

EFEITO DE SUBSTRATOS COM DIFERENTES CLASSES
TEXTURAIS NA MOBILIDADE DO NEMATÓIDE
ENTOMOPATOGENICO *Heterorhabditis baujardi* LPP7
(RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)

CARLA CRISTINA DA SILVA PINTO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

Abril – 2009

EFEITO DE SUBSTRATOS COM DIFERENTES CLASSES
TEXTURAIIS NA MOBILIDADE DO NEMATÓIDE
ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis baujardi* LPP7
(RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)

CARLA CRISTINA DA SILVA PINTO

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.

Orientador: Prof^a Cláudia de Melo Dolinski

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

Abril – 2009

EFEITO DE SUBSTRATOS COM DIFERENTES CLASSES
TEXTURAIS NA MOBILIDADE DO NEMATÓIDE
ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis baujardi* LPP7
(RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)

CARLA CRISTINA DA SILVA PINTO

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

Aprovada em 17 de Abril de 2009.

Comissão Examinadora:

Prof. Richard Ian Samuels (Ph.D. em Entomologia) – UENF

Prof. Ricardo Moreira de Souza (Ph. D. em Fitopatologia) – UENF

Prof^a Luciana Aparecida Rodrigues (D.S. em Produção Vegetal) –ISTCA/FAETEC

Prof^a Claudia de Melo Dolinski (Ph. D. em Fitopatologia) – UENF
Orientador

Dedico

Aos meus amados pais Arê e Eliana

e ao tio Fuca (in memoriam), pelo enorme carinho, força e amor!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve presente, me capacitando, fortalecendo, cuidando de mim, dando a paz de espírito nos momentos mais difíceis. Que me fez sorrir quando tive vontade de chorar;

Aos meus pais Arê e Eliana, essenciais na minha vida, que me amam, sempre presentes... Aos meus amados irmãos, Sandro, Cássia Regina, Vinícius, Ariana, Davi Jônatas e Luiz Felipe pelo incentivo, força e amor. Eu amo vocês!!!!

Aos meus lindos sobrinhos Luana, Lucas, Alessandro, Júlia e Vitória pela alegria que me proporcionam;

Ao Robson pelo amor e carinho dedicados, além da enorme força, ajuda e incentivo nos momentos mais difíceis;

A todos os meus primos, que acreditaram e torceram por mim;

À minha orientadora, professora Cláudia Dolinski, pelos conhecimentos transmitidos e preocupação destinada a todos os seus orientados;

Ao professor Doracy, pela orientação e total desprendimento em me ajudar com as questões relacionadas ao solo;

Ao professor Ricardo Moreira, pelos ensinamentos em Nematologia;

Ao professor Cláudio, pela oportunidade de uso do LSOL e ajuda quando necessária;

Às técnicas do LSOL, Kátia e Vanilda, pelo carinho e por sempre serem maravilhosas e atenciosas comigo;

A Ederaldo do LSOL, pelo ótimo convívio, pelas inúmeras vezes que se disponibilizou a ir comigo ao campo coletar materiais, inúmeras análises de solo realizadas e por sua plena disponibilidade;

Às meninas do LSOL, Liliana, Maria Kelly, Joyce e Leisiane, pelo carinho e amizade;

Aos professores Richard, José Oscar e Sivaldo, pela contribuição ao meu trabalho;

Aos professores Paulo Torres Brioso e Helena Montano, pelo carinho, atenção e disponibilidade;

Ao Luis filho, pela atenção e ajuda na ausência do professor Doracy;

Aos amigos, Janilda, Pra Lílian, Pr Eduardo, Luiz, Eliezer Rangel e aos amigos de Campos, pelas orações, carinho, conselhos e pela maravilhosa convivência;

Às amigas Luciene, Vanessa, Tati e Jalile, pelo enorme carinho, agradáveis momentos de estudo e conversa;

Aos colegas de laboratório da Nematologia ao Aílton, Dimmy, Carol, Paulo, Rogério, Rafael, Thiago e Vicente pela maravilhosa convivência;

A Inês, pela enorme força e ajuda;

Ao Ramón, por me ajudar com os “Neps”;

A Renata, por estar sempre presente me ajudando com os experimentos, sendo solidária e amiga;

Ao Luciano, pela amizade, força e ajuda nos experimentos. Ah! Muito obrigada por aquele cafezinho!

A Viviane pela ajuda e incentivo em momentos difíceis;

Aos demais colegas e funcionários do LEF, Alexandre, Dona Maria, Néia, Rita, Érika e Shênia;

Ao Adilson, pela ajuda e amizade;

Ao Gil de Sena, pela ajuda oferecida nos momentos em que eu precisei;

Às funcionárias da coordenação da Pós - graduação em Produção Vegetal, pela atenção oferecida a cada um de nós: Luciana, Fatinha e Patrícia;

A UENF, pela oportunidade de realização do curso;

FAPERJ, pela concessão da bolsa;

A todas as pessoas que contribuíram, ainda que indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Nematóides Entomopatogênicos (Neps): Taxonomia e biologia.....	5
2.2. Controle biológico utilizando Neps.....	9
2.3 Fatores que afetam a infectividade dos NEPs.....	13
2.4 Formas de aplicação de NEPs	15
2.5. Classes Texturais.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Local de realização dos experimentos.....	24
3.2 Material biológico.....	24
3.2.1 <i>Galleria mellonella</i> L. (Lepdoptera: Pyralidae).....	24
3.2.2 <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7.....	26
3.3 Áreas de coleta e material.....	27
3.3.1 Análise dos substratos.....	28
3.3.2 Solarização dos substratos.....	30
3.4 Montagem das unidades experimentais.....	31
3.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	35

4- RESULTADOS.....	36
5- DISCUSSÃO.....	44
6-CONCLUSÃO.....	49
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida dos nematóides do gênero <i>Heterorhabditis</i> sp.....	7
Figura 2. Diagrama triangular adaptado utilizado para a classificação textural do solo.....	19
Figura 3. Foto de larvas de <i>Galleria mellonella</i> no 7º instar utilizadas na multiplicação do nematóide entomopatogênico <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7.....	25
Figura 4. Armadilha de White modificada usada para resgatar JIs saídos dos cadáveres de <i>G. mellonella</i> infectados com nematóides entomopatogênicos.....	27
Figura 5. Limpeza do local antes da realização da coleta do substrato.....	28
Figura 6. Equipamento utilizado para solarização do substrato usado no experimento.....	31
Figura 7. Detalhe do tubo de polivinil carbonato utilizado para avaliar a mobilidade dos JIs de <i>H. baujardi</i> através de diferentes classes texturais do substrato.....	32

Figura 8. Envelope confeccionado em tela metálica contendo larvas de 7° instar de <i>Galleria mellonella</i>	33
Figura 9. Tubos de PVC contendo substrato. As setas amarelas indicam a posição dos envelopes contendo as larvas de <i>G. mellonella</i> para cada unidade experimental e a branca o local de aplicação dos JIs de NEPs de <i>H. baujardi</i> LPP7.....	34
Figura 10. . Fotomicrografia das larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas e dissecadas, liberando fêmeas de <i>Heterorhabditis. baujardi</i> LPP7. Sony 7.2 megapixels.....	35
Figura 11. Mortalidade média de larvas de 7° instar de <i>Galleria mellonella</i> em tubos de PVC preenchidos com substratos de diferentes classes texturais, quando colocados a 30cm de distância de juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/classe textural. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Duncan a 5%.....	37
Figura 12. Mortalidade média de larvas de 7° instar de <i>Galleria mellonella</i> em tubos de PVC preenchidos com substratos de diferentes classes texturais, quando colocados a 60cm de distância de juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/classe textural. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Duncan a 5%.....	38
Figura 13 Mortalidade média de larvas de 7° instar de <i>Galleria mellonella</i> em tubos de PVC preenchidos com substratos de diferentes classes texturais, quando colocados a 90cm de distância de juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/classe textural. Médias seguidas de mesma letra não diferem	

entre si, de acordo com o teste de Duncan a 5%.....	39
Figura 14. Mortalidade de larvas de <i>Galleria mellonella</i> quando estas foram colocadas a 30, 60 ou 90 cm de distância de juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7, em tubos de PVC preenchidos com substrato de textura areia. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/distância.....	40
Figura 15. Mortalidade de larvas de <i>Galleria mellonella</i> quando estas foram colocadas a 30, 60 ou 90 cm de distância de juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7, em tubos de PVC preenchidos com substrato de textura franco-argilo-arenosa. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/distância.....	41
Figura 16. Mortalidade de larvas de <i>Galleria mellonella</i> quando estas foram colocadas a 30, 60 ou 90cm de distância de juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7, em tubos de PVC preenchidos com substrato de textura franco-argilosa. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/distância.....	42
Figura 17. Superfície de resposta da mortalidade de larvas de <i>Galleria mellonella</i> , causada por <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 em função da porcentagem de areia e argila para a distância de 30 cm do ponto de aplicação dos Juvenis infectantes, em tubos de PVC para substratos com diferentes classes texturais areia, franco-argilo-arenosa, franco-argilosa e argila. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos.....	43

RESUMO

PINTO, Carla Cristina da Silva; M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2009. **Efeito de substratos com diferentes classes texturais na mobilidade do Nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae)**. Orientador: Prof^a. Cláudia de Melo Dolinski.

Os nematóides entomopatogênicos (NEPs) (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) são utilizados no controle biológico de insetos pragas. Diante disto, existe grande interesse no conhecimento das condições ambientais que possam favorecer sua sobrevivência e movimentação no solo. A sobrevivência e sucesso no controle de insetos dependem da habilidade de persistência e dispersão destes juvenis infectantes (JIs) no solo. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito das diferentes classes texturais na mobilidade do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis baujardi* LPP7. Os JIs foram quantificados e as concentrações foram ajustadas a 10.000 IJ / 30mL em água destilada. Os bioensaios foram realizados em tubos de PVC com 1 m de comprimento e 150 mm de diâmetro. O total de 40 larvas de *Galleria mellonella* foi adicionado para cada tubo de PVC confinadas em tela metálica, para cada classe textural testada: areia, franco- argilo-arenosa, franco-argilosa e argila. Cada tubo

foi preenchido com 4 kg de substrato previamente solarizado e com umidade ajustada a 12% (peso/ volume). Para cada classe textural testada, larvas de *G. mellonella* foram colocadas às distâncias de 30, 60 e 90 cm do ponto de aplicação dos JIs. Após 12 dias, as larvas e pupas foram recuperadas, e as mortalidades foram quantificadas ao dissecar as larvas em lupa para verificar a infecção pelos nematóides. Os resultados demonstraram que a mortalidade das larvas de *G. mellonella* apresentou interação significativa entre a variável distância e classe textural. As maiores médias de mobilidade e infectividade ocorreram para as classes areia e franco- argilo- arenosa. A mortalidade das larvas de *G. mellonella* foi elevada para as classes areia e franco-argilo-arenosa à distância de 30 cm (39,9 e 39,2), do que para franco-argilosa (19,0). As taxas de mortalidade para as distâncias de 60 e 90 cm, somente foi computada para as classes areia (33,8 e 15,2) e franco-argilo-arenosa (19,0 e 6,0). Nenhuma mortalidade foi observada para a classe franco-argilosa a 60 e 90 cm. Para a classe argila não se observou infecção para nenhuma das distâncias avaliadas. Os dados mostraram que os JIs de *Heterorhabditis 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.

Palavras- chave: mobilidade, classes texturais, *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

ABSTRACT

PINTO, Carla Cristina da Silva; M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2009. **Effect of substrates with different textures classes in the mobility of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae)**. Major adviser: Ph.D. Cláudia de Melo Dolinski.

Entomopathogenic nematodes (EPNs) (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) are used as biological control agents against insects pests. Therefore there is a great interest in studying the environmental conditions that favor their survival and movement in the soil. The survival and success in controlling insects depends on infective juveniles (IJs) ability to persist and disperse in the soil. The objective of this research was to determine the effects of different textures classes on mobility of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis baujardi* LPP7. The IJs were quantified and concentrations were adjusted to 10.000 IJ/ 30 mL in distilled water. Bioassays were realized PVC pipes 1 m long and 150 mm in diameter. A total of 40 *Galleria mellonella* larvae were added to each PVC pipe confined in metallic screen in each texture class tested: sandy, sandy clay loam, clay loam and clay. Each pipe was filled with 4 kg of

substrate previously placed in a solar collector, and adjusted to 12% humidity (weight/volume). In each texture class tested, *G. mellonella* larvae were placed at a distance of 30, 60 and 90 cm from the application point of the IJs. After a 12 day period, larvae and pupae were recovered, and mortality was quantified under a dissected magnifying glass to verify nematode infection. Our results showed that the average mortality of *G. mellonella* larvae presented a significant interaction between the variables distance and textural class. The greatest average mobility and infectivity occurred for the classes sand and sandy clay loam. The mortality of the *G. mellonella* larvae was higher in the classes sand and sandy clay loam at the distance of 30cm (39,9 and 39,2), than in clay loam (19,0). The mortality rate for the distances of 60 and 90 cm, was only computed for the classes sand (33,8 and 15,2) and sand clay loam (19,0 and 6,0). No mortality was observed for the class clay loam at 60 and 90 cm. For class clay infection was not observed for all of the distances evaluated. The data showed that IJs of *Heterorhabditis baujardi* LPP7, are very movable in sandy substrate, what contributes to her larger use efficiency in the biological control of insects pests, in areas where the clay contents are smaller.

Key-words: mobility, texture classes, *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

1- INTRODUÇÃO

Os insetos pragas ocasionam perdas da ordem de 2,2 bilhões de dólares nas principais culturas brasileiras (Bento, 1999). Portanto, são considerados um dos fatores limitantes no aumento da produção de alimentos. Diante disso, o controle de pragas tem sido objeto de estudo em vários projetos de pesquisa, com maior enfoque no controle químico e cultural.

As principais medidas de controle de pragas agrícolas desenvolvidas nas últimas décadas têm como base a utilização de inseticidas sintéticos. Contudo, alguns questionamentos sobre a viabilidade e segurança dessa tecnologia têm sido feitos, principalmente devido aos efeitos indesejáveis, como a contaminação ambiental e a persistência dos resíduos nos alimentos (Gaugler, 1988; Georgis e Hague, 1991; Georgis, 1992). Atualmente, há uma forte demanda por tecnologias “limpas”, que atendam aos preceitos sociais de preservação do meio ambiente e a produção de alimentos de qualidade, de forma a promover uma agricultura sustentável.

O controle biológico tem se destacado como alternativa promissora para o controle fitossanitário de pragas e doenças. Dentre os agentes biocontroladores, os

nematóides entomopatogênicos (NEPs) destacam-se pelo seu potencial no controle de alguns insetos pragas, sendo assim utilizados como ferramenta para os programas de manejo integrado de pragas (MIP) (Ehlers, 1996).

NEPs vêm sendo largamente testados no controle biológico de pragas (Kaya e Gaugler, 1993). A utilização destes agentes é uma opção no manejo de pragas presentes no solo e em locais críticos e se destacam, sobretudo, pelas características de inocuidade ao meio ambiente e à saúde humana (Glaugler e Han, 2002).

Estudos da biologia e epidemiologia têm sido realizados principalmente com agentes pertencentes às famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, em razão de seu elevado potencial de controle. Testes de patogenicidade têm revelado a eficácia destes agentes no controle de várias pragas. Além disso, efeitos na redução da produção de ovos e juvenis de nematóides parasitos de plantas também têm sido verificados (Smiths, 1997; Lewis e Grewal, 2005).

Outros trabalhos também demonstraram que é possível a interação entre NEPs e alguns fungos biocontroladores de pragas. Neste caso, verificou-se que a associação entre nematóides *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar e David e *Metarhizium anisopliae* Metchnikoff ou *Steinernema carpocapsae* e *Beauveria bassiana* Balsamo aumentou a mortalidade da larva de *Curculio caryae* Horn (Coleoptera: Curculionidae) (Shapiro *et al.*, 2005).

Os NEPs destacam-se pelo seu potencial para persistir no solo por determinado tempo, garantindo sua sobrevivência em diversos sistemas de produção agrícola (Kaya e Gaugler, 1993). Essa persistência se dá pela presença de uma dupla cutícula no estágio de juvenil infectante (JI), ou seja, a cutícula do segundo e a do terceiro estágio (J2 e J3, respectivamente) ficam retidas. Contudo, alguns estudos têm revelado uma variação entre as pesquisas de campo e os resultados obtidos em laboratório, o que tem comprometido a aceitação dos NEPs em programas de manejo integrado de pragas agrícolas (Gaugler, 1988; Klein, 1990; Smith, 1999).

Isso é agravado quando resultados obtidos em laboratórios são contrastantes em relação aos de campo (Efron *et al.*, 2001; Wilson e Gaugler, 2004). Tal fato

sugere a necessidade de mais pesquisas sobre a biologia e ecologia destes agentes, bem como de seus insetos alvo em associação com o meio ambiente.

O comportamento dos NEPs e sua eficiência são afetados por fatores ambientais, com destaque para os raios ultravioleta (U.V), umidade, temperatura, densidade e textura do solo (Kaya, 1990; Ames, 1990; Kung *et al.*, 1991; Babercheck e Kaya, 1991a; Gaugler *et al.*, 1992; Griffin, 1993; Grewal *et al.*, 1994; Koppenhöfer *et al.*, 1995; Fujie *et al.*, 1996; Fujie e Yokoyama, 1998; Portillo-Aguilar *et al.*, 1999; Lewis, 2002). Kaya (1990) afirma que as interações de todos esses fatores podem alterar desde a sobrevivência até a capacidade de infecção do nematóide.

Em condições ideais para a sobrevivência e ação dos NEPs, os primeiros 25 a 65 cm do solo devem estar bem irrigados, para permitir o movimento desses agentes no solo (Shetlar, 1999). A umidade tem sido reconhecida como um dos mais importantes fatores do solo, que afeta a sobrevivência, virulência e persistência dos JIs (Klein, 1990; Curran, 1993; Grant e Villani, 2003a, 2003b).

A textura do solo também precisa ser adequada, pois afeta a sobrevivência e a movimentação dos JIs (Shapiro *et al.*, 2006). Por isso, ao utilizar NEPs a campo, é importante que se façam estudos para pleno aproveitamento de seu potencial de controle, e a habilidade de deslocamento dos JIs é determinante no controle de pragas agrícolas (Kaya e Gaugle, 1993).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a mobilidade do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis baujardi* Phan, Sabbotin, Nguyen e Moens, LPP7 em substratos de diferentes classes texturais.

- Objetivos específicos

- Analisar a capacidade de mobilidade do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis baujardi* LPP7 para as distâncias lineares de 30, 60 e 90cm em substratos de diferentes classes texturais, através da mortalidade;
- Verificar a possível correlação entre as variáveis físicas e químicas das seguintes classes texturais: areia, franco-argilo-arenosa, franco-argilosa e argila e a mobilidade do nematóide *H. baujadi* LPP7.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nematóides Entomopatogênicos (NEPs): Taxonomia e biologia

Os NEPs têm sido isolados dos solos em diferentes ecossistemas, que incluem regiões do ártico aos trópicos, e isolados de vários insetos hospedeiros (Hominick *et al.*, 1996). Estes nematóides pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea) e às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae (Adams e Nguyen, 2002). Os gêneros *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, 1994 estão incluídos na família Steinernematidae, enquanto que o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976 na família Heterorhabditidae. Atualmente são reconhecidas 41 espécies do gênero *Steinernema*, uma do gênero *Neosteinernema* e 12 do gênero *Heterorhabditis* (Adams *et al.*, 2006). Em laboratório, colonizam mais de 250 espécies de insetos de aproximadamente 75 famílias pertencentes a 11 ordens de insetos e podem infectar larvas, pupas e adultos (Poinar, 1979; 1990; Peters, 1996).

Esses nematóides possuem associação simbiote com bactérias patogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. (gêneros

Steinernema e *Heterorhabditis*, respectivamente) (Poinar, 1990), apresentam capacidade de infectar e matar insetos no solo e em ambientes críticos em 24 a 72 horas, por isso chamados entomopatogênicos (Dowds e Peters, 2002).

Esses nematóides possuem as fases de ovo, juvenil e adulto. A fase juvenil é composta por quatro estádios (J1, J2, J3 ou juvenil infectante e J4). O juvenil infectante (JI) é o estágio em que o nematóide é encontrado no solo carregando as bactérias simbiotes. Essas bactérias são transportadas na parte anterior do intestino ou em uma vesícula no intestino dos JIs dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, respectivamente.

Em ambos os gêneros o processo de infecção se inicia quando os JIs entram em contato com o hospedeiro, e o penetram por suas aberturas naturais: boca, ânus e/ou espiráculos (Forst e Clarke, 2002). Os JIs de *Heterorhabditis* podem penetrar também diretamente pela cutícula, devido à presença de um dente quitinoso na sua extremidade anterior (Kaya e Gaugler, 1993). Após a penetração, estes agentes seguem para a hemocele, onde liberam as células das bactérias simbiotes, que se multiplicam, liberam toxinas, e iniciam um processo de infecção generalizada (septicemia) e óbito do inseto hospedeiro. As bactérias também produzem antibióticos que exercem a função de proteção dos nematóides, os quais continuam os seus ciclos de desenvolvimento, e se alimentam das células bacterianas e tecidos degradados do inseto (Forst e Clarke, 2002; Sicardi *et al.*, 2004).

No gênero *Heterorhabditis* na primeira geração ocorrem fêmeas hermafroditas que se autofecundam e produzem os demais estádios (ovo, J1, J2, J3 e J4), que irão se diferenciar em machos e fêmeas na segunda geração (Poinar, 1990). No gênero *Steinernema*, a primeira e a segunda geração são formadas por machos e fêmeas, e com a fecundação haverá o desenvolvimento dos demais estádios de juvenis reiniciando o ciclo (Forst e Clarke, 2002). Após duas ou três gerações, quando o alimento é esgotado, os JIs saem do inseto cadáver e vão para o solo à procura de novos hospedeiros (Grewal e Georgis, 1998) (Figura 1).

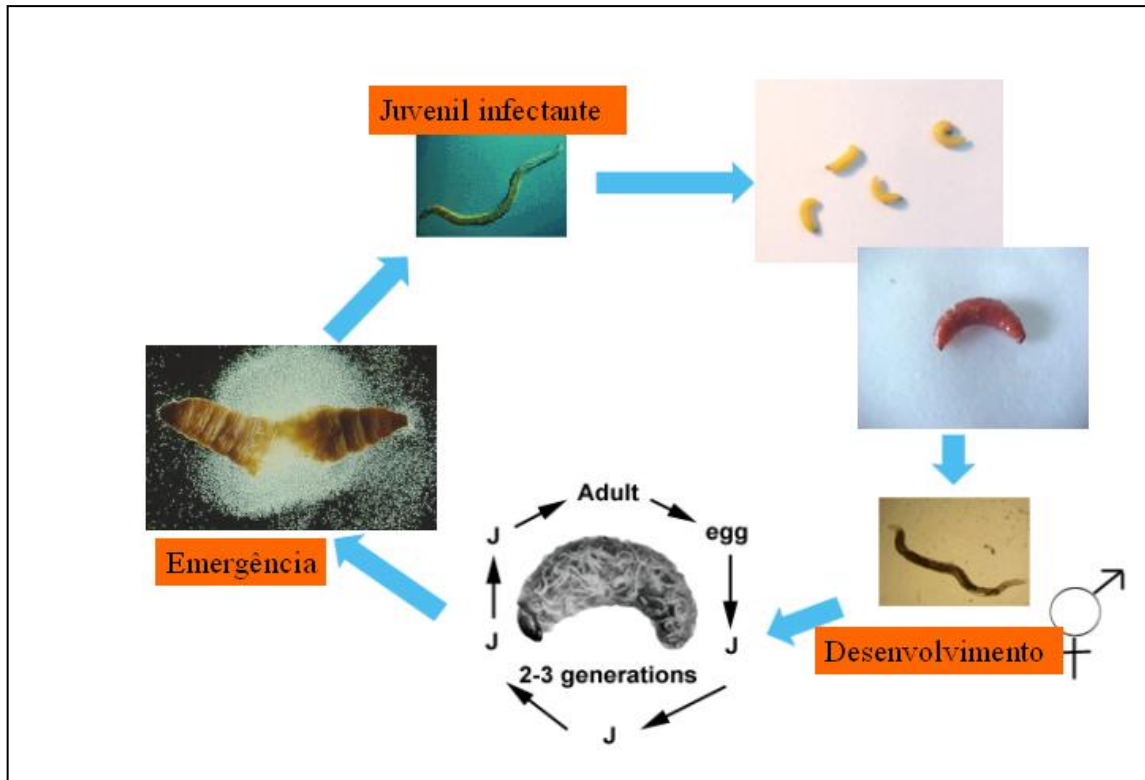


Figura 1. Ciclo de vida dos nematóides do gênero *Heterorhabditis* sp. Fonte: Dolinski.

O processo de dispersão dos NEPs é um mecanismo de comportamento essencial para sua sobrevivência e infecção de novos insetos hospedeiros. O conhecimento da estratégia de busca é essencial na escolha da espécie de NEPs para o controle de uma praga alvo.

Os JIs são atraídos por produtos da atividade fisiológica do hospedeiro, como a respiração, que produz diferentes gradientes de CO₂ (dióxido de carbono) (Zuckerman e Jansson, 1984; Gaugler *et al.*, 1989). De acordo com Grewal *et al.* (1994), JIs de *H. bacteriophora* Poinar, *H. megidis* Poinar, Jackson e Klein, *S. anormali* Kozodoi, *S. glaseri* Steiner, *S. feltiae* Filipjev e espécies de *Steinernema* responderam de forma direcional e positiva aos compostos liberados pelo inseto. Outros compostos também podem influenciar na atração de NEPs. Estudos de Kanagy e Kaya (1996) ao investigarem o comportamento de quimiotaxia em nematóides em testes realizados em placas de Petri, concluíram que indivíduos de *S.*

carpocapsae foram atraídos por sementes de cravo em estágio de germinação e fragmentos de raízes não-estéreis de cravo e tomate. Segundo Boff *et al.* (2002), os JIs são estimulados a se mover devido à presença de compostos químicos que se formam nas raízes, larvas ou através da combinação de ambos. Boff *et al.* (2001) observaram que em raízes de morango, utilizando *G.mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), *Otiorhynchus sulcatus* Fabricius (Coleoptera: Curculionidae) e *H. megidis* que a resposta de movimentação dos JIs, está relacionada com a fonte de estímulo, uma vez que obtiveram alta resposta para *G. mellonella*, enquanto que a combinação de *O. sulcatus* e raízes de morango aumentou positivamente as respostas de *H. megidis*, quando comparado com *O. sulcatus* individualmente. Raízes de certas espécies de plantas comprometem a habilidade de busca dos NEPs pelo hospedeiro, porém a intensidade e direção da resposta variam de acordo com o NEP aplicado (Cutler e Webster, 2003).

De acordo com a estratégia de busca os NEPs podem ser classificados como: “ambusher” ou “cruiser” (Lewis *et al.*, 2006). Fazer nictação, ou seja, suspender o corpo e sustentá-lo sobre a ponta da cauda é uma característica de espécies “ambushers”. A parte anterior do nematóide fica livre, e, ele aguarda a passagem de um hospedeiro e quando isso ocorre lança-se sobre ele. São exemplos de NEPs que fazem nictação, *S. carpocapsae* Weiser e *S. scapterisci* Nguyen e Smart (Lewis *et al.*, 1993). *Heterorhabditis bacteriophora* e *S. glaseri* são nematóides com estratégia de busca “cruiser”, que buscam o hospedeiro ativamente no solo, respondem aos seus voláteis e deslocam-se até localizá-lo (Ishibashi e Kongo, 1990). Além disso, existem espécies de NEPs que podem apresentar ambos os comportamentos: “ambusher” e “cruiser”, dependendo da proximidade do inseto, como no caso de *S. feltiae* (Grewal *et al.*, 1994a).

O mecanismo apropriado de busca do inseto hospedeiro é essencial. Portanto, a estratégia “ambusher” *S. carpocapsae*, por exemplo, é apropriada para o controle de insetos que se movimentam na região mais superficial do solo, enquanto que, os com a estratégia “cruiser”, que se movimentam ativamente no solo, como *H. bacteriophora*, são adequados para suprimir insetos menos móveis abaixo da superfície do solo (Lewis, 2002). Ao avaliar a capacidade de deslocamento do

nematóide *S. carpocapsae*, Wennemam *et al.* (2004) observaram que houve maior deslocamento no sentido vertical do que no horizontal. Em estudos de distribuição de NEPs, populações naturais de *S. carpocapsae* foram encontradas na camada mais superficial do solo (1-2 cm), ao passo que *H. bacteriophora* se encontrava distribuído em toda a superfície a 8 cm de profundidade do solo (Campbell *et al.*, 1995). Já se tem conhecimento da fácil mobilidade de *H. bacteriophora* no solo, mostrando a alta habilidade para buscar hospedeiros em diferentes profundidades (Campbell *et al.*, 1996).

Nematóides com estratégia de busca “cruiser” percebem seu hospedeiro por meio da quimiorrecepção e seu comportamento é mais eficiente em substratos arenosos, enquanto que os “ambusher” se mostram mais eficazes que os nematóides “cruiser” em ensaios realizados com papel filtro como substrato e menos sensíveis à quimiorrecepção (Grewal *et al.*, 1994b).

2.2 – Controle biológico utilizando NEPS

Os NEPs são considerados ambientalmente seguros e não tóxicos para vertebrados, desta forma são isentos de registro e regulamentação na maior parte dos países, o que favorece seu uso e o desenvolvimento de novas formulações (Neves *et al.*, 2000). Gaugler (1988) infere que NEPs podem ser multiplicados em grandes quantidades tanto “in vivo” quanto “in vitro”. Testes de patogenicidade demonstraram que aproximadamente 17 ordens e 135 famílias de insetos são susceptíveis aos NEPs (Akhurst e Smith, 2002). O uso de NEPs no controle de pragas agrícolas já vem sendo testado desde a década de 70 (Kaya e Gaugler, 1993), mas nos últimos dez anos estudos vêm se intensificando tanto em laboratório como em aplicações a campo (McCoy *et al.*, 2000).

No Brasil já é conhecido o efeito positivo dos NEPs no controle do gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), tanto em condições de laboratório como a campo, com destaque para a espécie *H. baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen e Moens LPP7 nativa do Brasil e que possui elevado

potencial para atuar no controle biológico também de outras pragas (Dolinski *et al.*, 2006, 2007). Ao estudar a virulência de NEPs em larvas do gorgulho-da-goiaba em placas de Petri, todas as espécies e linhagens testadas apresentaram alta mortalidade quando comparada ao controle, sendo que as quatro linhagens de *Heterorhabditis* foram mais virulentas (75,5 a 84,5 %), que as espécies de *Steinernema* (33,5 a 66 %) (Dolinski *et al.*, 2006).

Estudos também demonstraram a eficácia no uso dos NEPs no controle de carrapato de bovino (Vasconcelos, 2004, Freitas-Ribeiro *et al.*, 2005, Reis, 2005). A espécie *H. indica* Poinar, Karanukar e David LPP4, também se mostrou muito eficiente em suprimir populações de estipes resistentes a carrapaticida de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Canestrini (Acari: Ixodidae), com controle acima de 90% na concentração de 960 JIs/fêmea (Machado *et al.*, 2007). Em uma avaliação da eficiência do NEP *Heterorhabditis* sp. (CB-n5) no parasitismo de ovos de *Migdolus fryanus* Westwood (Coleoptera: Cerambycidae) em condições de laboratório, verificou-se uma elevada capacidade de parasitismo, destacando-se como uma alternativa dentro do programa de manejo das larvas de *M. fryanus* na cultura da cana-de-açúcar pelos produtores do Estado de São Paulo (Machado *et al.*, 2003).

Andaló *et al.* (2004), ao realizarem trabalho de seleção de isolados de NEPs para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae), observaram que as fêmeas adultas do inseto apresentaram susceptibilidade ao isolado de *S. carpocapsae* a baixas concentrações (25 JIs/inseto). Experimentos utilizando *H. indica* IBCB-n05 no controle de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) sob comedouros em granja avícola se mostraram muito eficazes. Após doze dias da aplicação, o nematóide causou 94%, 97% e 100% de mortalidade das larvas para as dosagens de 0,4, 4,0 e 40 JI/cm², respectivamente (Rodrigueiro *et al.*, 2008).

Resultados promissores obtidos em laboratório ou a campo têm sido citados por todo mundo. Shapiro-Ilan *et al.* (2008), ao fazerem aplicações de *S. riobrave* 3-8b e 335 em áreas demarcadas com ameixeiras selvagens, constataram que houve supressão na emergência do gorgulho da ameixa, *Conotrachelus nenuphar* Herbst

(Coleoptera: Curculionidae). As aplicações contra as larvas de *C. nenuphar* apresentaram altos níveis de mortalidade para *S. riobrave* 355 (100 %) durante os dois anos de experimento, enquanto que as áreas tratadas com *S. riobrave* 3-8b, resultaram em controle de 98,6 % e 87,9 %. Kim e Alston (2008), em estudos de laboratório, também obtiveram maiores índices de mortalidade de *C. nenuphar*. Para os estádios de pupa e adultos infectados com *H. bacteriophora* a concentrações de 500 JIs do que para os outros tratamentos (100 JIs de *H. bacteriophora*; 100 JIs e 500 JIs de *S. feltiae*). A mortalidade neste estágio de vida foi baixa com *S. feltiae*. Todas as pupas e adultos do gorgulho da ameixa foram susceptíveis aos nematóides, contudo *H. bacteriophora* foi mais virulento que *S. feltiae*.

Diaprepes abbreviatus (L.) (Coleoptera: Curculionidae) é outro inseto que tem sido muito estudado por gerar grandes prejuízos em plantas de interesse econômico. Ao avaliar a eficiência de nematóides na supressão de *D. abbreviatus* em solos com elevado conteúdo de argila (Oxisol) foi detectado mortalidade de 100% de larvas em vasos que receberam *S. riobrave* TP ou em vasos contendo *S. riobrave* 355. A mortalidade causada por *S. riobrave* foi mais elevada para as larvas de *D. abbreviatus* em relação a *S. diaprepesi* Nguyen e Duncan e *H. megidis* (Jenkins *et al.*, 2008).

A combinação de fungos e nematóides entomopatogênicos também mostrou a viabilidade de uso e sucesso no controle de insetos pragas. Barbercheck e Kaya (1991b) investigaram a interação de *H. bacteriophora* e *Beauveria bassiana* Balsamo Vuillemin (Moniliales: Moniliaceae) contra larva de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctidae), e mostraram que ao associar os dois agentes de controle, elevou-se a taxa de mortalidade comparada ao uso individual. Isolados de *H. bacteriophora* JPM4 e dos fungos *Metarhizium anisopliae* Metchnikoff Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) denominados LPP45 e LPP39, causaram altas taxas de mortalidade. Isoladamente, JPM4 e LPP45 causaram 100% de mortalidade e LPP39 66%, porém ao combinar JPM4 com LPP39, houve 100% de mortalidade ocorrida em menor período de exposição aos agentes (Acevedo *et al.*, 2007).

É notória a eficiência dos NEPs no controle de pragas, mas o conhecimento de seus efeitos sobre a população de nematóides fitoparasitas ainda é pouco

conhecido (Lewis e Grewal, 2005). Por outro lado, o efeito antagônico entre NEPs e fitoparasitas já havia sido demonstrado por pesquisas realizadas por Bird e Bird (1986) e Ishibashi e Kondo (1986). Bird e Bird concluíram que houve uma redução da infestação de *Meloidogyne javanica* Treub em plantas de tomateiro aplicando-se *S. glaseri*. Fato reforçado por Ishibashi e Kondo, que em estudos fazendo uso tanto de *S. glaseri* como de *S. feltiae* evidenciaram não apenas a redução da população de diferentes fitonematóides, assim como aumentaram as populações de nematóides rhabditídeos bacteriófagos. Estudos desenvolvidos por Pérez e Lewis (2004) indicaram que a pré e pós aplicação de JIs vivos de *S. feltiae* diminuíram a penetração de juvenis de *M. hapla* (Chitwood) em raízes de tomateiro.

Recentemente, Acevedo (2008) afirmou que tanto JIs vivos como mortos de *H. baujardi* LPP7 e *S. feltiae* Sn influenciaram negativamente a infecção de tomateiros com ovos e J2 de *M. mayaguensis* Rammah e Hirschmann, ocasionando redução no número de galhas. O fato de JIs mortos apresentarem resultados significativos estaria relacionado a possíveis compostos eliminados por estes e/ou sua bactéria simbiote, gerando efeito direto ou indireto no comportamento do fitonematóide.

Vários trabalhos afirmam que aleloquímicos produzidos pelos JIs dos NEPs ou por suas bactérias simbiotes surtem efeitos repelindo e/ou intoxicando algumas espécies de fitonematóides (Grewal *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 1999; Li e Webster, 1999; Jagdale *et al.*, 2002). Além disso, de acordo com Siddiqui e Mahmood (1999), os efeitos repelentes podem degradar os exudados da raiz, alterando o comportamento de fitonematóides quanto à atração pelas raízes.

Resultados de Grewal *et al.* (1999) confirmaram que filtrados de células bacterianas pertencentes a isolados de *Xenorhabdus* sp. a 15 % são altamente tóxicos a juvenis de *M. incognita* Chitwood, gerando de 98-100 % de mortalidade. Pesquisas mais recentes reafirmam o potencial de redução sobre a população de fitonematóides gerada por bactérias simbiotes *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. (Lewis e Grewal, 2005). Acevedo (2008) concluiu a partir das respostas de diferentes tratamentos, que J2 de *M. mayaguensis* são repelidos devido à aplicação de JIs de *S. feltiae* Sn e *H. baujardi* LPP7 para o sentido contrário ao da fonte de

estímulo (raízes de tomateiro), e que essa reação de repelência e toxidez dos juvenis pode ser devido a semioquímicos e/ou fatores de alelopatia gerados pelas bactérias simbiotes.

2.3 - Fatores que afetam a infectividade dos NEPs

Diante da alta eficiência destes nematóides, testes de patogenicidade têm sido realizados em pragas de grande importância econômica, além de estudos da biologia e epidemiologia dos isolados de maior potencial a serem usados no controle biológico. Entretanto, é importante lembrar que fatores abióticos e bióticos podem interferir na eficiência do uso de NEPs a campo.

A umidade do solo tem sido relacionada à infectividade de NEPs a populações de insetos pragas. A irrigação, chuva e as flutuações na umidade do solo são citadas como razões para o sucesso ou falha desses nematóides (Grant e Villani, 2003). Portanto, as condições de umidade podem influenciar diretamente a virulência dos NEPs. A exemplo disso, em solos com baixo percentual de umidade, alguns JIs podem ser estimulados à quiescência e anidrobiose, diminuindo o metabolismo, e às vezes chegar à morte se a umidade do solo se mantiver baixa por um período muito longo (Kung *et al.*, 1990a). A sobrevivência de JIs tanto de *Steinernema sp.* como de *Heterorhabditis sp.* está associada ao nível de umidade do ambiente (Glazer *et al.*, 1992), no entanto esse fator pode interferir de forma distinta de acordo com a espécie.

Koppenhöfer e Fuzy (2006), ao estudar o efeito da umidade na infectividade de *S. scarabaei* e *H. bacteriophora* contra *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae) e *Anomala orientalis* Waterhouse (Coleoptera: Scarabaeidae) concluíram que ambos são mais eficientes em solos com umidade moderada, do que em solos mais secos ou saturados. Os NEPs são sensíveis à baixa umidade do solo, e a mesma influencia negativamente em sua dispersão e infectividade (Molina e López 2003).

Hussaini *et al.* (2004) estudando o efeito do pH na patogenicidade de *S. carpocapsae* PDBC EN11 e *H. indica* PDBC 13.3, observaram que a sobrevivência de NEPs foi reduzida significativamente em pH 2 a 3 e que ocorreu 100% de mortalidade de *G. mellonella* a pH 5 a 8 por *H. indica* e *S. carpocapsae* em pH 4 a 9 com 72 h de imersão do nematóide nesses pHs. Observou-se uma correlação negativa entre o período de imersão e a patogenicidade. Em *H. indica* a imersão prolongada por 28 dias a pH 9 deletoriamente afetou a patogenicidade e somente 66,6% de mortalidade de *G. mellonella* foi alcançada, e 33,3% de mortalidade por *S. carpocapsae*.

A sensibilidade destes nematóides às elevadas temperaturas existentes nas regiões tropicais, pode ser outro fator limitante para a implementação de programas de controle biológico utilizando NEPs (Kaya e Gaugler, 1993). A amplitude da temperatura, que conduz ao aproveitamento máximo das potencialidades dos NEPs como agentes de controle biológico é relativamente estreita e especialmente sua capacidade de infecção e persistência no solo são afetadas em temperaturas superiores a 30 °C ou inferiores a 15 °C (Kaya, 1990).

Geralmente, a atividade inseticida dos NEPs é mais eficiente na faixa de temperatura de 18 a 28 °C (Akhurst, 1986). Contudo, em condições de laboratório obteve-se populações (*H. baujardi* LPP7 28) de NEPs tolerantes a temperaturas de 30°C a partir de *H. baujardi* LPP7 submetidas à pressão de seleção, que se mostraram mais virulentas a essas temperaturas em relação à população original (Del Valle *et al.*, 2005)

A temperatura influencia vários processos metabólicos dos JIs, principalmente a taxa de mobilização de suas reservas (lipídios, proteínas e carboidratos), sua dispersão, sobrevivência, capacidade de infecção, desenvolvimento e reprodução (Dunphy e Webster, 1986). Cada isolado de NEP tem suas exigências térmicas e temperaturas específicas em que são melhores adaptados, sendo tal conhecimento de vital importância para a sua persistência e desenvolvimento, e desta forma elevar as chances de sucesso em aplicações a campo (Kaya,1990; Zervos *et al.*, 1991; Choo *et al.*, 2002).

Ao avaliar a habilidade de *S. glaseri* para infectar *G. mellonella* em colunas de areia umedecida com extratos de raízes de cravo de defunto e tomateiro, uma suspensão de α -terthienyl e o exudado de algumas plantas incluindo o cravo, Kanagy e Kaya (1996) demonstraram que o extrato de cravo e tomateiro não afetou a infectividade deste nematóide quando comparado ao controle, enquanto que as concentrações de 20 e 40 ppm de α -terthienyl reduziram significativamente o número de nematóides que infectaram os insetos hospedeiros.

Outro fator importante é que os nematóides podem estar sujeitos à infecção ou a serem afetados por algumas bactérias, protozoários, fungos nematófagos, ácaros predadores e outros nematóides (Kaya, 2002).

2.4- Formas de aplicação de NEPs.

Existem relatos demonstrando que o êxito na utilização de nematóides como agentes de controle biológico está relacionado não só à escolha do NEP, porém também ao método de aplicação. Por isso, a tecnologia de aplicação destes agentes tem sido muito pesquisada. De maneira geral, NEPs podem ser aplicados por pulverização, através de sistemas de irrigação e em insetos cadáveres (Gewal, 2002).

Para os nematóides, o diluente mais usado é a água. A gota é o veículo ou meio de transporte para fazer chegar a substância ativa até o seu destino (Villalba, 2003). Geralmente, todos os equipamentos para aplicação de pesticidas, fertilizantes e águas de irrigação podem ser usados na aplicação de JIs nas áreas de cultivo. Em aplicações por aspersão, às vezes é aconselhável retirar os filtros e as telas, mas isto requer re-calibração do equipamento. As telas e os filtros dos equipamentos de aspersão devem permitir que os nematóides passem através deles. *S. carpocapsae* pode passar através de telas tão finas quanto 100 micrômetros de diâmetro, mas espécies maiores como *S. glaseri* e *H. megidis* necessitam de telas com aberturas maiores (Grewal, 1998).

O nematóide *Steinernema* sp. pode ser aplicado com equipamentos manuais e de pressão previamente definida até 40 psi sem causar nenhum dano físico e sem

diminuir sua infectividade (Lara e López, 2005). Entretanto, de forma geral os NEPs não devem ser submetidos a pressões superiores a 300 psi nos tanques dos equipamentos e a temperaturas superiores a 30 °C (Grewal, 1998).

A capacidade de dispersão dos JIs armazenados em suspensões aquosas, pode ser afetada pelo tempo de armazenamento (Lewis *et al.*, 1995). Por isso formulações líquidas de NEPs devem ser aplicadas de 48 a 72 horas após serem diluídas, ou permanecerem em agitação contínua para evitar dessecação e perdas de virulência (Georgis *et al.*, 1995). Juvenis de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* emergidos de insetos cadáveres exibem maior habilidade dispersiva quando comparados a JIs que procedem de suspensões aquosas (Shapiro e Glazer, 1996). Isto se deve ao estresse fisiológico ao qual é submetido o nematóide durante o período de armazenamento na suspensão aquosa (Shapiro *et al.*, 2000). Por outro lado, ao aplicar os JIs em insetos cadáveres, estes devem ser utilizados preferencialmente em áreas de cultivo como pomares, onde os insetos pragas se encontram concentrados sob a copa das plantas (Del Valle *et al.*, 2008).

Estudos vêm sendo realizados testando diferentes substâncias adjuvantes adicionadas à água de aplicação com interesse de promover maior proteção dos JIs no solo. Nas aplicações foliares, esses adjuvantes auxiliam a persistência dos JIs, no intuito de diminuir a dessecação, pois esses produzem um fino filme de água sobre a superfície foliar, e desta forma mantêm a umidade e permitem o aumento da persistência dos juvenis (Lello *et al.*, 1996).

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 ou amido (Shapiro-Ilan *et al.*, 2001). Esse procedimento confere ao inseto cadáver que será adicionado ao solo, maior rigidez e durabilidade.

Del Valle *et al.* (2009), ao avaliarem o efeito dos diferentes invólucros em insetos cadáveres na emergência e infectividade de *H. baujardi* LPP7, verificaram alta infectividade dos JIs emergidos de larvas de *G. mellonella*, para os diferentes

tipos de invólucros. Também observaram que os tratamentos podem influenciar na emergência dos JIs, ainda que nenhum dado negativo tenha sido observado em relação à patogenicidade. Dados também demonstraram um alto número de insetos cadáveres removidos por duas espécies de formigas (*Ectatomma* spp.) com diferentes coberturas. Entre os tratamentos as cápsulas em gelatina não foram removidas pelas formigas, o que permitiu acreditar que mesmo sendo uma tecnologia simples, este tipo de formulação apresenta elevado potencial de uso.

2.5– Classes Texturais

A variação das características texturais do solo ocorrem em função do ambiente de deposição de sedimentos, da vegetação, do relevo que regula o tempo de exposição dos materiais à ação do intemperismo (Young e Hammer, 2000) e, principalmente, do material de origem (Cunha *et al.*, 2005).

As argilas são formadas por partículas finíssimas, decorrentes da alteração dos silicatos de alumínio componentes das rochas, quer sejam as de origem magmática, metamórficas e sedimentares. Os silicatos de alumínio mais abundantes são os feldspatos e as micas; é principalmente da decomposição destes minerais que resultam as grandes massas de argilas. Entretanto, o quartzo é anidrido sílico (sílica), material amplamente disseminado em rochas eruptivas, metamórficas e sedimentares. É um mineral muito comum nas camadas sedimentares, formando arenitos e nas rochas metamorfoseadas os quartzitos (Fróis, 1973).

Os arenitos e as coberturas superficiais arenoquartzosas, produzirão solos de textura arenosa. Por outro lado, solos oriundos de basaltos e diabásios em condições de clima quente e úmido e em terrenos de relevo suave são geralmente muito profundos, de textura argilosa a muito argilosa (Oliveira, 2005). Adicionalmente, Gobin *et al.* (2001) afirmaram que a distribuição espacial da textura no terreno é dependente espacial da direção e da intensidade dos fluxos de água, o que é influenciado pelas formas de relevo.

A textura refere-se à proporção relativa das frações granulométricas que compõem a massa do solo, raramente encontra-se um solo que seja constituído de uma só fração granulométrica. Desta forma surgiram as classes de textura buscando definir as diferentes combinações de areia, silte e argila. (Lemos e Santos, 1996). São abundantes as classificações para a textura do solo, para fins práticos as partículas do solo estão agrupadas em classes texturais. Várias são as classes e subclasses de textura. Assim surgem as texturas areia, areia franca, silte, franco-arenosa, franco-siltosa, franca, franco-argilo-arenosa, franco-argilo-siltosa, franco-argilosa, argilo-siltosa, argilo-arenosa e argila, que exprimem a distribuição das partículas do solo de acordo com os respectivos diâmetros (Vieira, 1988). Além das classes anteriormente citadas, houve a adoção de uma pequena modificação com o surgimento de uma nova classe textural para solos com mais de 60% de argila; a classe muito argilosa (Lemos e Santos, 1996).

No Brasil é amplamente empregado o agrupamento de classes proposto pelo Serviço de Conservação de Solos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, por consequência das muitas conjecturas e a inexistência de um sistema universal (Oliveira, 2005). Tal agrupamento textural está compreendido em um diagrama de repartição de classes texturais (triângulo) (Figura 2) que é utilizado na descrição morfológica dos horizontes dos perfis de solos, e que para utilizá-lo, usam-se duas das três frações granulométricas: argila, silte e areia (Oliveira, 2005).

Porosidade é o volume do solo ocupado pela água e ar, e no campo é determinada quanto ao tamanho e a quantidade de macro poros (Lemos e Santos, 1996). O solo apresenta poros de tamanhos variados, de macro poros visíveis a olho nu, como canais formados por animais e raízes apodrecidas e fendas, e os extremamente pequenos, representados por espaços entre as partículas coloidais (Oliveira, 2005).

Poros grandes e médios são importantes na aeração, infiltração e na condução da água através do solo; enquanto que os menores poros no armazenamento da água. Como a capacidade do solo de armazenar e transmitir líquido está diretamente relacionada com a geometria do sistema poroso, desta forma considera-se que solos arenosos (presença de grande quantidade de poros médios e grandes), possuem elevada permeabilidade interna e diminuta capacidade de retenção de água. Todavia solos argilosos representados por materiais muito intemperizados, ricos em óxidos de ferro e de alumínio, apresentam em geral, mesmo possuindo elevada quantidade de argila, considerável porosidade total (Oliveira, 2005).

Solos argilosos com altos conteúdos de argilas 2:1 (esmectitas), como os Vertissolos, apresentam baixa permeabilidade quando umedecidos, por apresentar porosidade total relativamente baixa e por possuírem micro poros predominantes aos macro poros (Oliveira, 2005).

Buckman e Brady (1989) avaliando curvas características de umidade do solo, verificaram que elas variam especificamente com a granulometria e que as maiores retenções de água ao longo de toda faixa de energia, estão associadas aos solos com frações granulométricas mais finas, que possuem maior percentagem coloidal, maior espaço poroso e superfície específica para maior adsorção quando comparados aos solos de granulometria mais grosseira.

Kitamura *et al.* (2007) relatam que de modo geral, os solos com elevados teores de argila possuem faixa mais ampla de umidade, enquanto a dos arenosos é bem mais estreita. À medida que aumentam os teores de argila, aumenta também a quantidade de água retida. O que constata uma estreita relação entre os conteúdos de água adsorvida e os teores de argila (Mota *et al.*, 2008). Peterson *et al.* (1968) ao

trabalharem com solos brasileiros estabeleceram que a disponibilidade de água em relação à textura média é maior do que a argilosa, que por sua vez é maior que a arenosa.

A granulometria é um dos atributos do solo que influencia diretamente o fluxo superficial e o movimento de água no solo, e deve ser considerada no momento em que se planeja a utilização de metodologias de controle biológico com NEPs.

Wallace (1958) descreve que o movimento dos nematóides em filmes de água com espessura aproximada à metade de seu corpo é tido como ótimo. Todavia, solos com poros muito grandes irão drenar excessivamente a água acrescentando restrições ao movimento dos nematóides. Por outro lado, Blackshaw e Senthamizhselvan (1991) observaram que a eficiência de busca de *S. feltiae* é sensível ao tamanho das partículas do solo, apresentando máxima atividade em solos arenosos com partículas de tamanho intermediário (700-800 µm). Georgis e Poinar (1983) e Portillo-Aguilar *et al.* (1999) reportaram que *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* e *S. glaseri* apresentaram maior movimentação em solos de textura arenosa.

O movimento também pode ser restrito quando associado aos poros do solo completamente preenchidos com água, ou seja, em condições de saturação. Visto que, nematóides são seres aeróbicos e que a baixa disponibilidade de oxigênio pode diminuir sua sobrevivência (Glazer, 1996). O oxigênio pode ser limitante em solos com elevado conteúdo de argila ou matéria orgânica (Kaya, 1990). Provavelmente a pequena aeração, devido às pequenas partículas nos solos de textura argilosa é um fator que diminui significativamente a sobrevivência dos NEPs (Kung *et al.*, 1990a). A exemplo disto, Kung *et al.* (1990a) demonstraram que a dispersão do nematóide é inibida em solos cujas partículas são menores, e ao comparar a persistência de nematóides nas texturas areia, areia franca, franco argiloso e argila notaram que a persistência de *S. glaseri* e *S. carpocapsae* diminuiu da textura mais grosseira para mais fina. Tal observação coincidiu com a hipótese de que a sobrevivência é afetada pela associação da umidade, aeração e tipo de textura (Wallace, 1971).

Em geral, em solos orgânicos, de texturas arenosa e franco-arenosa, a sobrevivência e deslocamento dos nematóides são maiores que em solos de textura

argilosa (Georgis e Poinar, 1983; Kaya, 1990; Barbercheck, 1992; Portillo et al., 2000; Molina e López, 2002). Barbercheck (1992), Kung *et al.* (1990a) e Portillo (2000) afirmaram que se elevar a proporção de argila na textura do solo, menor é o deslocamento de diferentes espécies de NEPs em relação a solos com textura arenosa. Kaya (1990) esclarece que cada espécie de NEP requer uma textura adequada de solo e, que de forma geral, solos mais arenosos (teor de areia > 50 %) são os mais adequados. Por outro lado, Shapiro *et al.* (2000b) mostraram que a busca e a virulência de *H. bacteriophora* e *S. riobrave* (Cabanillas, Poinar e Raulston), para *Diaprepes. abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) pode ser alta, em certos solos com elevado conteúdo de argila.

Barbercheck e Kaya (1991a) comentam que *H. bacteriophora* foi mais móvel que *S. carpocapsae* em solo franco e em areia franca, porém *S. carpocapsae* foi mais móvel que *H. bacteriophora* em textura argilosa exemplificando a variação da movimentação do NEP com o tipo de textura.

Burman e Pye (1980) já haviam demonstrado que em solos com granulometria mais fina, ou seja, mais argilosos em condições de umidade excessiva, apresentavam aeração deficiente e níveis de oxigênio reduzido para a respiração dos nematóides. Por outro lado, um pequeno número de nematóides foi recuperado nas regiões mais superficiais de solos com textura arenosa, o que de acordo com Alekseev *et al.* (2006) pode ser atribuído ao fato da evaporação ocorrer de forma mais rápida em solos mais arenosos (areia-franca) e que os JIs morrem por dessecação ou por migrarem para as regiões mais profundas do solo. Enquanto que em solos mais argilosos o drástico declínio da população de nematóides na camada superior está provavelmente associado à dificuldade de penetração dos JIs neste tipo de solo e exposição à rápida dessecação.

Nematóides maiores, como *S. glaseri*, podem ser afetados pela diminuição do espaço poroso. Entretanto, Shapiro *et al.*, (2000b) observaram elevada infectividade em larvas de *D. abbreviatus* para *H. bacteriophora* e *S. riobrave*, em solos de textura mais fina que em solos mais arenosos. A virulência de *S. riobrave* foi maior do que a de *H. bacteriophora* para todos os tipos de textura. Susurluk (2006) relatou que a eficiência das espécies *H. bacteriophora* e *S. feltiae* contra larvas de *Tenebrio molitor*

(Coleoptera:Tenebrionidae) foi superior em solos com textura arenosa do que em solos argilosos. Logo, geralmente solos mais arenosos quando comparados com os de maior conteúdo de argila restringem a movimentação e o potencial de aeração, o qual pode resultar na diminuição do tempo de vida dos NEPs (Georgis e Poinar, 1983; Kung *et al.*, 1990a).

Estudos de Alekseev *et al.* (2006) avaliando o efeito da umidade e o tipo de solo na atividade de nematóides contra fêmeas ingurgitadas de *Boophilus annulatus*, demonstraram que a população de *S. carpocapsae* DT e atividade de JIs foi fortemente afetada na camada mais superficial (1cm) pela textura do solo. Uma mortalidade de 100% de fêmeas de *B. annulatus* foi registrada em baldes plásticos contendo substratos de textura franco-arenosa, areia marinha e arenito calcário, enquanto somente 40–45 % de mortalidade foi observada em baldes contendo argila e argilo- siltosa.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF)/ Nematologia pertencente ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ, no período de março de 2008 a janeiro de 2009.

3.2 – Material biológico

3.2.1 - *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae).

As larvas de *G. mellonella* foram obtidas conforme metodologia descrita por Dukty et al. (1962). Os ovos foram colocados em potes plásticos retangulares de 6,5 X 20 X 14 cm com dieta alimentar baseada em farelo de trigo, gérmen de trigo,

levedo de cerveja, leite, glicerina e mel, adicionada diariamente conforme a necessidade. A colônia foi mantida à temperatura de 28 ± 2 °C e umidade relativa de 60%. As larvas no último instar (4-5 semanas) foram depositadas em potes plásticos nas mesmas dimensões citadas acima, onde permaneceram sem dieta para passarem para o estágio de pupa e depois adultos. Para manutenção da colônia, insetos adultos foram colocados em recipientes de vidro de 30 cm de altura para ovipositar em folhas de papel depositadas na tampa. As folhas de papel contendo os ovos foram cortadas em quadrados de aproximadamente 3 cm e colocadas em potes de vidro (10 cm de altura) com a tampa perfurada, contendo a dieta. Após a eclosão dos ovos, as larvas de 3º instar foram transferidas para potes plásticos (6,5 X 20 X 14 cm) contendo dieta própria. As larvas de *G. mellonella* no 7º instar foram utilizadas para multiplicação dos NEPs (Figura 3) (Machado, 2006).



Figura 3. Foto de larvas de *Galleria mellonella* no 7º instar utilizadas na multiplicação do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

3.2.2 - *Heterorhabditis baujardi* LPP7

H. baujardi LPP7 foi multiplicado em larvas de *G. mellonella* no 7° instar. Dez larvas foram colocadas em cada placa de Petri (9 cm de diâmetro) forrada com duas folhas de papel de filtro (Whatman nº1), onde foi adicionada uma suspensão de 100 JIs/mL de água destilada. As placas foram seladas com filme plástico, identificadas e mantidas em câmara climatizada a 27 ± 1 °C e UR > 80%. Após sete dias, as larvas que apresentaram sintomatologia típica de infecção por *Heterorhabditis* sp. (corpo íntegro com coloração uniforme marrom-avermelhada) foram transferidas para armadilhas modificadas de White (White, 1927) (Figura 4), e em cada armadilha foram adicionados cerca de 14 mL de água destilada. Após a montagem das armadilhas, estas foram repostas nas câmaras climatizadas, nas mesmas condições anteriores.

Após 11 a 12 dias de infecção, os primeiros JIs de *H. baujardi* LPP7 começaram a emergir dos cadáveres. Estes foram coletados utilizando-se pipetas Pasteur de vidro, e armazenados em garrafas de cultura de células de 40 mL. Estas garrafas com JIs foram acondicionadas em câmara climatizada a 16 °C, onde permaneceram por no máximo uma semana, antes de sua utilização nos experimentos.

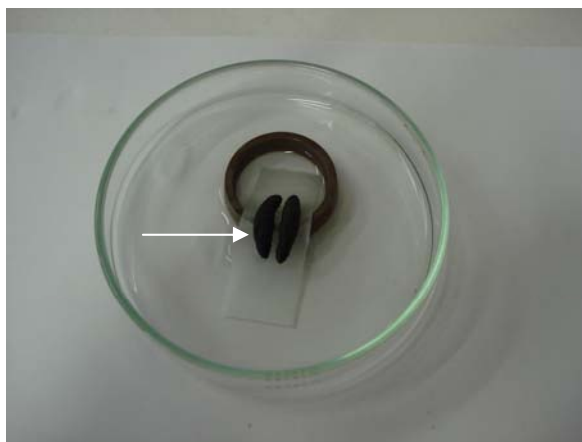


Figura 4. Armadilha de White modificada usada para resgatar J1s saídos dos cadáveres de *G. mellonella* (seta) infectados com nematóides entomopatogênicos.

3.3 – Áreas de coleta e material

Para a realização do experimento foram coletadas sete amostras de solo em diferentes áreas. O material foi analisado e somente quatro destas amostras foram utilizadas de acordo com suas classes texturais de interesse. Os locais de coleta estão localizados nas coordenadas planas UTM (Fuso 24 Datum Sad 69 / Modelo MAP 76C): estrada do Açú/Campo da praia (E 0283887, N 7590518), Caetá (E 0277058, N 7596747), Martins Laje (E 0266975, N 7590680) e Usina Sapucaia (E 0250500, N 76051975) em Campos dos Goytacazes, RJ. A coleta das amostras foi realizada a uma profundidade de 0-25 cm em áreas de pastagem e cultivos comerciais. Antes de cada coleta fez-se a limpeza da área que contou com a retirada de toda cobertura vegetal e serrapilheira, procedeu-se a coleta com enxadão e pá (Figura 5). Cada amostra apresentou massa de 180-200 kg. Após a coleta, as amostras foram identificadas, colocadas em sacos de nylon de 50 Kg e foram armazenadas em casa de vegetação.



Figura 5. Limpeza do local antes da realização da coleta do substrato.

De acordo com o agrupamento de classes de solo proposto pelo Serviço de Conservação de Solos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Lemos e Santos, 1996), as amostras foram definidas como areia (0,6% argila, 99,0% areia, 0,4% silte), franco-argilo-arenosa (28,0% argila, 63,5% areia, 8,5% silte), franco-argilosa (31,0% argila, 33,0% areia, 36% silte) e argila (44,8% argila, 16,3% areia, 38,9% silte). Para classificá-las foi utilizado o triângulo (diagrama de repartição de classes texturais) (Figura 2).

3.3.1 - Análise dos substratos

Antes da realização das análises, cerca de 200 g de cada material foi retirado e espalhado sobre folhas de jornal, e secas ao ar à sombra por 48 horas dentro de casa de vegetação. Após a secagem, as amostras foram destorroadas com o auxílio de um cilindro e peneiradas em peneira de 2,0 mm.

A composição granulométrica de cada material foi determinada pelo método da pipeta, utilizando-se solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 M como dispersante químico e agitação mecânica em aparato de baixa rotação por 16 horas, seguindo-se o método proposto pela Embrapa (1997), com pequenas modificações.

Após 16 horas de agitação constante, as amostras foram retiradas e separou-se a fração argila da areia com o auxílio de uma peneira de 53 mm. O material não retido pela peneira foi transferido para uma proveta, onde o volume foi completado com água para 1000 mL. O material retido na peneira foi colocado em placa de Petri previamente pesada e levada para estufa de circulação forçada de ar a 110 °C.

A fração de argila foi separada por sedimentação, de acordo com a lei de Stokes. Para efetuar este procedimento o líquido contido na proveta foi homogeneizado por um minuto e a temperatura medida com o auxílio de um termômetro. De acordo com a temperatura foi definido o tempo de espera (cerca de 3-4 horas) para a retirada da alíquota, da solução por meio de uma pipeta de 50 mL. A alíquota foi armazenada em vidro (4 cm diâmetro/abertura superior x 5 cm /base x 8cm de profundidade) também pesado e direcionado à estufa de circulação forçada de ar também a 110°C. Após secagem o material restante foi considerado fração argila. As frações areia e argila foram calculadas após secagem e pesagem e a fração silte determinada pela diferença entre elas.

A leitura do pH foi realizada por meio de eletrodo imerso (potenciômetro com eletrodo combinado (MicroNal/modelo B-474) na suspensão de solo (10 mL) em copo plástico contendo 25 mL de água destilada homogeneizada com um bastão de vidro por 60 segundos (Embrapa, 1997). O potenciômetro foi aferido a partir de soluções padrão pH 4 e 7.

Para todas as amostras foi analisada a mineralogia da argila, e calculou-se o K_i , que indica o grau de intemperismo dos materiais coletados. Este foi calculado a partir da fórmula: $\%SiO_2 / \%Al_2O_3 \times 1,7$ (Kehrig, 1949). O K_i foi calculado com valores expressos em porcentagem, divididos pelos seus respectivos pesos moleculares (Embrapa, 1997).

A caracterização química e a obtenção das porcentagens de SiO_2 e Al_2O_3 foram realizadas por meio de espectroscopia através de fluorescência de raios X, utilizando-se para tal procedimento o espectrofotômetro da Shimadzu modelo EDX - 700 acoplado a um computador para o processamento dos dados. Antes da realização da análise, as amostras foram submetidas ao mesmo tratamento realizado

na análise granulométrica para a aquisição da argila seca em estufa. Contudo, para realizar esta análise as amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 110 °C por 24 horas e homogeneizadas e pipetadas 4 vezes (segundo a metodologia para análise granulométrica) para se ter a quantidade necessária de material. O ensaio foi realizado em atmosfera a vácuo.

A porcentagem de matéria orgânica foi definida a partir do teor de carbono orgânico contido nas amostras de solo coletadas, multiplicado por 1,724. Em capela de exaustão foi feita a análise do carbono orgânico utilizando-se tubo de ensaio para digestão. Neste foi pesado 0,5 g de solo, adicionado 5 mL de dicromato de potássio na concentração de 0,21 mol.L⁻¹ e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, deixou-se que este escorresse lentamente pelas paredes do tubo de ensaio. Foram adicionadas bolas de vidro no interior dos tubos de digestão para evitar um superaquecimento da solução e que a mesma transbordasse. Também foi utilizado sobre cada tubo de ensaio, um funil de refluxo. Fez-se a digestão por 1 hora utilizando bloco digestor (Marconi/Modelo MA-4025) a 150 °C, período em que o cromo VI é reduzido a cromo III, adquirindo coloração verde. Após a digestão, e depois que a solução atingiu a temperatura ambiente, adicionou-se cloreto de bário (Anderson e Ingram, 1996).

3.3.2 - Solarização dos substratos

As amostras coletadas foram solarizadas por três dias consecutivos e imediatamente utilizadas. O coletor solar ou “solarizador” consiste basicamente de uma caixa de madeira (1,0 x 1,5 m) que contém seis tubos metálicos (15 cm de diâmetro) e uma cobertura de plástico transparente, que permite a entrada dos raios solares (Ghini e Bettiol, 1991). O coletor usado para solarização do substrato atinge uma temperatura máxima que varia entre 60 a 80°C (Martins *et al.*, 2003) (Figura 6). O substrato foi colocado pela abertura superior dos tubos e, após o tratamento, retirado pela inferior, por meio da força da gravidade. Os tubos são de cobre e pintados com tinta preta fosca pelo lado de fora.

O coletor recebeu 120 L de substrato e foi instalado com exposição na face norte e um ângulo de inclinação semelhante à latitude local acrescida de 10°. Após colocar o material e preencher todos os tubos, foi necessário que todas as manhãs, houvesse a abertura da lona que o recobria e o fechamento no final da tarde para evitar chuvas e sereno.



Figura 6. Equipamento utilizado para solarização do substrato usado no experimento.

3.4 - Montagem das unidades experimentais

O procedimento experimental foi de acordo com a metodologia descrita por Lara (2006). Foram utilizados tubos de polivinil carbonato (PVC) com 1 m de comprimento e 150 mm de diâmetro cortados longitudinalmente, com extremidades fechadas com plástico e fita adesiva (Figura 7).



Figura 7. Detalhe do tubo de polivinil carbonato utilizado para avaliar a mobilidade dos JIs de *H. baujardi* através de diferentes classes texturais do substrato.

Para cada classe textural, foram montados 15 tubos contendo 4 Kg de substrato e umidade ajustada a 12 % (peso / volume). Para avaliar a distância percorrida por *H. baujardi* LPP7 em busca do inseto hospedeiro (*G. mellonella*), em cada uma das classes texturais testadas (areia, franco-argilo-arenoso, franco-argilosa e argila), quatro envelopes confeccionados em tela metálica (6 x 5 cm) contendo 10 larvas de *G. mellonella* no 7° instar foram colocados em cada tubo de PVC para cada distância do ponto de aplicação dos JIs de *H. baujardi* (Figura 8). As distâncias avaliadas foram de 30, 60 e 90 cm, com a montagem de 5 tubos para cada distância (Figura 9).

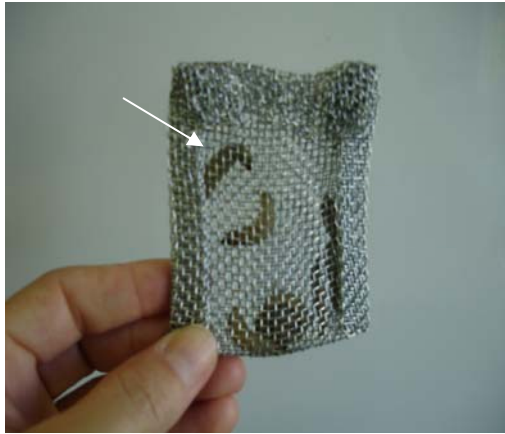


Figura 8. Envelope confeccionado em tela metálica contendo larvas de 7° instar de *Galleria mellonella* (seta).

Os JIs de *H. baujardi* LPP7 foram aplicados em suspensão aquosa (10.000 JIs/30 mL), e uniformemente distribuídos em uma das extremidades de cada tubo de PVC contendo os substratos. Foi feita uma pequena abertura no substrato, onde foram colocados os envelopes metálicos contendo as larvas de *G. mellonella*. Em seguida os mesmos foram cobertos com o próprio substrato, para aumentar o contato das larvas de *G. mellonella* com o material, e facilitar assim a chegada dos nematóides aos insetos hospedeiros. E também se recobriu os tubos com filme plástico para diminuir perdas por evaporação.

O experimento foi conduzido em laboratório a uma temperatura média de 27 °C \pm 3, umidade relativa do ar de 67 % \pm 3 e pHs dos substratos na faixa de 4,4 a 5,3, classificados como fortemente ácidos (Embrapa, 2006).

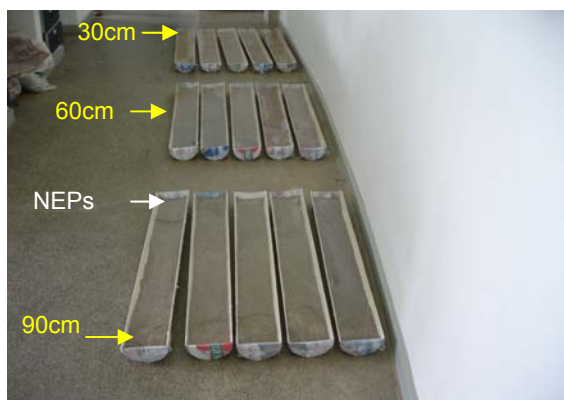


Figura 9. Tubos de PVC contendo substrato. As setas amarelas indicam a posição dos envelopes contendo as larvas de *G. mellonella* para cada unidade experimental e a seta branca o local de aplicação dos JIs de NEPs de *H. baujardi* LPP7.

A mobilidade dos JIs de *H. baujardi* LPP7 nas diferentes classes texturais, foi determinada indiretamente pela mortalidade das larvas de *G. mellonella* nos envelopes. No 12º dia após a aplicação dos JIs de *H. baujardi* LPP7. Os índices de mortalidade causados pelos nematóides foram quantificados a partir da coloração do inseto cadáver (marrom-avermelhado), característica da bactéria simbiote *Photobabdus sp.* Os cadáveres das larvas foram dissecados em placa de Petri com o auxílio da lupa, pinça e bisturi e foram adicionadas gotas de água destilada para melhor visualização e verificação da presença dos NEPs no interior das larvas (Figura 10). No momento da avaliação, as larvas que ainda se moviam foram consideradas vivas e foram colocadas em câmara climatizada a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ e UR > 80 %, por 48 horas, para observar se houve a ocorrência de uma possível infecção tardia.



Figura 10. Fotomicrografia das larvas de *Galleria mellonella* infectadas e dissecadas, liberando fêmeas de *Heterorhabditis. baujardi* LPP7. Sony 7.2 megapixels.

3.5 – Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições e em arranjo fatorial 3x4 (distância x classe textural). A diferença estatística na mobilidade para cada classe textural foi verificada pela análise de variância (ANOVA) com o auxílio do programa estatístico: Sistema de Análises Estatísticas (SAEG, 2007). As diferenças entre médias de tratamentos foram avaliadas pelo teste de Duncan a 5% de significância e foi realizada análise de regressão para avaliar a mortalidade em função da distância.

4 – RESULTADOS

A média de mortalidade das larvas de *G. mellonella* causada pelos JIs de *H. baujardi* LPP7 foi significativa para as variáveis distância e classe textural ($F= 455,67$, $GL= 3$ $P < 0,001$).

A 30 cm do local de liberação do JIs, os maiores índices de mortalidade de larvas foram observados nos materiais Areia e Franco-argilo-arenosa, seguidos de Franco-argilosa e Argila.

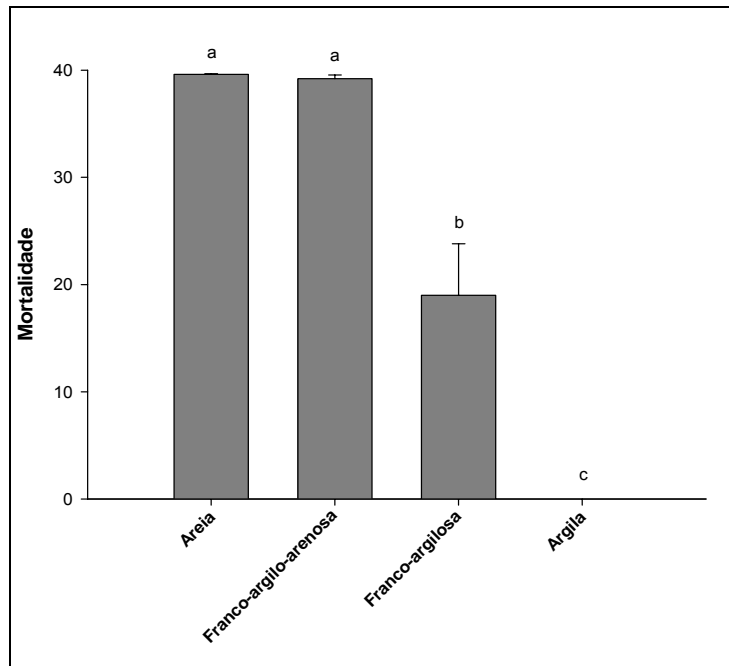


Figura 11. Mortalidade média de larvas de 7^o instar de *Galleria mellonella* em tubos de PVC preenchidos com substratos de diferentes classes texturais, quando colocados a 30cm de distância de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/classe textural. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Duncan a 5%.

À distância de 60 cm, a mortalidade de larvas de *G. mellonella*, somente foi observada nos materiais Areia e Franco-argilo-arenosa, sendo constatadas diferenças significativas entres estes dois materiais, com o maior índice de mortalidade em Areia. Nenhuma mortalidade para as classes franco-argilosa e argila foi observada. Conforme verificado na distância de 30 cm, a variável porcentagem de areia apresentou uma relação funcional com a mortalidade. A 90 cm a mortalidade de larvas apresentou um padrão semelhante ao observado na distância de 60 cm, com o maior índice de mortalidade em Areia.

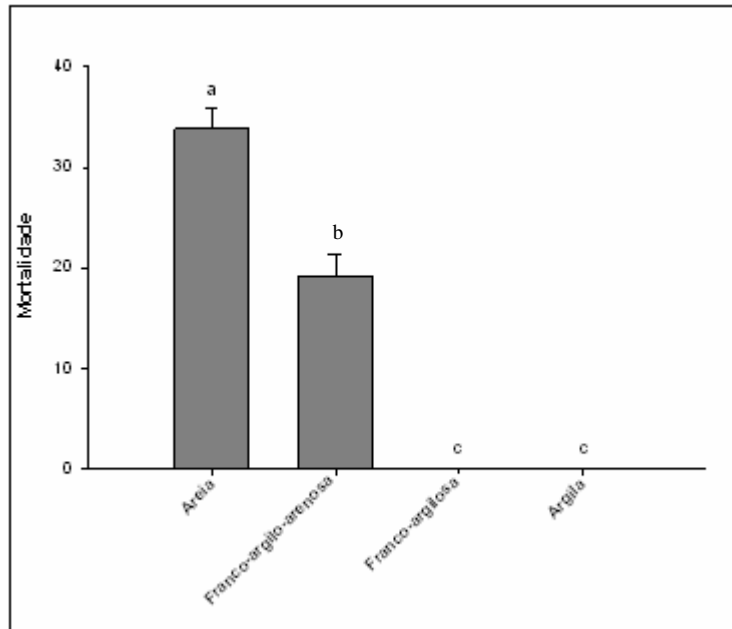


Figura 12. Mortalidade média de larvas de 7º instar de *Galleria mellonella* em tubos de PVC preenchidos com substratos de diferentes classes texturais, quando colocados a 60cm de distância de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/classe textural. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Duncan a 5%.

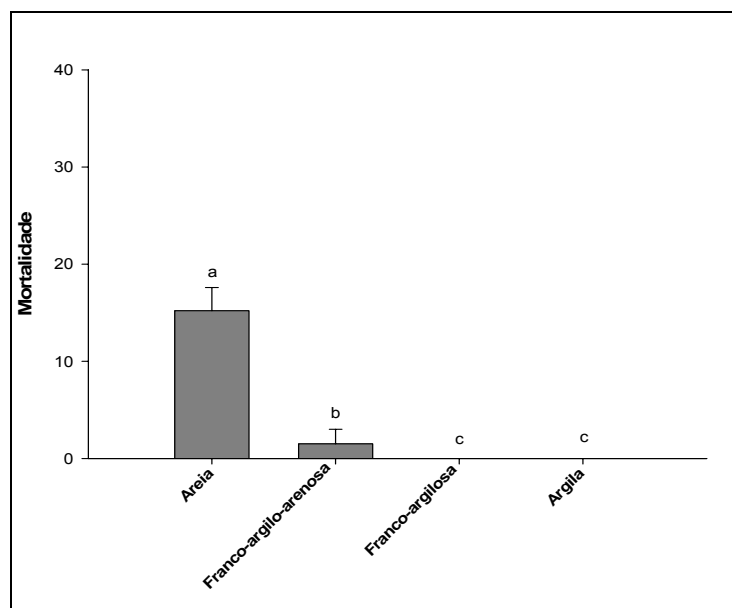


Figura 13. Mortalidade média de larvas de 7º instar de *Galleria mellonella* em tubos de PVC preenchidos com substratos de diferentes classes texturais, quando colocados a 90 cm de distância de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/classe textural. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, de acordo com o teste de Duncan a 5%.

As distâncias dos locais de liberação de JIs de *H. baujardi* LPP7, apresentaram uma relação funcional com a mortalidade de larvas de *Galleria mellonella*. Os maiores índices de mortalidades foram verificados à distância de 30 cm, seguido de uma redução progressiva da mortalidade nas distâncias de 60 e 90 cm, para os materiais Areia, Franco-argilo-arenosa e Franco- argilosa.

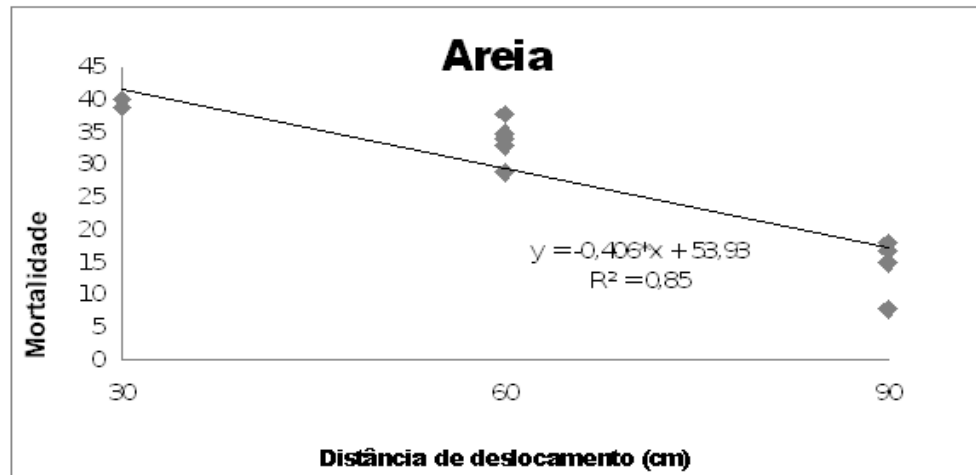


Figura 14. Mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* quando estas foram colocadas a 30, 60 ou 90 cm de distância de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em tubos de PVC preenchidos com substrato de textura areia. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/distância.

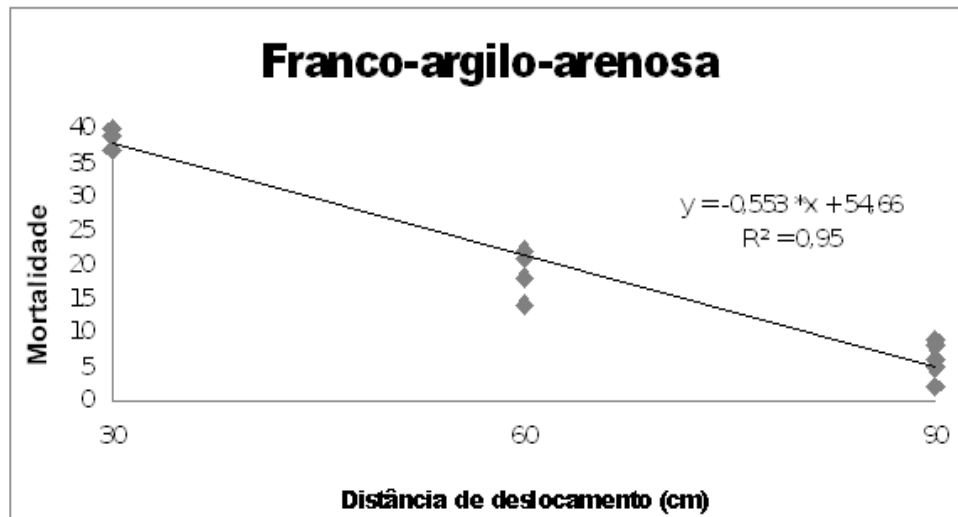


Figura 15. Mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* quando estas foram colocadas a 30, 60 ou 90 cm de distância de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em tubos de PVC preenchidos com substrato de textura franco-argilo-arenosa. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/distância.

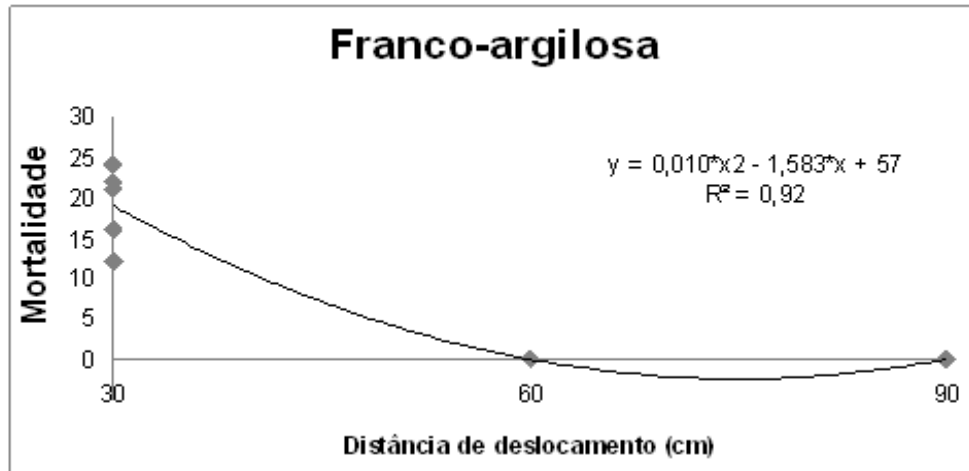


Figura 16. Mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* quando estas foram colocadas a 30, 60 ou 90cm de distância de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, em tubos de PVC preenchidos com substrato de textura franco-argilosa. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos. Valores são médias de 40 larvas/distância.

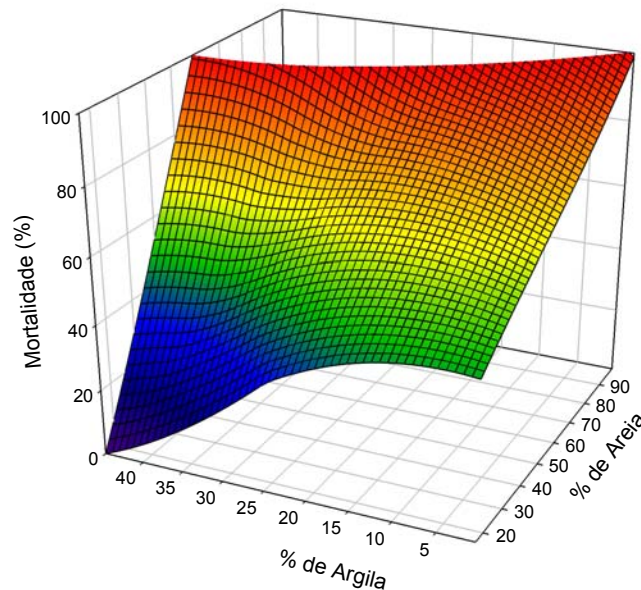


Figura 17. Superfície de resposta da mortalidade de larvas de *Galleria mellonella*, causada por *Heterohabditis baujardi* LPP7 em função da porcentagem de areia e argila para a distância de 30 cm do ponto de aplicação dos Juvenis infectantes, em tubos de PVC para substratos com diferentes classes texturais areia, franco-argilo-arenosa, franco-argilosa e argila. A avaliação da mortalidade deu-se 12 dias após a aplicação de ambos os organismos nos tubos.

Os resultados demonstraram que a 30 cm do ponto de aplicação dos JIs, os substratos que apresentaram areia acima de 60% e menos de 30% de argila alcançaram mortalidade próxima a 100%. Entretanto, quando a relação areia é menor que 60% e argila superior a 30%, tem-se uma queda drástica na mortalidade. Acima de 40% de argila, nenhuma mortalidade foi alcançada para os primeiros 30 cm.

Não foi verificada nenhuma correlação entre as variáveis Ki, pH e a mortalidade. Para os valores encontrados para o Ki e pH (vide anexo).

5 - DISCUSSÃO

Os juvenis de *H. baujardi* LPP7 se apresentaram eficientes na capacidade de infectar larvas de *G. mellonella*. As taxas de mortalidade avaliadas demonstraram, contudo, que a capacidade de dispersão do NEP foi significativamente afetada pela textura dos substratos e pela distância percorrida pelo nematóide do ponto de aplicação dos juvenis até as larvas de *G. mellonella*. À medida que as distâncias a serem percorridas e os conteúdos de argila aumentaram, diminuiu a média de mortalidade das larvas.

A eficiência de busca do inseto hospedeiro pelos JIs foi melhor em substratos com maior conteúdo da fração areia, enquanto que os materiais de granulometria mais fina reduziram significativamente a movimentação dos NEPs. Esses resultados são muito próximos aos encontrados por Georgis e Poinar (1983), que ao avaliarem a habilidade de movimentação e infectividade de *Steinernema carpocapsae*, em colunas verticais, observaram maior dispersão e infectividade para as classes areia e franco-arenosa. Os autores também observaram que em classes texturais mais argilosas ocorreram reduzida migração e infecção de pupas de *Galleria mellonella*

para a classe franco-argilo-siltosa, enquanto que, em argila não foram recuperados nematóides além de 4 cm na presença ou ausência do inseto hospedeiro.

Nos resultados do presente trabalho, nenhuma mortalidade foi registrada, para a classe franco-argilosa (distâncias 60 e 90 cm) e argila nas três distâncias analisadas (30, 60 e 90 cm), onde não se verificou nenhuma mortalidade. Georgis e Poinar (1983) obtiveram 13,2% de mortalidade de pupas de *Galleria mellonella* em argila. Em outro experimento, ao analisar o efeito da textura na atividade de NEPs contra fêmeas de *Boophilus annulatus*, Alekseev *et al.*(2006) encontraram 40-45% de mortalidade para fêmeas de carrapato em argila, e uma mortalidade de quase 100% para substratos de textura arenosa. Contudo, é importante lembrar que este estudo fez uso de vasos plásticos (400 cm², 21 cm profundidade e com 2/3 de substrato) e neles foram colocados os JIs, uma a duas horas antes de depositar as fêmeas de carrapato. Já no experimento anteriormente citado, usaram tubos plásticos de 28 cm comprimento e 7 de diâmetro, apenas 100 cm³ de substrato e 30.000JIs / 0,2mL que foram adicionados a 14 cm de profundidade. No presente estudo utilizou-se tubos plásticos com 1 m de comprimento e 4 kg de material e avaliaram distâncias muito superiores de movimentação. Além do fato de se fazer uso de uma suspensão com concentração 3 vezes inferior de juvenis infectantes (10.000JIs/ 30mL).

Barbercheck e Kaya (1991a) observaram que além das condições do hospedeiro, a classe textural também influenciou na busca do inseto pelos nematóides *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae*. A mobilidade variou com o tipo de nematóide, uma vez que *S. carpocapsae* se mostrou mais móvel que *H. bacteriophora* em argila. O autor sugere que esta diferença pode estar relacionada à diferença de cutícula entre as duas espécies, devido a interações iônicas entre a cutícula e o solo. As argilas apresentam alta adsorção e são iônica e ativas. Também inferiu que possivelmente as interações das argilas com a cutícula de *H. bacteriophora* tenham limitado a sua mobilidade. As respostas negativas com relação à movimentação dos JIs no presente trabalho, talvez possam ser explicadas também por este fator.

A relação macro e micro poros também afetam a mobilidade dos nematóides, logo, o acréscimo das porcentagens de argila e silte podem diminuir sua dispersão.

O nematóide não pode mover-se entre as partículas do solo quando o diâmetro do poro é menor que a largura do nematóide (Georgis e Poinar, 1983) Desta forma, sua distribuição local também fica limitada. Outra justificativa seria a deficiência em responder aos voláteis liberados pelo inseto hospedeiro, que pode ter sido gerada em consequência da falta de atratividade, principalmente no caso de NEPs com comportamento de busca “cruiser”, como no caso de *H. baujardi* LPP7, que se movimenta ativamente entre as partículas do solo em busca do hospedeiro. Segundo Glazer (1996), a redução do espaço poroso pode influenciar na transmissão de dióxido de carbono (CO₂) ou exudados voláteis os quais os nematóides usam como sinais para encontrar o hospedeiro.

Geralmente, os solos que possuem maiores conteúdos de argila, reduzem os movimentos dos JIs e o potencial de aeração, resultando em diminuta sobrevivência e eficiência do nematóide. Kung *et al.* (1990a) confirmaram que os solos argilosos podem afetar a sobrevivência dos NEPs devido à pequena aeração associada ao predomínio de pequenas partículas.

Em trabalhos de campo, Georgis e Poinar (1986) perceberam que a movimentação de *S. carpocapsae* em material de textura Franco-argilosa, foi de 4,35 cm/dia, o que demonstrou ser uma razoável eficiência em condições de campo.

No trabalho de Moyle e Kaya (1981) em areia foi mostrada uma taxa de dispersão de 7 cm/dia e uma infecção de 5% de pupas de *Galleria mellonella* a 14 cm do ponto de aplicação. No presente trabalho obteve-se após 12 dias para esta classe infecção de 15% para larvas de *G. mellonella* a 90 cm de distância do ponto de aplicação dos JIs, o que demonstrou ser *H. baujardi* LPP7 muito móvel em areia.

A queda na taxa de infectividade para as maiores distâncias, também pode estar relacionada à diminuição na mobilidade do nematóide, referente ao declínio das reservas, devido ao elevado gasto energético.

Segundo Oliveira (2005), quando o índice de Ki for $\leq 2,0$ os solos são considerados muito intemperizados. O contrário demonstra que o solo possui pequeno nível de intemperização (Ki > 2). Logo, os índices de Ki para as amostras

utilizadas indicam que os substratos apresentam o mesmo nível de intemperização e não influenciaram na mobilidade dos NEPs.

O pH pode influenciar diretamente na sobrevivência e virulência dos nematóides. Kung *et al.* (1990b) demonstraram em laboratório que a sobrevivência de *S. carpocapsae* e *S. glaseri* foi maior em pH 8, seguido pelo pH 6 e pH 4, enquanto que, em pH 10 esta foi significativamente menor. Ao passo que *S. glaseri* mostrou maior patogenicidade que *S. carpocapsae* a pH 4 e 6 após duas semanas, porém havendo declínio 4 a 8 semanas depois.

Os substratos analisados apresentaram pH entre 4,4-5,3 (anexo). De acordo com os resultados apresentados, o pH não influenciou na taxa de mortalidade, visto que, as respostas obtidas para a classe argila, onde não se observou nenhuma mortalidade, o pH era muito similar ao das demais classes (areia e franco-argilo-arenosa) onde foram computadas altas mortalidades (Figura 12).

A metodologia de desinfestação dos substratos provavelmente não influenciou os resultados. A solarização foi um método proposto por ser eficiente no controle de fitopatógenos, plantas daninhas e pragas de solo, por meio de uso de energia solar, (Ghini, 1997). Os coletores solares foram eficientes na desinfestação dos substratos, visando o controle de *Sclerotium rolfsii* do isolado Sr-1. As temperaturas atingidas pelos coletores nos ensaios de 60 a 80°C, foram suficientes para erradicar 100% dos escleródios do patógeno, conforme constatado pela ausência de germinação em BDASC e coloração por TCT (Martins *et al.*, 2003).

Os autores, Ghini *et al.* (1998) constataram a erradicação de adultos e Juvenis de *Meloidogyne arenaria* Neal e Chitwood, de pedaços de raízes infestadas de tomateiro submetidos ao tratamento por 1 dia no coletor.

De forma geral, o presente trabalho demonstrou que os juvenis de *H. baujardi* LPP7 apresentaram melhor comportamento de busca ao inseto hospedeiro em substratos de textura mais arenosa. Estes resultados condizem com a origem deste NEP que é nativo da floresta Amazônica de Monte Negro-RO e distribuído em solos de areia franca (Dolinski *et al.*, 2008).

Os NEPs nativos são adaptados às condições edafoclimáticas do Brasil. Entretanto, é importante buscar o conhecimento das melhores condições ambientais,

e aumentar a eficiência de uso e distribuição destes nematóides na área que se destina fazer controle da praga. Aos produtores que pensam na utilização desta metodologia de controle, esta pesquisa pode contribuir tanto na decisão da viabilidade do uso de NEPs em função da classe textural, bem como na quantidade de JIs a ser ministrada. Porém, é necessário que estudos sejam realizados a campo, considerando-se além desta característica física, outros fatores que venham a influenciar na movimentação e sobrevivência destes nematóides.

6 – CONCLUSÃO

- Os juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 se dispersaram a maiores distâncias nas classes texturais areia e franco-argilo-arenosa.
- Não houve correlação entre as variáveis Ki, pH e a mortalidade de larvas de *Galleria mellonella*.
- Houve redução progressiva da mortalidade nas distâncias de 60 e 90 cm, para as classes areia, franco-argilo-arenosa e franco-argilosa.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acevedo, J.P.M. (2008) Interações entre o Fitonematóide *Meloidogyne mayaguensis* (Rhabditida: Meloidoginidae) e o complexo Nematóides Entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) e suas bactérias Simbiontes. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Tese de Doutorado em Produção Vegetal. 104p.

Acevedo, J.P.M., Samuels, R.I., Machado, I.R., Dolinski, C. (2007) Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Invertebr Pathol.* 96:187-192.

- Adams, B.J., Fodor, A., Koppenhoffer, H.S., Stackebrandt, E., Stock, P., Klein, M. (2006) Biodiversity and systematics of nematode- bacterium entomopathogens. *Biol 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. 311-332.
- Anderson, I.D., Ingram, J.S.I. (1996) Tropical soil biology and fertility: A handbook of methods. 2. ed. Wallingford, UKCAB international, 171p.
- Akhurst, R.J., Smith, K. (2002) Regulation and safety. *In: Gaugler, R. (ed). Entomopathogenic Nematology*. New Jersey: Rutgers University, p. 311- 332.
- Alekseev, E., Glazer, I., Samish, M. (2006) Effect of texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* ticks. *Biocontrol* 51:507-518.
- Ames, L. (1990) The role of some abiotic factors in the survival and motility of *Steinernema scapterisci*. University of Florida, Gainesville.
- Andaló, V., Moino Jr., 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, São Paulo, 71(2):181-187, abr./jun.
- Barbecheck, M.E. (1992) Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. *The Florida Entomologist*, 75(4):539-548.
- Barbecheck, M.E., Kaya, H.K (1991a) Effect of host condition and soil texture on host finding by entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida:

Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environ Entomol.* 20:582-589.

Barbercheck, M.E., Kaya, H.K. (1991b) Competitive interactions between entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) in soil borne larvae of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ Entomol.* 20:707-712.

Bento, J.M.S. (1999) Perdas por insetos na agricultura . Ação ambiental, ano II nº 4.

Bird, A., Bird, J. (1986) Observations of the use of insect parasitic nematodes as a means of biological control of root knot nematodes. *Int J Parasitol.* 1134:473-482.

Blackshaw, R.P., Senthamizhselvan, M. (1991) The effect of sand particle size on *Steinernema feltiae* sensu Filipjev (1934) (*N. bibionis* Bovien) activity against *Galleria mellonella* larvae. *Ann Appl Biol.* 118:637-643.

Boff, M.I.C., Van Tol, R.H.W.M., Smits, P.H. (2002) Behavioural response of *Heterorhabditis megidis* towards plant roots and insect larvae. *Bio control* 47:67-83.

Boff, M.I.C., Wieggers, G.L., Smits, P.H. (2001) Influence of insect larvae and plant roots on the host-finding behaviour of *Heterorhabditis megidis*. *Biocontrol Sci Techn.* 11:493-504.

Buckman, H.O., Brady, N.C. (1989) Natureza e propriedade dos solos. 7. ed. Tradução de A.B. de Figueiredo Filho. Rio de Janeiro, Freitas Bastos. 594p.

Burman, M., Pye, A.E. (1980) *Neoaplectana carpocapsae*: respiration of infective juvenile. *Nematologica* 26:214-219.

- Campbell, J.F., Lewis, E., Yoder, F., Gaugler, R. (1996) Entomopathogenic nematode (Heterorhabditidae and Steinernematidae) spatial distribution in turfgrass. *Parasitology*. 113:473-482.
- Campbell, J.F., Lewis, E.E., Yoder, F., Gaugler, R. (1995) Entomopathogenic nematode (Heterorhabditidae and Steinernematidae) seasonal population dynamics and impact on insect populations in turfgrass. *Biol Control*. 5:598-606.
- Choo, H.Y., Lee, D.W., Yoon, H.S., Lee, S.M, Hang, D.T. (2002) Effects of temperature and nematode concentration on pathogenicity and reproduction of entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Pocheon strain (Nematoda: Steinernematidae). *Korean J. Appl. Entomol*. 41:269-277.
- Cunha, P., Marques Júnior, Curi, N., Pereira, G.T. Lepsch, I.F. (2005) Superfícies geomórficas e atributos de Latossolos em uma sequencia arenítico-basáltica da região de Jaboticabal (SP). *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29:81-90.
- Curran, J. (1993) Post-application biology of entomopathogenic nematodes in soil. p. 67-77. In: Bedding, R., Akhurst, R., Kaya, H. (eds). Nematodes and the Biological Control of Insect Pest. CSIRO. *East Melbourne, Austrália*.
- Cutler, G.C., Webster, J.M. (2003) Host-finding ability of the three entomopathogenic nematode isolates in the presence of plant roots. *Nematology*. 5:601-608.
- Del Valle, E.E., Dolinki, C., Barreto, E.L.S., Souza, R.M., Samuels, R.I. (2008) Efficacy of Heterorhabditis baujardi LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in Galleria mellonella (Lepdoptera: Pyralidae) insect cadavers to Conotrachelus psidii, (Coleóptera: Curculionidae) larvae. *Biocontrol Sci Techn*. 18:33-41.

- Dolinski, C. Kamitami, F., Machado, I.R., Winter, C.E (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabdit entomopathogenic Nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Mem I Oswaldo Cruz*. 103(2):150-159.
- Dolinski, C., Del Valle, E.E., Burla, R.S, Machado, I.R (2007) Biological traits of two native brazilian entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematol Bras*. 31:180-185.
- Dolinski, C., Del Valle, E.E., Stuart, R (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biol Control*. 38: 422-427.
- Dowds, B.C.A., Peters, A. (2002) Virulence Mechanisms. *In: Gaugler, R. (ed). Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, New York, p. 79-98.
- Dunphy, G.B., Webster, J.M. (1986) Temperature effects on the growth and virulence of *Steinernema feltiae* strains and *Heterorhabditis heliothidis*. *J Nematol*. 18: 270-272.
- Dutky, S.R., Thompson, J.V., Cantwell, G.E. (1962) A technique for mass rearing the greater wax moth (Lepdoptera : Galleriidae). *Proc Entomol Soc Wash*. 64:56-58.
- 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. *Environ Entomol*. 30:254-261.
- Ehlers, R.U. (1996) Current and future use of nematodes. *In: biocontrol: Practice and comercial aspects with regard to regulatory policy issues*. *Biocontrol Sci Techn*. 6:303-316.

- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. (1997) Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise do solo. 2. ed. Rio de Janeiro, 212p.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa (2006) Sistema Brasileiro de Classificação de solos. [editores técnicos, Humberto Gonçalves dos Santos et al.]. 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 306p.
- Forst, S., Clarke, D. (2002) Bacteria-Nematode Symbiosis. *In*: Gaugler R editor. *Entomopathogenic Nematology*, CRC press, p. 57-77.
- Fróis, A., S. (1973) Fróis, A., S. (1973) Recursos Minerais do Brasil. 2 ed. São Paulo Edgard Blücher, Ed. da Universidade de São Paulo; Rio de Janeiro; Instituto Nacional de Tecnologia, 324p.
- Fujie A., Y. Takata, M. Tachibana, and T. Yokohama (1996) Insecticidal activity of an entomopathogenic nematode. *Steinernema kushidae* (Nematoda: Steinernematidae) against *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae under different soil moisture conditions. *Appl. Entomol. Zool.* 31:453-454.
- Gaugle, R. (1988) Ecological Consideration in the biological control of soil inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture Ecosystem Environmental Agr Ecosyst Environ.* 24(1-3): 351-360.
- Gaugler, R., Campbell, J.F., McGuire, T.R. (1989) Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *J Invertebr Pathol.* 54:363 -372.
- Gaugler, R., Bednareck, A., Campbell, J.F. (1992) Ultraviolet inactivation of heterorhabditid and steinenematid nematodes. *J Invertebr Pathol.* 59:155-160.

- Gaugler, R., Han, R. (2002) Production Technology. *In: Entomopathogenic Nematology*, R.Glauber. Ed.,CABI Publishing New York , p. 289-310.
- Georgis, R., Poinar Jr, G.O. (1983) Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *J Nematol.* 15:308-311.
- Georgis, R. (1992) Present and future prospects for entomopatghogenic products. *Biocontrol Sci Techn.* 2:83-89.
- Georgis, R., Hague, N.G.M. (1991) Nematodes as biological insecticides. *Pesticide Outlook* 2:29-32.
- Georgis, R., Dunlop, D.B., Grewal, P.S. (1995) Formulation of entomopathogenic nematodes. In: Hall, F.R., Barry, J.W. (eds). *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*. Washington: American Chemical Society, P. 197-205.
- Ghini, R. (1997) Desinfestação do solo com o uso de energia solar: solarização e coletor solar. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA,.. (Embrapa-CNPMA. Circular Técnica,1), 29p
- Ghini, R., Bettiol, W. (1991) Coletor solar para desinfestação de substratos. *Summa Phytopathol.* 17:281-286
- Glazer I. (1996). Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. *Environ Entomol.* 25:1455-1461.
- Glazer, I. (1996) Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Sci Techn.* 6:373-378.

- Gobin, A., Campling, P., Feyen, J. (2001) Soil-landscape modelling to quantify spatial variability of soil texture. *Phys Chem Earth*. 26:41-45.
- Grant, J.A., Villani, M.G (2003). Effects of soil rehydration on the virulence of entomopathogenic nematodes. *Environ Entomol*. 32:983-991.
- Grewal, P.S., Ehlers, R.U., Shapiro-Ilan, D.I., (2005) Nematodes as Biocontrol Agents. CABI Publishing, Wallingford, UK, 505 p.
- Grewal, P.S. (2002) Formulation and application technology *In: Gaugler, R (ed.) Entomopathogenic nematology*. Wallingford: CABI Publishing, p. 265-287.
- Grewal, P.S., Selvan, S., Gaugler, R. (1994a) Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment and reproduction. *J. Therm. Biol*. 19:245-253.
- Grewal, P.S., Lewis, E.E., Gaugler, R., Campbell, J.F. (1994b) Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 108:207-215
- Grewal, P.S. (1998) Formulation of entomopathogenic nematodes for storage and application. *Japanese Journal of Nematology* 28:68-74.
- Grewal, P.S., Lewis, E.E., Venkatachari, S. (1999) Allelopathy: a possible mechanism of suppression of plant parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. *Nematology*, 1:735-743.
- Griffin, C.T. (1993) Temperature responses of entomopathogenic nematodes: implications for the success of biological control programmes. *In R. Bedding.R. Akhurst and Kaya [eds]. Nematodes and the biological control of insect pests*.CSIRO. East Melbourne, Australia, p. 115-126.

- Hominick, W., Reid, A.P., Bohan, D.A., Briscoe, B.R. (1996) Entomopathogenic nematodes: biodiversity , geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Sci Techn.* 6:317-331.
- Hillel, D. (1982) Introduction to soil physics. Academic Press. New York, 364p.
- Hussaini, S.S., Nagesh, M., Rajeshwari, R., Fathima, M.S. (2004) Effect of pH on survival, pathogenicity and progeny production of some indigenous isolates of entomopathogenic nematodes. *Indian Journal of Nematology*, 34:169-173.
- Hu, K.J., Li, J.X., Webster, J.M. (1999) Nematicidal metabolites produced by *Photobacterium luminescens* (Enterobacteriaceae); bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology*, 1:457-469.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE. (2007) Manuais Técnicos em Geociências N° 4. 2 ed .Manual de Técnico de Pedologia. 316p
- Ishibashi, N., Kondo, E. (1986) *Steinernema feltiae* (DD-136) and *S. glaseri*: Persistence in soil and bark compost and their influence on native nematodes. *J Nematol.* 18:310-316.
- Jagdale, G.B., Somasekhar, N., Grewal, P.S., Klein M.G. (2002) Suppression of plant-parasitic nematodes by application of live and dead infective juveniles of an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, on boxwood (*Buxus* spp.). *Biol Control.* 24:42-49.
- Jenkins, D.A., Shapiro-Ilan, D., Goenaga, R. (2008) Efficacy Of Entomopathogenic Nematodes Versus *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) Larvae In A High Clay-Content Oxisol Soil: Greenhouse Trials With Potted *Litchi Chinensis*. *Florida Entomologist* 91(1): 75-78

- Kanagy, J.M.N., Kaya, H.K. (1996) The possible role of marigold roots and atherthienyl in mediating host-finding by steinernematid nematodes. *Nematologica*. 42:220-231.
- Kaya, H.K. (2002) Natural enemies and other antagonists. *In: Gaugler, R. (ed.), Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Publishing, p. 189-200
- Kaya, H. K., Gaugler, R. (1993) Entomopathogenic Nematodes. *Annual Rev Entomol*. 38:181- 206.
- Kaya, H.K. (1990) Soil ecology. *In: Gaugler, R. and Kaya, H.K., (eds.). Entomopathogenic nematodes in Biological control*. CRC Press, Boca Raton, Fl. p. 93-115.
- Kehrig, A.G. (1949) As relações K_i e k_r no solo. Ministério de Agricultura Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas. Boletim do Instituto de Química Agrícola, n. 13, 67p
- Kim, H.G., Alston, D.G. (2008) Potential of Two Entomopathogenic Nematodes for Suppression of Plum Curculio (*Conotrachelus nenuphar*, Coleoptera: Curculionidae) Life Stages in Northern Climates. *Environ Entomol*. 37(5):1272-1279.
- Kitamura., A.E., Carvalho., M.P., Lima., C.G.R. (2007) Relação Entre a Variabilidade Espacial das Frações Granulométricas do Solo e a Produtividade do Feijoeiro Sob Plantio Direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31:361-369.

- Klein, M.G. (1990). Efficacy against soil – inhabiting insect pest, pp 195-214. In R. Gaugler and H. Kaya [eds]. *Entomopathogenic Nematodes in Biological control* CRC. Boca Raton. FL.
- Koppenhöfer, A.M., Fuzy, E.M. (2006) Nematodes for White grub control: effects of soil type and soil moisture on infectivity and persistence. *USGA Turfgrass and Environmental Research Online* 5:1-10.
- Koppenhöfer, A.M., Kaya, H.K., Taormino, S.P. (1995) Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures . *J. Invertebr. Pathol.* 65:193-199.
- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K. (1990a) Soil type and entomopathogenic nematodes persistence. *J Invertebr Pathol*, 55:401-406.
- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K. (1990b) Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. *J Nematol.* 22(4):440-45.
- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K. (1991) Effects of soil temperature moisture and relative humidity on entomopathogenic nematodes persistence. *J Invertebr Pathol.* 57:242-249.
- Lara, J.C. (2006) Avaliação de aspectos biológicos de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (nematoda: Heterorhabditidae) Visando a aplicação num sistema de irrigação por microaspersão. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Dissertação de mestrado em Produção Vegetal. 74p.
- Lara, J.C., López, J.C. (2005) Evaluación de diferentes equipos de aspersión para la aplicación de nematodos entomopatógenos. *Rev Colomb Entomol.* 31:1-4.

- Lello, E.R., Patel, M.N., Matthews, G.A., Wright, D.J. (1996) Application technology for entomopathogenic nematodes against foliar pests. *Crop Protec.* 15:567-574.
- Lemos, R.C., Santos R.D. (1996) Manual de descrição e coleta de solos no campo. 3 ed. Campinas.SiBCS /SNLCS. 45p
- Lewis, E.E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., Peters, A. (2006) Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biol Control.* 38:66-79.
- Lewis, E.E., Grewal, P.S. (2005) Effects of entomopathogenic nematodes on plant-parasitic nematodes. In: Nematodes as biocontrol agents (P. S. Grewal, R. U. Ehlers & D. Shapiro- Ilan, Eds.), CABI Publishing, Wallingford, U.K, p. 349-361.
- Lewis, E.E. (2002). Behavioral ecology. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 205–224.
- Lewis, E.E., Gaugler, R., Harrison, R. (1993) Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Can J Zool.* 71:765-769.
- Lewis, E.E., Selvan, S., Campbell, J.F., Gaugler, R. (1995) Changes in foraging behaviour during the infective stage of entomopathogenic nematodes *Parasitology.* 110:583-590.
- Machado, I.R., Pinto, C.C.S., Minas, R.S., Silva, E.R., Furlong, J., Dolinski, C.M. (2007) Nematóide Entomopatogênico *Heterorhabditisindica* LPP4 No Controle de Estirpes Resistentes de Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*. In: VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. Universidade do Vale do Paraíba. *Resumo.*

- Machado, I. (2006) Isolamento e identificação de nematóides entomopatogênicos provenientes da floresta amazônica em Monte Negro-Ro. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Monografia. 34p.
- Machado, L.A., Habib, M., Leite, L.G., Goulart, R.M., Tavares; F.M., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M. (2003) Patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. a ovos de *Migdolus fryanus*, broca da raiz da cana-de-açúcar. In: Simpósio de Controle Biológico, 8. SP, *Resumo*. São Pedro, 86p.
- Martins, M. V. V., Silveira , S. F., Carvalho A.J. C., Souza, E. F. (2003) Erradicação de Escleródios de *Sclerotium Rolfsii* em Substratos Tratados em Coletores Solares, em Campos dos Goytacazes-Rj. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 421-424,
- McCoy, C.W., Shapiro, D.I., Duncan, LW., Nguyen, K. (2000) Entomopathogenic nematodes and Other Natural Enemies as Mortality Factors for Larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biol Control*. 19:182-190.
- Molina, J.P., López, J.C. (2003) Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatogênicos para el control de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) em frutos de café. Bol. San.Veg. Plagas, 29:523-533.
- Mota, J.C.A., Júnior, A.R.N., Filho, J.A., Libardi., P.L. (2008) Algumas Propriedades Físicas e Hídricas de Três Solos na Chapada do Apodi, Rn, Cultivados com Melão. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32: 49-58.
- Neves, J.M., Simões, N., Mota, M. (2000) Nematóides entomopatogênicos: Uso e novas perspectivas. Boletim de Biotecnologia p. 23-29.
- Oliveira, J.B. (2005) Pedologia aplicada. FEALQ . 2ed. Piracicaba, 574p.

- Peterson, G.W., Cunningham, R.L., Matelski, R. (1968) Moisture characteristics of Pennsylvania soils. I. Moisture retention as related to texture. *Soil Sci.Soc Amer Proc.* 32:271-275.
- Pérez, E.E., Lewis, E.E. (2004) Supression of *Meloidogyne incógnita* and *Meloidogyne hapla* with entomopathogenic nematodes on greenhouse peanuts and tomatoes. *Biol Control.* 30:336-341.
- Poinar Jr., G.O. (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In:* Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.) Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Ratón, FL. Press, p. 23-61.
- Poinar Jr, G.O., Hom, A. (1986) Survival and movement of infective stage *Neoaplectana carpocapsae* in the field. *J Nematol.* 18 (1): 34-36.
- Peters, A. (1996) The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci. Technol.* 6:389-402.
- 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. *Environ Entomol.* 28:1021-1035.
- Rodrigueiro, T.S.C., Ginarte, C.M.A., Leite, L.G., Tavares, F.M., Goulart, R.M., Giometti, F.H.C. (2008) Eficiência de *Heterorhabditis indica* IBCB-N05 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) sob comedouros de granja avícola. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.75, n.3, p.279-284, jul./set.
- SAEG- sistema para análises estatísticas, versão 9.1. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa 2007.

- Shapiro, D.I., Gouge, D.H., Simon, B., Piggott, J., Jane, C., Fife, P. (2006) Application Technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biol Control*. 38:124-133.
- Shapiro, D.I., Jackson, M., Reilly, C.C., Hotchkiss, M.W. (2004) Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biol Control*. 30:119-126.
- Shapiro, D.I., McCoy, C.W., Fares, A., Obreza, T., Dou, H. (2000a) Effects of soil type on virulence and persistence of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biol Control*. 38:124-133.
- Shapiro, D.I., McCoy, C.W., Fares, A., Obreza, T., Dou, H. (2000b) Effects of soil type on virulence and persistence of entomopathogenic nematodes in relation to control of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ Entomol*. 29:1083-1087.
- Shapiro, D.I., Lewis, E.E., Paramasivam, S., McCoy, C.W. (2000c) Nitrogen partitioning in *Heterorhabditis bacteriophora*-infected hosts and the effects of nitrogen on attraction/repulsion. *J Invert Pathol* 76:43-48.
- Shapiro-ilan, D.I., Mizell, R.F., Cottrell, T.E., Horton, D.L. (2008) Control of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, with entomopathogenic nematodes: Effects of application timing, alternate host, and nematode strain. *Biol Control*. 44:207-215.
- Shapiro-Ilan, D.I., Lewis, E.E., Behle, R.W., McGuire, M.R. (2001) Formulation of entomopathogenic nematode – infected- cadavers. *J Invert Pathol*. 78:17-23.

- Shetlar, D.J. (1990) Application methods in different cropping systems. In Polavarapu, S. (Ed). Proceedings of workshop: Optimal Use of Insecticidal Nematodes in Pest Management. *New Brunswick*, NJ, p. 31-36.
- Siddiqui, Z.A., Mahmood, I. (1999) Biological Control of plant parasitic nematodes by fungi a review. *Bioresource Technol.* 58:229-239.
- Smith, K. (1999) Factor affecting efficacy. In: S. Polavarapu [ed]. Optimal use of Insecticidal Nematodes in Pest Management. *Rutgers University. New Brunswick*. NJ., p. 37-46.
- Smiths, P.H. (1997) Insects pathogens: their suitability as biopesticide *In: Microbial insecticides: novelty or necessity? Farham British Crop Protection Council*, 302p.
- Susurluk, I.A. (2006) Effectiveness of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae* against *Tenebrio molitor* (yellow mealworm) larvae in different soil types at different temperatures. *Turkish Journal of Biology*, 30:199-205.
- Thurler, A.M. (1989) Estimativa da Macro e da Microporosidade Através da Granulometria e Densidades de Partículas e do Solo. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 66p.
- Villalba, G., D.A. (2003) Tecnologia y equipos de aspersión para el control de la broca del café. In: Curso Tecnologia y Equipos de aspersión para el control de la broca del café.(Colombia).
- Wallace, H.R. (1971) Abiotic influences in soil environment *In: Zuckerman, B.M., Mai, W.F., Rohde, R.A.(eds)*, Plant parasitic Nematodes, vol I. Academic Press, New York, p. 257-280.

Wallace, H.R. (1958) Movement of eelworms. II.A comparative study of the movement in soil of *Heterodera schachtii* Schmidt and of *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev. *Ann Appl Biol*, 46:86-94.

Wennemann, L., Shanks, C.H., Smith, K.A. (2004) Movement of entomopathogenic nematodes in soils of *Fragaria* spp. *Commun. Agricultural Applied Biological Science*, Ghent, v. 69, p. 347-357.

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

Young, F.J., Hammer, R.D (2000) Defining geographic soil bodies by landscape position, soil taxonomy, and cluster analysis. *Soil Sci Soc Am J.* 64:989-998.

Zervos, S., Johnson, S.C., Webster, J.M. (1991) Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. *Can. J. Zool.* 69:1261-1264.

Zuckerman, B.M., Jansson, H.B. (1984) Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host-prey recognition. *Annu Rev Phytopathol.* 22:95-113.

ANEXO

Quadro1. Resultados das análises dos materiais utilizados nos experimentos.

Classe Textural	% Argila	% Areia	% Silte	pH	Ki	C- Orgânico	% de M.O	Dp
Areia	0,6	99	0,4	5,1	-	0,14	0,23	2,56
Franco – argilo – arenosa	28,0	63,5	8,5	5,2	1,8	0,86	1,48	2,44
Franco-argilosa	31,0	33,0	36,0	4,4	2,0	1,05	1,81	2,37
Argila	44,8	16,3	38,9	5,3	2,0	1,35	2,33	2,32

Quadro 2. Análise de variância (ANOVA).

Distância percorrida (cm)	Textura			
	Areia	Franco – argilo-arenosa	Franco-argilosa	Argila
30	39,90aA	39,20aA	19,00bA	0,00cA
60	33,80aB	19,00bB	0,00cB	0,00cA
90	15,20aC	6,00bC	0,00cB	0,00cA

CV=17,23

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na mesma linha e maiúscula na mesma coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Duncan em 5%.