entomopatogênicos

Foram obtidos quatro isolados do gênero *Heterorhabditis* por meio do método do inseto armadilha proposto por Kaya e Stok (1997). A identificação do gênero *Heterorhabditis* ocorreu por observações morfológicas de JIs e adultos visualizados em microscópio óptico. Nos machos foram observados a presença de bursa bem como a quantidade e distribuição das papilas (Nguyen *et al.*, 2004). A projeção na região anterior dos JIs também foi visualizada, além da presença do estágio hermafrodita na primeira geração dos nematoides no inseto cadáver (Figura 3) e pigmentação marrom avermelhada do inseto cadáver após infecção devido à proliferação da bactéria *Photorhabdus*, associada ao gênero *Heterorhabditis*.

Os isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39 e *Heterorhabditis* sp. LPP40 são provenientes de duas das cinco áreas amostradas no manguezal de Gargaú, em São Francisco de Itabapoana. As armadilhas foram colocadas no manguezal em três momentos diferentes, a primeira em setembro de 2012, onde não houve isolamento de NEPs. A segunda, em janeiro de 2013 e a terceira em outubro de 2013, com resultados positivos de infecção e isolamento (Figura 4). As armadilhas que apresentaram insetos cadáveres infectados com NEPs estavam distribuídas na Zona II (Figura 5) do manguezal, em áreas de baixa inundação pela ação das “marés baixas” que ocorrem duas vezes ao dia, conforme as fases lunares.



Figura 3. Foto de uma hermafrodita *Heterorhabditis* sp. LPP39

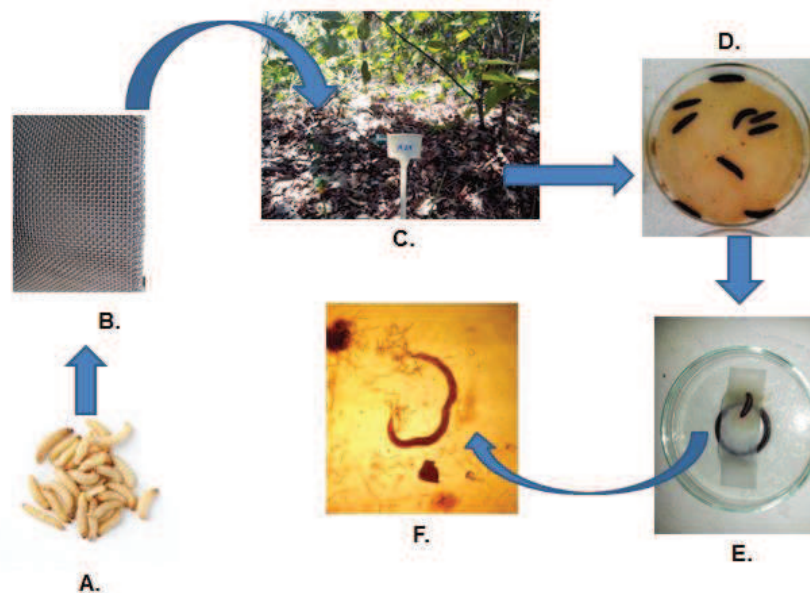


Figura 4. Isolamento de NEPs utilizando-se inseto armadilha com larvas de *Galleria mellonella*. A. Larvas de *G. mellonella* no último instar, B. Grade de aço, C. Local de aplicação da armadilha, D. Coleta dos insetos cadáveres e lavagem para esterilização, E. Armadilha de “White modificada”. F. Emergência de juvenis infectantes a partir de insetos cadáveres de *G. mellonella*.



Figura 5. Foto da Zona II do manguezal de Gargaú em São Francisco do Itabapoana, RJ.

4.2 Análise da progênie dos isolados

Após os sete dias da permanência dos insetos cadáveres de *G. mellonella* em armadilhas de “White modificada” e coletas diárias, foi feita a contagem da emergência total dos JIs. Em condições de laboratório, o início da emergência em insetos cadáveres de *G. mellonella* infectados com *H. baujardi* LPP7 é de 14 dias pós-infecção, continuando por um período de 5 dias (Dolinski *et al.*, 2007).

A progênie para o primeiro bioensaio não foi significativamente diferente entre as médias de produção dos isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39 e *Heterorhabditis* sp. LPP40 (Tabela 1). Poinar (1992) obteve de 100.000 a 300.000 JIs por inseto cadáver. De acordo com Dolinski *et al.* (2007), a produção de *H. baujardi* LPP7 por inseto cadáver de *G. mellonella* apresenta variação entre 100 e 150 mil JIs por inseto cadáver, valores equivalentes ao encontrados na produção dos isolados *Heterorhabditis* sp. LPP40 e *H. bacteriphora* HP88 (Figura. 6). Acevedo *et al.* (2005), ao avaliar a progênie de JIs de três linhagens de *Steinernema*, encontraram um valor entre 27.000 e 37.000 JIs em um período de 19 dias. As diferenças entre os valores de produção de JIs podem estar relacionadas a

diferentes metodologias, nutrição da larva e tamanho do hospedeiro. O número de JIs é dependente do tamanho do hospedeiro, que possibilita maior número de JIs e disponibilidade de alimento, Adams & Nguyen (2007).

Isolados	Ensaio 1	Ensaio 2
LPP37	247,90 A	156,35 A
LPP38	116,20 B	148,65 A
LPP39	34,65 B	39,55 B
LPP40	137,05 AB	129,93 A
HP88	139,07 AB	153,50 A
	C.V%= 93,092	C.V%=39,274

Tabela 1 – Número de juvenis infectantes (JIs) total dos isolados *Heterorhabditissp.* LPP37, *Heterorhabditissp.* LPP38, *Heterorhabditis sp.* LPP39, *Heterorhabditis sp.* LPP40 e *H. bacteriophora* HP88 (valores da tabela x1000).

Nas colunas, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade. Valores são médias de produção de JIs por larva de *G. mellonella*.

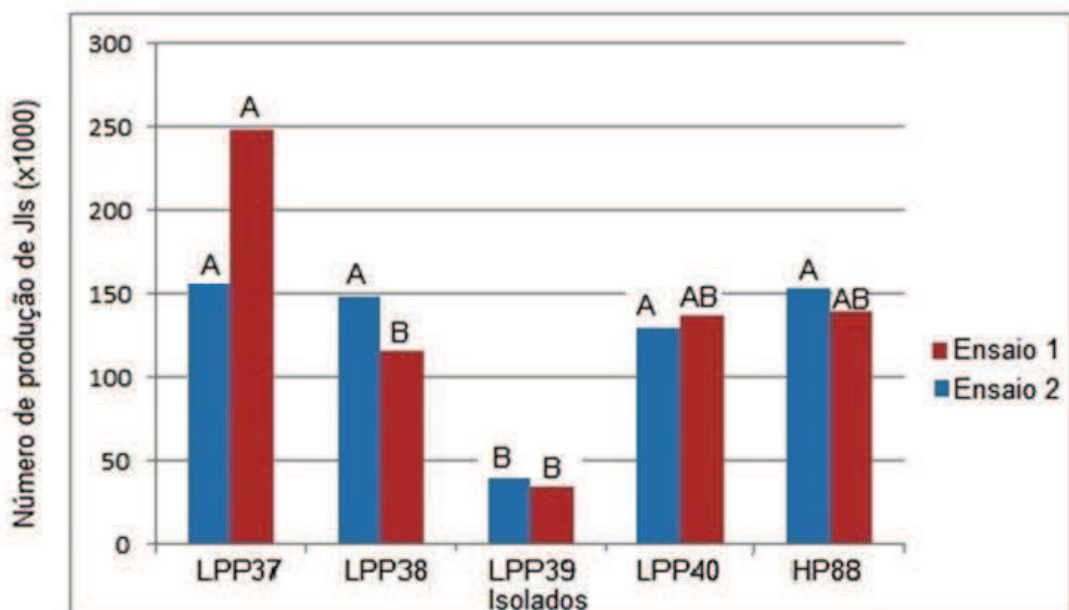


Figura 6. Médias comparativas entre ensaio 1 e 2 da produção de juvenis infectantes (JIs) total dos isolados *Heterorhabditis sp.* LPP37, *Heterorhabditis sp.*

LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39, *Heterorhabditis* sp. LPP40 e *H. bacteriophora* HP88.

Ocorreram diferenças significativas entre os valores de produção do isolado *Heterorhabditis* sp. LPP39 comparados com as médias das produções dos isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP40 e *H. bacteriophora* HP88. A média de produção de JIs dos isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37 foi superior no segundo ensaio e com características significativas diferentes comparada à média de produção do isolado *Heterorhabditis* sp. LPP39.

Em análise comparativa entre os bioensaios, a diferença nos resultados entre as médias de produção de JIs pode estar relacionada com a larva de *G. mellonella*, como a disponibilidade de nutrientes e suscetibilidade, bem como a patogenicidade do NEPs.

4.3 Teste de salinidade com diferentes concentrações de NaCl em solução Tampão M9

Houve redução da sobrevivência dos JIs e aumento da concentração de NaCl (Tabela 2). Não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de NaCl das linhagens do mangue em relação ao controle. Contudo, a sobrevivência de JIs de *H. bacteriophora* HP88 na concentração de 18 g diferiu do controle (6 g de NaCl) ($P \leq 0,05$).

Quando comparando as linhagens, o nematoide *H. bacteriophora* HP88 apresentou menor taxa de sobrevivência a partir da concentração de 9 g de NaCl, diferindo estatisticamente das demais linhagens pelo Teste de Tukey (Figura 7).

Tabela 2 – Sobrevivência média de juvenis infectantes dos isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39, *Heterorhabditis* sp. LPP40 e *H. bacteriphora* HP88 submetidos em solução Tampão M9 com diferentes concentrações (g) de NaCl. Valores dos isolados x 1000.

Isolados	6 g	9 g	12 g	15 g	18 g
LPP37	200 aA	180 aA	100 aA	120 aA	140 aAB
LPP38	200 aA	200 aA	200 aA	200 aA	120 aAB
LPP39	200 aA	200 aA	200 aA	200 aA	140 aAB
LPP40	200 aA	200 aA	200 aA	200 aA	200 aA
HP88	200 aA	200 aA	140 abA	60 bA	0 bB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas entre as linhas e letras maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

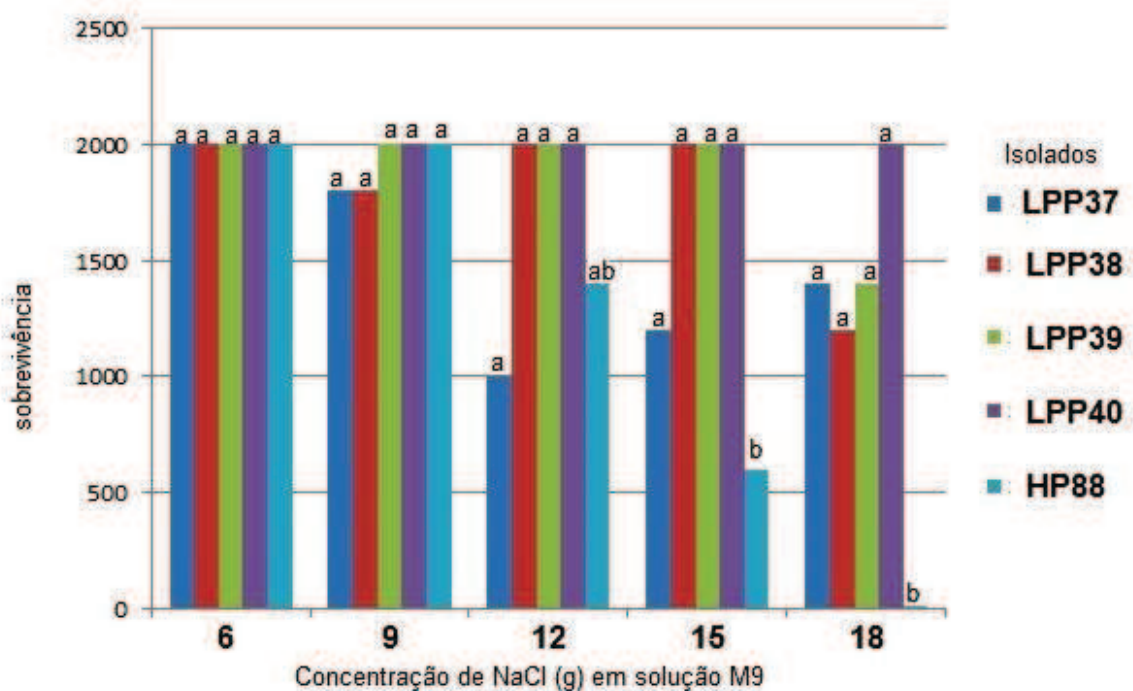


Figura 7. Sobrevivência média de JIs dos isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39, *Heterorhabditis* sp. LPP40 e *H. bacteriphora* HP88 imersos em Tampão M9 com diferentes concentrações (g) de NaCl. Valores dos isolados x 100.

Após sete dias de aplicação dos diferentes isolados em placas com solo, é perceptível as diferenças das médias de sobrevivência dos isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37, LPP38, LPP39 e LPP40 em relação ao isolado *H. bacteriophora* HP88, evidenciando que estes isolados provenientes de manguezais apresentaram maior tolerância à salinidade por adaptação em decorrência do ecossistema onde foram isolados. Thurston *et al.* (1996) utilizaram os NEPs *H. bacteriophora* e *S. glaseri* (Steiner) em soluções salinas com concentrações de 0; 52; 4,1; 9,4 e 18 gramas de NaCl por um litro de água destilada 24° C. Para os JIs de *H. bacteriophora* HP88, quando submetidos à alta concentração de NaCl, houve diferenças significativas de sobrevivência e de infecção. No atual experimento a solução utilizada, M9, apresenta uma maior diversidade de sais minerais similares ao meio natural que pode determinar resultados mais precisos quanto à tolerância real de nematoides em solos salinos.

De acordo com os testes de salinidade realizados por Nielsen *et al.* 2011, *Heterorhabditis bacteriophora* demonstrou tolerância à salinidade, porém com solução diferente, conhecida como “Instant Ocean”. Segundo Kaspi *et al.* 2010, a espécie *Steinernema riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, (1994) teve resultados de intolerância a altos teores de salinidade, bem como a redução de forrageamento em solos salinos.

A atividade dos NEPs é influenciada pela espessura da camada de água que recobre as partículas de solo (Molyneux e Bedding, 1984). O solo utilizado no experimento foi classificado como arenoso (Tabela 3), apresenta uma formação de camada de água ao redor das partículas de solo, sem afetar a aeração, a locomoção e sobrevivência dos NEPs. Outro importante fator abiótico é o nível de pH em que o nematoide está submetido. Para este experimento o pH foi de 6,1. Segundo Kung *et al.* 1990, o pH ideal na sobrevivência de NEPs é entre 4 e 6. Segundo Thurston *et al.* (1996), a faixa ideal de pH para sobrevivência de nematoides entomopatogênicos está entre 5,1 e 6,2. No presente experimento, sob diferentes concentrações de NaCl em solução Tampão M9, o valor do pH foi de 6,80 a 6,42 (Tabela 4), tornando-se mais ácido conforme o aumento da concentração de cloreto de sódio.

Tabela 3 – Características química e granulométrica de solo solarizado usado no teste de salinidade.

Química		Granulometria	
pH	6,1	Silte (g/kg)	0
MO (g/dm ³)	1,9	Argila (g/kg)	7
C (%)	0,11	Areia (g/kg)	993

Análise química e física de solos pelo Centro de Análises da UFRRJ em 22/01/2014.

Tabela 4 – Valor do pH de soluções M9 em diferentes concentrações (g) de NaCl usado no teste de salinidade.

	6g	9g	12g	15g	18g
Ph	6,80	6,74	6,68	6,67	6,42

Assim, pode-se inferir que os NEPs isolados podem ser adequados para utilização em solos agrícolas salinos, embora sejam necessários mais testes para trabalhar com outros membros destes e em situações mais representativas de salinidade no campo que pode ser necessário para confirmar esta conclusão geral.

4.4 Sobrevivência de NEPs isolados e capacidade de infecção em solo de manguezal

Para a variável média de sobrevivência de JIs em cinco diferentes solos de manguezais não houve diferenças significativas para cada isolado pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade. Contudo, houve diferenças significativas entre os isolados de manguezais (*Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39 e *Heterorhabditis* sp. LPP40) e *H. bacteriophora* HP88 (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores das médias de sobrevivência dos isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39, *Heterorhabditis* sp. LPP40 e *H. bacteriophora* HP88 em solo de cinco áreas coletadas no manguezal de Gargaú, São Francisco de Itabapoana-RJ.

Isolados	1	2	3	4	5	Total
LPP37	200 a	200 a	200 a	200 a	200 a	200 A
LPP38	200 a	200 a	200 a	200 a	200 a	200 A
LPP39	200 a	200 a	200 a	200 a	200 a	200 A
LPP40	200 a	200 a	200 a	200 a	200 a	200 A
HP88	120 a	80 a	80 a	60 a	140 a	96 B

Nas colunas, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade. Nas linhas, não significativo (n.s). Valores na tabela x 1000.

Quanto à causa das diferenças significativas, deduz-se que os nematoides entomopatogênicos isolados dos manguezais (*Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39 e *Heterorhabditis* sp. LPP40) possuem particularidades adaptativas típicas dos ecossistemas de manguezais, em relação ao isolado *H. bacteriophora* HP88 (Figura 8). Não há dados de experimentos e isolamento de NEPs em áreas de manguezais. Tietjen & Alongi (1990) descrevem a presença de nematoides marinhos de vida livre, alimentadores de detritos dos gêneros *Monhystera* sp. e *Chromadorina* sp., mas não caracterizam a relação destes nematoides com os fatores abióticos do solo, exceto a redução de sobrevivência em altas concentrações de amônia.

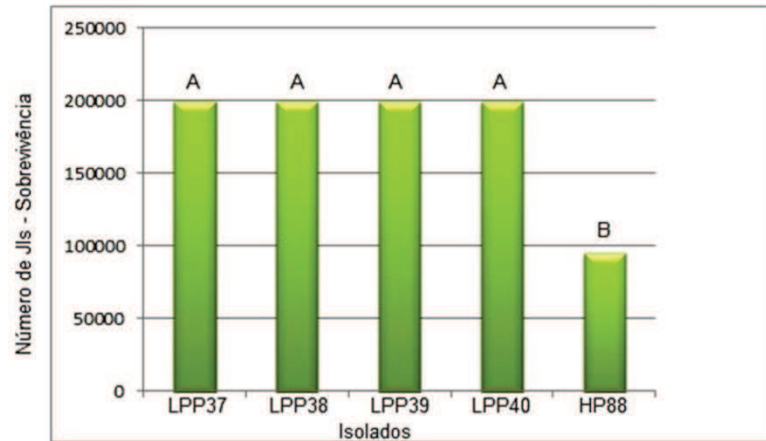


Figura 8. Média de sobrevivência dos isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39, *Heterorhabditis* sp. PP40 e *H. bacteriophora* HP88 em solo de cinco áreas coletadas no manguezal de Gargaú, São Francisco de Itabapoana-RJ.

Solos de manguezais apresentam uma concentração alta de matéria orgânica (Tabela 5). Para Lamberti, (1969), o pH do solo de manguezais pode oscilar entre os valores de 6,33 a 7,04. A cor preta pode ser explicada pela presença da matéria orgânica, constantemente depositada e reciclada – valores de 8,58% de carbono (C), sendo, na maioria dos casos, superior a 2% na superfície e 1% em subsuperfície –, e pela presença constante de água. No solo de manguezal de Gargaú (Tabela 5), a porcentagem de carbono (C) esteve entre 1,37 e 3,39% no solo 1, o que confere este valor mais alto (Solo 1) ao correspondente que possui também maior concentração de matéria orgânica, concentração de 58,4 g/dm³. A área 1 (Solo 1) foram isolados dois nematoides, *Heterorhabditis* sp. LPP37 e *Heterorhabditis* sp. LPP40.

A segunda área amostrada com maior concentração de matéria orgânica e carbono (C) foi a área 4 (Solo 4) onde foram isolados os outros dois nematoides, *Heterorhabditis* sp. LPP38 e *Heterorhabditis* sp. LPP39. Em análise química, o solo 4, apresenta alto teor de Potássio, Sódio, Fósforo, Cobre Zinco e enxofre em relação aos demais solos coletados. No solo 4 por análise química verificou-se que há baixa concentração de Ferro. Uma distribuição considerável de matéria orgânica de 44,1 g/dm³ e 2,56% de Carbono no solo 4. Segundo Odum, (1972), o solo de manguezal apresenta porcentagem de areia total variando de 480 a 970g/kg, sendo que a maioria dos perfis se encontra com valores acima de 800

g/kg. Este valor caracterizado por Odum (1972) corresponde à análise granulométrica do manguezal de Gargaú (Tabela 5). De acordo com os bioensaios de Pinto *et al.*, (2009), os dados mostraram que os JIs de *H. baujardi* LPP7, são muito móveis em substratos mais arenosos, o que contribui para sua maior eficiência de uso no controle biológico de insetos pragas, em áreas onde os teores de argila são menores. Esta relação entre mobilidade do nematoide em relação ao tipo granulométrico do solo evidencia a presença efetiva de nematoides entomopatogênicos em solos de manguezais.

Tabela 5 - Características químicas e granulométricas do solo de cinco áreas coletadas no manguezal de Gargaú, São Francisco de Itabapoana-RJ.

Química	Substrato 1	Substrato 2	Substrato 3	Substrato 4	Substrato 5
pH	5,7	5,7	6,6	5,2	5,5
MO (g/dm ³)	58,4	38,1	23,6	44,1	28,4
C (%)	3,39	2,21	1,37	2,56	1,65
P (mg/dm ³)	5	5	5	40	8
K (mg/dm ³)	228	141	64	246	131
Na (cmol _c /dm ³)	5,25	5,88	1,32	5,25	4,20
Fe (mg/dm ³)	122,4	303,0	104,0	58,2	324,0
Cu (mg/dm ³)	1,5	0,9	0,9	2,1	1,7
Zn (mg/dm ³)	2,8	1,5	1,2	7,0	2,8
S (mg/dm ³)	112,8	129,9	37,9	183,2	100,4
Granulometria					
Silte (g/kg)	98	47	27	73	57
Argila (g/kg)	288	98	49	90	98
Areia (g/kg)	647	855	924	837	845

Análise química e física de solos pelo Centro de Análises da UFRRJ em 05/11/2013.

5. CONCLUSÕES

1. Isolaram-se nematoides entomopatogênicos oriundos de solo de manguezais;
2. As linhagens de nematoides entomopatogênicos isolados pertencem ao gênero *Heterorhabditis* por apresentar hermafroditas na primeira geração no inseto cadáver, machos com bursa e papilas e JIs com projeção na região anterior do corpo;
3. Foram isolados quatro NEPs (*Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39 e *Heterorhabditis* sp. LPP40) no manguezal de Gargaú em São Francisco do Itabapoana;
4. A produção de JIs foi expressiva e comparável a *H. bacteriophora* HP88, quando multiplicados em larvas de *G. mellonella*;
5. Os isolados dos manguezais (*Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39 e *Heterorhabditis* sp. LPP40) obtiveram uma média superior de sobrevivência em altas concentrações de NaCl em solução Tampão, em relação a *H. bacteriophora* HP88;
6. Em solo trazido do manguezal, os isolados *Heterorhabditis* sp. LPP37, *Heterorhabditis* sp. LPP38, *Heterorhabditis* sp. LPP39 e *Heterorhabditis* sp. LPP40 não tiveram a sobrevivência afetada, em contrapartida *H. bacteriophora* HP88, teve menor sobrevivência neste tipo de solo.

6. 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 nematoides entomopatogênicos nativos obtidos em Lavras, MG. *Nematologia Brasileira*, 29: 17-23.
- Adaime, R.R. (1987). Estrutura, produção e transporte em um manguezal. Simpósio sobre ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira, *Aciesp*, vol. 1, p. 80-97.
- 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*, V. 37:p.32-49.
- Adams, B. J.; Nguyen, K. B. (2007). Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. New York: CABI Publishing, . p.1-33.
- Akhurst, R. J., and N. E. Boemare. (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*, In R. Gaugler and H. K. Kaya (ed.), *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton, Fla. p. 75–90.
- Amabis, J. M; Martho, G. R. (2009). *Biologia dos organismos – 3ª ed.* São Paulo: Moderna, ISBN 978-85-16-06331-3,.356 p.

- Andaló, V.; Nguyen, K.B.; Moino Jr. A. (2006). *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology*, V. 8: p. 853-867.
- Barbercheck, M. E., (1992). Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. *Florida Entomol.* V. 75: p.539-548.
- Bernini, E. & Rezende, C. E. (2004). Estrutura da vegetação em floresta de mangue do estuário do rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 18(3): p. 491-502.
- Bernini, E.; Santos, D. O. & Resende, C. E. (2003). Estrutura de um bosque de manguezal do estuário do rio Paraíba do Sul, estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: *Mangrove, Anais, Bahia*, 58p.
- Blaxter, M. (2003). Molecular systematics: Counting angels with DNA. *Nature*, V. 421, n. 421, n. 6919, p. 122-124,.
- Coull, B. C. (1985). Long term variability of estuarine meiobenthos: na 11 year study. *Marine Ecology Progress Series* 24: p. 205-218.
- Courtney, W. D.; Polley, D.; Miller, (1955). V. I. TAF, an improved fixative in nematode technique. *Plant Disease Reporter, Beltsville*, v. 39, p. 570-571.
- Dolinski, C, Del Valle EE, Burla, RS, Machado, IR. (2007). Biological traits of two native brazilian entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae):
- 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 Instituto Oswaldo Cruz* [online]. vol.103, n.2, p. 150-159. ISSN 0074-0276. doi:10.1590/S0074-02762008000200005.

- Ferraz, L.C.C.B. (1998). Nematoides entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Coord.), Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba, FEALQ, p.541-569.
- Figueira, E.A.G. (2002). *Caracterização da Comunidade Macrobentônica dos manguezais do Furo Grande, Bragança, Pará*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, Pará. 109 p.
- Franklin, M.; Goodey, J. B. (1949). A cotton blue lactophenol technique for mounting plant-parasitic nematodes. *Journal of Helminthology*, London, v. 23, p. 175-178.
- Glauber, R. & Han, R. (2002). Production Technology. In: Entomopathogenic Nematology, R. Glauber. Ed., CABI Publishing New York, NY, pp. 289-310.
- Hominick, W. M., Briscoe, B. R., Del-Pino, F. G., Heng, J., Hunt, D. J., Kozodoy, E., Mráčt EK, 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.
- Hominick, W.M., Reid, A.P., Bohan, D. A., Briscoe, B. R. (2002). Entomopathogenic Nematodes: Biodiversity, Geographical Distribution and the Convention on Biological Diversity. *Biocontrol Science and Technology* 6, 317-331.
- Ishibashi, N., Kondo, E., (1990). Behavior of infective juveniles. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 139–152.
- Jenkins WR. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis. Rep.* 48: 692.
- Kaspi, R., Ross, A., Hodson, A.K., Stevens, G.N., Kaya, H.K. & Lewis, E.E. (2010). Foraging efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema*

riobrave in different soil types from California citrus groves. *Applied Soil Ecology* 45, 243-253.

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

Kaya, H. K., Gaugler, R. (1993). *Entomopathogenic nematodes*. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.

Kaya, H. K.; Stock, S. P. (1997). *Techniques in insect nematology*. In: LACEY, L. (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. San Diego: Academic Press,. p. 281-324.

Kung, S. P., R. Gaugler, and H. K. Kaya (1990), Influence of Soil pH and Oxygen on Persistence of *Steinernema* spp. *Journal of Nematology* 22(4):440-445. 1990.

Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K (1991) Effects of soil temperature, moisture and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 242-249.

Lamberti, A. (1969) Contribuição ao conhecimento da ecologia das plantas do manguezal de Itanhaém. *Boletim de Botânica*, v. 23, n. 317.

LARA, JUAN CARLOS G. (2006). *Avaliação de aspectos biológicos de Heterorhabditis LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae) visando a aplicação num sistema de irrigação por microaspersão*. 74 f., il. Mestrado - Produção Vegetal, Campos dos Goytacazes, Orientação de: Cláudia Dolinski.

Lara-Domiínguez (eds.) (1999)*Ecosistemas de Manglar em América tropical*. Instituto de Ecologia, A. C. México, UICN/ORMA, Costa Rica, NOAA/NMFS Siver Spring MD USA 380p.

- Lara-Domínguez, A. L. YA. Yáñez-Arancibia, (1999). Productividad secundaria utilización del habitat y estrutura trófica, p. 153-166. In: A. Yáñez-arancibia y A.L.
- Lim, Kelvin K.P. et al. 2001. Guide to the Mangroves of Singapore, Singapore Science Centre. Singapore: Peter K.L. Ng and N. Sirosothi 1 ditors. V.1, v.2.
- Minas, R.S. (2012) Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visando o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*) em dois sistemas de cultivo. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 137 p.
- Molina, J. P. A., A. Moino Jr, R. S., Cavalcanti. (2004) Produção in vivo de nematoides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. Arquivos do Instituto Biológico, 71: 347-354.
- Molyneux, A.S., Bedding, R.A., (1984). Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. Nematologica 30: 358–365.
- Nguyen, K. B.; Hunt, D. J. 2007. Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts. Brill Leiden-Boston, V.5, 815 p.
- Nguyen, K. B.; Shapiro-Ilan, D. I.; Stuart, R. J.; McCoy, C. W.; James, R.R.; Adams, B. J. (2004) *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. Nematology, Leiden, v. 6 p. 231-244.
- Nguyen, K. B.; Smart, G. C. (1995) Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). Journal of Nematology, St. Paul, v. 27, p. 206-212.

- Nielsen, A. L., Spence, K.O., Nakatani, J., Lewis, E.E. (2011). Effect of soil salinity on entomopathogenic nematode survival and behaviour. *Nematology*, 2011, Vol. 13(7), 859-867.
- Odum, E.P. (1972) *Ecologia*. Trad. C. G. Ottenwaelder, 3.ed. México, Nueva Editorial Interamericana. 639 p.
- Pereira, C. (1927) *Rhabditis hambletoni* n.sp. nema aparentemente semiparasito da broca do algodoeiro (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Arquivos do Instituto biológico*, 8: 215- 230.
- Pereira, C. (1937).*Rhabditis hambletoni* n.sp. nema aparentemente semiparasito da broca do algodoeiro. *Arq. Inst. Biol.* v.8, p.125-135.
- Pinto, C. C. S; (2009). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual do Norte. Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2009. Efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade do Nematóide entomopatogênicos *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae).
- Pinto, T. K.; Austen, M. C. V.; Warwick, R. M.; Somerfield, P. J.; Esteves, A. M.; Castro, F. J. V.; Genevois, V. G. F.; Santos P. J. P. (2012) Nematode diversity in different microhabitats in a mangrove region. *Marine Ecology*. p.2-3.
- Poinar J. R., G. O. (1975) Description and biology of a new insect parasite rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp.. *Nematologica*, v. 21, p.463-470.
- Poinar J.R., (1979).*Nematodes for biological control of insects*. Boca Raton, CRC Press, 277p.,
- 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. R.; Kaya, Eds, H.K . (1990) G.O biology and taxonomy of Steinernematidae, and Heterorhabditidae in: entomopathogenic nematodes. *biocontrol Sci. technol* . 6: 477-480.
- Schaeffer-Novelli, Y *et al.* (2004) *Manguezais*. Ática, 1ªed, São Paulo:.
- Schaeffer-Novelli, Y. & Cintrón, G.M. (1993). Mangroves of arid environments of Latin America. In: H. Lieth and A. Al Masoom (eds), *Towards the rational use of righ salinity tolerant plants*, Vol 1, 107 - 116, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Schwendenmann, L. (1998). Tidal and seasonal variations of soil and water properties in a Brazilian mangrove ecosystem. *Dissertação de Mestrado*. University of Karlsruhe, Alemanha.
- Seinhorst, J. W. (1959) A rapid method for transfer of nematodes from fixate to anhydrous glycerin. *Nematologica*, Leiden, v. 4, p. 67-69.
- Silva, Frederico Sobrinho da *et al.* Biopolímeros, Carbono e Enxofre Totais Associados à Atividade Bacteriana dos Sedimentos Superficiais do Delta do Paraíba do Sul, RJ-Brasil. *Anu. Inst. Geocienc.* [online]. 2011, vol.34, n.1, pp. 33-45.
- Sottomayor, Alexandre (1996). *Solarização um método ecológico de desinfecção do solo*. DRAEDM.
- Souza Filho, P. W. M, (2005). Costa de manguezais de macromaré da Amazônia: cenários morfológicos, mapeamento e quantificação de áreas usando dados de sensores remotos. *Revista Brasileira de Geofísica* 23(4): 427-435.
- Thurston, G.S. *et. al.* (1994). Influence of Salinity on Survival and Infectivity of Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Nematology* 26(3):345-351. 1994.

- Tietjen, J. H. e Alongi, D.M. (1990). Population growth and effects of nematodes on nutrient regeneration and bacteria associated with mangrove detritus from northeastern Queensland (Australia). *Marine Ecology Progress Series. Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 68: 169-179, 1990.
- Ukpong, I. E. (1994). Soil-vegetation interrelationships of mangrove swamps as revealed by multivariate analyses. *Geoderma.* 64: 167-181.
- Ukpong, I. E. (1995). An ordination study of mangrove swamp communities in West Africa. *Vegetation.* 116: 147-159.
- White, G. F. (1927) A Method for Obtaining Infective Nematode Larvae from Cultures *Science*, Volume 66, Issue 1709, pp. 302-303.
- Woodring, J. L., Kaya, H. K. (1998) Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: hand book of biology and techniques. South cooperative Ser. *Bulletin Arkans. Agricultural Exp. Stn., Fayetteville.,* 331: p.88.
- Wouts, W. M.; Mráček, M. Z.; Gerdin, S.; Bedding, R. A. (1982) *Neoaplectana* Steiner 1929 a junior synonym of *Steinernema* Travassos (Nematoda: Rhabditida). *Systematic Parasitology*, v. 4, p. 147-154.
- Zuckerman, B.M., Jansson, H.B. (1984). Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host-prey recognition. *Ann. Rev. of Phytopathol.* 22:95-114.

