

POTENCIAL E CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO DE
NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO LPP35 COMO AGENTE NO
CONTROLE DE FORMAS IMATURAS DE *Aedes aegypti*

DENISE DE OLIVEIRA CARDOSO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Outubro – 2014

POTENCIAL E CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO DE
NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO LPP35 COMO AGENTE NO
CONTROLE DE FORMAS IMATURAS DE *Aedes aegypti*

DENISE DE OLIVEIRA CARDOSO

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
Outubro – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 010/2015

Cardoso, Denise de Oliveira

Potencial e caracterização do isolado de nematoide entomopatogênico LPP35 como agente no controle de formas imaturas de *Aedes aegypti* / Denise de Oliveira Cardoso. – 2014. 65 f.

Orientador: Claudia de Melo Dolinski.

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

Bibliografia: f. 56 –65.

1. Dengue 2. Controle biológico 3. Mosquito 4. Nematoides entomopatogênicos 5. Criadouros I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 592.57

POTENCIAL E CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO DE
NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO LPP35 COMO AGENTE NO
CONTROLE DE FORMAS IMATURAS DE *Aedes aegypti*

DENISE DE OLIVEIRA CARDOSO

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

Aprovada em 13 de Outubro de 2014.

Comissão Examinadora:

Inês Ribeiro Machado (Doutora em produção Vegetal) – UFOPA

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

Vicente Martins Gomes (Doutor em produção Vegetal)– UENF

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois permitiu que uma simples ideia se tornasse a minha Dissertação.

Ao meu esposo Vicente por ser o maior incentivador e motivador deste trabalho, e meu maior exemplo de dedicação a pesquisa.

A Liz, minha maior alegria e minha companheira nas horas da escrita e finalização de experimentos.

A minha mãe Rosâne, meu pai Humberto e meu irmão Gustavo, pelos cuidados diários, amor e apoio.

A Claudia e ao Ricardo, pelos ensinamentos na área da Nematologia e pelo apoio a este trabalho;

A UENF pela oportunidade de realização deste curso

A Renata pela ajuda nos primeiros experimentos e pela amizade,

Alexandre pelo suporte nas medições dos nematoides e por tornar possível o experimento com as bromélias.

Ao Sergio pela ajuda com os mosquitos

Às amadas amigas (Nathália, Mariana, Aline, Isabela, Scheila e Bia e Jo);

A meus queridos Tarcísio, Etelvina, Eliane, Ernane, Sebastião, Iara, Natalino, Adriene, Juvenal e Beth;

A minha família pelo apoio e amor e orações, em especial as tias Gilsa e Vera.

E a tantos amigos e amigas que contribuíram para o cumprimento de mais esta etapa.

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Nematoides e nematoides entomopatogênicos	3
2.2. Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos.....	5
2.3 Importância dos nematoides entomopatogênicos.....	6
2.4 <i>Aedes aegypti</i>	7
2.5 O vírus da dengue.....	8
2.6 Controle dos culicídeos.....	9
2.6.1 Controle genético.....	9
2.6.2 Controle químico.....	10
2.6.3 Controle biológico.....	11
2.7 Criadouros de <i>A. aegypti</i>	12
3 TRABALHOS.....	16
3.1 Potencial dos nematoides entomopatogênicos como agentes no controle de formas imaturas de <i>Aedes aegypti</i>	16
3.2 Influência do ambiente e do volume do criadouro sobre a patogenicidade de <i>Heterorhabditis</i> sp. LPP35 a larvas L3 e L4 de <i>Aedes aegypti</i>	30

3.3 Identificação do nematoide entomopatogênico <i>Heterorhabditis</i> sp. LPP35 pela análise morfométrica.....	40
4 CONCLUSÕES.....	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMO

CARDOSO, DENISE DE OLIVERA; MS; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Outubro de 2014. Potencial e caracterização do isolado de nematoide entomopatogênico LPP35 como agente no controle de formas imaturas de *Aedes aegypti*. Orientadora: Professora PhD. Claudia de Melo Dolinski.

Nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são de grande importância, pois são usados com sucesso no controle de insetos praga. Os objetivos deste trabalho visaram avaliar a patogenicidade e virulência do isolado de *Heterorhabditis* sp. LPP35 encontrado no fitotelmata de bromélia em áreas preservadas de Mata Atlântica, RJ sobre larvas de *Aedes aegypti*, avaliando os efeitos e as interações do uso desse isolado em diferentes doses (0; 10; 20; 40; 80; 100 e 160 JIs/larva de *A. aegypti*), volumes de água (10, 100, 1.000 e 10.000 mL), ambientes (pleno, sol e sombra) e criadouro natural (bromélias tanque). Além da identificação do isolado *Heterorhabditis* sp. LPP35 pela análise morfométrica. Quando aplicado em condições de laboratório, o isolado causou mortalidade em larvas L3 e L4 de *A. aegypti* inferior a 50% nas doses de 10, 20 e 40 JIs por larva, enquanto as doses de 80 e 100 JIs por larva apresentaram mortalidade acima de 70%, chegando a 100% de mortalidade na dose de 160 JIs por larva. Já em condições de semicampo larvas expostas aos diferentes ambientes e a diferentes volumes dos criadouros tiveram de 27% a 92% de mortalidade e em tanques de bromélias, *Heterorhabditis* sp. LPP35 causou taxa de 24 % de mortalidade em larvas L3 e L4 de *Aedes aegypti*.

Baseado nos valores morfométricos, o isolado *Heterorhabditis* sp. LPP35 apresenta caracteres distintos de outras espécies do gênero já descritas. No presente estudo *Heterorhabditis* sp. LPP35 apresenta alguns valores morfométricos que o coloca no “grupo-*indica*” (*H. indica*, *H. baujardi*, *H. mexicana*, *H. floridensis* e *H. amazonenses*).

PALAVRAS-CHAVE: dengue, controle biológico, mosquito.

ABSTRACT

CARDOSO, DENISE DE OLIVERA; MS; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. October, 2014. Potential and characteristics of isolated entomopathogenic nematode LPP35 AS agent in on immature *Aedes aegypti* control. Advisor: Professor PhD. Cláudia de Melo Dolinski.

Entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* and *Steinernema* are of great importance because they are used successfully in controlling pest insects. The objectives of this study aimed to evaluate the pathogenicity and virulence of the isolate of *Heterorhabditis* sp LPP35 found in phytotelmate bromeliad in preserved areas of Atlantic Forest, RJ on larvae of *Aedes aegypti*, evaluating the effects and interactions using such isolated at different doses (0 ; 10; 20 ; 40 ; 80 ; 100 and 160 IJs / larva of *A. aegypti*), volumes of water (10, 100, 1,000 and 10,000 mL), environments (sun and shade) and natural breeding (tank bromeliads). Besides the identification of isolated *Heterorhabditis* sp. LPP35 by morphometric analysis. When applied to laboratory conditions, the isolate showed mortality in L3 and L4 larvae of *A. aegypti* and mortality rates below 50% at doses of 10, 20 and 40 IJs per larva, while doses of 80 and 100 IJs per larvas howedover 70% mortality, reaching 100% mortality at a concentration of 160 JIs per larva. Alreadyin semi-exposed to different environments and different volumes of larvae breeding field had 27-92% mortality and in bromeliads *Heterorhabditis* sp. LPP35 obtained a rate of 24% mortality in L3 and L4 larvae of *Aedes aegypti*. Morphometric values for the isolated LPP35 *Heterorhabditis* sp. presents distinct characters of other species of the genus already described, in our study

Heterorhabditis sp. LPP35 presents some morphometric values that puts the "indica-group" (*H. indica*, *H. bajardi*, *H. mexicana*, *H. floridensis* and *H. amazonenses*).

KEYWORDS: dengue, biologic control, mosquito.

1. INTRODUÇÃO

Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) é um mosquito das regiões tropicais e subtropicais. Este mosquito é vetor da dengue e da febre amarela. O reaparecimento da dengue nas últimas décadas transformou esta doença em um sério problema de saúde pública, principalmente em países localizados em regiões tropicais (Instituto Virtual da Dengue, 2012). Como exemplo se cita que durante a 15ª semana epidemiológica de 2013 foram notificados 107.168 casos suspeitos de dengue no estado do Rio de Janeiro, enquanto que em todo o ano de 2012 foram notificados 184.123 casos. Os dados de casos notificados foram compilados pela Secretaria de Estado de Saúde a partir de informações inseridas no sistema pelos municípios (SES, 2013). Em 2014 foram registrados 531.012 casos prováveis de dengue no país até a semana epidemiológica 37 (07/09 a 13/09). A região Sudeste teve o maior número de casos prováveis (299.617 casos; 56,4%) em relação ao total do país.

Esse mosquito é essencialmente antropofílico, sendo encontrado em áreas urbanas e povoados rurais (Edman et al. 1992). O controle da população desses dípteros tem sido feito ao longo dos anos mediante o uso de inseticidas químicos (Campos & Andrade, 2001), porém é observado crescente grau de resistência dos insetos em curto espaço de tempo, além da supressão de seus inimigos naturais e a intensificação dos riscos de contaminação ambiental (Reiter et al. 1997).

O controle biológico e os mosquitos transgênicos surgem como novos métodos alternativos ao controle do *A. aegypti*, e entre eles os nematoides entomopatogênicos (NEPs).

Os nematoides entomopatogênicos no terceiro estágio, juvenil infectante (JI), podem viver livremente, procurando no solo um hospedeiro suscetível. Durante esse estágio, os nematoides não se alimentam nem se desenvolvem. Uma vez dentro de um inseto hospedeiro, liberam sua bactéria simbiote, a qual, em combinação com toxinas produzidas pelos nematoides, mata o hospedeiro em dois ou três dias. As bactérias e os tecidos degradados do hospedeiro fornecem fontes de nutrientes para o desenvolvimento dos nematoides. Esses geralmente passam duas gerações dentro do hospedeiro em um período de dez dias, dependendo da temperatura e da densidade inicial de inóculo (Adams & Nguyen, 2002).

Nematoides entomopatogênicos (Rabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) têm sido usados como agentes no controle biológico de espécies de insetos nocivos à agrosilvicultura. Os nematoides possuem hospedeiros que estão distribuídos em diversas Ordens de insetos, como Coleóptera, Lepidóptera, Díptera e Ortóptera. A propriedade dos NEPs de infectar diferentes Ordens de insetos despertou grande interesse da comunidade científica para uma possível aplicação no controle biológico de pragas, principalmente aquelas cujo estágio larval ocorre no solo. Desde a década de 30, os NEPs são estudados e explorados no controle de pragas agrícolas. Os primeiros relatos contam a experiência da utilização de NEPs no combate ao escaravelho-japonês, ou besouro-japonês, *Popillia japonica*, uma importante praga de gramados e plantas ornamentais. No entanto, somente na década de 70 é que os experimentos com NEPs e controle biológico de pragas e vetores aumentaram (Almenara et al. 2012).

O objetivo desse trabalho foi investigar o potencial de diferentes isolados de NEPs em condições de laboratório no controle de formas imaturas do mosquito *A. aegypti*, bem como avaliar em condições de semicampo e campo o isolado mais virulento a larvas do mosquito, e fazer a identificação do nematoide *Heterorhabditis* sp. LPP35 encontrado no fitotelmata de bromélia em áreas preservadas de Mata Atlântica, RJ, que apresentou eficiência elevada no parasitismo de larvas de *A. aegypti*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nematoides e Nematoides Entomopatogênicos

Entre os animais multicelulares, o Filo Nematoda é considerado o grupo mais numeroso. Ocorrem em diferentes ambientes, e no solo se movimentam no filme de água presente entre as suas partículas (Tihohod, 1993). Esse Filo tem grande diversidade de espécies que, de acordo com seus diferentes hábitos alimentares, podem ser classificados em grupos tróficos: parasitos de plantas ou de animais, bacteriófagos, fungívoros, predadores e onívoros. Devido às diferenças no ciclo de vida, taxa de reprodução e capacidade de persistência no solo entre os membros desses grupos, as comunidades de nematoides são bastante estudadas, utilizando-se dados relativos às suas estruturas tróficas e taxonômicas como indicadores biológicos para mensurar as alterações resultantes da adoção de práticas de manejo dos agroecossistemas (Bongers,1990).

Os nematoides possuem sistemas reprodutivo, muscular, digestivo, secretor/excretor e nervoso, mas não possuem órgãos de visão e audição nem sistema circulatório e respiratório. A maioria das espécies possui os sexos separados (anfimíticos). No entanto, a partenogênese (somente nas fêmeas) ou o hermafroditismo ocorre em algumas espécies (Bird e Bird, 1991).

A morfologia da região anterior do nematoide, especialmente da cavidade bucal, está relacionada ao seu hábito alimentar. Nematoides fitoparasitos

apresentam necessariamente estilete bucal, do tipo estomato-estilete, odontoestilete ou onchioestilete, e podem ser responsáveis por perdas na agricultura. Porém, nem todos os nematoides que possuem estilete são parasitos de plantas. Existem nematoides portadores de estilete que atuam como micófagos ou parasitos de plantas facultativos; outros são predadores ou onívoros (Cares, 2006).

Os nematoides bacteriófagos, comuns no solo, apresentam cavidade bucal predominantemente cilíndrica e estreita; podem consumir e disseminar tanto bactérias benéficas como patogênicas. Nematoides com cavidade bucal ampla, muitas vezes armada de dentes ou denticulos, são predadores frequentes de pequenos animais do solo, inclusive de outros nematoides (Cares, 2006).

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são agentes de controle biológico promissores e particularmente efetivos quando aplicados a insetos que habitam ou que passam uma fase do ciclo de vida no solo ou em ambientes crípticos. NEPs pertencem à ordem Rhabditida, na qual estão classificadas as famílias Steinernematidae Chitwood e Chitwood e Heterorhabditidae Poinar.

Estes nematoides agem em associação com bactérias em uma relação simbiote e, por meio de diferentes estratégias de busca, localizam hospedeiros potenciais, invadindo-os através de aberturas naturais. Foram descritos dois gêneros de bactérias, associadas a estes nematoides: *Xenorhabdus*, associado ao gênero *Steinernema*; e *Photorhabdus*, associado ao gênero *Heterorhabditis*, ambos os gêneros compostos por γ -proteobactérias gram-negativas (Forst et al. 1997).

Photorhabdus luminescens e *Xenorhabdus nematophila* são as espécies mais estudadas. Embora apresentem comportamentos semelhantes dentro do ciclo de vida dos NEPs, algumas características fenotípicas diferem entre estas duas espécies de bactérias. A maioria das linhagens de *P. luminescens* é bioluminescente, propriedade observada devido à presença de todos os genes do operon *lux*, codificadores de uma luciferase, semelhante ao que ocorre nos microrganismos marinhos bioluminescentes (Paracer & Ahmadjian, 2000). *P. luminescens* também sintetiza um pigmento do tipo antraquinona e antibióticos da classe dos estilbenos (Brachmann et al. 2007; Joyce et al. 2008). *Xenorhabdus nematophila* não apresenta bioluminescência nem síntese de pigmentos, e seus

metabólitos secundários são antibióticos de diferentes classes: xenocumarinas e xenorhabdinas.

Os NEPs podem ser facilmente produzidos em larga escala e aplicados com equipamentos convencionais de pulverização. Esses organismos têm ampla gama de hospedeiros e são inócuos ao ambiente, oferecendo uma opção segura e limpa para o controle de pragas agrícolas (Nardo et al. 2001; Grewal et al. 2002). No mercado mundial, já existem vários produtos à base de NEPs, comercializados principalmente nos Estados Unidos e na Europa, em especial para o controle de pragas de solo que ocorrem em ambientes protegidos (Gaugler et al. 2000).

2.2 Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos

O ciclo de vida de NEPs do gênero *Steinernema* pode ser descrito a partir da entrada dos J1s no inseto. Essa penetração ocorre através da boca, do ânus ou dos espiráculos do inseto-alvo. Os J1s chegam até o hemoceloma, onde liberam as bactérias. Eles então retomam seu desenvolvimento e se alimentam ativamente das bactérias que se multiplicam no cadáver. Os juvenis crescem, fazem ecdises, e dão origem aos adultos de primeira geração (machos ou fêmeas). Havendo machos e fêmeas no mesmo cadáver, ocorre a cópula. Alguns J1 vão mudar para o estágio J2 e, mais tarde, vão se transformar em J3 (J3 infectantes), retendo a cutícula do estágio anterior. Outros J1 vão completar o ciclo de desenvolvimento, passando por J2, J3, J4 e adultos de segunda geração, que são menores que os de primeira geração. Estes adultos copulam e novos ovos e juvenis são liberados. Quando os recursos alimentares se esgotam, estes ciclos de reprodução cessam e os J1s migram para o ambiente, onde permanecem até encontrarem outro inseto e reiniciar o ciclo (Adams & Nguyen 2002).

O ciclo de *Heterorhabditis* é muito semelhante ao de *Steinernema*, porém os vermes adultos de primeira geração são hermafroditas, com morfologia de fêmeas (Poinar, 1990). Essas “fêmeas hermafroditas” são protândricas, ou seja, possuem gônadas que produzem espermatozoides que ficam armazenados na espermateca a espera dos ovócitos que serão produzidos. Em alguns ciclos de *Heterorhabditis*, ocorre o fenômeno de endotoquia matricida, quando os ovos

eclodem no interior do corpo da mãe e os juvenis rompem a parede para serem liberados, matando a fêmea ou a hermafrodita. A partir da segunda geração de *Heterorhabditis* surgem machos e fêmeas e a reprodução ocorre por fertilização cruzada entre eles.

2.3 Importância dos nematoides entomopatogênicos

Os nematoides pertencentes aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são os que têm recebido maior atenção no controle biológico de pragas (Ferraz, 1998). Segundo Smart Jr. (1995), o uso de nematoides para controle de insetos começou a ser efetivamente considerado a partir de dados apresentados por Glaser e Fox (1930), sobre a produção e aplicação de nematoides na tentativa de controlar as populações de *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae), chegando a atingir resultados de 81% de eficiência. No entanto, foi nas três últimas décadas que se notou um grande interesse pelo estudo desse grupo de agentes entomopatogênicos (Dolinski, 2006).

Segundo Dolinski e Lacey (2007), várias espécies de NEPs são produzidas comercialmente e disponíveis para aplicação em larga escala. Em certos cultivos, como é o caso dos citrus na Flórida, os NEPs são utilizados há muitos anos, especialmente para o controle de curculionídeos, sendo possível afirmar, neste caso, a existência de uma relação de custo/benefício positiva da inserção destes agentes no manejo integrado de pragas.

Schmitt et al. (1992), em testes de campo no Brasil, obtiveram bons níveis de controle de *Cosmopolites sordidus*, o moleque da bananeira, mediante aplicação de *S. carpocapsae* linhagens All e UK sobre pseudocaulis partidos, utilizados como “iscas”. A aplicação nas iscas proporcionou melhores resultados que a liberação dos nematoides no solo ao redor das bananeiras. Resultados semelhantes foram obtidos por Treverrow e Bedding (1993), que aplicaram o nematoide *S. carpocapsae* no pseudocaulis de bananeira, resultando em um bom nível de controle de *C. sordidus*, com baixo custo.

Segundo Goulart et al. (2003), mais de 20 isolados de nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* já foram encontrados em diferentes regiões do estado de São Paulo.

Acevedo et al. (2005) obtiveram, através de coleta de solo na região de Lavras/MG, os isolados JPM3, JPM3.1 e JPM4. Estes isolados demonstraram uma virulência superior a 89% quando aplicados em lagartas de *Galleria mellonella* em testes de patogenicidade. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 é um excelente candidato para utilização como agente de controle biológico, por demonstrar alta virulência (>80%) a larvas do quarto ínstar do gorgulho da goiaba e pelo fato de ser um isolado natural do Brasil (Del Valle et al. 2005b). Outros levantamentos foram feitos em Rondônia (DOLINSKI et al. 2008), identificando-se *H. indica* e *H. baujardi* e no Amazonas, com a descrição de *Heterorhabditis amazonensis* (ANDALÓ et al. 2006).

2.4 *Aedes aegypti*

Provavelmente originário da África, na região da Etiópia, foi introduzido na América no período colonial, por meio de embarcações oriundas daquele continente. *A. aegypti* é um inseto amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (Pontes e Ruffino-Neto, 1994).

Possui hábito alimentar diurno, com maior pico entre as 16h e 18h (Silva et al. 2004). É um mosquito doméstico, antropofílico e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar os seus ovos (Tauil, 2002).

O ciclo biológico do mosquito *A. aegypti* compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos são colocados fora da água, em locais úmidos ou em paredes de recipientes. O desenvolvimento embrionário dura de 2 a 3 dias e os ovos eclodem dentro da água. O tempo de crescimento larval está condicionado às condições dos criadouros, como bom suprimento alimentar, ausência de predadores e condições climáticas adequadas. As baixas temperaturas retardam o crescimento larval. As larvas se alimentam de microrganismos aquáticos e da matéria orgânica sedimentada no fundo de criadouros (Consoli et al. 1998; Marcondes, 2001). O estágio larval tem o período entre 5 a 7 dias. As larvas e as pupas são aquáticas e a fase de pupa dura de 2 a 3 dias (Consoli et al. 1998; Marcondes, 2001; Strieder, 2005). Os criadouros são aqueles que têm água limpa acumulada em recipientes sombreados e paredes escuras (Vianna, 2001). Os ovos podem resistir ao ressecamento por até mais de

um ano. Se ocorrer a evaporação da água, o ovo pode permanecer viável até que haja condições adequadas para o seu desenvolvimento (Vianna, 2001).

O metabolismo energético de machos e fêmeas depende da ingestão de carboidratos. O repasto sanguíneo, exclusivo das fêmeas, está relacionado primordialmente ao desenvolvimento dos ovos, podendo igualmente contribuir para a energia e o aumento da longevidade. Os açúcares fornecem aos mosquitos energia necessária para o voo e as demais atividades biológicas e fisiológicas (Clements, 1963; Consoli et al. 1998; Marconi, 2001; Eiras, 2000). O repasto sanguíneo tem como objetivo ativar a maturação ovariolar.

A fêmea se infecta com o vírus da dengue quando faz repasto sanguíneo em uma pessoa em fase de viremia. O período de incubação do vírus no mosquito ocorre durante sete dias (Salazar et al. 2007). O vírus se aloja na glândula salivar da fêmea (Marconi, 2001). No sétimo dia os mosquitos se tornam aptos a disseminar o vírus (Consoli et al. 1998). O vírus é inoculado no homem no momento do repasto sanguíneo. A replicação do vírus no homem ocorre em células musculares estriadas, lisas e fibroblastos, bem como nos linfonodos locais, e logo após se dissemina por todo o organismo. O vírus pode circular livre no plasma ou no interior de monócitos/macrófagos. Sabe-se que o vírus da dengue tem tropismo por essas células fagocitárias, as quais são os maiores sítios de replicação viral no homem (Kurane e Eennis, 1992).

2.5 Vírus da dengue

O vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, e podem ser encontrados na natureza como quatro sorotipos antigenicamente distintos, designados de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Hammon et al. 1960). A infecção com um sorotipo confere imunidade permanente apenas contra este sorotipo, não conferindo imunidade cruzada para os outros sorotipos. Desse modo, indivíduos que vivem em áreas endêmicas de dengue podem se infectar com mais de um sorotipo ao longo da vida (Gubler 1998). São vírus esféricos, envelopados e com cerca de 40 a 50 nanômetros de diâmetro.

O período de transmissibilidade viral ocorre em dois ciclos: intrínseco - é o que se passa no homem. Começa um dia antes do aparecimento dos sintomas e

vai até o 6º dia da doença. Durante esse período, o vírus está presente no sangue e os mosquitos que o sugarem podem se infectar. Extrínseco - é o que se dá no mosquito. Os vírus ingeridos juntamente com o sangue multiplicam-se nas glândulas salivares após um repasto de sangue infectado, os mosquitos se tornam infectantes, isto é, capazes de transmitir a doença e assim continuarão por toda a sua vida (FUNASA, 2000).

O vírus da dengue é a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui-se em um dos maiores problemas de saúde pública, especialmente nos países tropicais. A pandemia de dengue em meados do século XX vem intensificando-se nas últimas décadas, com a expansão da distribuição geográfica dos seus mosquitos vetores e dos quatro sorotipos do vírus. A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 100 milhões de pessoas se infectem anualmente em 100 países, de todos os continentes, com exceção da Europa. Dessas pessoas, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e pelo menos 20 mil morrem da doença (Silva Júnior e Pimenta Júnior, 2008).

2.6 Controle dos culicídeos

2.6.1 Controle genético

A principal meta do controle de mosquitos é impedir a veiculação de organismos patogênicos ao homem. Para surtir efeito duradouro o controle deve agir simultaneamente combatendo ovos, larvas, pupas e adultos. O processo de combate às formas aquáticas e aos adultos deve ser idealizado em longo prazo com constante monitoramento (Marcondes, 2001).

Recentemente no Brasil foram liberados milhões de mosquitos geneticamente modificados. Até agora todos os experimentos realizados em campo foram com a cepa do mosquito *A. aegypti* OX513A. Neste experimento os mosquitos machos OX513A cruzam com as fêmeas silvestres e produzem descendência que morre na fase de larva. Existem muitas preocupações sobre a tecnologia utilizada e algumas perguntas ainda estão sem respostas. Por exemplo, os resultados dos experimentos no Brasil ainda não foram publicados em revistas científicas (Wallace, 2013).

Outra técnica, a Técnica do Inseto Estéril (TIE) consiste em liberar grandes quantidades de insetos irradiados para que cruzem com silvestres, já que esses insetos estéreis não produzem crias (Wallace, 2013).

2.6.2 Controle químico

O uso de inseticidas do grupo organofosforado iniciou-se após a constatação do aumento da população de insetos resistentes ao inseticida clorado diclorodifeniltricloroetano (DDT) ®. Desde 1985 o controle larvário dos mosquitos *A. aegypti* tem sido feito por meio dos inseticidas Fenitrothion® e Malation®. Nebulizações térmicas e atérmicas têm sido utilizadas para controlar a população adulta desse vetor, empregando vários inseticidas, destacando-se: Propoxur® (carbamato), Malation® (organofosforado) e Cipermetrina® (piretroide) (Macoris et al. 1999). Os principais problemas do uso destes inseticidas foram o desenvolvimento de populações resistentes e os danos provocados ao ambiente (Polanczyk et al. 2003; Luna et al. 2004).

Por mais de 30 anos o inseticida organofosforado temefós foi o larvicida exclusivamente usado no Brasil para o controle de *A. aegypti*. Com as epidemias de 1986, seu uso foi amplamente intensificado. Em pouco tempo, casos de resistência ao temefós em diversas regiões do Brasil começaram a surgir, levando à implantação de programas de monitoramento da suscetibilidade do mosquito aos inseticidas químicos (Campos & Andrade, 2001; Polanczyk et al. 2003; Braga et al. 2004). A aplicação dos inseticidas químicos deve ser feita somente em casos de epidemia.

A resistência é uma característica genética que se insere em uma população em função do uso de inseticidas, ou seja, quanto mais o inseticida for utilizado mais rápido é a seleção de insetos resistentes. A capacidade dos insetos de tolerar concentrações inicialmente letais promove uma redução gradual na eficácia dos inseticidas, até a sua completa ineficiência (Cruz, 2002; Carvalho et al. 2004). Martins et al. (2004) sugeriram que o inseticida diflubenzuron® fosse usado em localidades onde *A. aegypti* apresenta resistência ao temefós. O Diflubenzuron é um inseticida regulador de crescimento, mais conhecido como IGR (“insect growth regulator”), que age pela inibição da síntese de quitina

durante o estágio imaturo do inseto e tem sido comercializado em muitos países com o nome Dimilin® (Silva et al. 2004).

Diversos estudos comprovam a atividade de extratos vegetais contra diferentes espécies de mosquitos, incluindo-se *A. aegypti* (Silva et al. 2004). Os óleos essenciais podem acarretar efeitos sobre os insetos, como repelência, inibição de oviposição e da alimentação, distúrbios no desenvolvimento ocasionado por alterações no sistema hormonal, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases dos insetos (Roel, 2001).

2.6.3 Controle biológico

Organismos capazes de parasitar ou preda mosquitos em suas várias fases evolutivas vêm sendo estudados há bastante tempo. Existem mais de 250 predadores de larvas de mosquitos. Entre os predadores invertebrados destacam-se as planárias (ex.: *Dugesia dorotocephala*), os microcrustáceos (*Mesocyclops* sp.), as baratas d'água (Hemiptera: Belostomatidae), as larvas de mosquitos (ex.: *Toxorhynchites* sp., *Psorophora* sp., *Sabethes* sp. e *Culex* sp.). Entre os vertebrados destacam-se os peixes larvívoros (ex.: *Oreochromis* = tilápia; *Poecilia reticulata* = guppy).

Os fungos entomopatogênicos têm sido considerados potenciais candidatos para o controle dos mosquitos adultos, inclusive da dengue (Scholte et al. 2007; Paula et al. 2008; Paula et al. 2011a; Paula et al. 2011b). Dentre os gêneros mais importantes de fungos entomopatogênicos encontram-se: *Metarhizium* sp., *Beauveria* sp., *Nomuraea* sp., *Aschersonia* sp. e *Entomophthora* sp. (Ferron, 1978; Faria & Magalhães, 2001).

Os efeitos da combinação de fungos entomopatogênicos com o inseticida permetrina foram recentemente estudados para o controle do mosquito da malária, *Anopheles funestus*, *A. arabiensis* e *A. gambiae*. Os mosquitos pré-infectados com *B. bassiana* ou *M. anisopliae* e depois expostos à permetrina tiveram significativas taxas de mortalidade, comparado com os mosquitos expostos somente à permetrina (Farenhorst et al. 2009). Entretanto, a mortalidade dos mosquitos expostos a somente fungo não foi observada.

O uso de bactérias no controle biológico das larvas de mosquitos tem se destacado entre as diversas estratégias que compõem os programas de manejo

integrado. As principais razões para isto são as suas vantagens em relação aos inseticidas químicos. Esses produtos possuem inúmeras formulações e são usados contra diversas espécies de mosquitos, com um preço um pouco superior aos produtos tradicionalmente utilizados, mas competitivos quando considerados os custos sociais e ambientais do uso de inseticidas não seletivos em ecossistemas aquáticos (Vilarinhos et al. 1998).

A bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) possui três diferentes toxinas Cry (cristal tóxico), e uma Cyt (toxina com atividade citolítica e hemolítica). Este número de toxinas reduz a probabilidade do desenvolvimento da resistência (Becker, 2000; Regis et al. 2001).

Os mermitídeos são nematoides parasitas obrigatórios de artrópodes, principalmente insetos. As infestações por mermitídeos são letais para o inseto, no entanto o uso desses vermes para controlar insetos praga é inviável em larga escala, uma vez que o parasitismo obrigatório impede a produção comercial em massa desses nematoides (Popiel & Hominick, 1990).

2.7 Criadouros de *A. aegypti*

Aedes aegypti utiliza principalmente os recipientes artificiais com acúmulo de água, como criadouro para o desenvolvimento de suas formas imaturas. Tem-se observado com menor frequência a presença de *A. aegypti* em criadouros naturais. Entre os criadouros artificiais estão os pneus, as latas, os vidros, os pratos de vasos, as caixas de água e os tonéis mal tampados, as piscinas e os aquários abandonados, os bebedouros de animais ou qualquer tipo de objeto capaz de armazenar água (Rossi e Silva, 2007). Os criadouros naturais de *A. aegypti*, correspondem a bromélias, cavidade de árvores, buracos em rocha e internódios de bambu.

Em algumas espécies de bromélias as partes inferiores das folhas se alargam, formando as bainhas, que se curvam quase imperceptivelmente em torno do caule, constituindo um espaço que os estudiosos de bromélia chamam de “tanque”, denominação devida à presença dessas estruturas que acumulam água da chuva, compondo-se em pequenos depósitos de água. (Esteves, 2011).

De acordo com Rossi e Silva (2007), a diversidade de criadouros contribui diretamente na produção de indivíduos adultos, permitindo o aumento na

densidade de espécies de mosquitos vetores, assumindo risco na dispersão de doenças.

Devido às suas características biológicas, *A. aegypti* tem criadouros transitórios, que são condicionados diretamente pelas chuvas, como os seus preferenciais. Decorrente disso, sua população de alados sofre flutuação grande e abrupta de densidade no ciclo anual, isto é, seu ciclo anual é influenciado pela quantidade de chuvas e pela temperatura ambiental. Seus criadouros, representados pelas poças d'água e pelos recipientes naturais e artificiais, são preenchidos quase somente na época chuvosa. Com o aumento da precipitação pluviométrica simultânea às ascensões térmicas que precedem a chegada do verão e que se mantêm durante esta estação, estes criadouros passam a ser ciclicamente reabastecidos de água, desencadeando o processo de eclosão dos ovos depositados meses antes. Assim, as chuvas i

nfluenciam positivamente na densidade populacional desses insetos (Consoli e Oliveira, 1998).

O conhecimento e a identificação dos criadouros são de fundamental importância para o controle de qualquer espécie de mosquito. No caso particular do *A. aegypti* o Programa Nacional de Controle da Dengue recomenda a identificação e determinação da importância de cada tipo. A identificação desses recipientes permitirá melhorar o direcionamento das ações de vigilância e decidir sobre a melhor estratégia de controle a ser adotada (Rossi e Silva 2007).

3. TRABALHOS

3.1 Potencial de nematoides entomopatogênicos como agentes no controle de formas imaturas de *Aedes aegypti*

Resumo *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) é um importante vetor dos vírus da febre amarela e da dengue em países localizados nas zonas tropicais e subtropicais do mundo. A grande resistência dos mosquitos a inseticidas químicos e a frequente preocupação social com a poluição ambiental, resultou na procura por alternativas para o controle desses insetos, tais como a utilização de nematoides entomopatogênicos. Nematoides entomopatogênicos são considerados importantes agentes de biocontrole e podem também ser promissores para o controle das formas imaturas de *A. aegypti*. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a virulência do nematoide *Heterorhabditis* sp. LPP35 encontrado em fitotelmata de bromélia em áreas preservadas de Mata Atlântica sobre os diferentes estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) de *A. aegypti*. Bem como avaliar a virulência de outros isolados: *Heterorhabditis indica* LPP1, *H. baujardi* LPP7, *Heterorhabditis* sp. LPP22 e *Steinernema carpocapsae* NCA11 sobre os estágios larvais L3 e L4 de *A. aegypti*. *Heterorhabditis* sp. LPP35 causou mortalidade em larvas L3 e L4 de *A. aegypti* superior a 85%. Contudo, o mesmo não causou mortalidade aos estágios L1 e L2. No teste de virulência de diferentes isolados de *Heterorhabditis* e *Steinernema* aos estágios larvais L3 e L4 houve maior mortalidade das larvas de *A. aegypti* quando usadas espécies de *Heterorhabditis*. No ensaio de diferentes doses resposta, o aumento da dosagem

de JIs de *Heterorhabditis* sp. LPP35 nos estagios larvais L3 e L4 apresentou correlação positiva com a mortalidade das larvas do mosquito. As doses de 10, 20 e 40 JIs por larva apresentaram mortalidade inferior a 50%, enquanto as doses de 80, 100 JIs por larva apresentaram mortalidade acima de 70%, chegando a 100% de mortalidade na dose de 160 JIs por larva de *A. aegypti*. Nos ensaios em laboratório o NEP *Heterorhabditis* sp. LPP35 apresentou potencial como agente no controle biológico de larvas L3 e L4 de *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; *Heterorhabditis* sp.; controle biológico

Abstract: *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) is an important vector of yellow fever and dengue in countries located in tropical and subtropical areas of the world virus. A large mosquito resistance to chemical insecticides and frequent social concern about environmental pollution resulted in the search for alternatives to control these insects, such as the use of entomopathogenic nematodes. Entomopathogenic nematodes are considered important biocontrol agents and can also be promising for the control of immature forms of *A. aegypti*. In this sense, the objective of this study was to evaluate the virulence of the nematode *Heterorhabditis* sp. LPP35 found in phytotelmate bromeliad in preserved areas of Atlantic Forest on the different larval stages (L1, L2, L3 and L4) of *A. aegypti*. Well as evaluating the virulence of other isolates: *Heterorhabditis indica* LPP1, *H. baujardi* LPP7, *Heterorhabditis* sp. LPP22 and *Steinernema carpocapsae* NCALL on the L3 and L4 larval stages of *A. aegypti*. *Heterorhabditis* sp. LPP35 caused mortality more than 85% in L3 and L4 larva of *A. aegypti*. However, it did not cause mortality to the L1 and L2 stages. In the virulence of different isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis* the larval stage L3 and L4 tested a higher mortality of *A. aegypti* larvae of *Heterorhabditis* species when used. In the assay response of different doses, the increase of the dosage of JIS *Heterorhabditis* sp. LPP35 in larval stages L3 and L4 showed a positive correlation with mortality of mosquito larvae. Doses of 10, 20 and 40 IJs per larva had mortality rates below 50%, while the doses of 80, 100 IJs per larva had a mortality rate above 70%, reaching 100% mortality at a dose of 160 IJs per larva of *A. aegypti*. In bioassays EPN *Heterorhabditis* sp. LPP35 presented potential biological control agent of L3 and L4 larvae of *Aedes aegypti*.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Heterorhabditis* sp; biocontrol.

Introdução

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é o vetor do vírus da dengue. O agente etiológico é um vírus RNA Arbovírus do gênero Flavivírus, pertencente à família Flaviviridae. São conhecidos quatro sorotipos: DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4. A transmissão se faz pela picada dos mosquitos *A. aegypti*, no ciclo ser humano – *A. aegypti* – ser humano. O período de transmissibilidade compreende dois ciclos: um intrínseco, que ocorre no ser humano, e outro extrínseco, que ocorre no vetor. Quando o vírus da dengue circulante no sangue de um humano em viremia (geralmente um dia antes do aparecimento da febre até o sexto dia da doença) é ingerido pela fêmea do mosquito durante o repasto, o vírus infecta o intestino médio do inseto e depois se espalha sistemicamente ao longo de um período de oito a doze dias. Após esse período de incubação extrínseca, o vírus pode ser transmitido para humanos durante os futuros repastos. Este período de incubação é influenciado por fatores ambientais, especialmente temperatura. Em seguida, o mosquito permanece infectante até o final da sua vida (SES, 2013).

O ciclo biológico do mosquito *A. aegypti* compreende as seguintes fases: ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos são colocados isoladamente fora da água, em locais úmidos ou em paredes de recipientes com capacidade de reter água. O desenvolvimento embrionário dura de 2 a 3 dias e os ovos eclodem dentro da água. As larvas de primeiro instar utilizam um órgão cônico quitinoso para romper o exocório do ovo. O tempo de crescimento larval está condicionado às condições dos criadouros como bom suprimento alimentar, ausência de predadores e condições climáticas adequadas. As larvas se alimentam de microrganismos aquáticos (fitoplâncton e zooplâncton) e da matéria orgânica sedimentada no fundo de criadouros (Consoli et al. 1998; Marcondes, 2001).

Numerosos estudos têm sido realizados para o controle não químico dos agentes devido aos perigos dos pesticidas convencionais. Vários ensaios foram realizados utilizando-se, por exemplo, nematoides mermitídeos contra as larvas *Aedes* sp. e outros gêneros (Santamarina, 2000; Perez-Pacheco et al.2004).

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) pertencentes às famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae têm sido usados contra insetos e artrópodes de importância médica e veterinária, incluindo os mosquitos do gênero *Culex* transmissores da filária e da malária (Zohdy et al 2013; Cagnolo e Walter 2010) e carrapatos (Monteiro et al. 2014). A vantagem dos NEPs sobre os nematoides mermitídeos é que o primeiro pode ser cultivado *in vivo* em hospedeiros alternativos ou *in vitro* em meios artificiais (Friedman, 1990). Uma segunda vantagem é a longevidade da fase infectante (3 a 6 meses em água à temperatura ambiente) e também por possuir ciclo de vida curto (Dolinski et al., 2006).

Welch & Bronskill (1962), Dadd (1971) e Poinar & Kaul (1982) foram os primeiros a estudar a potencialidade dos nematoides e sua bactéria simbiote contra os mosquitos. Recentemente Cagnolo & Walter (2010) e Zohdy et al. (2013), em trabalhos de laboratório, relataram que os mosquitos *Culex quinquefasciatus* e *Culex apicinus* foram parasitados pelos nematoides *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. indica*, e *Steinernema rarum*, mostrando que os NEPs têm potencial para serem usados no controle biológico de larvas de mosquitos de importância sanitária.

O presente estudo teve como objetivos: i) avaliar a virulência do NEP a estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) de *A. aegypti*; ii) comparar a virulência de cinco linhagens pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* em larvas de *A. aegypti*; iii) avaliar a mortalidade de larvas de *A. aegypti* sob diferentes concentrações de NEPs; e iv) quantificar e avaliar a progênie de JIs emergidos em cadáveres de *A. aegypti*.

Foram utilizados neste estudo *Heterorhabditis* LPP35 e NEPs do banco do LEF: *H. indica* LPP1, *H. baujardi* LPP7, *Heterorhabditis* sp. LPP22 e *Steinernema carpocapsae* NCALL.

Materiais e Métodos

Criação de *Galleria mellonella*

A dieta para larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) preparada previamente (farelo de trigo 400 g, gérmen de trigo 200 g, leite em pó desnatado 200 g, levedura de cerveja 120 g, glicerina 82 mL e 153 mL de mel) foi colocada sobre folha de papel, dentro de potes plásticos (14 cm x 14 cm x 05 cm - comprimento, largura e altura, respectivamente) e sobre esse substrato foram colocadas as posturas realizadas pelos adultos. Após a passagem das larvas para o estágio pupal, estas foram transferidas para frascos de vidro (11 cm x 17 cm - diâmetro e altura, respectivamente) contendo na tampa papel para postura.

Completando o ciclo da criação, as posturas foram retiradas e transferidas para os potes plásticos (22 cm x 22 cm x 10 cm - comprimento, largura e altura, respectivamente) com dieta, iniciando nova geração de larvas. A criação foi mantida em sala climatizada a 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10 %, e a manutenção realizada em dias alternados, fazendo-se a limpeza dos recipientes, coleta de posturas e adição de dieta.

Produção dos nematoides

Para a produção *in vivo*, larvas de 7º instar de *G. mellonella* foram colocadas em placas de Petri de nove cm de diâmetro contendo folha de papel filtro no fundo e inoculadas com uma suspensão de um mL de nematoide entomopatogênico mantido em câmara climatizada 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotofase de doze horas.

Após sete dias, as larvas mortas com sintomatologia característica da infecção foram retiradas e em seguida colocadas em Armadilhas de White (White, 1927), que consiste em uma placa de Petri de nove cm de diâmetro com um anel de PVC no centro da placa, sobre o qual foi colocada uma tira de papel filtro, onde foram depositadas as larvas mortas. A armadilha recebeu ainda cerca de 10 mL de água destilada, após sete dias foram coletados os nematoides suspensos na água, de onde foram recolhidos e armazenados em câmara climatizada 16° C (Dutky et al. 1964).

Obtenção dos isolados de NEPs

Os isolados de nematoides das cinco linhagens, *Heterorhabditis indica* LPP1, *Heterorhabditis baujardi* LPP7, *Heterorhabditis* sp. LPP35, *Heterorhabditis* sp. LPP22 e *Steinernema carpocapsae* NCALL, foram obtidos do banco de nematoides entomopatogênicos do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia /Nematologia / CCTA/ UENF.

Estes nematoides foram produzidos pelo método *in vivo*, adaptado a partir de Woodring e Kaya (1988), em lagartas de *G. mellonella*. Os JIs emergidos foram armazenados em suspensão a $16\pm 1^\circ\text{C}$ em câmara climática até a utilização no experimento.

Obtenção de larvas do mosquito *Aedes aegypti*

As larvas do mosquito foram obtidas a partir de ovos coletados em armadilhas de oviposição instaladas em residências domiciliares no município de Campos dos Goytacazes, RJ. As coletas de ovos do mosquito foram feitas usando armadilhas de oviposição denominadas “ovitrapas”. As ovitrapas foram confeccionadas em um vaso plástico preto de 1500 mL com seis palhetas de madeira eucatex (3 x 12 cm) presas nas bordas do vaso com elástico (Fig. 1a). Dentro do vaso foram adicionados 250 mL de água de torneira. A face áspera das palhetas foi voltada para parte externa do vaso.

Os ovos retirados das palhetas (fig. 1b) foram colocados para secar por 48h e, em seguida, acondicionados em bandejas plásticas (40 x 40 x 7,5 cm) (Fig 1a), com um terço de sua capacidade preenchida com água desclorada. Após a eclosão, foi ofertado como alimento ração para peixe ornamental (Alcon/goldfish crescimento), na proporção de 100 mg/bandeja.

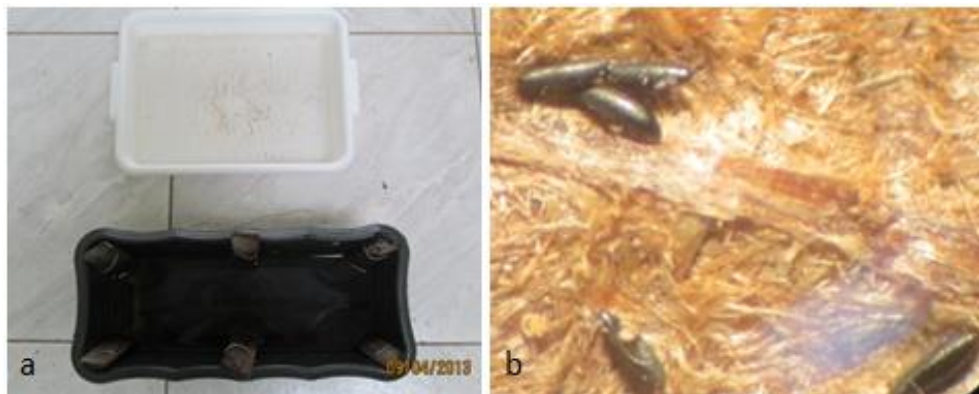


Fig 1 a) ovitrampas confeccionadas em vaso plástico preto de 1500 mL com seis palhetas de madeira eucatex (3 x 12 cm) presas na borda do vaso com elástico. b) detalhe da palheta contendo ovos de *Aedes aegypti*.

Patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. LPP35 a diferentes estágios larvais de *Aedes aegypti*.

Heterorhabditis sp. LPP35 foi utilizado para estudar o efeito da infecção de JIs em diferentes estágios larvais de *A. aegypti*. Esse isolado foi encontrado em fitotelmata de bromélia em áreas preservadas de Mata Atlântica.

O bioensaio consistiu na utilização de potes tipo coletores contendo 10 mL de água de torneira, 10 larvas de *A. aegypti* por pote e uma suspensão de um mL contendo 1.000 juvenis infectantes (JIs) do isolado em questão. Foram utilizadas 10 repetições para cada estágio larval (L1, L2, L3 e L4). Para o controle foram utilizados potes tipo coletores contendo 10 mL de água de torneira e 10 larvas de *A. aegypti* e 10 repetições. Os potes foram tampados e acondicionados em câmara de germinação do tipo BOD sob temperatura de 25°C, no escuro. As avaliações foram diárias até a mudança de fase do mosquito (formação de pupa) contando-se o número de larvas vivas e mortas. As larvas mortas foram observadas em microscópio estereoscópio para verificar a presença de JIs. Para a análise estatística, as variáveis foram testadas quanto à homogeneidade das variâncias (testes de Cochran & Bartlett) e à normalidade dos erros (teste de Lilliefors), em 5% de probabilidade, utilizando-se o Sistema de Análises estatísticas (SAEG). A seguir, os dados foram submetidos à Anova e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Todo o experimento foi repetido duas vezes, tendo-se feito uma análise conjunta das repetições no tempo.

Teste de virulência de diferentes isolados de *Heterorhabditis* sp. e *Steinernema* sp. aos estágios larvais L3 e L4 de *Aedes aegypti*.

Como os estágios larvais L3 e L4 foram os mais susceptíveis a LPP35, foram utilizadas larvas L3 e L4 de *A. aegypti* e considerados seis tratamentos: 10 larvas de mosquito + *H. baujardi* LPP7, 10 larvas de mosquito + *H. indica* LPP1, 10 larvas de mosquito + *Heterorhabditis* sp. LPP35, 10 larvas de mosquito +

Heterorhabditis sp. LPP22, 10 larvas de mosquito + *Steinernema carpocapsae* NCALL, além do controle (sem nematoide).

Para cada tratamento foram utilizados potes coletores de três cm de diâmetro contendo 10 mL de água de torneira, 10 larvas de *Ae. aegypti* por pote e um mL de suspensão contendo 1000 JIs da espécie relacionada ao tratamento. Para a testemunha foi adicionado um mL de água de torneira e 10 larvas de mosquito. Os potes foram tampados e acondicionados em câmara de germinação do tipo BOD, sob temperatura de 25°C, no escuro. As avaliações foram diárias até a mudança de fase do mosquito (formação de pupa), contando-se o número de larvas vivas e mortas. As larvas mortas foram observadas em microscópio estereoscópio para verificar a presença de JIs. Para a análise estatística, as variáveis foram testadas quanto à homogeneidade das variâncias (testes de Cochran & Bartlett) e à normalidade dos erros (teste de Lilliefors), em 5% de probabilidade, utilizando-se o Sistema de Análises estatísticas (SAEG). A seguir, os dados foram submetidos à Anova e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Todo o experimento foi repetido uma vez, tendo-se feito uma análise conjunta das repetições no tempo.

Ensaio de diferentes doses resposta de JIs de *Heterorhabditis* sp. LPP35 na mortalidade do 3º e 4º instar larval do mosquito *A. aegypti*.

Para cada tratamento foram utilizados copos descartáveis de café de 50 mL contendo 10 mL de água de torneira, uma larva no estágio L3 ou L4 de *A. aegypti*. As doses testadas foram: controle (0 JIs); 10; 20; 40; 80; 100 e 160 JIs/larva de *A. aegypti*. Os JIs nas diferentes concentrações foram aplicados usando-se pipeta graduada, em volume de suspensão de um mL. Para cada tratamento foram feitas 10 repetições. Os copos foram acondicionados em bandejas e levados à câmara de germinação do tipo BOD sob temperatura de 25°C no escuro. As avaliações foram diárias até a mudança de fase do mosquito (formação de pupa) contando-se o número de larvas vivas e mortas. As larvas mortas foram observadas em microscópio estereoscópio para verificar a presença de juvenis infectantes. O ensaio foi repetido uma vez. Para a análise estatística, as variáveis foram testadas quanto à homogeneidade das variâncias (testes de

Cochran & Bartlett) e à normalidade dos erros (teste de Lilliefors), em 5% de probabilidade, utilizando-se o Sistema de Análises estatísticas (SAEG). A seguir, os dados foram submetidos à análise de regressão.

Progênie de *Heterorhabditis* sp. LPP35 em larvas de *A. aegypti*

Larvas L3 e L4 de *A. aegypti* foram infectadas individualmente em copos plásticos de café adicionando uma suspensão de 1 mL na dose de 100 JIs/larva. Trinta larvas que apresentaram sinais de infecção e presença de hermafroditas foram selecionadas e transferidas individualmente para placas de Petri com 6 cm de diâmetro. As placas foram mantidas em câmaras BODs por sete dias a 25 °C e após este período coletou-se os JIs emergidos. A contagem da progênie foi feita através de três microalíquotas de 0,1 mL em câmara de Peterson e microscópio estereoscópio. O ensaio foi repetido uma vez.

Resultados e Discussão

O isolado LPP35 causou mortalidade em larvas L3 e L4 de *A. aegypti*, superior a 85%, contudo, o mesmo não causou mortalidade aos estágios L1 e L2 (Fig. 2 e 3).

Segundo Ciche e Ensign, 2003, depois de perceber a presença de um inseto-hospedeiro, os JIs entram na hemocele do inseto através das aberturas naturais, tais como a boca ou o ânus, ou usando um “dente” quitinoso para penetrar na cutícula e, em seguida, regurgitam suas bactérias simbiontes intestinais. Entretanto, nesse trabalho não foi observada mortalidade nas fases L1 e L2 de *A. aegypti*, sugerindo que a infecção de larvas de *A. aegypti* ocorre pela ingestão dos JIs pela boca e não por penetração na cutícula do hospedeiro.

Nos estágios L1 e L2 as larvas são pequenas e não há abertura suficiente para a passagem dos nematoides pela boca. O trabalho realizado por Dadd (1971) corrobora com a hipótese de ingestão, pois JIs de *Neoaplectana carpocapsae* foram ingeridos pelo 4º instar das larvas do mosquito *Culex pipiens*, Diptera Culicidae Linnaeus, mas ingeridos relativamente mal pelo 3º instar e foram excluídos pelo 2º e 1º estádios larvais do mosquito.

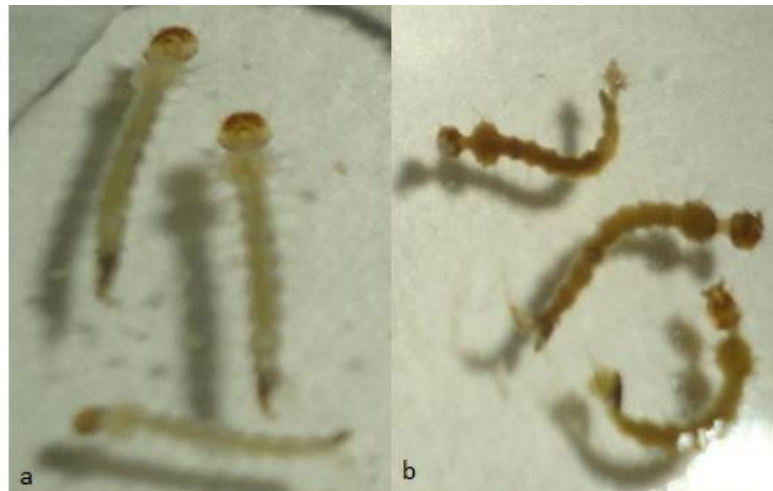


Figura 2. a) larvas de *Aedes aegypti* vivas apresentando coloração clara. b) Larvas de *A. aegypti* mortas pelo isolado *Heterorhabditis* sp. LPP35 apresentando coloração marrom típica da infecção.

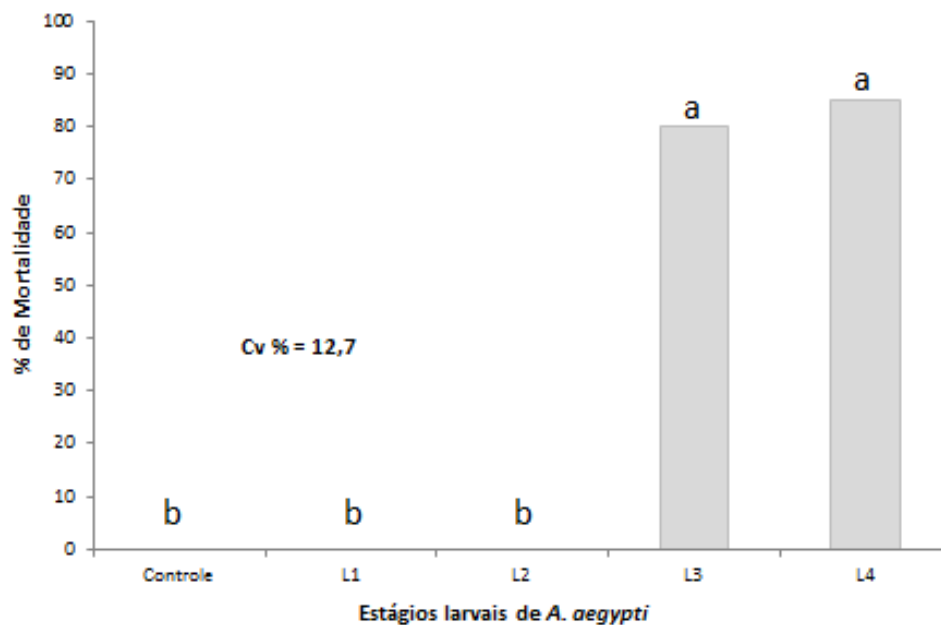


Figura 3. Porcentagem de mortalidade dos diferentes estágios larvais de *A. aegypti* (L1, L2, L3, L4) infectados pelo isolado *Heterorhabditis* sp. LPP35, cada estágio larval com seu respectivo controle. Os valores são médias de dez repetições por estágio larval e uma repetição no tempo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

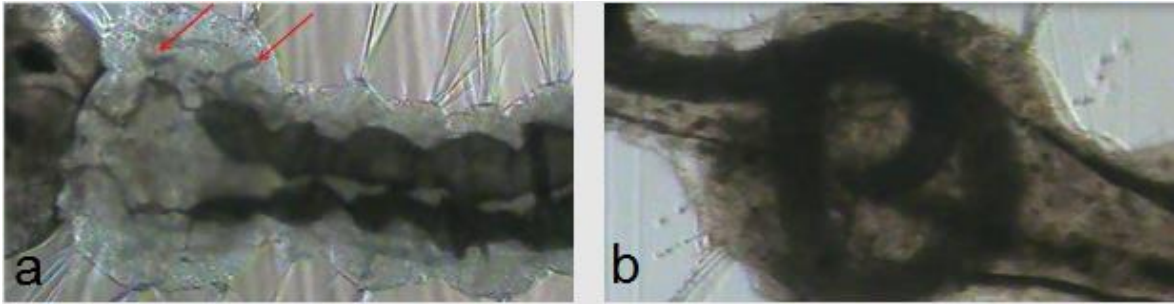


Figura 4 a. setas indicando a presença de juvenis em larva de *A. aegypti* morta b. hermafroditas do isolado de *Heterorhabditis* sp LPP35 em larvas de *A. aegypti*.

No teste de virulência dos diferentes isolados de *Heterorhabditis* e *Steinernema* aos estágios larvais L3 e L4 houve maior mortalidade das larvas de *A. aegypti* quando usadas espécies de *Heterorhabditis*. Já *S. carpocapsae* mostrou-se menos virulento sem diferenciar significativa do controle ($P \geq 0,05$) com mortalidade em torno de 4%. *Heterorhabditis* sp. LPP35 causou mortalidade de 95%, mas não diferiu de LPP22 e LPP1 com 81 e 88 % de mortalidade, respectivamente (Fig. 5).

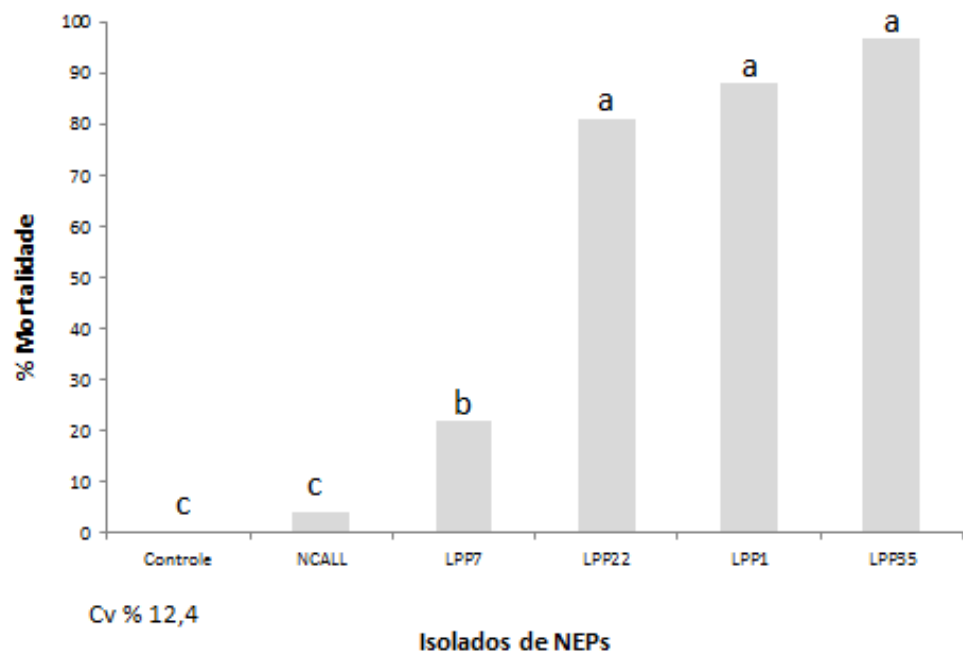


Figura 5. Porcentagem de mortalidade de larvas L3 e L4 de *A. aegypti* após a exposição de juvenis infectantes (JIs) de *Steinernema carpocapsae* NCALL, *Heterorhabditis indica* LPP1, *Heterorhabditis baujardi* LPP7, *Heterorhabditis* sp. LPP35, *Heterorhabditis* sp. LPP22. Os valores são médias de dez repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

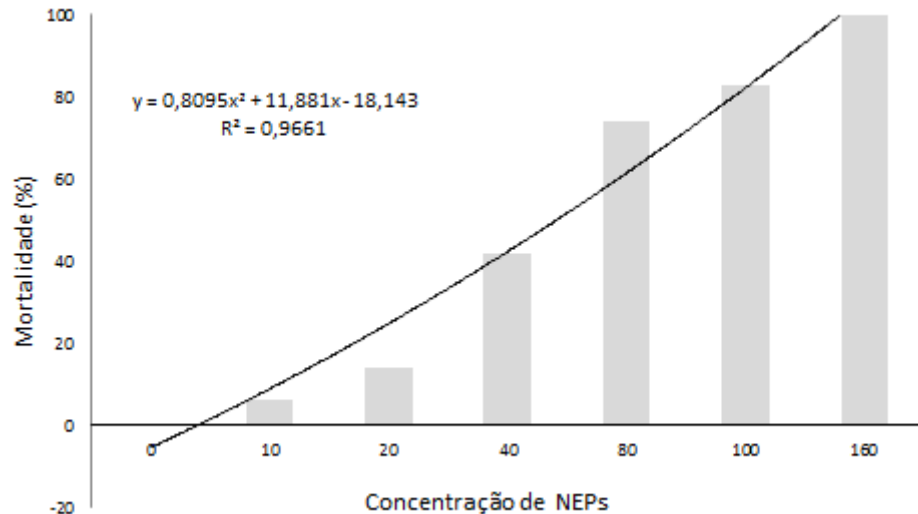
Os estudos revelaram o papel supressor de *H. indica* LPP1, *Heterorhabditis* sp. LPP22 e *Heterorhabditis* sp. LPP35, em controlar as larvas do mosquito. Eles se estabeleceram com sucesso no hospedeiro e geraram novos juvenis infectantes (JIs). Por outro lado, *Steinernema carpocapsae* não atingiu valores significativos de mortalidade do hospedeiro. Resultados semelhantes foram encontrados por Zohdy et al. (2013), que relataram que *S. carpocapsae* e *S. feltiae* não conseguiram se estabelecer no hospedeiro *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).

Recentemente Cagnolo & Walter (2010) e Zohdy et al. (2013) em trabalhos de laboratório relataram que os mosquitos *Culex quinquefasciatus* e *Culex apicinus* foram parasitados pelos nematoides *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. indica*, e *S. teinernemamarum*, mostrando que os NEPs têm potencial para uso no controle biológico de larvas de mosquitos de importância sanitária.

Bedding & Akhurst (1983) e Molyneux et al. (1983) demonstraram diferenças interespecífica e intraespecíficas na infectividade de NEPs às espécies de insetos terrestres e salientaram a necessidade de se testar mais de uma espécie de nematoides contra qualquer inseto-alvo potencial. Os mesmos autores salientaram sobre a importância de testes que forneçam informações quantitativas e qualitativas sobre os NEPs, e as pistas de curvas de dose-resposta são amplamente utilizadas para indicar o potencial de um agente de controle ou medição da susceptibilidade de uma praga (Hewlett & Plaekett, 1979; Molyneux et al, 1983.; Hughes et al. 1984). Tal informação é essencial para a seleção de agentes de controle para uma possível aplicação em campo contra insetos específicos e para os interesses comerciais (Hughes et al. 1984).

No ensaio de diferentes doses resposta, o aumento da dose de JIs de *Heterorhabditis* sp. LPP35 nos estagios larvais L3 e L4 (Fig. 6) apresentou correlação positiva com a mortalidade das larvas do mosquito. As doses de 10, 20 e 40 JIs por larva apresentaram mortalidade inferior a 50%, enquanto as doses de 80, 100 JIs por larva apresentaram mortalidade acima de 70 %, chegando a 100% de mortalidade na dose de 160 JIs por larva de *A. aegypti*.

O presente trabalho e os primeiros trabalhos de Dadd (1971) e Poinar e Kaul (1982) seguiram o mesmo padrão de resposta à mudança de concentração de nematoides.



(Figura 6.) Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. aegypti* após a exposição a diferentes doses de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. LPP35, mantidas em BOD a 25 °C até o aparecimento do estágio de pulpas de *A. aegypti*.

Em trabalhos de Molta e Hominick (1989) a mortalidade das larvas de *A. aegypti* demonstrou uma correlação linear positiva com a concentração dos nematoides e duração da exposição. O número de nematoides de *Heterorhabditis heliothidis* (Khan et al. 1976) e *Steinernema feltiae* que ganhou acesso à hemocele de larvas foi sempre baixo, mas aumentou com a dose e o tempo de exposição. Estes mesmos autores verificaram que os níveis de mortalidade de larvas expostas a uma única dose de *H. heliothidis* durante 60 min foram semelhantes nas diferentes espécies de NEPs. No entanto, a adição de uma segunda dose do inóculo de nematoides ao sistema aumentou a mortalidade. Estes dados confirmam o empobrecimento da primeira dose do inóculo e mostram que a exposição prolongada a esta proporção de hospedeiro - parasita teria pouco ou nenhum efeito adicional letal.

Heterorhabditis sp. LPP35 completou seu ciclo biológico em larvas de *A. aegypti* e em média emergiram dos insetos-cadáveres cerca de 200 JIs. Este valor é bem inferior à progênie produzida em larvas de *G. mellonella* que chegam a emergir mais de 300.000 JIs por cadáver. Porém, estes resultados demonstram que a ciclagem do nematoide pode ocorrer em larvas de *A. aegypti*, e desta forma reduzir os custos de controle e aumentar as chances de sucesso.

Apesar de larvas de 3^o e 4^o instar ingerirem centenas de nematoides dentro de poucas horas, poucos indivíduos se estabelecem com sucesso na hemocele, e provavelmente os JIs restantes dentro da membrana peritrófica desintegram dentro de algumas horas.

Em trabalhos de Zody et al. (2014) testando a eficácia de nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* no controle de larvas de *Culex quinquefasciatus*, o aumento da concentração inicial de JIs até cerca de 200 JIs/hospedeiro, emergiu em média 68,3 e 97,1 juvenis infectantes de *H. bacteriophora* e *H. indica*, respectivamente.

Referencias Bibliográficas

Bedding, R. A., Molyneux, A. S. & Akhurst, R. J. (1983). *Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp., and *Steinernema kraussei* : interspecific and intraspecific differences in infectivity for insects. *Exp. Parasitol.*, 55, 249-257.

Cagnolo, S.R. and Walter R.A (2010) Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasitize *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae) *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69 (1-2): 141-145.

Ciche, T.A., Ensign, J.C. (2003) For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 90-97.

Consoli, R. A. G. B., Oliveira R. L. (1998) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz, Reimpressão. 225p.

Dadd R.H., (1971). Size limitations on the infectibility of mosquito larvae by nematodes during filter-feeding, *J. Invert. Pathol.*, 18: 246-251.

Dolinski, C. (2006) Uso de nematoides entomopatogênicos no controle de pragas agrícolas. In: Venzon, M., Paula Júnior, T.J., Pallini, A. (eds.) *Tecnologias alternativas para o controle de pragas de doenças*. 1. ed. Viçosa:, p.261-289.

Dutky, S.R., J.V. Thompson & G.E. Cantwe. (1964). A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology*, 6: 417-422.

Friedman M.J., (1990). Commercial production and development, In: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, Gaugler R., and Kaya H.K., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL., pp.153-172

Hewlett, P. S. & Plackett, R. L. (1979). *The Interpretation of Quantal Responses in Biology*. Edward Arnold, London.

Hughes, P.R., Wood, H.A., Burand, J.P. & Granados, R.R. (1984). Quantification of the dose-mortality response of *Trichoplusia hi*, *Heliothis zea* and *Spodoptera frugiperda* to nuclear polyhedrosis viruses : application of an exponential model. -- *J. Invertebr. Pathol.*, 43, 343-350.

Khan, A., W. M. Brooks, and H. Hirschmann. 1976. *Chromonema heliothidis* n. gen., n. sp., (Steinemematidae, Nematoda), a parasite of *Heliothis zea* (Noctuidae, Lepidoptera) and other insects. *J. Nematol* 8: 159-168.

Marcondes, C. B. *Entomologia Médica e Veterinária*. São Paulo: Atheneu, 2001.

Molyneux, A.S., Bedding, R.A. & Akhurst, R.J. (1983). Susceptibility of larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* to various *Heterorhabditis* sp. *Neoaplectana* sp, and an undescribed steinernematid (Nematoda). *J. Invertebr. Pathol.*, 42, 1-7.

Molta, N. B. & Hominick, W. M. (1989) Dose- and time- response assessments of *heterorhabditisheliothidis* and *steinernema feltiae* [*nem. : rhabitida*] against *aedes aeg ypt1* larvae *ENTOMOPHAGA* 34 (4), 485-493.

Monteiro, C.M.O; Matos, R.S.; Araújo, L.X.; Perinotto, W.A.S.; Bittencourt, V.R.E.P.; Dolinski, C.; Prata, M.C.A. (2014) First report of pathogenicity of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* on partially engorged females of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Biological Control* (Print), v. 69, p. 78-81.

Pérez-Pacheco R., Rodríguez-Hernández C., Lara-Reyna, J., Montes-Belmont R., Ramírez-Valverde G., and Martínez-Martínez L., (2004). Parasitismo de *Romanomermis iyengari* en larvas de tres especies de mosquitos en laboratorio y de *Anopheles pseudopunctipennis* en campo, *Agrociencia*, 38(4): 413-421

Poinar G.O.Jr., and Kaul H.N., (1982). Parasitism of the mosquito *Culex pipiens* by the nematode *Heterorhabditis bacteriophora*, *J. Invert. Pathol.*, 39: 382-387

Santamarina A, Perez R, Honorio S. (2000). Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to parasitism by *Romanomermis culicivorax* in laboratory and field conditions in Oaxaca, Mexico. *Rev Panam Salud Publica*. 8(5):299-304.

SES, Secretaria de Estado de Saúde, Disponível em www.saude.rj.gov.br, acesso dia 16 de Abril de 2013.

Rossi, j. C. N. & silva, A. M. (2007). Diversidade de criadouros frequentados por *aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no estado de santa catarina, período de 1998 A 2007. http://www.dive.gov.br/conteudos/publicacoes/tcc/Diversidade_de_criadouros_frequentados_por_aedes_aegypti_e_aedes_albopictus_SC.pdf ACESSO EM 29 - 08-2014.

Zohdy, N.M. Shamseldean, M.M., Abd-El-Samie, E.M. and Hamama H.M. (2013). Efficacy of the Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes for Controlling the Mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) *Journal of Mosquito Research*, Vol.3, No.5, 33-44 (doi: 10.5376/jmr.2013.03.0005)

Welch H.E., and Bronskill J.F., (1962) Parasitism of mosquito larvae by the nematode DD136 (Nematoda: Neoaplectanidae), *Can. J. Zool.*, 40: 1200-1208

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

3.2 Influência do ambiente e do volume do criadouro sobre a patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. LPP35 a larvas L3 e L4 de *Aedes aegypti*.

Resumo: A dengue é uma das mais sérias doenças transmitidas por mosquitos, o que instiga pesquisas para novos métodos de controle do vetor *Aedes aegypti*. Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) estão sendo cada vez mais estudados para o controle de pragas, pois possuem boa capacidade de adaptação a novos ambientes e têm capacidade de se disseminar na busca por um hospedeiro. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do local do criadouro (a pleno sol e a sombra) e o volume de água (10, 100, 1000 e 10000 ml) nos recipientes sobre a mortalidade dos estágios larvais L3 e L4 de *Aedes aegypti* expostos ao nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp. LPP35. Em uma segunda etapa foi avaliada a virulência do NEP contra larvas de *A. aegypti* em condição de campo utilizando bromélias tanque como criadouros naturais. Os resultados confirmam que em condições de semicampo larvas expostas aos diferentes ambientes e a diferentes volumes dos criadouros tiveram de 27 a 92% de mortalidade, já em tanques de bromélias, *Heterorhabditis* sp. LPP35 obteve uma taxa de 24 % de mortalidade em larvas L3 e L4 de *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; *Heterorhabditis* sp., bromélias.

Abstract: The entomopathogenic nematodes are increasingly being studied for pest control because they have good ability to adapt to new environments and have the ability to spreading search for a host. Thus the aim of this work was to

study the effect of location, the breeding (full sun and shadow) and the volume of water in the containers of the same on mortality of larval stages L3 and L4 of *Aedes aegypti* exposed to the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp LPP35. In a second step the virulence of the EPN against *A. aegypti* was evaluated under field condition using bromeliads as natural breeding. The results confirm that in semi-field larvae exposed to different environment and different volume of water for the breeding had 27-92% of mortality, in bromeliad tanks *Heterorhabditis* sp. LPP35 obtained a rate of 24% mortality in L3 and L4 larvae of *Aedes aegypti*.

Keywords: *Aedes aegypti*; *Heterorhabditis* sp; bromeliads.

Introdução

A dengue é uma doença febril aguda caracterizada, em sua forma clássica, por dores musculares e articulares intensas. Tem como agente um arbovírus do gênero Flavivírus da família Flaviviridae, do qual existem quatro sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Trata-se caracteristicamente de enfermidade de áreas tropicais e subtropicais, onde as condições do ambiente favorecem o desenvolvimento dos vetores. Várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes* podem servir como transmissores do vírus da dengue. No Brasil, duas delas estão hoje instaladas: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Funasa, 2001).

O *Aedes aegypti* é uma espécie tropical e subtropical, encontrada em todo mundo, entre as latitudes 35°N e 35°S. Embora a espécie tenha sido identificada até a latitude 45°N, esta tem sido achada durante a estação quente, não sobrevivendo ao inverno (Funasa, 2001). *Aedes aegypti* é um inseto holometabólico, a fase larvária é o período de alimentação e crescimento. As larvas passam a maior parte do tempo alimentando-se principalmente de material orgânico acumulado nas paredes e fundo dos depósitos. O estágio larval tem o período aproximado entre cinco a sete dias.

A principal meta do controle de mosquitos é impedir a veiculação de organismos patogênicos ao homem. Para surtir efeito desejado e duradouro o controle deve agir simultaneamente combatendo ovos, larvas, pupas e adultos. O processo de combate às formas aquáticas e aos adultos deve ser idealizado em

longo prazo com constante monitoramento. A aplicação dos inseticidas químicos deve ser feita somente em casos de epidemia (Marcondes, 2001).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do local do criadouro a pleno sol e a sombra e dos diferentes volumes de água (10, 100, 1000 e 10000 mL) sobre a mortalidade dos estágios larvais L3 e L4 de *A. aegypti* expostas a *Heterorhabditis* sp. LPP35, isolado da fitotelmata de bromélia em áreas preservadas de Mata Atlântica, bem como avaliar a virulência do mesmo contra larvas de *A. aegypti* em condição de campo utilizando bromélias tanque do gênero *Neoregelia* como criadouros naturais.

Material e Métodos

Influência do volume de água do criadouro na patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. LPP35 sobre larvas L3 e L4 de *Aedes aegypti* sob condição de sombra e a pleno sol

Para estudar o efeito do local do criadouro a pleno sol e a sombra (Fig. 1), e o volume de água nos recipientes dos criadouros sobre a mortalidade dos estágios larvais L3 e L4 de *A. aegypti* quando expostos a *Heterorhabditis* sp. LPP35 foi realizado um bioensaio com dez repetições para cada tratamento, sendo monitorada a amplitude térmica de cada local durante a realização do experimento.



Figura1. Local dos experimentos no campus da UENF. a) a sombra; b) a pleno sol

Para os criadouros com capacidade volumétrica de 10 mL foram usados copos plásticos transparentes de 300 mL (Fig. 2a), nos quais foram acrescentados 10 mL de água de torneira, 10 larvas de mosquito e 1.000 JIs de *Heterorhabditis* sp. LPP35 em um mL de água. Para os criadouros de 100 mL

foram usados copos plásticos transparentes de 300 mL (Fig. 2b), onde em cada copo acrescentou-se 100 mL de água de torneira, 10 larvas de mosquito e 1.000 JIs *Heterorhabditis* sp. LPP35 em um mL de água. Nos criadouros de 1.000 mL foram usadas garrafas de politereftalato de etila (PET) transparentes de 2L (Fig. 2c), nos quais cada garrafa recebeu 1.000 mL de água de torneira, 10 larvas de mosquito e 1.000 JIs de *Heterorhabditis* sp. LPP35 em um mL de água. Para os criadouros com capacidade volumétrica de 10.000 mL foram utilizados baldes plásticos de cor verde ou azul de 15L (Fig. 2d), onde foram acrescentados 10.000 mL de água de torneira, 10 larvas de mosquito e 1.000 JIs de *Heterorhabditis* sp. LPP35 em um mL de água. Foram usados os mesmos recipientes, as mesmas doses de nematoides e a mesma quantidade de larvas de mosquito tanto nos tratamentos em pleno sol, quanto nos tratamentos à sombra. O experimento foi repetido no tempo nas duas estações do ano, inverno e verão. Todos os tratamentos tiveram um controle que consistiu de cada recipiente com as larvas de *Aedes* sem o acréscimo do nematoide. As avaliações foram diárias até a mudança de fase do mosquito (formação de pupa), contando-se o número de larvas vivas e mortas. As larvas mortas foram observadas em microscópio estereoscópio para verificar a presença de JIs. Para a análise estatística, as variáveis foram testadas quanto à homogeneidade das variâncias (testes de Cochran & Bartlett) e à normalidade dos erros (teste de Lilliefors), em 5% de probabilidade, utilizando-se o Sistema de Análises estatísticas (SAEG). A seguir, os dados foram submetidos à Anova em fatorial e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Todo o experimento foi repetido duas vezes, tendo-se feito uma análise conjunta das repetições no tempo.



Figura 2. Criadouros artificiais de *Aedes aegypti* com diferentes volumes. a) e b) Copos plásticos transparentes de 300 mL para os criadouros de 10 mL e 100 mL, c) Garrafas tipo PET para criadouros de 1.000 mL e d) baldes para criadouros de 10.000 mL.

Patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. LPP35 a larvas de *A. aegypti* em criadouros naturais.

Foi avaliada a patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. LPP35 contra larvas de 3^o e 4^o instares de *Aedes aegypti* em criadouros naturais de bromélias tanque da espécie *Neoregelia cruenta* (Figura 3). Foram considerados dois tratamentos: plantas inoculadas com *Heterorhabditis* sp. LPP35 e plantas sem aplicação de nematoides (testemunha).



Figura 3. Bromélia da espécie *Neoregelia cruenta* utilizadas como criadouros naturais de *A. aegypti* nos experimentos de semicampo.

Para o bioensaio, *Heterorhabditis* sp. LPP35 foi multiplicado em larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) e utilizados com até 10 dias de emergência. Para cada tratamento foram utilizadas dez repetições, e cada tanque de bromélias com capacidade aproximada de 500 mL de água recebeu dez larvas de *Aedes aegypti* e 10 mL de suspensão contendo 10.000 JIs (Figura 4a). As bromélias com aproximadamente 40 cm de altura foram envolvidas com tecido tipo voal com 1,50 m de diâmetro e posteriormente preso ao vaso das bromélias com tiras de elástico (Figura 4b), para evitar que os mosquitos escapassem.

Para a testemunha cada tanque de bromélias recebeu dez larvas de *Aedes aegypti* e foram adicionados 10 mL de água de torneira e as bromélias foram envolvidas com tecido tipo voal com 1,50 m de diâmetro e posteriormente preso ao vaso das bromélias com tiras de elástico. As avaliações foram diárias até a mudança de fase do mosquito (formação de pupa), contando-se o número de larvas vivas e mortas. As larvas do mosquito mortas foram recolhidas em placas de Petri de 9 cm e observadas em microscópio estereoscópio e mantidas em BOD, para confirmação da infecção através da presença de nematoides.

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



Figura 4. a. adição da suspensão de juvenis infectantes (JIs) ao tanque da bromélia; b. bromélias cobertas com tecido tipo voal.

Resultados e Discussão

As larvas expostas aos diferentes ambientes e a diferentes volumes dos criadouros tiveram de 27 a 92% de mortalidade (Tabela 1). Foi possível observar que houve interação significativa entre os fatores estudados, sendo que o volume dos criadouros influenciou diretamente na mortalidade das larvas de *A. aegypti* e foi possível observar uma redução na mortalidade nos criadouros de maior volume. Este comportamento ocorreu para os dois ambientes, a pleno sol e a sombra e nas duas épocas testadas. Na estação do verão ocorreu mortalidade dos tratamentos controle a pleno sol, o que pode ser explicado pela elevada temperatura registrada no local do experimento chegando a média de 41 °C. Este fato deixa em evidência que os criadouros com volumes de até 1000 mL em pleno sol na estação de verão não são favoráveis ao desenvolvimento do mosquito e do isolado de NEP.

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. aegypti* expostas ao isolado de *Heterorhabditis* sp LPP35 em ambiente de sol e sombra em criadouros com diferentes volumes, no verão e no inverno.

AMBIENTE	VERÃO			
	VOLUME (mL)	ÁREA DA BASE (cm ²)	Mortalidade	
			COM NEMATOIDE	SEM NEMATOIDE
SOL	10	19,625	100 Aa	100 Aa
	100	19,625	100 Aa	100 Aa
	1000	78,50	95 Aa	100 Aa
	10000	314,0	34 Ab	14 Bb
SOMBRA	10	19,625	92 Aa	1 Bb
	100	19,625	66 Ab	12 Ba
	1000	78,50	52 Abc	5 Bb
	10000	314,0	27 Ac	2 Bb
INVERNO				
	VOLUME (mL)	ÁREA DA BASE (cm ²)	Mortalidade	
SOL	10	19,625	78 Aa	0.00 Ba
	100	19,625	80 Aa	0.00 Ba
	1000	78,50	67 Aa	0.00 Ba
	10000	314,0	26 Ab	7 Bb
SOMBRA	10	19,625	91 Aa	5 Ba
	100	19,625	76 Ab	6 Ba
	1000	78,50	70 Abc	2 Ba
	10000	314,0	48 Ac	1 Ba

Letras iguais maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si em 5% de probabilidade. Os dados são média de duas repetições no tempo.

Em tanques de bromélias, *Heterorhabditis* sp. LPP35 causou uma taxa de 24 % de mortalidade em larvas L3 e L4 de *A. aegypti* (Figura 5). Ao comparar o sistema aquático do experimento com os sistemas agrícolas observa-se que a dessecação não é um fator limitante para o uso dos NEPs nos criadouros de *A.aegypti*, entretanto fatores como matéria orgânica e o pH dos criadouros podem interferir na eficiência dos NEPs como agentes de controle biológico.

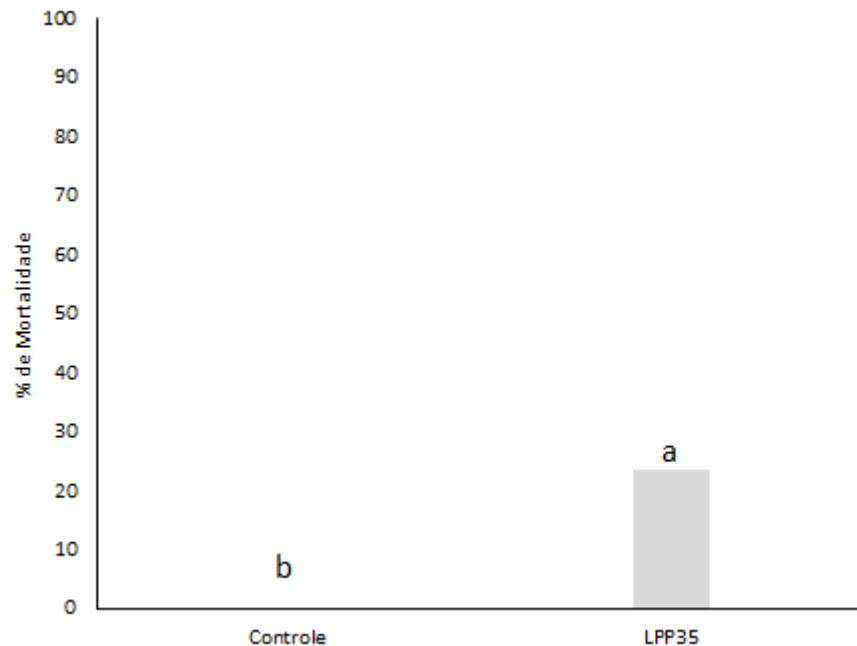


Figura 5. Porcentagem de mortalidade de larvas L3 e L4 de *A. aegypti* após a exposição a juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. LPP35 em tanques de bromélias da espécie *Neoregelia cruenta*. Os valores são médias de dez repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey em 5%.

Estudos mostram que os tanques de bromélias tendem a ser um ambiente menos adequado para o desenvolvimento de larvas de *A.aegypti* devido à acidificação gerada pela fisiologia da bromélia (Lopez, etal. 2011), porém nesse bioensaio através da lavagem do tanque de bromélias, verificou-se a presença de pulpas e larvas vivas após o encerramento do experimento.

A presença de insetos sobre estes criadouros é diversificada e principalmente relacionada com o tamanho da planta, a forma de exposição à luz, e a quantidade de materia orgânica presente nos tanques (Araújo etal. 2007). Estudos sobre a fauna associada à bromélia produziram uma lista de espécies com informações sobre o papel epidemiológico destas plantas como criadouros

para mosquitos, incluindo mosquitos vetores de doenças como a dengue e a malária (Delgado e Machado-Allison, 2006).

No ensaio utilizando os criadouros naturais das bromélias, um substrato desigual, em oposição ao fundo liso dos recipientes de plástico utilizados nos ensaios em laboratório diminuiu a exposição dos nematoides às larvas de *A. aegypti*. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Finney & Harding (1981), que observaram que ao modificar o fundo dos recipientes com diferentes materiais alterava a taxa de mortalidade das larvas de *A. aegypti*, tornando o controle menos eficaz.

Dois fatores podem estar inter-relacionados: a taxa de ocupação do nematoide para a parte inferior do substrato e, como Welch (1962) apontou, a rugosidade do substrato onde habitam as larvas do mosquito no qual o desnível diminuiria as chances de pastagem das larvas ao se alimentarem dos nematoides.

No entanto, os resultados apresentados indicam claramente que a disponibilidade dos nematoides para o hospedeiro é diminuída quando um substrato está presente (como o material orgânico presente no fitotelmata das bromélias). Embora os recipientes plásticos de fundo liso possam ser utilizados com sucesso para os testes de susceptibilidade de larvas de mosquito em laboratório, é preciso ter cuidado na extrapolação dos resultados para a determinação de doses eficazes de medidas de controle do mosquito a campo. Desta forma, atenção especial deverá ser dada à natureza do habitat (s) das espécies alvo.

Assim, surge a oportunidade de novos trabalhos usando o isolado como forma de controle das larvas do mosquito da dengue, já que o uso de NEPs como agentes de controle dos vetores de doenças transmitidas por mosquitos como a dengue é uma linha de pesquisa recente que necessita de estudos complementares.

Referências Bibliográficas

Araújo V.A, Melo S.k, Araújo Apa, Gomes MIM And Carneiro MAA. (2007). Relationship between invertebrate fauna and bromeliad size. Braz J Biol 67: 611 617.

Cagnolo, S.R. and Walter R.A (2010) Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasite *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae) Rev. Soc. Entomol. Argent. 69 (1-2): 141-145.

Chambers, U., Bruck, D.J., Olsen, J. and Walton, V.M. (2010) Control of overwintering filbertworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae with *Steinernema carpocapsae*. *J. Econom. Entomol.* 103, 416-422.

Delgado L, Machado-Allison CE. 2006. La comunidade de insectos acuáticos asociados a *Alocasiamacrorrhiza* en Venezuela. Composición de la fauna y aspectos de su historia natural. *Entomotropica* 21: 105–115.

Finney, J.R. & Harding, J.B. (1981). Some factors affecting the use of *Neoaplectana* sp. For mosquito control. -- *Mosquito News*, 41, 798-800.

Funasa, (2001). Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor : manual de normas técnicas. - 3. ed., rev. - Brasília : Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde, 2001. 84 p.

Lopez, L C.S., Silva E. G.B., Beltra, M.G., Leandro, R.S., Barbosa, J.E. L., Beserra E. B. (2011). Effect of tank bromeliad micro-environment on *Aedes aegypti* larval mortality *Hydrobiologia* 665:257–261

Marcondes, C. B. *Entomologia Médica e Veterinária*. São Paulo: Atheneu, 2001.

Zohdy, N.M. Shamseldean, M.M., Abd-El-Samie, E.M. and Hamama H.M. (2013). Efficacy of the Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes for Controlling the Mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) *Journal of Mosquito Research*, Vol.3, No.5, 33-44 (doi: 10.5376/jmr.2013.03.0005)

Welch, H. E. & Bronskill, J. F. (1962). Parasitism of mosquito larvae by the nematode, DD-136 [Nematoda : Neoaplectanidae]. -- *Can. J. Zoology*, 40, 1263-1268.

3.3 Identificação do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp. LPP35 pela análise morfométrica.

Resumo: Espécimes de população de nematoide entomopatogênico do gênero *Heterorhabditis* foram retirados de um tanque em uma bromélia nativa da mata Atlântica no Parque Estadual do Desengano, no município de Campos dos Goytacazes- RJ. Estudos morfométricos indicam se tratar de uma nova espécie de *Heterorhabditis*. *Heterorhabditis* sp. LPP35 é distinta de outras espécies do gênero descritas pelo comprimento do corpo dos juvenis infectantes (JIs) exceto *H. Baujardi*, Phan et al (2003). Pelo valor do NR (distância da extremidade ao anel nervoso) exceto de *H. Sonorensis*, Stock et al (2009). Quando comparado o número de papilas bursais das espécies do grupo indica, *Heterorhabditis* sp. LPP35 apresentou o mesmo padrão que as espécies *H. indica*, *H. baujardi*, *H. floridensis*, com 9 pares de papilas bursais. Diferentemente das espécies *H. mexicana* e *H. amazonense* que apresentam 8 pares de papilas. Foi observada uma grande flexibilidade no gubernáculo. Essa flexibilidade é demonstrada quando o espículo foi ejetado, e a parte superior do gubernáculo apresentou uma curvatura, o mesmo não foi observado quando o espículo não estava ejetado. Estas características são observadas em *Heterorhabditis baujardi*.

Palavras-chave: taxonomia, nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis*.

Abstract – Specimens population of entomopathogenic nematode of the genus *Heterorhabditis* were taken from a tank in a bromeliad native Atlantic forest in the Parque Estadual do Desengano, in the city of Campos dos Goytacazes- RJ. Morphometric studies indicate it is a new species of *Heterorhabditis*. *Heterorhabditis* sp. LPP35 is distinct from other species of the genus described by body length of infective juveniles (IJs) except *H. baujardi*. Phan et al (2003). By the value of NR (distance from end to nerve ring) except *H. sonorensis*. Stock et al (2009). Compared the number of bursal buds species group indicates, *Heterorhabditis* sp. LPP35 showed the same pattern indicates that the species *H. H. baujardi*, *H. floridensis* with nine pairs of bursal buds. Unlike the *H. mexicana* and *H. amazonense* species with 8 pairs of papillae. Great flexibility in gubernaculum was observed. This flexibility is demonstrated when the spicule was ejected, and the top of the gubernaculum showed a curvature, the same was not observed when the spicule was not ejected. These features are observed in *Heterorhabditis baujardi*.

Keywords: morphometric, entomopatogenic nematode, *Heterorhabditis*.

Introdução

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são parasitas obrigatórios de insetos e são usados como agentes de controle biológico de pragas de importância econômica (Adams et al. 2006). São utilizados contra uma ampla gama de insetos que incluem além das pragas de solo, insetos praga da parte aérea que apresentam parte do seu ciclo de vida no solo, e insetos que habitam em ambientes crípticos (Tavares, 2010).

Nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* possuem associação com bactérias simbiotes que causam morte rápida do inseto, em 24 a 72 horas, por septicemia (Griffin et al 2005).

Estes gêneros de nematoides apresentam associação simbiote com bactérias patogênicas, gênero *Xenorhabdus* sp. associado a *Steinernema* e *Photorhabdus* sp. a *Heterorhabditis* (Poinar, 1990). Assim que os IJs atingem a hemocele do inseto, ocorre a liberação das bactérias simbiotes que causarão infecção e morte do hospedeiro. Estas mesmas bactérias após proliferarem

servem de base para a nutrição dos nematoides e para defesa contra invasores secundários (Poinar, 1990). Antes dos JIs deixarem o cadáver, as bactérias simbiontes são apreendidas na vesícula especializada nos NEPs do gênero *Steinernema*, já para as espécies pertencentes ao gênero *Heterorhabditis*, as bactérias simbiontes são apreendidas e armazenadas na região anterior do intestino dos JIs, que não possui vesícula (Adams & Nguyen, 2002).

A descoberta de novas espécies de nematoides entomopatogênicos pode melhorar o processo de utilização destes organismos em programas de controle biológico, pois indivíduos melhor adaptados a um determinado habitat podem vir a ser melhores controladores de insetos praga daquele habitat. As descrições de espécies com dados morfológicos e moleculares podem ser usadas para identificar, diagnosticar e delimitar parâmetros para o aperfeiçoamento da identificação de outras espécies (Powers et al. 1997).

O objetivo do trabalho foi caracterizar morfológicamente indivíduos do isolado *Heterorhabditis* sp. LPP35, obtidos do fitotelmata de uma bromélia nativa da Mata Atlântica do Parque Estadual do Desengano, no município de Campos dos Goytacazes- RJ.

Material e Métodos

O nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp. LPP35 foi encontrado no fitotelmata de bromélias do gênero *Nidularium* em um estudo de levantamento da nematofauna associada a bromélias na floresta atlântica, com uma vegetação de floresta ombrófila densa a 400 metros de altitude no Parque Estadual do Desengano - RJ. Os espécimes encontrados foram retirados da amostra com o auxílio de uma pipeta graduada de 100 microlitros e armazenados em uma cubeta de vidro de 5 mL. Esta suspensão foi usada para inocular larvas de *Galleria mellonella*, que foram incubadas em BOD de 25 °C. Posteriormente, as larvas que apresentaram sinal típico de infecção por NEPs foram colocadas em armadilha de White modificada e após a emergência dos JIs estes foram coletados e armazenados em BOD de 16 °C, sendo feitas novas infecções periodicamente para manutenção dos mesmos no banco de NEPs do laboratório de Nematologia da UENF.

Para a identificação os nematoides (machos, fêmeas e hermafroditas) foram mortos pelo calor (60 °C) e fixados em formalina em 4% (Carta & Osbrink, 2005). Para microscopia de luz, pelo menos 20 machos, 20 fêmeas de primeira geração, 20 fêmeas de segunda geração e 30 juvenis infectantes foram observados. Os dados morfométricos analisados para todos os espécimes foram: comprimento do corpo (W); largura do corpo (L); distância da região anterior ao fim do esôfago (Es); distância da região anterior ao poro excretor (Ep), distância da região anterior ao anel nervoso (NR); comprimento da cauda (T) ; largura do corpo na região do ânus (ABW); a (relação entre o comprimento do corpo e a maior largura do corpo), b (relação entre o comprimento do corpo e o comprimento do esôfago), c (relação entre o comprimento do corpo e o comprimento da cauda).

Além das medidas acima em juvenis infectantes foram calculados $E\% = Ep/T \times 100$. Já em machos foram medidos comprimentos dos espículos (SP), do testículo reflexo (TR), e do gubernáculo (GU) e calculado o $D\% = EP/ES \times 100$. Nas fêmeas de primeira (hermafroditas) e segunda geração o V% (que é a distância do término anterior até a vulva dividido pelo comprimento do corpo) foi calculado.

Foram confeccionadas lâminas temporárias para a análise morfométrica, e os espécimes foram observados em microscópio óptico Nikon I80 equipado com contraste diferencial de interferência (DIC) e câmera digital Nikon. Para mensurações foi utilizado o programa Image Pro-plus versão 3.0 para Windows. Todos os dados morfométricos foram analisados pela análise estatística multivariada, utilizando o aplicativo SAEG.

Resultados e Discussão

A descrição precisa de uma nova espécie de nematoide é uma tarefa especialmente complexa, devido à diversidade morfológica e reprodutiva dos nematoides (Nadler, 2002).

Após análise das variáveis morfométricas da linhagem LPP35, o isolado *Heterorhabditis* sp. LPP35 é distinto de outras espécies do gênero descritas pelo comprimento do corpo dos juvenis infectantes (JIs) exceto *H. baujardi*. Pelo valor do NR (distância da extremidade ao anel nervoso) exceto de *H. sonorensis*. Os

machos do isolado *Heterorhabditis* sp. LPP35 diferem das demais espécies identificadas na comparação morfométrica do comprimento do corpo (L), na largura do corpo (W). Porém, na análise morfométrica do diâmetro do corpo na posição anal (ABW) não foi observada diferença entre as seguintes espécies: *H. sonorensis*, *H. downesi*. Além de valores do comprimento do gubernáculo (GU) serem próximos de *H. indica* (Tabela 1).

Stock e Kaya (1996) sugeriram que o comprimento do corpo e comprimento da cauda dos juvenis é importante na identificação de espécies, assim como o tamanho dos testículos do macho, a largura do corpo, o comprimento do esôfago e o comprimento total que servem como parâmetros para a avaliação morfológica.

Lee (2004) relata a necessidade de integração entre a taxonomia clássica envolvendo medidas morfométricas e técnicas avançadas de diagnose. Em conclusão, as técnicas moleculares não devem ser consideradas de maneira isolada, como propôs Tautz et al. (2003), mas como ferramenta de auxílio para a segura e correta identificação da espécie.

No presente estudo *Heterorhabditis* sp. LPP35 apresenta alguns valores morfométricos que aproximam o isolado ao “grupo - *indica*” (Tabela 2 e 3) (Nguyen et al. 2004; Andaló et al. 2006), que inclui as espécies *H. indica*, *H. baujardi*, *H. mexicana*, *H. floridensis* Nguyen, Gozel, Koppenhofer e Adams e *H. amazonensis* Andaló, Nguyen e Moino Jr.

Tabela 1. Morfometria de diferentes estágios de *Heterorhabditis* sp. LPP35. Todas as medidas em μm .

	Macho	Fêmea de 1 ^a geração	Fêmea de 2 ^a geração	Juvenis Infectantes
Caracteres				
n	20	20	20	30
Comprimento do corpo (L)	774 \pm 75 723-799	2339 \pm 129 1705-2766	796 \pm 64 675-986	574 \pm 113 492 - 606
a = L/MBD				29 \pm 8 25 - 33
b = L/ES				4 \pm 1 3 - 4
c = L/T				5 \pm 1 4 - 5
V		1082 \pm 520 783 - 1303	412 \pm 37 338 - 515	
V%		46 \pm 4 43 - 48		
Maior diâmetro do corpo (W)	46 \pm 3 45 - 48	127 \pm 13 88 - 198	56 \pm 16 65 - 49	19 \pm 4 22 - 17
Comprimento do estôma		8 \pm 4 7 - 11	7 \pm 1 5 - 10	
Diâmetro do estôma		12 \pm 5 8 - 14	5 \pm 1 2 - 62	
EP	114 \pm 16 109-125	168 \pm 45 192 - 146	108 \pm 8 91 - 127	102 \pm 10 97 - 108
NR	75 \pm 13 68 - 81	126 \pm 27 113 - 141	86 \pm 4 72 - 96	88 \pm 8 84 - 93
ES	100 \pm 9 97 - 106	165 \pm 33 184 - 150	110 \pm 5 95 - 118	121 \pm 9 127 - 117
Testículo reflexo (TR)	109 \pm 2 98 - 116			
Comprimento da cauda (T)	38 \pm 9 33 - 42	99 \pm 50 75 - 125	71 \pm 4 80 - 59	103 \pm 10 100 - 110
Diâmetro na altura do ânus (ABW)	23 \pm 7 20 - 27	42 \pm 23 35 - 58	23 \pm 1 20 - 25	12 \pm 3 11 - 14
Comprimento do espículo(SP)	38 \pm 7 35 - 42			
Comprimento do gubernáculo (GU)	20 \pm 1 18 - 24			
D% = EP/ES x 100	114 \pm 2 107 - 125			83 \pm 10 78 - 89
E% = EP/T x 100				98 \pm 12 91 - 104
SW% = SP/ABD x 100	165 \pm 9 137 - 196			
GS% = GU/SP x 100	52 \pm 2 47 - 60			

V% distância do término anterior até a vulva dividido pelo comprimento do corpo ; EP, distância da região anterior ao poro excretor; NR, distância da região anterior ao anel nervoso; ES, distância da região anterior ao fim do esôfago.

Tabela 2. Comparação morfométrica de machos *Heterorhabdits* sp. LPP35 e outras espécies já relatadas. Fonte: (Malan *et al* 2014)

Caract.	Isolado LPP35	TAY Shamselda et al. (1996)	IND Poinar <i>et al.</i> (1992)	NOE n. sp. SF669	BAU Phan <i>et al</i> (2003)	SOR Stock <i>et al</i> (2009)	FLO Nguyen <i>et al</i> (2006)
n	20	20	12	20	14	20	20
L	774±75 (723 -799)	703±23 (648-736)	721±64 (573-788)	649±72 (530-775)	889±45 (818-970)	725±31 (500-750)	862±44 (785-924)
W	46±3 (45- 48)	44±2 (38-48)	42±7 (35-46)	41±3 (34-46)	49±2 (43-53)	37±3 (32-42)	47±2,2 (43-50)
EP	114±16 (109- 125)	95±12 (78-120)	123±7 (109-138)	86±7 (75-102)	81±7 (71-93)	73±5 (60-84)	117±6 (104-128)
NR	75±13 (61-68)	65±12 (54-88)	75±4 (72-85)	67±3 (64-75)	65±7 (54-77)	71±5 (60-80)	80±5 (73-90)
ES	100±9 (97 - 106)	112±13 (85-123)	101±4 (93-109)	95±5 (88-106)	116±10 (105-132)	93±7 (80-100)	105±4 (97-111)
T	38±9 (33-42)	25±5 (20-29)	28±2 (24-32)	25±2 (21-32)	33±3 (28-38)	34±5 (25-45)	34±6 (29-40)
ABW	23±7 (20- 27)	25±3 (21-30)	23±8 (19-24)	19±2 (15-22)	22±1 (20-24)	25±2 (20-30)	26±3 (20-31)
SP	38±7 (35 - 42)	39±5 (30-42)	43±3 (35-48)	43±4 (37-49)	40±3 (33-45)	39±3 (31-45)	42±4 (36-46)
GU	20±1 (18 - 24)	18±3 (14-21)	21±3 (18-23)	20±2 (17-24)	20±1,5 (18-22)	22±3 (20-31)	23±4 (17-30)
D%	114±2 (107 - 125)	88 -	18 -	90±6 (81-108)	70 -	79±6 (72-91)	112±4 (105-119)
SW%	165±9 (137 - 196)	156 -	187 -	231±24 (202-301)	182±18 (138-208)	150 -	157±25 (133-209)
GS%	52±2 (47 - 60)	46 -	50±10 (40-60)	47±4 (38-56)	50±5 (44-61)	60 -	54±26 (47-65)

n= número de indivíduos mensurados; L= comprimento do corpo ; W= largura do corpo; EP= distância da região anterior a poro excretor; NR= distância da região anterior a anel nervoso; ES= distância da região anterior à junção esôfago-intestino; T= comprimento da cauda; ABW= diâmetro na altura do ânus; SP= comprimento do espículo, GU= comprimento do gubernáculo; D% = relação percentual ente a distância da região anterior ao poro excretor e a distância da extremidade anterior ao esôfago; SW% = relação percentual entre o comprimento do espículo e a largura do corpo na altura do ânus; GS% = relação percentual entre o comprimento do gubernáculo e comprimento do espículo; TAY, *H. taysearae*; IND, *H. indica*; NOE, *H. noenieputensis* n. sp.; BAU, *H. baujardi*; SOR, *H. sonorensis*; FLO, *H. floridensis*; Mensurações das espécies relatadas fonte: Malan *et al* 2014

Tabela 2, Cont.

Caract.	Isolado LPP35	MEX Nguyen <i>et al.</i> (2004)	AMA Andaló <i>et al.</i> (2006)	GEO Nguyen <i>et al.</i> (2008)	SAF Malan <i>et al.</i> (2008)	GER Plichta <i>et al.</i> (2009)	DOW Stock <i>et al.</i> (2002)
n	20	20	20	20	20	20	19
L	774±75 (723 -799)	686±38 (614-801)	752±43 (692-826)	838±48 (721-913)	892±66 (777-1009)	745±160 (508-916)	800±76 (669-876)
W	46±3 (45 - 48)	42±3 (38-47)	41±2,3 (36-43)	49±3,3 (43-55)	49±4,5 (40-58)	42±3,9 (34-48)	36±3 (33-40)
EP	114±16 (109 - 125)	124±10 (108-145)	109±6 (96-116)	120±12 (101-145)	135±11 (104-147)	125±11,2 (93-141)	89±2 (86-91)
NR	75±13 (61-68)	71±6 (61-83)	79±5 (71-88)	82±6 (72-93)	64±8 (52-81)	69±11 (54-87)	70±7 (62-78)
ES	100±9 (97 - 106)	96±5 (89-108)	105±5 (97-114)	109±6 (100-122)	115±5 (105-126)	103±9 (78-115)	101±3 (97-106)
T	38±9 (33 - 42)	27±4 (21-36)	33±3 (29-41)	33±4 (29-41)	35±5 (27-49)	28±5 (28-46)	32±2 (29-34)
ABW	23±7 (20 - 27)	24±1 (23-27)	27±3 (23-33)	26±2 (23-28)	24±3 (18-27)	24±2 (15-27)	24±2 (21-28)
SP	38±7 (35 - 42)	41±4 (30-47)	41±3 (35-45)	44±2 (41-49)	45±4 (35-54)	43±4 (34-48)	43±2 (41-47)
GU	20±1 (18 - 24)	23±3 (18-32)	21±2 (19-23)	25±3 (20-28)	24±2 (19-27)	22±3 (16-27)	18±1 (17-20)
D%	114±2 (107 - 125)	129±9 (114-149)	103±4 (95-109)	110±6 (100-122)	117±10 (92-133)	121±19 (100-172)	- -
SW%	165±9 (137 - 196)	167±20 (130-196)	152±20 (120-187)	172±14 (150-200)	196±32 (130-259)	183±28 (138±274)	180±20 (170-220)
GS%	52±2 (47 - 60)	56±7 (43-70)	51±3 (44-56)	56±6 (51-64)	54±5 (43-62)	51±8 (40-69)	43±4 (36-47)

n= número de indivíduos mensurados; L= comprimento do corpo ; W= largura do corpo; EP= distância da região anterior a poro excretor; NR= distância da região anterior a anel nervoso; ES= distância da região anterior à junção esôfago-intestino; T= comprimento da cauda; ABW= diâmetro na altura do ânus; SP= comprimento do espículo, GU= comprimento do gubernáculo; D% = relação percentual ente a distância da região anterior ao poro excretor e a distância da extremidade anterior ao esôfago; SW% = relação percentual entre o comprimento do espículo e a largura do corpo na altura do ânus; GS% = relação percentual entre o comprimento do gubernáculo e comprimento do espículo; MXA= *H. mexicana*, *AMA*, *H. amazonensis*; *GEO*, *H. georgiana*; *SAF*, *H. safricana*; *GER*, *H. gerrardi*; *DOW*, *H. downesi*. Mensurações das espécies relacionadas fonte: Malan *et al.* 2014

Tabela 3. Comparação morfométrica de juvenis infectantes de *Heterorhabdits* sp. LPP35 e outras espécies já relatadas. Fonte: (Malan *et al.* 2014)

Caract.	Isolado LPP35	TAY Shamselda <i>et al.</i> (1996)	IND Poinar <i>et al.</i> (1992)	NOE n. sp. SF669	BAU Phan <i>et al.</i> (2003)	SOR Stock <i>et al.</i> (2009)	FLO Nguyen <i>et al.</i> (2006)
N	30	30	25	25	25	25	25
L	574±113 (492-606)	418±38 (332-499)	528±26 (479-573)	536±21 (484-578)	551±27 (497-595)	557±28 (495-570)	562±24 (554-609)
A	29±8 (25 – 33)	21±2 (16-27)	26±4 (25-27)	24±1 (21-27)	28±1 (26-31)	23±1,5 (19-26)	28±5 (25-32)
B	4±1 (3 –4)	3,8±0,2 (3,4-4,2)	4,5±0,34 (4,3-4,8)	4,9±0,2 (4,3-5,2)	4,8±0,2 (4,5-5,1)	4,8±0,4 (4,4-5,4)	4,3±2,1 (3,9-4,9)
C	5±1 (4 –5)	7,7±0,7 (6,5-8,7)	5,3±0,5 (4,5--5,6)	6,2±0,3 (5,5-6,8)	6±0,3 (6-6,7)	5,5±1,0 (4,0-6,5)	5,6±2,4 (5,3-6,6)
W	19±4 (17 –22)	20±2 (17-23)	20±6 (19-22)	23±1 (21-25)	20±2 (18-22)	26±4 (19-32)	21±5 (19-23)
EP	102±10 (97 – 108)	90±9 (74-113)	98±7 (88-107)	97±3 (88-105)	97±3 (91-103)	99±5 (97-116)	109±10 (101-122)
NR	88±8 (84 – 93)	74±7 (58-87)	82±4 (72-85)	81±6 (69-96)	81±3 (75-86)	93±4 (87-98)	86±9,2 (68-107)
ES	121±9 (117–127)	110±8 (96-130)	117±3 (109-123)	106±9 (79-115)	115±3 (107-120)	119±7 (110-131)	135±11,6 (123-142)
T	103±10 (100–110)	55±7 (44-70)	101±6 (93-109)	86±3,4 (78-95)	90±4 (83-97)	105±7 (91-125)	103±10 (91-113)
ABW	12±3 (11– 14)	-	-	14±1,0 (12-16)	13±0,7 (11-14)	16±2,0 (13-16)	14±3,7 (12-16)
D%	83±10 (78 – 89)	83±6 (71-96)	84±5 (79-90)	89±3 (81-95)	84±3 (78-88)	90±8,5 (78-110)	81±8,9 (71-90)
E%	98±12 (91 – 104)	180±27 (110-230)	94±7 (83-103)	113±6 (99-125)	108±4 (98-114)	99±8 (81-111)	105±10 (95-134)

n= número de indivíduos mensurados; L= comprimento do corpo; a = comprimento do corpo dividido pela largura do corpo; b = comprimento do corpo dividido pela distância da extremidade anterior ao poro excretor; c = comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda, W= largura do corpo; EP= distância da região anterior a poro excretor; NR= distância da região anterior a anel nervoso; ES= distância da região anterior à junção esôfago-intestino; T= comprimento da cauda; ABW= diâmetro na altura do ânus; D% = relação percentual ente a distância da região anterior ao poro excretor e a distância da extremidade anterior ao esôfago; E%= relação percentual entre a distância da extremidade anterior ao poro excretor e o comprimento da cauda; TAY, *H. taysearae*; IND, *H. indica*; NOE, *H. noenieputensis* n. sp.; BAU, *H. bajardi*; SOR, *H. sonorensis*; FLO, *H. floridensis*;. Mensurações das espécies relatadas fonte: Malan *et al.* 2014

Tabela 3, Cont.

Caract.	Isolado LPP35	MEX Nguyen <i>et al.</i> (2004)	AMA Andaló <i>et al.</i> (2006)	GEO Nguyen <i>et al.</i> (2008)	SAF Malan <i>et al.</i> (2008)	GER Plichta <i>et al.</i> (2009)	DOW Stock <i>et al.</i> (2002)
n	30	25	20	20	25	25	20
L	574±113 (492-606)	578±23 (530-620)	589±12 (567-612)	598±27 (547-651)	600±27 (550-676)	604±39 (551-683)	637±32 (588-692)
A	29±8 (25 – 33)	26 (23-28)	26±1 (24-29)	27±3 (23-34)	29±2 (248-31,8)	13±3 (23-32)	35±4 (29-42)
b	4±1 (3 – 4)	4,6 (4,2-5,1)	4,9±0,3 (4,4-5,5)	4,7±0,3 (4,1-5,3)	4,5±0,2 (3,9-4,9)	0,21±0,02 (0,14-0,23)	4,7±0,3 (4,4-5,3)
c	5±1 (4 – 5)	5,9 (5,5-6,3)	5,5±0,2 (5,1-6,1)	6,1±0,4 (5,5-6,9)	6,4±0,6 (5,4-7,5)	0,17±0,03 (0,11-0,21)	9,5±5 (8,5-10,5)
W	19±4 (17 – 22)	23±1 (20-24)	23±1 (20-24)	22±2 (17-26)	21±1 (19-23)	23±3 (18-29)	18±2 (15-22)
EP	102±10 (97 – 108)	102±5 (83-109)	107±6 (89-115)	104±4 (97-113)	110±4 (103-122)	98±6 (92-111)	115±8 (96-128)
NR	88±8 (84 – 93)	81±4 (74-88)	85±5 (76-93)	85±5 (74-94)	93±4 (86-101)	93±18 (81-105)	101±3 (96-105)
ES	121±9 (117 – 27)	122±27 (104-142)	121±6,6 (107-132)	127±7 (110-139)	131±3,7 (125-141)	124±5 (110-130)	134±4 (126-141)
T	103±10 (100 110)	99±4 (91-106)	107±5 (98-115)	98±5 (86-108)	93±6 (86-108)	102±14 (76-141)	69±4 (62-74)
ABW	12±3 (11 – 14)	15±1,2 (12-17)	14±1,4 (13-17)	15±1,5 (13-17)	13±0,6 (12-14)	15±2,9 (12-21)	12±1 (9-14)
D%	83±10 (789 – 89)	81±3 (72-86)	88±2,7 (83-92)	- (70-93)	84±2,6 (80-90)	80±0,5 (73-92)	85±5 (76-98)
E%	98±12 (91 – 104)	104±5 (87-111)	100±6 (89-109)	107±8 (95-117)	119±9 (99-133)	99±2 (73-138)	170±10 (160-180)

n= número de indivíduos mensurados; L= comprimento do corpo; a = comprimento do corpo dividido pela largura do corpo; b = comprimento do corpo dividido pela distância da extremidade anterior ao poro excretor; c = comprimento do corpo dividido pelo comprimento da cauda, W= largura do corpo; EP= distância da região anterior a poro excretor; NR= distância da região anterior a anel nervoso; ES= distância da região anterior à junção esôfago-intestino; T= comprimento da cauda; ABW= diâmetro na altura do ânus; D%= relação percentual ente a distância da região anterior ao poro excretor e a distância da extremidade anterior ao esôfago;E%= relação percentual entre a distância da extremidade anterior ao poro excretor e o comprimento da cauda; MXA= *H. mexicana*, *AMA*, *H. amazonensis*; *GEO*, *H. georgiana*; *SAF*, *H. safricana*; *GER*, *H. gerrardi*; *DOW*, *H. downesi*. Mensurações das espécies relatadas fonte: Malan *et al.* 2014.

Nguyen et al. (2004) afirmam que o número de papilas da bursa é geralmente constante entre espécies de *Heterorhabditis*; porém Dolinski et al. (2008) analisando amostras de LPP1, LPP2, LPP4 e LPP7 e diferentes espécies descritas de nematoides, observaram números e formas variadas de papilas dentro de uma mesma espécie.

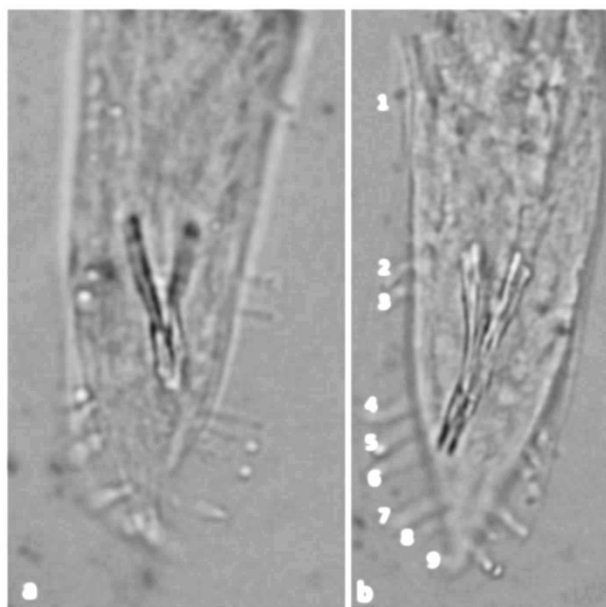


Fig 1. a e b. Microscopia de luz mostrando número de papilas bursais na região posterior de machos de *Heterorhabditis* sp. LPP35.

No presente estudo quando comparado o número de papilas bursais das espécies do grupo-*indica*, observou-se que o padrão é o mesmo das espécies *H. indica*, *H. baujardi*, *H. floridensis*, com 9 pares de papilas bursais (Figura 1), mas diferente das espécies *H. mexicana* e *H. amazonenses*, que apresentam 8 pares de papilas.

O estudo da morfologia do gubernáculo nos machos é um caráter que tem demonstrado consistência, devido à sua fidelidade morfológica ao longo do tempo, mas machos de uma mesma espécie observados em microscópio de luz apresentaram uma grande flexibilidade no gubernáculo (Dolinski et al. 2008).

Segundo Dolinski et al 2008, a forma do gubernáculo é um caráter morfológico constante entre todas as espécies estudadas de *Heterorhabditis*, e pode ser considerado como um bom candidato para fins de identificação.

Em nosso estudo 20 machos de *Heterorhabditis* sp. LPP35 foram observados em microscópio de luz e percebemos uma grande flexibilidade no

gubernáculo. Essa flexibilidade foi demonstrada quando o espículo foi ejetado, e a parte superior do gubernáculo apresentou uma curvatura (Figuras 2a), o mesmo não foi observado quando o espículo não estava ejetado (Figuras 2b). Estas características são observadas em *Heterorhabditis baujardi*. De acordo com Phan et al. (2003), *Heterorhabditis baujardi* é morfometricamente similar ao *H. indica*, mas pode ser separado de *H. indica* pela forma do gubernáculo e o número de pares de papilas da bursa. O gubernáculo de *H. baujardi* possui a extremidade curva que se assemelha a *H. bacteriophora*. *Heterorhabditis baujardi* pode ser separado deste último pelo menor comprimento do corpo dos juvenis infectantes e por apresentarem espículos e gubernáculos mais longos.

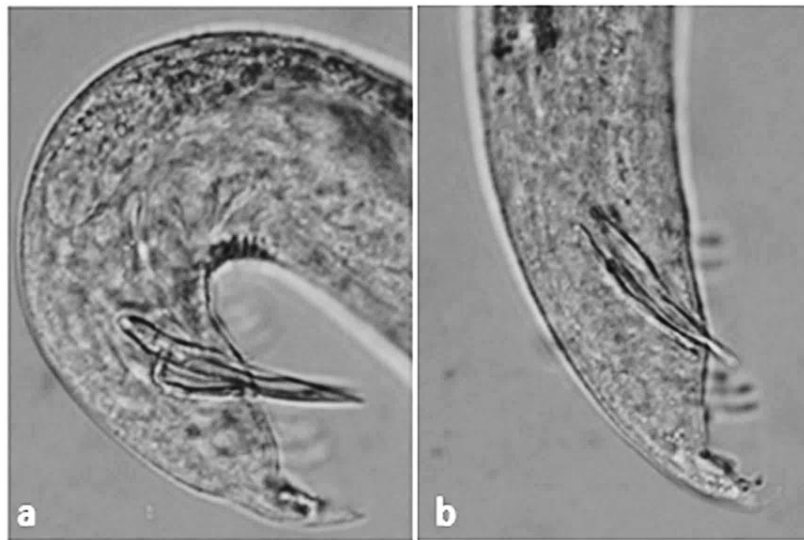


Fig 2. a) Microscopia de luz mostrando espículo ejetado e curvatura do gubernáculo de machos de *Heterorhabditis* sp. LPP35; b) Microscopia de luz mostrando espículo não ejetado e gubernáculo sem curvatura.

Referências Bibliográficas

Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Stock, S.P., Klein, M.G. (2006) Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control*, 37:32-49.

- Adams, B. J. Burnell, A. M., Powers, T.O. (1998) A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on Internal Transcribed Spacer 1 DNA sequence data. *Journal of Nematology*, 30: 22-39.
- Andalo, V., Nguyen, K. B., Alcides, M. (2006) *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology*, 8: 853-867.
- CARTA, L.K. & W. OSBRINK. 2005. *Rhabditis rainai* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) associated with the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Nematology*, 7 (6): 863-879.
- Dolinski, C., Kamitani, F.L., Machado, I.R., Winter, C.E. (2008) Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103: 150-159.
- Griffin, C.T., N.E. Boemare & E.E. Lewis.(2005). Biology and Behaviour. In: GREWAL, P.S.; R.U. EHLERS & D.I. SHAPIRO-ILAN (ed). *Nematodes as Biocontrol Agents*. CAB International, Wallingford (UK). p. 47-64.
- Lee, M.S.Y. (2004) The molecularisation of taxonomy. *Invertebrate Systematics*, 18: 1-6.
- Nguyen, K.B., Hunt, D.J. (2007) *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*. Boston, MA, U.S.A.: Brill, 832 pp.
- Phan L.K., Subbotin S.A., Nguyen C.N., Moens M. (2003) *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam with morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology*, 5: 367-382.
- Powers, T.O., Todd, T.C., Burnell, A.M., Murray, P.C.B., Fleming, C.C., Szalanski, A.L. Adams, B.A., Harris, T.S. (1997) The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology*, 29: 441–450.

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

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

Tautz, D., P. Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H., Vogler, A.P. (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 70-74.

4 CONCLUSÕES

- *Heterorhabditis* sp. LPP35 causa mortalidade em larvas L3 e L4 de *A. Aegypti*.
- No teste de virulência de diferentes isolados de *Heterorhabditis* e *Steinernema* aos estágios larvais L3 e L4 houve maior mortalidade das larvas de *A. aegypti* quando usadas as espécies de *Heterorhabditis*.
- No ensaio de diferentes doses resposta, doses de 10, 20 e 40 JIs por larva apresentaram mortalidade inferior a 50%, enquanto as doses de 80, 100 JIs por larva apresentaram mortalidade acima de 70%, chegando a 100% de mortalidade na dose de 160 JIs por larva de mosquito.
- Em condições de semicampo larvas expostas aos diferentes ambientes e a diferentes volumes dos criadouros tiveram de 27 a 92% de mortalidade.
- Em tanques de bromélias *Heterorhabditis* sp. LPP35 obteve uma taxa de 24 % de mortalidade em larvas L3 e L4 de *Aedes aegypti*.
- Nos ensaios em laboratório a utilização do isolado *Heterorhabditis* LPP35 sp. no controle biológico de larvas L3 e L4 de *Aedes aegypti* mostrou eficácia. Já em trabalhos de semicampo e campo observou-se que fatores como excesso de

temperatura, luz solar e matéria orgânica podem interferir na viabilidade dos juvenis infectantes (JIs).

- Medidas simples e básicas na rotina de cada indivíduo continuam sendo a forma mais eficaz de combater o mosquito transmissor da dengue evitando assim novas epidemias.

- *Heterorhabditis* sp. LPP35 apresenta alguns valores morfométricos que aproximam o isolado ao “grupo - *indica*” subgrupo *baujardi*.

- Na análise morfométrica, o isolado *Heterorhabditis* LPP35 sp. encontrado em tanques de bromélias de Mata Atlântica apresenta caracteres distintos de outras espécies do gênero *Heterorhabditis* já descritas, mas a análise molecular confirmará se o isolado é uma espécie bem descrita ou se trata de uma nova espécie.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acevedo, J.P.M.; Moino Jr., A.; Cavalcanti, R.S.; Dolinski, C.; Carvalho, F. A. (2005). Patogenicidade, multiplicação e biologia de isolados nativos de nematoides entomopatogênicos (Rhaditida: Heterorhabditidae) provenientes de Lavras, MG. *Nematologia Brasileira*, v. 29, n.1, p. 25-30.

Adams, B.J.; Nguyen, K.B. (2002) Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. (Ed.) *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 1-33.

Aguillera, M. M.; Voss, M.; Paron, M. J. F. O.; Salvadori, J. R. Controle biológico de *Diloboderus abderus* (Coleoptera: Melolonthidae): estudos preliminares com nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae). In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE PRAGAS DE SOLO, 8., 2001, Londrina. Anais... Londrina: Embrapa Soja, 2001.p. 202-207 (Embrapa Soja. Documentos, 172).

Aldama, P. C.; Garcia, F. J. H. Ciclo de vida Del *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue. **Acta Pediátrica de México**. México, DF, v. 22, n. 2, 2001.

ALMENARA, D. P. ; ROSSI, C. ; NEVES, M. R. C. ; WINTER, C. E. . CAPÍTULO 16 - Nematoides Entomopatogênicos. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. 01ed.: , 2012, v. , p. 1-.

Andaló V, Nguyen KB, Moino A 2006. *Heterorhabditis amazonensis* n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology* 8: 853-867.

Becker N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles JF, Delécluse A, LeRoux CN. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 383-98.

BESERRA, E. B. et al. Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 6, p. 853-860, nov. 2006.

Bird, A.F.; Bird, J. (1991) The structure of nematodes (S. Diego, CA, Academic Press).

Bongers, T. (1990) The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematodes species composition. *Oecologia*, Heidelberg, v. 83, n. 1, p 14-19.

Blossfeld, H. (1964) Orquídeas e Bromélias nº 2, São Paulo, ed. Chácaras e quintais, 69 p.

Brachmann, A.O., Joyce, S.A., Jenke-Kodama, H., Schwär, G., Clarke, D.J. and Bode, H.B. (2007). A type II Polyketide Synthase is responsible for anthraquinone biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Chem. Biochem.* **14**, 1721-1728.

Braga, I, A., Lima, J. B. P., Soares, S. S., Valle, D. (2004) *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99 (2): 199-203.

Cagnolo, S.R. And Walter R.A (2010) Capacity of the terrestrial entomopathogenic nematode *Steinernema rarum* (Rhabditida: Steinernematidae) to parasite *Culex apicinus* larvae (Diptera: Culicidae) *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 69 (1-2): 141-145.

Campos J., Andrade C. F. S. (2001) Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista de Saúde Pública*. 35 (3): 232-236.

Cares, J.E. Nematóides como indicadores ambientais de solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 26., 2006, Campos dos Goytacazes. Anais Campos dos Goytacazes: SBN, P. 14-16.

Carvalho M.S.L, Caldas E. D, Degallier N, Vilarinhos P. T. R, Souza L. C. K. R, Yoshizawa M. A. C, Knox M. B, Oliveira C. (2004) Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal. *Revista Saúde Pública*. 38: 623-629.

Clements, A. N. (1963) The physiology of mosquitoes. International series of monographs on pure and applied biology. The Macmillan Company–NY. 393p.

Consoli, R. A. G. B., Oliveira R. L. (1998) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz, Reimpressão. 225p.

Cruz I. (2002) Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). Embrapa Milho e Sorgo. 15p.

Dembilio, O., Llácer, E., Martinez de Altube Mdel, M. and Jacas, J.A. (2010) Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil *Rhyncophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in *Phoenix canariensis*. *Pest Management Science*. 66, 365-370.

Del Valle E. E., Dolinski, C., Souza, R.M., Samuels, R.I. (2005b) Performance de *Heterorhabditis baujardi* LPP7(28) (Nematoda: Rhabditida), Seleccionada para Tolerância a Elevadas Temperaturas, no Controle de *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematol. Bras.* 29: 199-205.

Dolinski, C.; Lacey, L.A. (2007) Microbial Control of Arthropod Pests of Tropical

Tree Fruits. *Neotropical Entomology* 36, 161-179.

Edman, J. D., D. Strickman, P. Kittayapong, and T. W. Scott (1992).

Eiras, A. E., Resende, M.C. (2009) Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for *Aedes aegypti* monitoring and control. *Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro*. 1: 45-58.

Eiras, A. E. (2000) Culicidae. In: Neves, David Pereira. *Parasitologia humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 428 p.

Esteves, Francisco de Assis.(2011). *Do índio goitacá à economia do petróleo: uma viagem pela história e ecologia da maior restinga protegida do Brasil*. Campos dos Goytacazes (RJ): Essentia Editora 105p.

Faria, M. R., Magalhães, B. P. (2001) O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biociências e Desenvolvimento*. Brasília 2 (2): 18-21.

Ferron, P. (1978) Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*. 23: 409-442.

Forst, S. and Clarke, D. J. (2002). *Nematode-bacterium symbiosis*. In: *Entomopathogenic Nematology*, p. 57–77 ed. Gaugler, R. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Frost JA, Steen H, Shapiro P, Lewis T, Ahn N, Shaw PE, Cobb MH (1997) Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *EMBO J* 16:6426–6438.

Gaugler, R.; Grewal, P.; Kaya, H.; Smith-Fiola, D. (2000). Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. *Biological CONTROL*, San Diego 17, 100-109.

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

GOULART, R. M.; TAVARES, F. M.; LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M. Formação de um banco de nematóides entomopatogênicos no Instituto Biológico, SP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro, Resumos... São Pedro, 2003. p.83.

Grewal, P.S. (2002) Formulation and application technology. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 265- 288.

Griffin, C.T., N.E. Boemare & E.E. Lewis. 2005. Biology and Behaviour. In: GREWAL, P.S.; R.U. EHLERS & D.I. SHAPIRO-ILAN (ed). *Nematodes as Biocontrol Agents*. CAB International, Wallingford (UK). p. 47-64.

Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4(3): 442-449.

Hammon WMcd, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fever of the Philippines and Thailand. *Science*. 1960; 31: 1102-1103.

Instituto Virtual da Dengue do Estado do Rio de Janeiro: <http://www.ivdrj.ufrj.br>
Histórico. Acessado: 03/08/2012.

Joyce, S.A., Brachmann, A.O., Glazer, I, Lango, L., Schwär, G., Clarke, D.J. and Bode, H. (2008) Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene. *Angewandte Chemie*. 47, 1942-1945.

Kurane I. & Eennis F. E. (1992) Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Seminars in Immunology*. 4: 121 – 127.

Leite, L.G. (2006) Nematóides entomopatogênicos. *Boletim Técnico do Instituto Biológico – Controle Biológico de Insetos e Ácaros*. São Paulo, n.15, p. 42-51.

Luna J. E. D., Martins M. F., Anjos A., Kuwabara E. F., Navarro-Silva M. A. (2004) Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Revista Saúde Pública*. 38: 842-843.

Marcondes, C. B. *Entomologia Médica e Veterinária*. São Paulo: Atheneu, 2001.

Marcoris, M. L. G., Andrighetti, M. T. M., Takaku, L., Classer, C. M., Garbeloto, V. C., Cirino, V. C. (1999) Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 33: 521-522.

Martins, F., Silva, I. G. (2004) Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37 (2): 135-138.

Müller, G.A. & C.B. Marcondes, 2006. Bromeliad-associated mosquitoes from Atlantic forest in Santa Catarina Island, southern Brazil (Diptera, Culicidae), with new records for the State of Santa Catarina. *Iheringia Série Zoologia*, 96: 315-319.

Nadler SA 2002. Species delimitation and nematode biodiversity: phylogenies rule. *Nematology* 4: 615-625.

Nardo, E. A. B.; Aguilera, M. M.; Grewal, P. S. Pragas brasileiras de solo com potencial de serem controladas com nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae). In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE PRAGAS DE SOLO, 8.; 2001, Londrina. Anais... Londrina: Embrapa Soja, 2001.p.273-278. (Embrapa Soja. Documentos, 172).

Nguyen KB, Shapiro-Ilan DI, Stuart RJ, McCoy CW, James RR, Adams BJ 2004. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematology* 6: 231-244.

OMS- Organização Mundial Da Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/en/>, acesso dia 11 de junho de 2011.

Paracer, S., and Ahmadjian, V. (2000) *Symbiosis. An Introduction to Biological Associations*. Oxford: Oxford University Press.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Samuels, R. I. (2011a) Susceptibility of adult females *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. *Parasites & Vectors*. 4 (91): 2-7.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Paula, C. O., Samuels, R. I. (2011b) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the Dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Parasites & Vectors*. 4 (8): 2-8.

Paula, A. R., Brito, E., Pereira, C., Carrera, M.P., Samuels, R.I. (2008) Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: Prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science Technology*. 18: 1-21.

Pereira, C. (1937) *Rhabdtis hambletoni* n.sp., nema aparentemente semi-parasito da "bróca do algodoeiro" (*Gasterocercodes brasiliensis*). *Arch. Inst. Biologico*. 8, 214-230.

Poinar, G.O. (1990). *Taxonomy and biology od Steinernematidae and Heterorhabditidae*. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. p. 23-60 Press Inc. Boca Raton, Florida.

Polanczyk, R. A., Garcia, M. O., Alvez, S. B. (2003) Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*. 6: 813-816.

Pontes, R. J. S.; Ruffino-Neto. A Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. *Revista de Saúde Pública*, v.28, n. 3, p. 218-227. 1994.

Popiel, I. and Hominick, W.M. (1990) Nematodes as biological control agents: part II. *Advances in Parasitol.* **31**, 381-431.

Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol* 2001;17:377-80.

Reiter P. & Gubler D. J. (1997) Surveillance and control of urban dengue vectors. *In: Gubler DJ, Kuno G Editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever fever. New York: CAB International.* 45-6.

Roel, A.R. (2001) Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Revista Internacional do Desenvolvimento Local, Campo Grande*, v.1, n.2, p. 43-50.

Rossi, j. C. N. & silva, A. M. Diversidade de criadouros frequentados por aedes aegypti e Aedes albopictus no estado de santa catarina, período de 1998 A 2007. http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/tcc/Diversidade_de_criadouros_frequentados_por_aedes_aegypti_e_aedes_albopictus_SC.pdf ACESSO EM 29 - 08-2014.

Schmitt, A.T.; Gowen, S.R.; Hague, N.G.M. (1992). Baiting technique for the control of *Cosmopolites sordidus* Germar by *Steinernema carpocapsae*. *Nematropica* 22, 159-163.

Scholte, E. J., Takken, W., Knols, B. G. J. (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *A. Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*. 102: 151-158.

SES, Secretaria de Estado de Saúde, Disponível em www.saude.rj.gov.br, acesso dia 16 de Abril de 2013.

Silva Júnior, J.B. & Pimenta J.F.G. (2008) Epidemiologia da dengue. In: Sousa, L.J. *Dengue - diagnóstico, tratamento e prevenção*. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed: Rubio , p.11-35.

Silva, H.H.G. da, I.G. da Silva, R.M.G. dos Santos, E.R. Filho & C.N. Elias. 2004. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37:396-399.

Smart JR., G.C. (1995) Entomopathogenic nematodes for the Biological Control of Insects. *Journal of Nematology* 27, 529-534.

Stock, S.P. & D.J. Hunt. 2005. Morphology and systematic of nematodes used in biocontrol. In: GREWAL, P.S., R.U. EHLERS & D.I. SHAPIRO-ILAN (ed). *Nematodes as Biocontrol Agents*. CAB International, Wallingford (UK), p. 3-43.

Tauil, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p.867-871, mai. 2002.

Tihohod, D. *Nematologia agrícola aplicada*. Jaboticabal: Funep, 1993. 235 p.

Treverrow, N.L.; Bedding, R.A. (1993) Development of a system for the control of the banana weevil borer, *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae) with entomopathogenic nematodes. In: Bedding, R.; Akhrust, R.; Kaya, H.K. (eds.). *Nematodes and biological control of insect pests*. Melbourne: CSIRO, p.41- 47

Vianna, M. S. R. (2001) A transmissão urbana da febre amarela e dengue. *Saúde Rio*. Rio de Janeiro. 5p.

Vilarinhos PTR, Dias JMCS, Andrade CFS, Araújo-Coutinho CJPC. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. In: Alves SB. *Controle*

microbiano de insetos. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz;1998.p.447-80.

Zohdy, N.M. Shamseldean, M.M., Abd-El-Samie, E.M. and Hamama H.M. 2013 Efficacy of the Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes for Controlling the Mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) Journal of Mosquito Research, Vol.3, No.5, 33-44 (doi: 10.5376/jmr.2013.03.0005)

Wallace, Helen. Genetically Modified Mosquitoes: Ongoing Concerns. TWN Biotechnology & Biosafety Series 15. 2013

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

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