

UTILIZAÇÃO DE CADÁVERES DE *Galleria mellonella*
(LEPIDOPTERA:PYRALIDAE) INFECTADOS POR *Heterorhabditis*
baujardi LPP7 NO CONTROLE DO GORGULHO-DA-GOIABA
Conotrachelus psidii (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

ELEODORO EDUARDO DEL VALLE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MAIO – 2008

UTILIZAÇÃO DE CADÁVERES DE *Galleria mellonella*
(LEPIDOPTERA:PYRALIDAE) INFECTADOS POR *Heterorhabditis*
baujardi LPP7 NO CONTROLE DO GORGULHO-DA-GOIABA
Conotrachelus psidii (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

ELEODORO EDUARDO DEL VALLE

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

Orientador: Prof. Ricardo Moreira de Souza

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MAIO – 2008**

UTILIZAÇÃO DE CADÁVERES DE *Galleria mellonella*
(LEPIDOPTERA:PYRALIDAE) INFECTADOS POR *Heterorhabditis*
baujardi LPP7 NO CONTROLE DO GORGULHO-DA-GOIABA
Conotrachelus psidii (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

ELEODORO EDUARDO DEL VALLE

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

Aprovada em 12 de maio de 2008.

Comissão Examinadora:

Prof^a Claudia Dolinski (Ph.D. em Fitopatologia) - UENF

Prof. Omar Eduardo Bailez (D.S. em Biologia do Comportamento) - UENF

Prof. Alcides Moino Júnior (D.S. em Entomologia) - UFLA

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

DEDICO E OFEREÇO

Aos meus pais, Eleodoro e Gloria

e à minha amada esposa, Jonicélia.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

À minha família, pelo apoio, confiança e compreensão ao longo destes anos,

À UENF, pela oportunidade de realização do curso,

Aos meus orientadores, Ricardo e Claudia, pela amizade, confiança, incentivo, orientação e formação,

Aos professores das disciplinas cursadas, pelos conhecimentos transmitidos,

Aos colegas do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia,

Aos integrantes do Setor de Nematologia, pela amizade e horas compartilhadas,

Ao Eduardo, Kelly e Juan Carlos, pela amizade e colaboração nos experimentos,

Aos técnicos do laboratório, que contribuíram para a condução dos experimentos,

Ao Vilarinho, pela atenção e disponibilidade na realização dos experimentos,

À FAPERJ, pela concessão da bolsa,

Aos colegas da pelada,

Ao Masao Uesu e Luis Kawae, pelo apoio nos experimentos de campo,

À minha querida esposa Jonicélia, pelo apoio, compreensão, confiança, cumplicidade e amizade incondicional,

Aos amigos Leandro, Chicão e Romano, pela grande amizade,

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract	viii
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
3. Trabalhos	12
Capacidade dispersiva de juvenis infectantes de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Rhabditida) formulados como insetos-cadáveres.....	12
Resumo.....	12
Abstract.....	13
Introdução	14
Material e Métodos	16
Resultados	19
Discussão	23
Referências Bibliográficas	27
Eficácia de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Rhabditida) aplicados em cadáveres de larvas de <i>Galleria mellonella</i> para o controle de larvas de <i>Conotrachelus psidii</i> (Coleoptera: Curculionidae).....	32
Resumo	32
Abstract	33
Introdução	33
Material e Métodos	35
Resultados e Discussão.....	38

Referências Bibliográficas	44
Efeito da proteção de cadáveres de <i>Galleria mellonella</i> L. (Lepidoptera: Pyralidae) na emergência e na infectividade de <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) e na sua remoção por <i>Ectatomma</i> spp. (Hymenoptera: Formicidae).....	47
Resumo.....	47
Abstract.....	48
Introdução.....	49
Material e Métodos.....	51
Resultados e Discussão.....	54
Referências Bibliográficas.....	59
Influência do período de tempo entre infecção e aplicação dos insetos-cadáveres de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) infectados por <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) na emergência de juvenis infectantes	62
Resumo.....	62
Abstract.....	63
Conteúdo.....	64
Referências Bibliográficas.....	67
4. Resumo e Conclusões	69
Referências Bibliográficas	70

RESUMO

DEL VALLE, Eleodoro Eduardo; D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Maio de 2008. Utilização de cadáveres de *Galleria mellonella* (Lepidoptera:Pyralidae) infectados por *Heterorhabditis baujardi* LPP7 no controle do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). Orientador: Prof. Ricardo Moreira de Souza. Co-orientador: Profa. Claudia Dolinski.

O gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922, é uma das principais pragas nos pomares de goiaba na região Norte/Noroeste Fluminense, provocando severa queda na quantidade e qualidade dos frutos colhidos. Uma alternativa para o controle desta praga é a aplicação de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com nematóides entomopatogênicos (insetos-cadáveres). Neste trabalho objetivou-se avaliar a eficácia da aplicação a campo de cadáveres de *G. mellonella* infectados por *Heterorhabditis baujardi* LPP7 no controle de larvas de quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba. Avaliou-se a capacidade dispersiva de juvenis infectantes (JIs) de *H. baujardi* LPP7 emergidos de insetos-cadáveres, bem como os níveis de supressão de larvas e a persistência de JIs no solo, quando aplicados em concentrações diferentes. Determinou-se o efeito de cinco coberturas protetoras de cadáveres de *G. mellonella* infectados por *H. baujardi* LPP7 e o comportamento de duas espécies de formigas do gênero *Ectatomma* frente a estes. A influência de diferentes períodos de tempo entre infecção e

aplicação no solo dos insetos-cadáveres sobre a emergência de JIs foi avaliada. O maior número de JIs foi recuperado aos 90 cm dos locais de aplicação, nos primeiros 10 cm de profundidade e na quinta semana após aplicação. Não foram observadas diferenças significativas no número de JIs recuperados quando 1 ou 15 cadáveres foram aplicados, mas o padrão espaço-temporal dos JIs de *H. baujardi* LPP7 apresentou uma distribuição horizontal mais ampla quando os insetos-cadáveres foram aplicados em maior quantidade. A aplicação de 2, 4 e 6 insetos-cadáveres em superfícies de 0,25 m² apresentou-se eficaz no controle de larvas de quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba. A persistência dos JIs emergidos dos cadáveres foi de 6 semanas após a aplicação. Após este período, significativa queda na persistência dos JIs foi observada. A cobertura de insetos-cadáveres que destacou-se foi em cápsulas de gelatina (7892,0 ± 1072,4 JIs), mas não apresentou diferenças com a testemunha (6346,4 ± 1310,7 JIs). Formigas do gênero *Ectatomma* prejudicaram a utilização de insetos-cadáveres. Por último, o período de tempo entre seis e dez dias entre infecção e aplicação no solo de cadáveres gerou a maior emergência de juvenis infectantes. Concluímos que cadáveres de *G. mellonella* infectados com *H. baujardi* LPP7 podem ser empregados no controle de larvas no quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba.

Palavras-chaves: tecnologia de aplicação, insetos-cadáveres, *Conotrachelus psidii*.

ABSTRACT

DEL VALLE, Eleodoro Eduardo; D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, May, 2008. Use of *Galleria mellonella* insect-cadavers infected with *Heterorhabditis baujardi* LPP7 for the control of guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera:Curculionidae). Major advisor: Ph.D. Ricardo Moreira de Souza. Co-advisor: Ph.D. Claudia Dolinski.

The guava-weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922, is one of the main guava orchards pest in the North/Nortwest Fluminense, causing severe fall in the quantity and quality of the collected fruits. An alternative for this pest control is the application of *Galleria mellonella* cadavers infected with entomopathogenic nematodes. The objective of this work was to evaluate the efficacy of *G. mellonella* cadavers infected with *Heterorhabditis baujardi* LPP7 application in field for fourth instar guava weevil larva control. Dispersal capacity of infective juveniles (IJs) emerged from insect cadavers were evaluated, as well as larvae suppression levels and soil persistence, when applied in different concentrations. It was tested the effect of five protecting coverings in *G. mellonella* infected with *H. baujardi* LPP7 cadavers, and the behavior of ants of genus *Ectatomma* on theses. Also, the influence of different time periods between infection and soil application of the insect cadavers on IJs emergency was evaluated. The largest number of IJs was recovered at 90 cm of the application places, in the first 10 cm depth on the fifth week after application. Significant differences were not observed in the number of

IJs recovered when applied 1 or 15 cadavers, but space-temporal pattern of IJs of *H. baujardi* LPP7 showed a wide horizontal distribution when the insect cadavers were applied in larger concentration. The application of 2, 4 and 6 insect cadavers in surfaces of 0.25 m², were effective in the fourth instar guava weevil larvae control. Persistence of cadavers emerged IJs were of 6 weeks after application. After this time, significant fall was observed. The insect cadavers coverings that point out in IJs emergency was gelatin capsules (7892,0 ± 1072,4 IJs), but they didn't present differences with test (6346,4 ± 1310,7 IJs). Ants of the genus *Ectatomma* were harmed in the use of insect cadavers. Finally, the time period between six to ten days between infection and cadaver's soil application, generated the largest emergency of IJs. We concluded that *G. mellonella* cadavers infected with *H. baujardi* LPP7 can be applied for the fourth instar guava weevil larvae control.

Key words: Application technology, infect host cadaver, *Conotrachelus psidii*.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a goiaba (*Psidium guayaba* L.) é uma das culturas de maior importância da fruticultura nacional (Choudhury *et al.*, 2001). O gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae), é a principal praga dos pomares de goiaba do Estado de Rio de Janeiro, pois afeta a qualidade dos frutos e, por conseguinte, os rendimentos da cultura.

O controle químico com inseticidas tem sido o método de controle de pragas mais utilizado nas últimas décadas, mas seus efeitos sobre organismos não-alvo, a contaminação da água, os resíduos encontrados em alimentos e o desenvolvimento de resistência em insetos-praga têm aumentado a rejeição dos inseticidas pela sociedade em geral e pelos produtores (Gaugler, 1988; Georgis e Hague, 1991; Georgis, 1992). Por outro lado, associações ambientalistas têm procurado atrair a atenção da indústria, universidades e centros de pesquisa para o desenvolvimento de métodos de controle alternativos e menos tóxicos ao meio ambiente que possam ser incorporados ao manejo integrado de pragas (MIP) (Georgis e Poinar, 1994).

O papel do controle microbiano na proteção de diferentes culturas contra insetos-pragas tem se expandido com o estudo de novos agentes. Neste contexto, os nematóides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Steinernematidae Chitwood e Chitwood, 1937, e Heterorhabditidae Poinar, 1976 (Rhabditida), podem ser importantes componentes nos programas de MIP (Lacey e Goettel, 1995). Estes nematóides são agentes controladores alternativos ao uso

de inseticidas, com potencial para o controle do gorgulho-da-goiaba, cuja utilização poderá desencadear uma estratégia mais racional de combate a esta praga (Dolinski *et al.*, 2006).

NEPs podem ser aplicados a campo em cadáveres de insetos infectados. Desta forma os NEPs demonstram maior dispersão no solo, infectividade e sobrevivência quando comparados à aplicação em suspensão aquosa (Shapiro-Ilan *et al.*, 2003). Esta forma de aplicação de NEPs demanda baixo investimento e tecnologia. Larvas de *Galleria mellonella* podem ser criadas, infectadas e aplicadas pelos produtores subsuperficialmente ao solo, sob a copa das goiabeiras. Juvenis infectantes emergem dos insetos-cadáveres 3 a 5 dias após aplicação e buscam larvas do gorgulho-da-goiaba. Estes penetram nas larvas, causam septicemia e morte, diminuindo, conseqüentemente, o número de adultos do gorgulho-da-goiaba que danificam os frutos.

O objetivo geral no presente trabalho foi avaliar a eficácia da aplicação de cadáveres de larvas de *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) infectadas com *Heterorhabditis baujardi* LPP7 para o controle do gorgulho-da-goiaba em pomares de goiaba do Estado do Rio de Janeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A Goiaba

O cultivo da goiaba vem adquirindo crescente importância econômica no Brasil, sendo este o principal produtor comercial de goiabas vermelhas do mundo. A área plantada com este cultivo no ano de 2002 superou 18000 hectares, atingindo uma produção de 389162 toneladas de frutos (FNP Consultoria & Comercio, 2004).

A goiabeira pertence à família Myrtaceae e é originária das Américas. Seus frutos vêm sendo melhorados para aumentar a qualidade, tanto para consumo *in natura* como para a industrialização. Os frutos são apreciados devido às suas características próprias como sabor, aroma e pelo seu elevado valor nutritivo. Sua qualidade para o consumo *in natura*, seja no mercado interno como para exportação, está relacionada aos seus atributos físicos, como aparência, tamanho, forma, cor e textura, e também por sua composição química. Esta crescente busca pela qualidade vem em resposta às exigências dos mercados interno e externo.

A utilização *in natura* pode ser feita sob a forma de refrescos, sucos e sorvetes e a polpa processada pode ser utilizada na confecção de doces de corte, sucos concentrados, polpa congelada, geléias e compotas.

O mercado interno absorve quase a totalidade da produção nacional, que vem aumentando em volumes crescentes nos últimos anos. Contudo, insetos-praga continuam afetando o aumento da produtividade.

O Gorgulho-da-goiaba

O gorgulho-da-goiaba é uma das principais pragas na cultura da goiaba no Brasil, afetando tanto a produção quanto a qualidade dos frutos, causando grandes perdas econômicas.

A praga em seu estágio larval é difícil de ser controlada através de métodos químicos convencionais devido à sua localização dentro dos frutos e no solo. O gorgulho é capaz de causar danos de 60 a 100% dos frutos (Orlando *et al.*, 1974).

Este inseto é um pequeno besouro (Coleoptera:Curculionidae) de aproximadamente 6,0 mm de comprimento por 4,0 mm de largura, de coloração pardo-escura, com peças bucais cilíndricas e alongadas. A larva é branca-amarelada, com cabeça marrom, corpo enrugado transversalmente, medindo, quando totalmente desenvolvida, 12,0 mm de comprimento por 4,0 mm de largura. As fêmeas, ao iniciarem a postura, procuram os frutos pequenos (3-4 cm) e verdes, cavando com o rostro canais onde depositam, em geral, um ovo por cavidade. Este local não acompanha o desenvolvimento do restante do fruto, ficando com uma cicatriz circular, deprimida de coloração negra. Após a eclosão, a larva penetra no fruto e se alimenta da polpa e das sementes, ficando estas parcialmente destruídas, de coloração escura, típica de deterioração (Manica *et al.*, 2000). As larvas se desenvolvem dentro do fruto passando por quatro instars. Os frutos amadurecem, caem e as larvas de quarto instar migram para o solo, onde se transformam em pré-pupa, permanecendo nesse estágio por cerca de três a quatro meses. Após este período surgem os adultos, que abandonam o solo iniciando um novo ciclo (Bailez *et al.*, 2003).

Na atualidade, as medidas de controle mais utilizadas são o controle químico com a aplicação de soluções inseticidas à base de fention a 0,10%, paration metílico a 0,10% ou triclorfon a 0,30%, começando a sua aplicação quando os frutos ainda se encontram verdes (Pereira e Martinez Jr., 1986).

Recomenda-se também o controle cultural com o ensacamento dos frutos quando estes ainda estão pequenos. Existe uma prática menos difundida que é a coleta e destruição dos frutos brocados caídos, visando a diminuição do inóculo para o ciclo seguinte. Vale ressaltar que os métodos químicos tradicionais para controlar esta praga nunca a eliminam totalmente, mas só reduzem sua população parcialmente devido ao difícil acesso à praga (Sampaio, 1977; Barelli e Galli, 1998).

As larvas no quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba são candidatas a serem controladas com NEPs, já que se encontram no solo. Com referência ao gênero *Conotrachelus*, existem trabalhos feitos com *C. nenuphar*, o gorgulho-da-ameixa, que é uma das principais pragas dos cultivos de frutas com caroço. Para esta praga foi demonstrado o potencial de *S. feltiae* e de *S. riobrave* no controle do estágio larval (Shapiro-Ilan *et al.*, 2002).

Nematóides Entomopatogênicos

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) são organismos de forma cilíndrica-alongada, sem segmentação nem apêndices, capazes de colonizar e serem letais a alguns invertebrados. Estes nematóides possuem três adaptações que são características do seu ciclo de vida (Sudhaus, 1993): são letais principalmente a insetos, se alimentam de bactérias simbiotes e seu terceiro estágio larval (J3), também chamado de juvenil infectante (JI), lhe outorga a capacidade de penetrar nos insetos e de sobreviver no solo (Poinar, 1990).

Os NEPs têm sido isolados de solos em diferentes ecossistemas do mundo, desde árticos até tropicais, apresentando um vasto leque de hospedeiros (Poinar, 1990; Hominick *et al.*, 1996). Em laboratório, colonizam mais de 250 espécies de insetos de aproximadamente 75 famílias pertencentes a 11 ordens de insetos e podem infectar larvas, pupas e adultos (Poinar, 1979; 1990; Peters, 1996). Nematóides entomopatogênicos pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda), na qual estão localizadas as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. A família Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinerema* Nguyen e Smart, 1994, enquanto que a família Heterorhabditidae possui apenas o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976.

Atualmente existem descritas e reconhecidas 41 espécies do gênero *Steinernema*, uma do gênero *Neosteinernema* e 12 espécies do gênero *Heterorhabditis* (Adams *et al.*, 2006).

Os progressos atingidos nas últimas décadas, em estudos sobre taxonomia, biologia, genética, ecologia, gama de hospedeiros, tecnologia de aplicação, testes em laboratório e no campo e comercialização dos NEPs, destacaram os nematóides do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* como excelentes candidatos a agentes do controle alternativo de insetos-praga (Gaugler, 1988; Grewal e Georgis, 1999).

O ciclo de vida das espécies do gênero *Steinernema* começa com JIs, os quais carregam bactérias simbiotes numa vesícula localizada na região anterior do intestino, penetrando no corpo de um determinado hospedeiro através de suas aberturas naturais como cavidade oral, ânus e espiráculos (Forst e Clarke, 2002). Subseqüentemente, os NEPs passam à hemocele, onde liberam suas bactérias simbiotes. Estas multiplicam-se rapidamente e, após curto período, causam septicemia e morte do hospedeiro. O cadáver fica então tomado por uma “sopa bacteriana”, ou seja, um meio rico em nutrientes constituído pelas bactérias e por tecidos do inseto já desorganizados, dos quais os nematóides se alimentam e se desenvolvem, passando pelo último estágio de juvenil (J4) e se tornando adultos da primeira geração (machos e fêmeas). Em geral, os juvenis originados por esses adultos ainda têm ao seu dispor, apreciável quantidade de alimento, conseguindo completar o ciclo e formar os adultos da segunda geração dentro do corpo do hospedeiro. Geralmente, após o surgimento e acasalamento dos adultos da segunda geração, têm-se a formação de uma população de juvenis que se alimentam do resto do cadáver e depois o abandonam, passando para o solo em busca de novos hospedeiros. Antes dos JIs deixarem o cadáver, as bactérias simbiotes são apreendidas na vesícula especializada (Adams e Nguyen, 2002).

O ciclo de vida das espécies do gênero *Heterorhabditis* é similar ao descrito para o gênero *Steinernema*, com a diferença de que a primeira geração de adultos no inseto morto compõe-se unicamente de hermafroditas, surgindo machos e fêmeas anfimíticos na segunda geração e, eventualmente, nas seguintes. Além disso, as bactérias simbiotes são apreendidas e armazenadas na região anterior do intestino dos JIs, que não possui vesícula (Adams e Nguyen, 2002). Para ambos os gêneros, a temperaturas na faixa de 18-28 °C, o ciclo de

vida é completado em 6 a 18 dias, dependendo também do inseto hospedeiro e da espécie de nematóide (Poinar, 1990; Zioni *et al.*, 1992).

Os JIs são morfológica e fisiologicamente adaptados à vida-livre e correspondem ao terceiro estágio juvenil do ciclo de vida dos nematóides (J3). Durante este estágio, os nematóides não se alimentam e dependem de suas reservas internas até encontrarem um novo hospedeiro. Estas reservas se encontram no intestino, principalmente na forma de glicogênio (Glazer, 2002). Os NEPs neste estágio são mais resistentes às condições ambientais adversas, o que permite a persistência deles no solo por um prolongado tempo. Esta resistência se dá devido à existência da cutícula do terceiro estágio e a do segundo estágio, que fica retida. Esta proteção tem um papel fundamental, pois auxilia contra a dessecação e o ataque de antagonistas (Poinar, 1979; Timper e Kaya, 1989; Campbell e Gaugler, 1991 a, b).

A estratégia dos JIs para encontrar seus hospedeiros é variável entre as distintas espécies de NEPs e pode ser classificada em “ambusher” ou “cruiser”. Os NEPs com estratégia “ambusher” esperam seu hospedeiro fazendo “nictation”, isto é, ficam eretos e apoiados em suas caudas, aguardando para saltar em direção ao hospedeiro quando ele se aproxima. Por outro lado, os NEPs com estratégia “cruiser” procuram ativamente seus hospedeiros, movimentando-se pelo solo, provavelmente atraídos por dióxido de carbono e outras substâncias químicas liberadas pelos hospedeiros. Os NEPs com estratégia “cruiser” são mais efetivos contra insetos de pouca mobilidade no solo, enquanto que os com estratégia “ambusher” são mais efetivos contra alvos móveis. Existem também algumas espécies com comportamento intermediário aos descritos anteriormente, fazendo “nictation” por algum tempo e também se movimentando no solo (Lewis *et al.*, 1992; 1993; Grewal *et al.*, 1994a; Campbell e Gaugler, 1993; 1997).

A principal via de ingresso dos NEPs nos insetos são os espiráculos. As vias alternativas são a cavidade oral e o ânus, mas podem haver resistências, pois os nematóides podem ser mastigados no processo de limpeza corporal que é comum a alguns insetos, como as larvas da família Curculionidae. Juvenis infectantes do gênero *Heterorhabditis* utilizam um “dente” presente na sua parte anterior para perfurar a cutícula do hospedeiro, por isso são considerados mais infectantes do que os JIs de *Steinernema* (Gaugler e Molloy, 1981; Georgis e

Hague, 1981; Bedding e Molyneux, 1982; Cui *et al.*, 1993; Peters e Ehlers, 1994; Eidt e Thurston, 1995).

Durante a infecção por NEPs, a morte dos insetos é causada pelas bactérias simbiotes carregadas nos intestinos dos nematóides e liberadas na hemolinfa dos insetos. Existe um alto grau de especificidade na simbiose nematóide-bactéria. Essa especificidade é mais estrita entre *Heterorhabditis* e *Photorhabdus*, onde uma espécie de nematóide se associa somente a uma espécie de bactéria. Já a simbiose entre *Steinernema* e *Xenorhabdus* é menos estrita porque várias espécies de *Steinernema* podem se desenvolver e reter várias espécies de *Xenorhabdus* (Boemare, 2002).

Na associação simbiótica, os nematóides contribuem oferecendo proteção à bactéria fora do corpo do inseto e atuando como transportadores ou vetores das mesmas do cadáver para um inseto vivo. A contribuição da bactéria, por sua vez, está no fornecimento de nutrientes aos nematóides, na produção de toxinas letais para os hospedeiros e na produção de antibióticos que eliminam outras bactérias oportunistas (Kaya e Gaugler, 1993).

Os NEPs possuem importantes vantagens para o controle de insetos-praga. Através da sua associação com bactérias simbiotes, os NEPs matam os insetos em 24 a 48 horas, podendo atingir um nível de controle equivalente ao dos inseticidas químicos (Akhurst, 1986; Georgis, 1990a). Em comparação com o controle químico, o uso de NEPs é mais seguro para o usuário e para o ambiente. Eles não prejudicam populações de insetos benéficos e menos ainda a mamíferos ou plantas (Poinar, 1989; Akhurst, 1990; Bathon, 1996). Quanto à sua aplicação, os JIs podem ser aplicados com equipamentos convencionais, sendo também compatíveis com vários inseticidas comerciais (Dutky, 1974; Gaugler, 1981; Rovesti *et al.*, 1988; Zimmerman e Cranshaw, 1990; Georgis, 1990 a,b; Rovesti e Deseo, 1990; 1991). Juvenis infectantes procuram ativamente seu hospedeiro, podendo atingir no controle de pragas de solo um nível de eficiência maior que os produtos químicos convencionais. Além disso, ao se reproduzirem e se multiplicarem dentro dos insetos, os nematóides produzem um novo inóculo para infectar outros insetos-praga (Kaya e Gaugler, 1993).

A eficácia do controle de insetos-praga com NEPs depende da temperatura ambiental na qual eles são liberados no solo (Kaya, 1990; Grewal *et al.*, 1994b). A temperatura influencia muitos processos, inclusive a proporção de reservas

alimentares (lipídios, proteínas e carboidratos), que são utilizadas pelos nematóides para sua motilidade, sobrevivência, infectividade, desenvolvimento e reprodução (Dunphy e Webster, 1986; Grewal *et al.*, 1994b). A virulência e a reprodução de *Heterorhabditis* spp. é reduzida em temperaturas superiores a 30 °C (Grewal *et al.*, 1994b). Em geral, a atividade inseticida dos NEPs é mais efetiva na faixa de temperatura de 18 a 28°C (Akhurst, 1986), com exceção de algumas espécies que são mais efetivas a temperaturas mais baixas. Ao se incrementar a habilidade dos NEPs em viver e ser infectantes a temperaturas mais elevadas (35-40 °C), pode-se melhorar a sua eficácia em condições de campo e ampliar o seu uso como agentes do controle biológico em regiões tropicais. Para superar os efeitos prejudiciais da elevada temperatura sob a patogenicidade e virulência dos NEPs, vários pesquisadores têm desenvolvido melhoramento genético de populações para esta característica (Glazer *et al.*, 1991; Tomalak, 1994; Del Valle *et al.*, 2005a).

Outro fator que influencia a atividade dos NEPs é a sua tolerância à dessecação. Todos os nematóides são organismos aquáticos e necessitam de uma película de água ao redor deles para se mover (Norton, 1978). Sob condições ambientais de baixa umidade a sobrevivência e motilidade dos NEPs é negativamente afetada (Kaya e Gaugler, 1993).

Existem vários exemplos de êxito do controle com NEPs de insetos-praga de diferentes ordens, como Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Blattaria, Orthoptera, Tisanoptera e Sifonaptera. Dentre as espécies de coleópteros controlados com sucesso com NEPs figuram *Otiorhynchus sulcatus* Fabricius, *O. ovatus* Linnaeus, *O. ligustici* Linnaeus, *Temnorhinus mendicus* Gyllenhal, *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus, *Popillia japonica* Newman, *Anomala* spp., *Maladera matrida* Argaman e *Conotrachelus nenuphar* Herbst, dentre outros (Nickle, 1984).

Os estudos visando o uso de NEPs no Brasil são escassos, na sua maioria limitando-se a registros de ocorrência de NEPs associados a insetos-praga em diferentes culturas do país. Além disso, tratam-se de esforços isolados que não tiveram seqüência, ou cujos resultados não tiveram caráter conclusivo. Nos últimos anos têm-se formado vários grupos de pesquisa abordando diferentes aspectos destes organismos, o que permitirá um maior conhecimento destes agentes em um futuro próximo (Alves, 2006; Del Valle *et al.*, 2005 a,b; Dolinski *et al.*, 2006).

Cadáveres infectados por nematóides entomopatogênicos

Nematóides entomopatogênicos são comumente preservados e aplicados em suspensão aquosa. O curto período de armazenamento e a queda da sobrevivência dos JIs em suspensão aquosa dificultam a utilização e expansão do controle biológico de pragas com estes agentes. Além disso, a aplicação de JIs desta forma requer sistemas de irrigação adequados e operadores treinados.

Uma alternativa viável para os produtores de goiaba do Estado do Rio de Janeiro é a aplicação de cadáveres de *G. mellonella* infectados com NEPs, visando o controle biológico de pragas. Larvas de *G. mellonella* são criadas e infectadas facilmente pelos produtores e aplicadas subsuperficialmente no solo sob a copa das goiabeiras. Juvenis infectantes começam a se dispersar dos insetos-cadáveres de 3 a 5 dias após aplicação no solo, à procura de larvas de quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba. Estes penetram nas larvas do quarto ínstar, produzindo septicemia e posterior morte, diminuindo conseqüentemente, o número de adultos do gorgulho-da-goiaba que danificarão os frutos.

O NEPs *Heterorhabditis baujardi* linhagem LPP7 é um excelente candidato para utilização como agente de controle biológico, por demonstrar alta virulência (>80%) ante larvas do quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba e pelo fato de ser um isolado natural do Brasil (Del Valle *et al.*, 2005b).

A capacidade de dispersão de JIs é uma característica importante para que o controle biológico de pragas agrícolas seja efetivo (Kaya e Gaugler, 1993). Para NEPs armazenados em suspensões aquosas, a capacidade de dispersão de JIs pode ser negativamente afetada pelo tempo de armazenamento (Lewis *et al.*, 1995).

Shapiro e Glazer (1996) demonstraram que JIs de *Steinernema carpocapsae* e *H. bacteriophora* emergidos de insetos-cadáveres exibem maior habilidade dispersiva quando comparados a JIs provenientes de suspensões aquosas. Pesquisas prévias indicam que a habilidade dispersiva de JIs de *Heterorhabditis* sp. varia com o tempo de armazenamento de JIs em suspensão aquosa, decrescendo com o aumento do período de armazenamento dos mesmos (Westerman, 1992).

Esta maior capacidade de dispersão de JIs emergidos de insetos-cadáveres pode ser devido a fatores fisiológicos. Reservas energéticas têm sido correlacionadas com a habilidade dispersiva de NEPs (Selvan *et al.*, 1993). O incremento da habilidade dispersiva acarreta um incremento na procura de novos hospedeiros e, conseqüentemente, aumento no controle da praga alvo. Adicionalmente, JIs emergidos de cadáveres infectados têm demonstrado maior infectividade e sobrevivência quando comparados à aplicação em suspensão aquosa (Shapiro-Ilan *et al.*, 2003).

A eficiência na utilização de insetos-cadáveres pode ser incrementada mediante coberturas protetoras. A formulação dos insetos-cadáveres com coberturas protegem esses de danos físicos derivados da manipulação e aplicação e, dependendo do tipo de cobertura, podem até resguardar os mesmos de condições adversas do ambiente (Hussaini *et al.*, 2004).

É promissor o controle de larvas de quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba através da utilização de insetos-cadáveres de *G. mellonella* infectados com NEPs, mas também existe a necessidade de se realizarem mais estudos, de modo a ter o máximo aproveitamento de suas potencialidades nas aplicações no campo.

3. TRABALHOS

CAPACIDADE DISPERSIVA DE JUVENIS INFECTANTES DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (NEMATODA: RHABDITIDA) FORMULADOS COMO INSETOS-CADÁVERES¹

RESUMO

Em pomares, parte dos insetos-praga se concentram abaixo das copas das árvores, podendo ser controlados com nematóides entomopatogênicos aplicados como insetos-cadáveres. Esse estudo avaliou a distribuição de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 em aplicações de 1 e 15 cadáveres por parcela em um pomar de

¹ Publicado no periódico *International Journal of Pest Management* 54(2): 115-122, 2008.

goiaba. As parcelas foram localizadas entre duas árvores de goiaba consecutivas, onde cadáveres de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) infectados foram colocados no centro. Amostras de solo foram coletadas a 1, 3, 5, 8 e 10 semanas após aplicação. Em cada data de coleta, as parcelas foram amostradas a 30, 60, 90 e 120 cm a partir do local de aplicação dos cadáveres e em três diferentes profundidades (0-10 cm, 10-20 cm e 20-30 cm). O número médio maior de JIs foi recuperado aos 90 cm do local de aplicação, nos primeiros 10 cm de profundidade e na quinta semana após aplicação. Não foram observadas diferenças significativas no número de JIs recuperados quando aplicados 1 ou 15 cadáveres, por outro lado observou-se uma dispersão mais uniforme quando a maior dosagem foi aplicada.

ABSTRACT

In orchards, in cases where the insect pests are concentrated under the canopy, entomopathogenic nematodes can be applied as infected host cadavers. This study evaluated the distribution of *Heterorhabditis baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen & Moens strain LPP7 applied as 1 or 15 host cadavers per plot in a guava orchard. The plots were located between guava trees, with the host cadavers being placed in the centre. Soil samples were taken at 1, 3, 5, 8 and 10 weeks after cadaver application. On each date, the plots were sampled at 30, 60, 90 and 120 cm from the cadaver application and at three different depths (0-10 cm, 10-20 cm and 20-30 cm). The highest average number of recovered infective juvenis was found at 90 cm from the cadaver application, and at 10 cm depth and on the fifth week after application. There was no significant effect on the number of recovered infective juvenile nematodes, when they were applied as 1 or 15 cadavers, although the most uniform dispersal was found when 15 host cadavers were applied.

INTRODUÇÃO

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) são patógenos obrigatórios que provocam a morte de insetos com o auxílio das bactérias simbiotas que carregam no seu intestino. Bactérias do gênero *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. são associadas aos gêneros *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* spp., respectivamente (Poinar, 1990; Forst e Clarke, 2002).

Os juvenis infectantes (JIs) são naturais do solo. Quando em contato com o inseto hospedeiro, os JIs penetram pelas aberturas naturais (cavidade oral, ânus e espiráculos) ou diretamente através da cutícula. Uma vez dentro do hospedeiro, eles liberam as bactérias simbiotas na hemocele do inseto. As bactérias se multiplicam rapidamente causando septicemia e matando o hospedeiro em 24 a 48 horas. Adicionalmente, as bactérias fornecem os nutrientes para o desenvolvimento e multiplicação dos nematóides (Forst e Clarke, 2002).

Nematóides entomopatogênicos vêm sendo utilizados com grande sucesso como agentes biológicos para a supressão de pragas com parte do ciclo no solo e de habitats críticos. Nas últimas duas décadas, as pesquisas referentes a métodos e tecnologias de aplicação destes organismos estiveram focadas nas aplicações em suspensão aquosa, através de sistemas de irrigação (Cabanillas e Raulston, 1994; Curran, 1992; Poinar e Hom, 1986; Shields *et al.*, 1999).

Várias tentativas de controlar pragas com NEPs têm fracassado devido à falta de conhecimento da ecologia e biologia desses e de seus hospedeiros. Isto fica evidente quando se observa os diferentes resultados obtidos em ensaios de laboratório e de campo para os mesmos nematóides e hospedeiros (Efron *et al.*, 2001; Wilson e Gaugler, 2004). No solo, JIs persistem e se movimentam influenciados por fatores bióticos e abióticos. A temperatura do solo, umidade e textura são os fatores abióticos de maior importância. Georgis e Poinar (1983) e Portillo-Aguilar *et al.* (1999) reportaram que *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, *Steinernema carpocapsae* (Weiser) e *S. glaseri* (Steiner) apresentaram maior movimentação em solos de textura arenosa. Contudo, a temperatura é o fator abiótico mais importante por comprometer a infectividade e limitando o sucesso dos NEPs. Cada isolado de NEP tem seus próprios requerimentos térmicos e existe um intervalo de temperatura em que são melhor adaptados. O

conhecimento deste intervalo é de vital importância para a sua sobrevivência, aumentando suas chances de sucesso nas aplicações a campo (Kaya, 1990; Zervos *et al.*, 1991; Choo *et al.*, 2002). *Heterorhabditis baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen e Moens, LPP7 têm se mostrado altamente virulentos a temperaturas superiores a 30 °C (Del Valle *et al.*, 2005a; b).

Como fatores bióticos, a densidade de invasão de JIs (Selvan *et al.*, 1993; Kopenhagenfer e Kaya, 1995; Boff *et al.*, 2000), o inseto hospedeiro (Jansson, 1996; Molina *et al.*, 2004) e o isolado de NEP (Jansson, 1996; Zervos *et al.*, 1991) estão relacionados à persistência e desenvolvimento dos nematóides.

A utilização de NEPs em pomares comerciais como insetos-cadáveres é uma alternativa que deve ser considerada, especialmente, quando o inseto praga localiza-se no solo (Jansson *et al.*, 1993; Parkman *et al.*, 1993; Shapiro-Ilan *et al.*, 2003 e Bruck *et al.*, 2005). Juvenis infectantes emergidos de insetos-cadáveres apresentaram maior capacidade migratória, infectividade e persistência no solo, quando comparados com JIs aplicados em suspensão aquosa (Shapiro e Glazer, 1996; Shapiro e Lewis, 1999; Perez *et al.*, 2003). Isto pode ser resultado de diferenças fisiológicas e comportamentais entre nematóides que emergem dos hospedeiros e os que são conservados em suspensão aquosa (Shapiro e Glazer, 1996).

Não existe informação sobre o padrão dispersivo de NEPs aplicados no solo em insetos-cadáveres. A capacidade dispersiva e a persistência no solo de JIs são aspectos que precisam ser conhecidos para o estabelecimento de um programa de controle biológico. A localização dos JIs no perfil do solo é um outro aspecto crítico a ser considerado quando deseja-se controlar pragas com esses agentes, principalmente no caso de insetos cadáveres, onde NEPs e insetos pragas precisam coincidir em tempo e espaço. Existe a necessidade de estudos adicionais que possibilitem maiores informações sobre tecnologias de aplicação, comportamento e implicações ecológicas. Objetivou-se com este estudo determinar a persistência e o padrão de distribuição de JIs de *H. baujardi* LPP7 no tempo e no espaço quando aplicados ao solo em duas concentrações.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização do experimento e caracterização da área

Os experimentos foram realizados em um pomar comercial de goiaba 'Pedro Sato' com 25 anos de implantação, localizado em Cachoeiras de Macacu, RJ, Brasil. Este pomar tem sido manejado sem aplicações de inseticidas nos últimos três anos.

Cinco amostras de 200 g de solo da área experimental foram coletadas para a análise granulométrica, sendo o solo classificado como arenoso, contendo 58% de areia, 23% de argila e 19% de silte; pH 4,6; 2.43% de matéria orgânica e 12,4 cmol_c/dm³ de capacidade de troca catiônica. Durante o estudo, a umidade do solo foi monitorada utilizando o método gravimétrico. A cada data de coleta, quatro amostras de solo foram coletadas para a determinação da umidade do solo. Para manter o solo próximo à capacidade de campo, a área experimental foi irrigada por aspersão, quando necessário. A temperatura do solo foi monitorada a cada hora à profundidade de 10 cm (Watchdog® datalogger, Spectrum Technologies, Inc.) durante o período experimental. O pomar é caracterizado por densa cobertura vegetal da superfície do solo embaixo das copas das árvores.

Antes de montar o experimento foram feitas tentativas de isolamento de NEPs na área experimental utilizando a técnica de inseto-armadilha (Kaya e Stock, 1997). Não foram registradas amostras positivas para NEPs.

Nematóides entomopatogênicos e cadáveres

O isolado de nematóide entomopatogênico utilizado neste estudo, *H. baujardi* LPP7, é originário da floresta tropical de Monte Negro, RO, Brasil (Dolinski *et al.*, 2008). Foram realizadas infecções em larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) com JIs de *H. baujardi*, segundo procedimento descrito por Woodring e Kaya (1988). Juvenis infectantes (JIs) foram coletados das armadilhas de White (White, 1927) durante um período de 6 dias após a emergência dos primeiros JIs dos cadáveres. Posteriormente, os JIs

coletados foram armazenados em suspensão aquosa a 16 °C em câmara de germinação no máximo uma semana antes da utilização.

Os cadáveres infectados foram produzidos pela exposição de larvas no sétimo ínstar de *G. mellonella* a 100 JIs de *H. baujardi* LPP7 em 0,5 mL de água destilada. Nematóides e uma larvas foram adicionadas a placas de Petri (9 cm) com papel de filtro na base (Whatman N°1). As larvas mortas foram transferidas para novas placas de petri, sem JIs, 48 hs após inoculação. As larvas foram incubadas durante 6 dias a 25°C em câmara de germinação para permitir o desenvolvimento dos sintomas típicos de infecção de NEPs.

Amostragem e desenho experimental

O estudo foi composto por dois tratamentos em arranjo inteiramente casualizado, com três repetições por parcela. As parcelas foram definidas como círculos imaginários localizados entre duas goiabeiras, com um distanciamento mínimo de 5 metros entre parcelas (Figura 1).

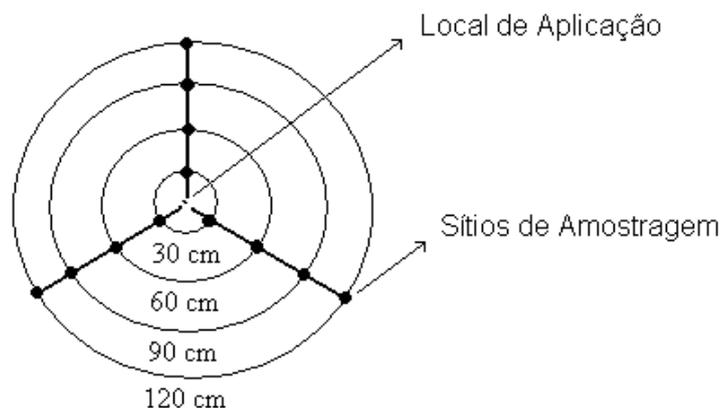


Figura 1. Esquema de amostragem por meio de transectas de posicionamento aleatório em diferentes distanciamentos.

No tratamento 1, um inseto-cadáver foi aplicado, enquanto no tratamento 2, 15 insetos-cadáveres foram aplicados. Os cadáveres foram aplicados sub-superficialmente a 5 cm de profundidade no centro de cada parcela e imediatamente cobertos pelo solo removido. O experimento foi montado durante o março de 2007 e estendeu-se por 60 dias. Amostras de solo foram coletadas 1, 3, 5, 8 e 10 semanas após a aplicação dos cadáveres para avaliar a capacidade dispersiva e persistência de JIs de *H. baujardi* LPP7 no solo. Em cada data de coleta, o solo foi amostrado utilizando três transectas aleatórias. O solo foi amostrado a 4 distâncias a partir do local de aplicação do cadáver (30, 60, 90 e 120 cm) e a 3 diferentes profundidades (0-10 cm, 10-20 cm e 20-30 cm). Em cada local de amostragem, uma amostra de solo foi tomada com trado a cada profundidade (Basic Soil Sampling Kit AMS, Inc.), gerando um total de 36 amostras por parcela em cada data de avaliação. Durante o período experimental, 180 amostras foram tomadas de cada parcela e 540 por tratamento (1.080 amostras totais). Cada amostra consistiu de aproximadamente 400 g de solo, que após homogeneização, obtinha-se uma sub-amostra de 100 g para a extração de JIs.

Extração de juvenis infectantes e análise estatística

No laboratório, sub-amostras de 100 g de cada amostra coletada foram submetidas à extração de JIs seguindo o procedimento de Jenkins modificado (Jenkins, 1964). Juvenis infectantes vivos foram identificados e contabilizados em microscópio estereoscópico com o auxílio de uma lâmina de Peters. Os JIs foram diferenciados de outras espécies de nematóides pela sua locomoção característica, tamanho e morfologia bucal.

Os dados foram normalizados utilizando a transformação de raiz quadrada e submetidos à análise de variância (ANOVA) para determinação de diferenças estatísticas entre tratamentos. Diferenças entre médias de tratamentos foram determinadas utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Não foram encontrados JIs de nenhuma espécie de NEP antes do estabelecimento do experimento. A temperatura média do solo no período experimental registrada a 10 cm de profundidade foi de 20,2°C (18,3-23,1) e o conteúdo hídrico do solo oscilou entre 13,4 e 25,9% de umidade.

Considerando todo o experimento, JIs foram recuperados em 114 das 1.080 amostras analisadas (10,6%). Nos tratamentos 1 e 2, 8,3 e 13% das amostras foram positivas, respectivamente. O número total de JIs recuperados em cada distanciamento avaliado foi de 4.881, 3.807, 2.828 e 1.854, respectivamente.

O número médio de JIs recuperados não foi significativamente diferente entre os tratamentos 1 e 2, e a cada distanciamento avaliado, com exceção da distância de 90 cm ($F = 7,98$; $df = 1,268$; $P = 0,0051$). Para comparar os diferentes distanciamentos nos dois tratamentos, o número médio de JIs recuperados a cada distância foi considerado, sem apresentar diferenças estatísticas ($F = 0,26$; $df = 3, 1.076$; $P = 0,84$) (Figura 2).

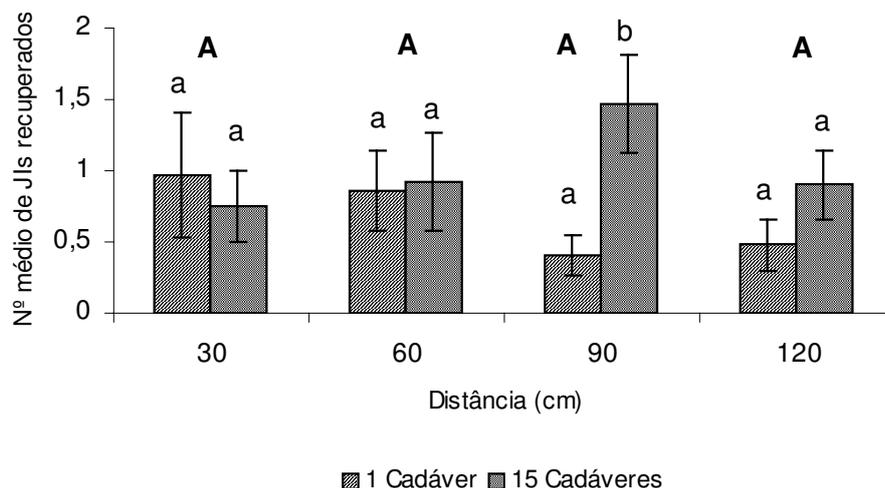


Figura 2. Número médio de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 recuperados de amostras de solo coletadas a diferentes distâncias do local de aplicação de 1 ou 15 cadáveres. Médias contendo mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

A respeito das três profundidades avaliadas, 63,2% do total das amostras positivas foram extraídas na profundidade de 0-10 cm. A porcentagem de amostras positivas obtidas às profundidades de 10-20 cm e 20-30 cm foram de 23,7 e 13,1%, respectivamente. O número médio de JIs recuperados a cada profundidade de avaliação foi significativamente diferente, sendo o maior número de JIs recuperados na profundidade de 0-10 cm ($F = 26,75$, $df = 2$, 1.077 , $P < 0,05$). Comparando os tratamentos 1 e 2 nas três profundidades amostradas, não foram observadas diferenças significativas (Figura 3).

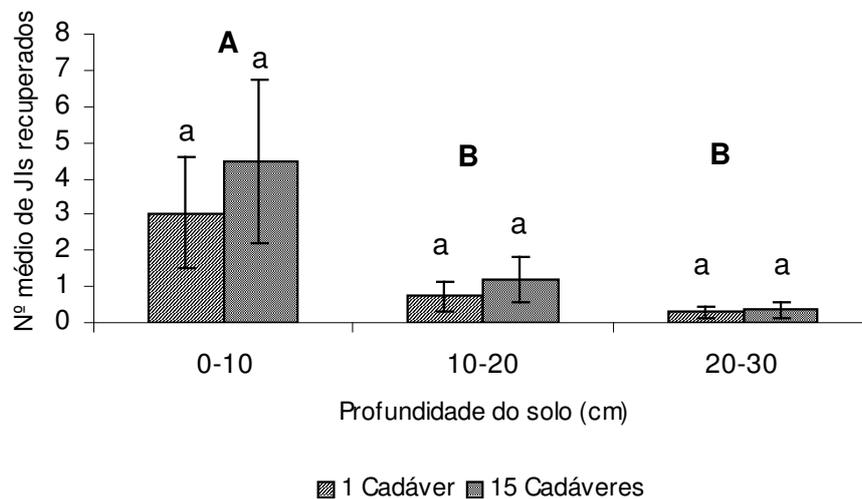


Figura 3. Número médio de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 recuperados de amostras de solo coletadas a diferentes profundidades após aplicação de 1 ou 15 cadáveres. Médias contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

A maior quantidade de amostras positivas foram recuperadas na quinta semana após a aplicação dos insetos-cadáveres (61,4%). Também, a maior média de JIs recuperados foi no mesmo período ($F = 37,91$; $df = 4$, 1.075 ; $P < 0,05$) (Figura 4).

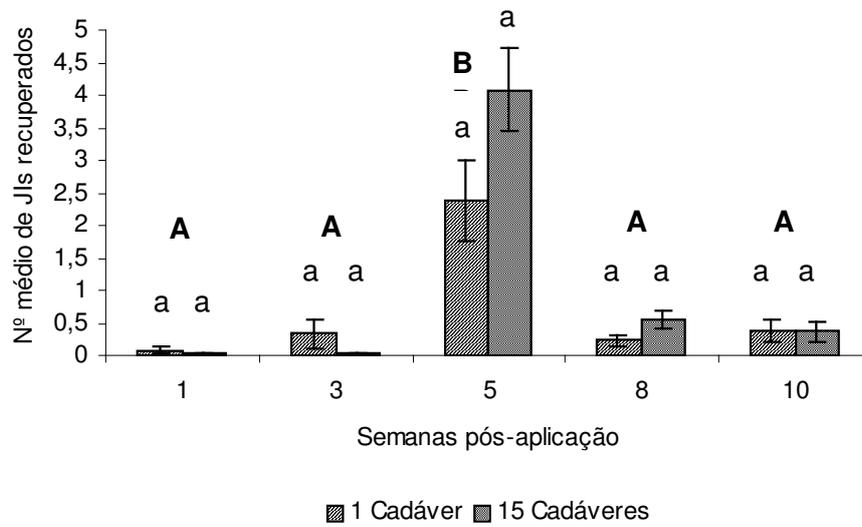


Figura 4. Número médio de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 recuperados de amostras de solo coletadas em diferentes datas. Médias contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

O número absoluto de JIs recuperados nos diferentes distanciamentos a partir do local de aplicação dos tratamentos 1 e 2, ao longo das 10 semanas de avaliação são observados nas Figuras 5 e 6.

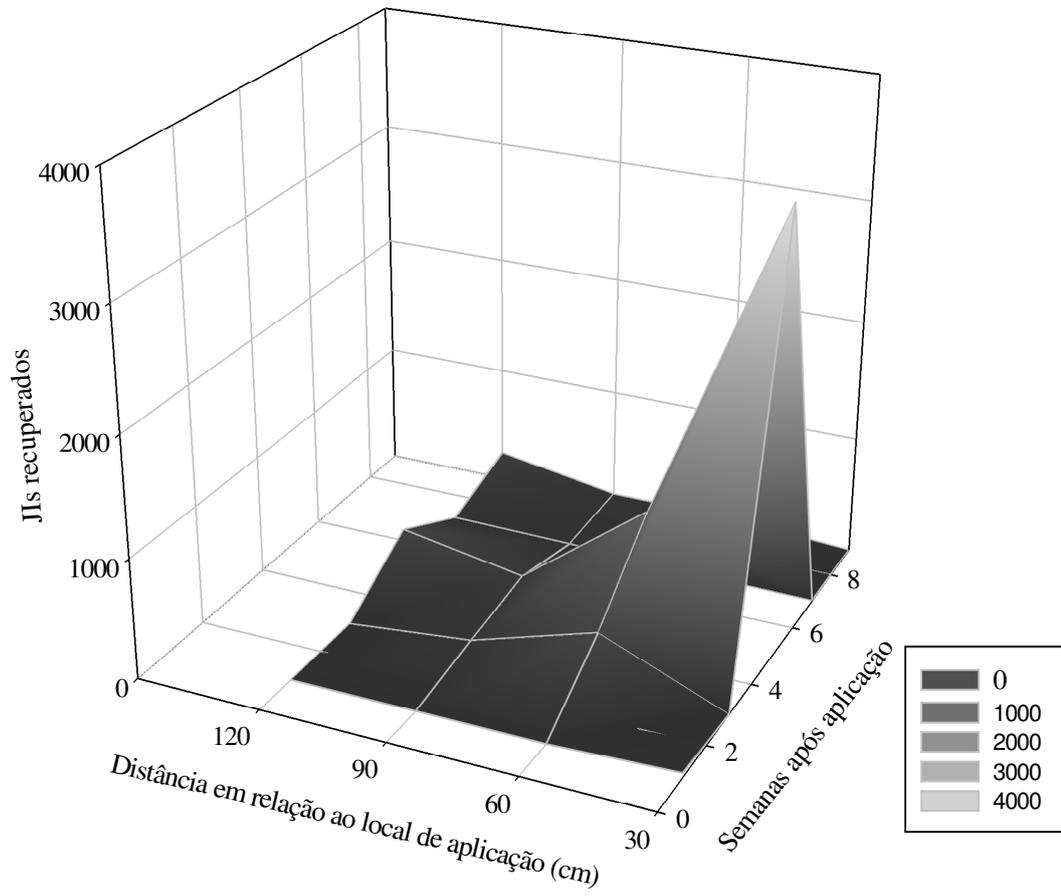


Figura 5. Distribuição espacial de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 quando uma larva de *Galleria mellonella* infectada foi aplicada.

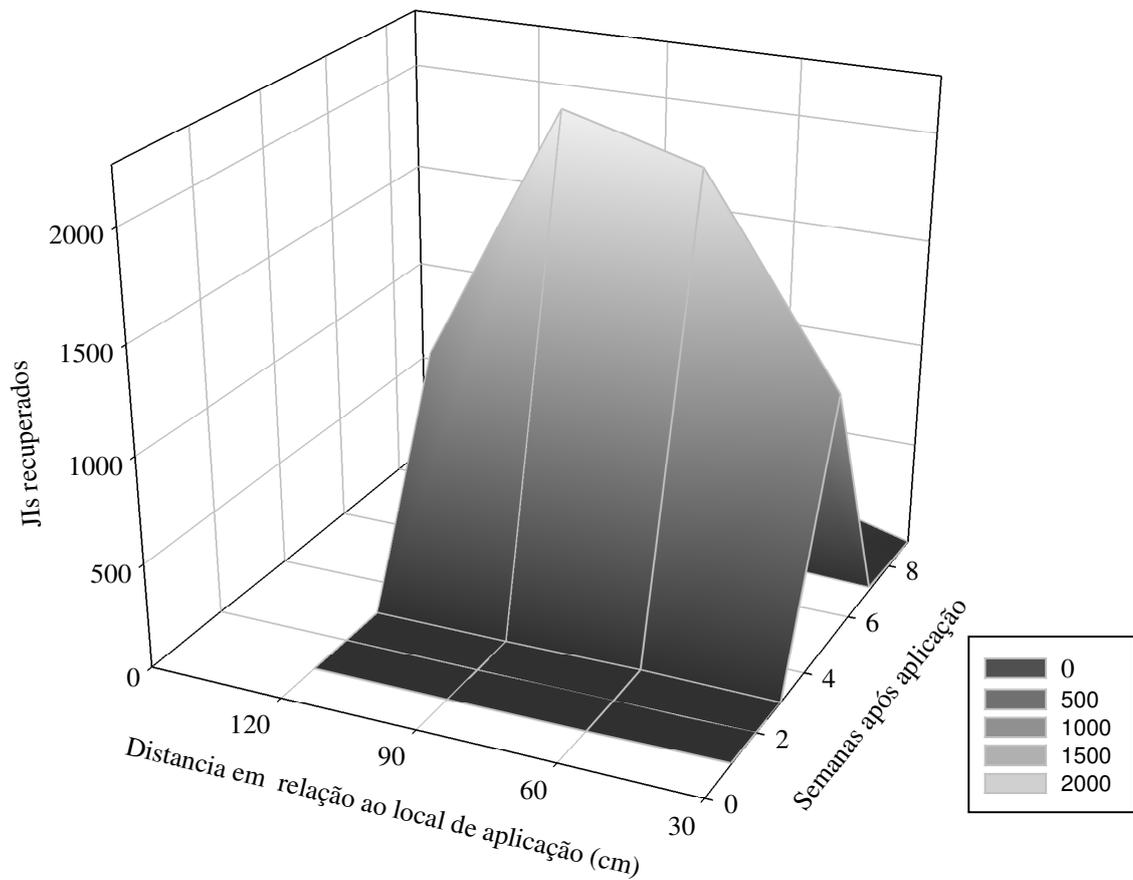


Figura 6. Distribuição espacial de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 quando quinze larvas de *Galleria mellonella* infectadas foram aplicadas.

DISCUSSÃO

Neste estudo, a capacidade dispersiva de JIs de *H. baujardi* LPP7 emergidos de insetos-cadáveres foi observada a campo. O maior número de JIs foram recuperados na profundidade de 0-10 cm, na quinta semana após

aplicação e a 90 cm do local de aplicação. Em geral, não existiram diferenças significativas no número médio de JIs recuperados nas duas dosagens testadas, 1 ou 15 cadáveres. Por outro lado, observa-se uma distribuição espacial mais uniforme nas parcelas onde foram aplicados 15 cadáveres.

Os resultados indicam que JIs de *H. baujardi* LPP7 possuem estratégia “cruiser” de busca (Lewis, 2002). A 120 cm foi observada uma redução no número de JIs recuperados. Em geral, em pomares de goiaba corretamente manejados, as áreas sob as copas podem ser maiores do que 3 m de diâmetro. Sabendo que JIs de *H. baujardi* LPP7 podem ser encontrados em número significativo em distâncias superiores a 90 cm, sugerimos essa distância entre os pontos de aplicação dos cadáveres.

Examinando as amostras coletadas a cada profundidade, a maior proporção de amostras positivas e de JIs recuperados foram aos 0-10 cm. Nossos resultados concordaram com os de Cabanillas e Raulston (1994), que recuperaram a maior parte de JIs de NEPs nos primeiros 10 cm do solo. Esta localização dos JIs favorece o controle de pragas que possuem parte do seu ciclo de vida nas camadas superficiais do solo. Por outro lado, essa localização dos JIs os expõem às variações ambientais que podem afetar a densidade populacional, movimentação e infectividade. É importante destacar que não foram observadas diferenças no número de JIs recuperados nos distanciamentos estudados. O maior número de JIs recuperados foi obtido na quinta semana após aplicação. O número de JIs recuperados nas primeiras duas datas de avaliação foi significativamente menor que na terceira, e similar à quarta e quinta data de coleta.

Na primeira avaliação escassos JIs foram recuperados. Em condições de laboratório o começo da emergência em larvas de *G. mellonella* infectadas com *H. baujardi* LPP7 é no dia 14 pós-infecção, continuando por um período de 5 dias (Dolinski *et al.*, 2007). Em conseqüência, a primeira data de avaliação coincide com o dia 15 pós-infecção, onde JIs acabaram de emergir e não tiveram tempo suficiente para movimentar-se até os locais de amostragem. A temperatura ideal para o desenvolvimento desse isolado é de 26 °C. A média de temperatura do solo na primeira semana foi de 18 °C, portanto a temperatura pode ter afetado negativamente a emergência de JIs dos cadáveres.

Embora o efeito da umidade do solo na movimentação dos JIs não tenha sido o objetivo deste trabalho, é importante fazer algumas considerações. Na segunda semana após aplicação dos cadáveres, registrou-se o nível mais alto de umidade de todo o experimento, causado pelas precipitações que aconteceram na região. O elevado conteúdo hídrico do solo poderia ter afetado a movimentação dos JIs que emergiram dos cadáveres. Infere-se que um grande número de JIs teriam emergido dos cadáveres e teriam permanecido próximos ao local de emergência até que o conteúdo hídrico do solo atingisse níveis que facilitassem a sua locomoção. Molyneux e Bedding (1984) demonstraram que a atividade de NEPs é influenciada pela espessura da camada de água que recobre as partículas de solo. O solo na área experimental foi classificado como arenoso, permitindo a formação de uma camada de água ao redor das partículas de solo, sem afetar a aeração. Wallace (1958) enfatizou que a maior eficiência de locomoção era observada quando a camada de água ao redor das partículas do solo possuíam a espessura da metade do diâmetro do corpo do nematóide. Portanto, durante a segunda semana, o elevado conteúdo hídrico do solo não foi suficiente para matar os nematóides, mas sim para inibir a sua locomoção. Na terceira semana pós-aplicação, o conteúdo hídrico do solo decresceu, permitindo a movimentação dos JIs. Como conseqüência, na terceira data de amostragem, foi registrado o maior número de amostras positivas (61,4%) e de JIs recuperados (88%). Além do alto conteúdo hídrico do solo afetando a locomoção dos JIs, outros fatores bióticos e abióticos podem ter afetado tanto a locomoção como a emergência dos JIs dos insetos-cadáveres. Estudos adicionais são necessários para o entendimento da emergência de JIs em condições de campo.

A alta concentração de JIs em espaço e tempos definidos (por exemplo, 90 cm do ponto de aplicação e quinta semana pós-aplicação) pode evidenciar que esses se movimentam em massa, podendo formar um padrão de dispersão agregado. Vários pesquisadores têm encontrado esse padrão agregado de JIs (Stuart e Gaugler, 1994; Cabanillas e Raulston, 1994; Glazer *et al.*, 1996; Efron *et al.*, 2001). Esta distribuição pode ser devido a uma soma de fatores, tais como características específicas da espécie (estratégia de busca dos hospedeiros, capacidade dispersiva, reciclagem, energias de reserva, tolerância à temperatura e dessecação), que por sua vez são reguladas por fatores bióticos (predação, competição, relações foréticas, sinergismo, raízes de plantas, entre outros) e

abióticos (umidade do solo, radiação, temperatura, aeração, características do solo, entre outros) existentes no ambiente (Kaya, 1990; Stuart e Gaugler, 1994; Koppenhöfer *et al.*, 1995; Shapiro-Ilan *et al.*, 1995; Koppenhöfer e Kaya, 1997; Efron *et al.* 2001; Kaya, 2002; Duncan *et al.*, 2003; Grant e Villani, 2003; Shapiro-Ilan *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2006). Adicionalmente, práticas culturais implementadas nos pomares de goiaba podem afetar todos esses fatores mencionados.

Ao término do experimento aos 2,5 meses, JIs de *H. baujardi* LPP7 permaneciam viáveis. Pesquisas adicionais são necessárias para determinar a persistência de *H. baujardi* LPP7 em condições de campo. *Heterorhabditis bacteriophora* Oswego apresentou persistência superior a 24 meses posterior a aplicação (Shields *et al.*, 1999; Loya e Hower, 2002). Um isolado do gênero *Heterorhabditis* persistiu 10 meses quando aplicado em solos cultivados com *Vaccinium* spp. (Shanks e Agudelo-Silva, 1990). Contudo, a persistência dos JIs está altamente correlacionada às condições ambientais e às condições intrínsecas e extrínsecas dos diferentes isolados. Loya e Hower (2002) não observaram diferenças significativas nas densidades de *H. bacteriophora* após 43 dias de aplicação por aspersão nas dosagens de 2.5, 7 ou 15 bilhões de JIs/ha, indicando que a concentração de aplicação provavelmente não afeta a persistência de JIs por longos períodos de tempo. Em pomares de goiaba, a persistência pode ser facilitada pela ausência de práticas culturais que promovam a remoção do solo e da cobertura vegetal de baixo das copas das árvores. A existência de cobertura vegetal diminui o efeito negativo dos raios ultravioletas e amortece estresses ambientais, principalmente oscilações da temperatura do solo e umidade. Também as condições tropicais podem incrementar o número de gerações de potenciais hospedeiros, favorecendo a reciclagem de JIs.

Neste estudo foi considerada a viabilidade e não a infectividade dos JIs. Juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 permaneceram infectantes durante os 4 meses de experimento no campo (Del Valle *et al.*, 2007). Para que um agente biológico seja eficiente no controle de pragas agrícolas de solo, estes devem permanecer infectantes no solo por um período de tempo mínimo de duas semanas (Shapiro-Ilan *et al.*, 2006). Este estudo demonstra que JIs de *H. baujardi* LPP7 aplicados como insetos-cadáveres permaneceram viáveis um período de tempo superior ao anteriormente mencionado. O padrão espacial de JIs de *H.*

baujardi LPP7 apresentou uma distribuição horizontal mas ampla quando os insetos-cadáveres foram aplicados em maior dosagem, permanecendo nos primeiros centímetros do solo.

Agradecimentos

Agradece-se a Vicente Mussi Dias, Juan Carlos Lara, Eduardo Sardinha e Grace Kelly dos Santos pela assistência técnica. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Governo do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão de bolsa de estudo de doutorado. E especialmente a K. Kawae e M. Uesu, membros da Associação de Produtores de Goiaba de Cachoeiras de Macacu-RJ (Goiacam), pela disponibilização de seus pomares para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boff MIC, Wieggers GL, Gerritsen LJM, Smits PH. 2000. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E87.3 in *Galleria mellonella*. *Nematology* 2: 303-308.
- Bruck DJ, Shapiro-Ilan DI, Lewis EE. 2005. Evaluation of application technologies of entomopathogenic nematodes for control of the black vine weevil. *J. Econ. Entomol.* 98: 1884–1889.
- Cabanillas HE, Raulston JR. 1994. Evaluation of the spatial pattern of *Steinernema riobravis* in corn plots. *J. Nematol.* 26: 25–31.
- Choo HY, Lee DW, Yoon HS, Lee SM, Hang DT. 2002. Effects of temperature and nematode concentration on pathogenicity and reproduction of entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Pocheon strain (Nematoda: Steinernematidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 41: 269-277.
- Curran J. 1992. Influence of application method and pest population size on field efficacy of entomopathogenic nematodes. *J. Nemat.* 24: 631–636.

- Del Valle EE, Dolinski C, Barreto, ELS, Souza RM, Samuels RI. 2008. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Bio. Sci. & Tech*, 18 (1): 33-41.
- Del Valle EE, Dolinski C, Souza RM, Samuels RI. 2005a. Avaliação de Metodologias de Seleção para Tolerância a Elevadas Temperaturas em *Heterorhabditis baujardi* (Nematoda: Rhabditida). *Nematol. Bras.* 29: 207-214.
- Del Valle EE, Dolinski C, Souza RM, Samuels RI. 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, Del Valle EE, Burla, RS, Machado, IR. 2007. Biological traits of two native brazilian entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematol. Bras.* 31: 180-185.
- Dolinski, C., Kamitani, FL., Machado, IR, Winter CE. 2008. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *in press*.
- Duncan LW, Graham JH, Dunn DC, Zellers J, McCoy CW, Nguyen K. 2003. Incidence of endemic entomopathogenic nematodes following application of *Steinernema riobrave* for control of *Diaprepes abbreviatus*. *J. Nematol.* 35: 178–186.
- Efron D, Nestel D, Glazer I. 2001. Spatial analysis of entomopathogenic nematodes and insect hosts in a citrus grove in a semi-arid region in Israel. *Environ. Entomol.* 30: 254–261.
- Forst S, Clarke D. 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis. In: Gaugler R, editor. *Entomopathogenic Nematology*, CRC Press, p 57-77.
- Georgis R, Poinar Jr. GO. 1983. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda:Steinernematidae). *J. Nematol.* 15: 308–311.
- Glazer I, Kozodoi E, Salame L, Nestel D. 1996. Spatial and temporal occurrence of natural populations of *Heterorhabditis* spp. (Nematoda:Rhabditida) in a semiarid region. *Biol. Control* 6: 130–136.

- Grant JA, Villani MG. 2003. Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. *Environ. Entomol.* 32: 80–87.
- Jansson RK. 1996. Infectivity and reproduction of three heterorhabditid nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) in two insect hosts. *Florida Entomol.* 79: 363-373.
- Jansson RK, Lecrone SH, Gaugler R. 1993. Field efficacy and persistence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) for control of sweetpotato weevil (Coleoptera: Apionidae) in southern Florida. *J. Econ. Entomol.* 86: 1055–1063.
- Jenkins WR. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis. Rep.* 48: 692.
- Kaya HK. 1990. Soil ecology. In: Gaugler R, Kaya HK, editors. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton, Florida. p 93-111.
- Kaya HK, Stock P. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey LA, editor. *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, San Diego, CA. p 281-324
- Kaya HK. 2002. Natural enemies and other antagonists. In: Gaugler R, editor. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK. p 189–204.
- Koppenhöfer AM, Kaya HK. 1995. Density-dependent effects on *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) within an insect host. *J. Parasitol.* 80: 797-799.
- Koppenhöfer AM, Kaya HK. 1997. Additive and synergistic interactions between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biol. Control* 8: 131–137.
- Koppenhöfer AM, Kaya HK, Taormino SP. 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *J. Invertebr. Pathol.* 65: 193–199.
- Lewis EE. 2002. Behavioral Ecology. In: Gaugler R, editor. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK. p 205–224.
- Loya LJ, Hower Jr. AA. 2002. Population dynamics, persistence, and efficacy of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Oswego strain) in association with the clover root curculio (Coleoptera: Curculionidae) in Pennsylvania. *Environ. Entomol.* 31: 1240-1250.

- Molina JPA, Moino Jr. A, Cavalcanti RS. 2004. Produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. *Arq. Inst. Biol.* 71: 347-354.
- Molyneux AS, Bedding RA. 1984. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Nematologica* 30: 358–365.
- Parkman JP, Hudson WG, Frank JH, Nguyen KB, Smart Jr. GC. 1993. Establishment and persistence of *Steinernema scapterisci* (Rhabditida: Steinernematidae) in field populations of *Scapteriscus* spp. mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae). *J. Entomol. Sci.* 28: 182–190.
- Perez EE, Lewis EE, Shaprio-Ilan DI. 2003. Impact of host cadaver on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) under desiccating conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 111-118.
- Poinar GO, Hom A. 1986. Survival and horizontal movement of infective stage *Neoplectana carpocapsae* in the field. *J. Nematol.* 18: 34–36.
- Poinar GO Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler R, Kaya HK, editors. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, CRC Press. p 23-61.
- Portillo-Aguilar C, Villani MG, Tauber MJ, Tauber CA, Nyrop JP. 1999. Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. *Environ. Entomol.* 28: 1021–1035.
- Selvan S, Campbell JF, Gaugler R. 1993. Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 278-284.
- Shanks Jr. CH, Agudelo-Silva F. 1990. Field pathogenicity and persistence of heterorhabditid and steinernematid nematodes (Nematoda) infecting black vine weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae) in cranberry bogs. *J. Econ. Entomol.* 83: 107-110.
- Shapiro DI, Glazer I. 1996. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. *Environ. Entomol.* 25: 1455–1461.

- Shapiro DI, Lewis EE. 1999. Comparisons of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. *Environ. Entomol.* 28: 907-911.
- Shapiro DI, Tylka GL, Berry EC, Lewis LC. 1995. Effects of earthworms on the dispersal of *Steinernema* spp. *J. Nematol.* 27: 21–28.
- Shapiro-Ilan DI, Gouge DH, Piggott SJ, Fife JP. 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biol. Control* 38: 124–133.
- Shapiro-Ilan DI, Lewis EE, Tedders WL. 2003. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspensions. *J. Invertebr. Pathol.* 83: 270-272.
- Shields EJ, Testa A, Miller JM, Flanders KL. 1999. Field efficacy and persistence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' and *H. bacteriophora* 'NC' on alfalfa snout beetle larvae (Coleoptera:Curculionidae). *Environ. Entomol.* 28: 128-136.
- Stuart RJ, Barbercheck ME, Grewal PS, Taylor RAJ, Hoy CW. 2006. Population biology of entomopathogenic nematodes: concepts, issues, and models. *Biol. Control* 38: 80–102.
- Stuart RJ, Gaugler R. 1994. Patchiness in populations of entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 39–45.
- Wallace HR. 1958. Movement of eelworms. *Ann. Appl. Biol.* 46: 74–85.
- White GF. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66:302–303.
- Wilson M, Gaugler R. 2004. Factors limiting short-term persistence of entomopathogenic nematodes. *J. Appl. Entomol.* 128: 250–253.
- Woodring L, Kaya HK. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas. Series Bull. 331. 30 p.
- Zervos S, Johnson SC, Webster JM. 1991. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. *Can. J. Zool.* 69: 1261-1264.

**EFICÁCIA DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (NEMATODA: RHABDITIDA)
APLICADOS EM CADÁVERES DE LARVAS DE *Galleria mellonella* PARA O
CONTROLE DE LARVAS DE *Conotrachelus psidii* (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)²**

RESUMO

O gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* Marsall ³(1922), é a praga de maior importância nos pomares de goiaba do Brasil, causando severa depreciação na qualidade dos frutos. Neste trabalho avaliou-se a susceptibilidade das larvas do gorgulho-da-goiaba frente a juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 em casa de vegetação e a campo, quando aplicados em cadáveres de larvas de *Galleria mellonella* no sétimo ínstar. A persistência desses nematóides foi avaliada mediante a técnica inseto-armadilha, utilizando larvas de *G. mellonella*. As concentrações de 2, 4 e 6 insetos-cadáveres por vaso em casa-de-vegetação causaram mortalidades significativamente diferentes quando comparadas à testemunha. A campo, diferenças significativas foram observadas em relação à testemunha somente quando insetos-cadáveres foram aplicados nas parcelas. A persistência dos JIs emergidos dos cadáveres foi de 6 semanas após a aplicação. Após este período, significante queda na persistência dos JIs foi

² Publicado no periódico *Biocontrol Science & Technology* 18 (1): 33-41, 2008.

observada. Nosso estudo demonstra que JIs *H. baujardi* LPP7 emergidos de cadáveres de *G. mellonella* infectados são patogênicos contra larvas no quarto instar do gorgulho-da-goiaba e que são persistentes.

ABSTRACT

The guava weevil, *Conotrachelus psidii*, is a major pest of guava in Brazil causing severe reduction in fruit quality. We assessed its susceptibility to *Heterorhabditis baujardi* LPP7 infective juveniles (IJs) in the greenhouse and under field conditions applying the nematodes in cadavers of 7th instar *Galleria mellonella* larvae. Field persistence of these nematodes in the soil was evaluated through *G. mellonella*-baiting. Insect cadaver concentrations of 2, 4, and 6 applied in pots in the greenhouse experiment caused significant mortality compared to the control. Significance differences were observed in the field between control and treatments only when 6 cadavers per 0.25 m² were applied. Infective juveniles from the cadavers persisted 6 weeks after application in the field, but decreased greatly thereafter. Our work demonstrates that *H. baujardi* LPP7 IJs emerging from *G. mellonella* cadavers can be efficacious against guava weevil fourth instar larvae. Also, we demonstrated the long term persistence of IJs in the soil.

INTRODUÇÃO

O gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), é a praga de maior importância nas plantações comerciais de goiaba no Estado do Rio de Janeiro, afetando a qualidade e quantidade dos frutos obtidos. Também é responsável por grandes perdas econômicas, atacando 60-100% da totalidade dos frutos produzidos (Bóscan de Martinez e Casares, 1982). Esse curculionídeo possui quatro estágios de desenvolvimento dentro do fruto de

goiaba. Frutos infectados amadurecem prematuramente e caem ao solo. As larvas abandonam os frutos amadurecidos, penetram e permanecem nos primeiros 10 cm do solo, desenvolvendo-se para os estádios pre-pupal e pupal durante o inverno e primavera, para a posterior emergência dos adultos no verão (Bailez *et al.*, 2003; Boscán de Martinez e Casares, 1982). Os adultos emergidos se acasalam e as fêmeas ovopositam sobre os frutos verdes recém formados (3 cm de diâmetro). Durante o desenvolvimento do fruto, cada local de ovoposição se converte em uma depressão escura comercialmente indesejada. Métodos químicos convencionais são utilizados rotineiramente para manter a população de adultos a níveis baixos, mas quimicamente não se pode se atingir as larvas no interior dos frutos ou as que permanecem no solo (Orlando *et al.*, 1974). Além disso, o controle dos adultos freqüentemente não é eficaz, devido à emergência escalonada desses e o curto período de tempo entre sua emergência e ovoposição.

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) do gênero *Heterorhabditis* e *Steinernema* podem ser eficientes agentes de controle de larvas do gorgulho-da-goiaba. Estudos realizados por Del Valle *et al.* (2005) e Dolinski *et al.* (2006) demonstraram a elevada susceptibilidade do quarto ínstar larval do gorgulho-da-goiaba a *H. baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen e Moens LPP7, em experimentos de laboratório e casa-de-vegetação.

Esses nematóides são patógenos obrigatórios de insetos. Os juvenis infectantes (JIs) do gênero *Heterorhabditis* carregam bactérias do gênero *Photorhabdus* no seu intestino. Após a entrada dos JIs através das aberturas naturais (boca, espiráculos, ânus) ou diretamente pela cutícula, eles migram até a hemocele, onde as bactérias são liberadas na hemolinfa do inseto (Forst e Clarke, 2002). Em geral, as bactérias matam o inseto hospedeiro por septicemia em 24-48 horas. Os nematóides em desenvolvimento se nutrem dos tecidos do hospedeiro digeridos e das bactérias que se proliferam, para posteriormente se reproduzirem (Forst e Clarke, 2002).

Nas últimas duas décadas, NEPs foram aplicados principalmente na forma de suspensão aquosa para o controle de pragas agrícolas. Contudo, este método de aplicação apresenta limitações (Wright *et al.*, 2005). Para pragas com algum estágio susceptível no solo, uma alternativa de aplicação é a colocação sub-superficial no solo de cadáveres de insetos hospedeiros infectados com NEPs

(referido como inseto-cadáver). Juvenis infectantes no inseto-cadáver podem levar entre 4 e 14 dias para completar o seu desenvolvimento e migrar para o solo na procura dos hospedeiros. Pesquisas têm demonstrado que JIs emergidos de insetos-cadáveres apresentaram maior capacidade migratória, infectividade e persistência no solo em relação a JIs aplicados em suspensão aquosa (Shapiro e Glazer, 1996; Shapiro e Lewis, 1999). Objetivou-se neste estudo determinar a susceptibilidade das larvas do gorgulho-da-goiaba a JIs *H. baujardi* LPP7 emergidos de cadáveres infectados de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) em experimentos de casa-de-vegetação e campo. A persistência de JIs aplicados no campo foi também determinada. Este é o primeiro trabalho no Brasil avaliando o desempenho de JIs emergidos de insetos-cadáveres para o controle de pragas agrícolas.

MATERIAL E MÉTODOS

Nematóides entomopatogênicos e insetos-cadáveres

Juvenis infectantes do nematóide entomopatogênico *H. baujardi* LPP7, proveniente da floresta equatorial em Rondônia-Brasil, foram utilizados para infectar larvas de sétimo ínstar de *Galleria mellonella* (peso aproximado de 300mg) em câmara de germinação a 25°C, de acordo com o procedimento descrito por Woodring e Kaya, (1988). Os JIs foram coletados mediante a utilização de armadilhas de White modificadas (White, 1927) por 6 dias consecutivos após a primeira emergência. Juvenis infectantes foram armazenados em água por no máximo uma semana a 16°C, antes de sua utilização.

Os insetos-cadáveres foram produzidos pela exposição de larvas no sétimo ínstar de *G. mellonella*, em grupos de cinco, 100 JIs adicionados em placas de Petri (90 mm), com papel de filtro na base (Whatman N°1). As placas foram fechadas e mantidas por 4 dias em câmara de germinação a 25 °C. Posteriormente, os cadáveres foram transferidos a outras placas de Petri (90 mm)

com papel de filtro seco (Whatman Nº1), por um período adicional de 2 dias para permitir o desenvolvimento dos sintomas típicos de infecção de NEPs.

Larvas no quarto ínstar de *C. psidii* foram coletadas manualmente em pomares de goiaba infectados na localidade de São Francisco de Itapaboana-RJ e armazenados em areia estéril umedecida (20% de umidade) a, aproximadamente, 20 °C até utilização.

Experimento em casa-de-vegetação

Potes plásticos (15 X 13 X 11 cm – com capacidade de 1,5 L) revestidos de tela plástica para evitar o escape de larvas foram preenchidos com 1000 cm³ de solo (58% areia, 23% argila, 19% silte; pH 4.6; 2.4% de matéria orgânica) coletados no pomar de goiaba. Os potes foram umedecidos a cada dois dias, visando manter o conteúdo hídrico próximo à capacidade de campo ao longo do experimento. Quatro larvas de quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba foram colocadas na base de cada pote, com 24 horas de antecedência à adição dos insetos-cadáveres. Cadáveres infectados foram colocados a 2 cm de profundidade em relação à superfície superior dos potes. Os tratamentos consistiram na aplicação de 0 (testemunha), 1, 2, 4 e 6 insetos-cadáveres em cada pote (área superficial de 133 cm). O desenho experimental foi inteiramente casualizado, com 6 repetições para cada tratamento. A mortalidade das larvas do gorgulho-da-goiaba foi registrada aos 10 dias pós-aplicação. A remoção completa do solo nos potes contendo os tratamentos foi necessária para avaliar a mortalidade das larvas, sendo consideradas larvas infectadas por NEPs aquelas que apresentaram sintomas e sinais típicos de infecção por heterorhabditídeos (cor marrom-tijolo homogênea e textura firme). O experimento foi repetido 3 vezes no tempo, utilizando-se 72 larvas por tratamento e cada repetição. Registros da temperatura do solo e do ar foram realizados durante o período experimental.

Os dados de mortalidade foram convertidos em porcentagem (média \pm erro padrão), transformados em arco-seno e analisados, utilizando análise de variância (ANOVA) com o auxílio do programa estatístico: Sistema de Análises Estatísticas (SAEG, 1990). Diferenças entre médias de tratamentos foram separadas utilizando o teste de Tukey ($P < 0.05$).

Experimento a campo

Este estudo foi conduzido em um pomar de goiaba comercial localizado em Cachoeiras de Macacu, RJ, Brasil. Na área experimental, goiabeiras com 25 anos de idade da variedade Pedro Sato têm sido manejadas sem a aplicação de inseticidas nos últimos 3 anos. Cinco amostras de solo de 200 g foram tomadas da área experimental para a análise granulométrica, sendo o solo classificado como arenoso (58% areia, 23% argila, 19% silte; pH 4.6; 2,4% de matéria orgânica e 12,4 cmol_c/dm³ de capacidade de troca catiônica). A umidade do solo foi monitorada utilizando o método gravimétrico, coletando quatro amostras em cada data de avaliação. Para manter o solo próximo à capacidade de campo, um sistema de irrigação por aspersão foi acionado quando necessário. Durante o transcurso do experimento a temperatura do solo foi monitorada a cada hora à profundidade de 10 cm (Watchdog® datalogger, Spectrum Technologies, Inc.)

O goiabal foi caracterizado por uma densa copa e cobertura vegetal sob esta. Antes do experimento, amostras de solo foram coletadas para determinar a presença de NEPs. Para isso, foi implementada a técnica de inseto-armadilha (Kaya e Stock, 1997). O estudo foi realizado durante o outono brasileiro (março-junho). No experimento foram utilizadas parcelas de 0,25 m² de superfície, delimitadas por tela de nylon até a profundidade de 20 cm. Vinte e quatro horas antes da adição dos insetos-cadáveres, 50 larvas de quarto ínstar no gorgulho-da-goiaba foram colocadas a 3 cm da superfície. Os tratamentos consistiram na aplicação de 2, 4 e 6 insetos-cadáveres infectados com *H. baujardi* LPP7. Após aplicação, as parcelas foram cuidadosamente cobertas pela vegetação retirada para simular as condições naturais. As parcelas correspondentes à testemunha não receberam insetos-cadáveres. Cada parcela foi irrigada com 2 L de água após a adição dos insetos-cadáveres, devido à baixa umidade do solo na época de montagem. As 12 parcelas foram distribuídas aleatoriamente entre as goiabeiras. Os tratamentos foram arranjados em um desenho inteiramente casualizado e repetido no tempo logo após o primeiro ensaio. As parcelas foram avaliadas registrando o número de larvas vivas aos 7, 14 e 28 dias pós-aplicação dos insetos-cadáveres. Para a avaliação, o solo foi cuidadosamente removido de cada parcela e as larvas vivas do gorgulho-da-goiaba foram contadas. As larvas

foram consideradas vivas quando apresentavam movimento ao serem manuseadas com pinça laboratorial. As larvas mortas do gorgulho-da-goiaba e insetos-cadáveres rapidamente se desintegram no solo (4-6 dias), impossibilitando sua remoção. Por esta razão, foi registrado o número de larvas vivas. As larvas vivas foram retiradas das parcelas após avaliação. O solo foi recolocado nos locais correspondentes às parcelas para a determinação da persistência dos JIs em condições de campo. A persistência de NEPs foi monitorada em cada parcela durante 3 meses utilizando o método modificado de inseto armadilha (Fan e Hominick, 1991). Duas amostras de solo de 500 g foram coletadas nas parcelas correspondentes aos diferentes tratamentos a cada 2 semanas, com trado de solo (Basic Soil Sampling Kit AMS, Inc.). As amostras foram separadas em duas de 250 gramas e colocadas em potes plásticos com tampas de 500 mL de capacidade. Cinco larvas de *G. mellonella* foram adicionadas em cada pote plástico e incubadas em laboratório à temperatura ambiente (aproximadamente 27°C). Após 7 dias o solo dos potes plásticos foi removido para a determinação do número de larvas de *G. mellonella* mortas. A infecção por NEPs foi confirmada através dos sintomas característicos (cor, textura e consistência dos tecidos).

As porcentagens de larvas vivas em cada parcela foram arco-seno transformadas e analisadas utilizando análise de variância (ANOVA) com o auxílio do software Sistema de Análises Estatísticas (SAEG, 1990). As porcentagens (média \pm erro padrão) mostradas nas figuras correspondem aos dados não transformados. Diferenças entre médias de tratamentos foram separadas utilizando o teste de Tukey ($P < 0.05$). A relação entre infectividade de JIs e persistência foi analisada mediante regressão linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento em casa-de-vegetação

A temperatura média do solo e do ar durante o experimento foi de 22,6 e 28,6 °C, respectivamente. Os tratamentos (2, 4 e 6 insetos-cadáveres por pote) causaram mortalidades significativamente diferentes à testemunha, mas semelhantes entre si ($F = 17.7$; $gl = 4,85$; $P < 0.01$) (Figura 1).

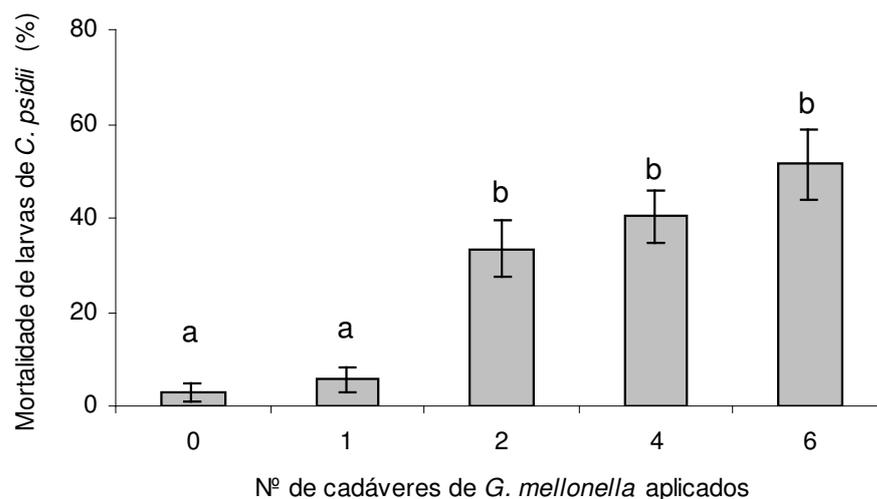


Figura 1: Mortalidade de larvas no quarto ínstar de *Conotrachelus psidii* em potes plásticos contendo 5 diferentes concentrações de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *Heterorhabditis baujardi* LPP7. Médias contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Tinha-se a expectativa de que a mortalidade das larvas do gorgulho-da-goiaba fosse superior a 51,4%, baseados em resultados prévios (Dolinski *et al.*, 2006). Contudo, a baixa mortalidade observada provavelmente foi devido ao curto período de tempo entre emergência de JIs dos cadáveres e o tempo de avaliação. A avaliação foi realizada aos 10 dias pós-tratamento, para que pudessem ser observados claramente os sinais da infecção de NEPs nas larvas do gorgulho-da-goiaba, antes da desintegração dessas. Dolinski *et al.* (2007) determinaram que a emergência de JIs de *H. baujardi* LPP7 em *G. mellonella* começa a partir do 11º dia pós-infecção, sendo que a grande maioria dos JIs emergem entre o 12º e o 15º dia. Neste experimento, os JIs tiveram cinco dias para abandonar o cadáver,

procurar o hospedeiro, penetrá-lo e matá-lo. Além disso, as larvas infectadas requerem no mínimo um dia para desenvolver os sintomas e sinais característicos de infecção de NEPs. O experimento confirma pesquisas prévias relacionadas à susceptibilidade das larvas no quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba frente a *H. baujardi* LPP7. Pesquisas desenvolvidas por Del Valle *et al.* (2005) mostraram mortalidades acima de 80% das larvas em ensaios de coluna de areia quando adicionados 500 JIs de *H. baujardi* LPP7. Em um experimento em casa-de-vegetação, utilizando potes de 20 litros, Dolinski *et al.* (2006) obtiveram 30 e 58% de mortalidade de larvas do gorgulho-da-goiaba quando aplicados 1000 e 2000 JIs de *H. baujardi* LPP7 em suspensão aquosa, respectivamente. No caso de *H. baujardi* LPP7, após 14,7 dias a 25 °C, $147,680 \pm 24,126$ JIs emergiram a partir de uma única larva de *G. mellonella* infectada (Dolinski *et al.*, 2007).

Experimento de campo

Através do método inseto-armadilha, não foram encontrados NEPs na área experimental. O experimento foi conduzido durante o outono, pois nesta época a maior parte dos frutos produzidos já tinha sido coletadas e a população de larvas no solo estava alta devido à queda dos frutos infestados. A aplicação de NEPs nesta época do ano beneficia os JIs, devido à presença e futura disponibilidade de larvas do gorgulho-da-goiaba no solo, incrementando a possibilidade de contato entre JIs e hospedeiros. Esta estratégia de controle biológico baseia-se na utilização de NEPs para diminuir o número de adultos que emergirão e causarão danos no próximo período de colheita.

A temperatura média do solo aos 10 cm de profundidade durante o período experimental foi de 20,2 °C. O conteúdo hídrico do solo variou entre 13,4 e 25,9%. Quando foram aplicados 6 insetos-cadáveres houve diferenças significativa entre a testemunha e os tratamentos ($F = 3.54$; $gl = 3,20$; $P = 0.033$) (Figura 2). Nesse estudo, o efeito de supressão de NEPs sobre as larvas do gorgulho-da-goiaba também foi avaliado de forma indireta, contabilizando as larvas vivas, devido a duas razões. Primeiro, devido à alta mortalidade natural das larvas do gorgulho-da-goiaba no campo e, segundo, devido às larvas infectadas se desintegrarem rapidamente, dificultando a avaliação. A mortalidade natural de larvas do

gorgulho-da-goiaba nas parcelas correspondente às testemunhas foi de $80,7 \pm 5\%$. Del Valle (comunicação pessoal) observou que, após 30 dias em parcelas de campo, a mortalidade natural de larvas do gorgulho-da-goiaba foi de $78,2 \pm 1.5\%$. Estudos adicionais são necessários para precisar a biologia e as causas de mortalidade natural dessa praga no campo. Essa porcentagem pode ser incrementada se for considerado um período de tempo maior, devido aos efeitos adversos de fatores bióticos e abióticos (Griffin *et al.*, 2005). Em condições de laboratório, a mortalidade natural de larvas supera 70 % (Bailez *et al.*, 2003).

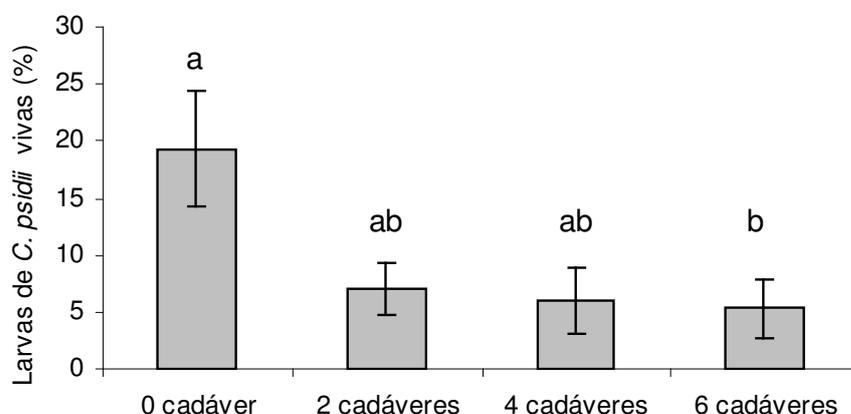


Figura 2: Porcentagem de larvas vivas de *Conotrachelus psidii* após aplicação de 0, 2, 4 e 6 cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *Heterorhabditis baujardi* LPP7 em condições de campo. Médias contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

Em relação às diferentes datas de avaliação no experimento de campo (7, 14 e 28 dias pós-aplicação), diferenças significativas não foram observadas entre tratamentos ($F = 1.91$; $gl = 2,20$; $P = 0.1734$).

A infectividade dos JIs decresceu com o tempo, apresentando diferenças significativas entre as diferentes datas de avaliação ($F = 4.71$; $gl = 5,66$; $P = 0.001$). A partir da sexta semana pós-aplicação observou-se considerável queda na infectividade dos JIs (Figuras 3 e 4). Relacionando a persistência com o

número de insetos-cadáveres aplicados, maior persistência de JIs foi observada nas parcelas que receberam maiores concentrações de insetos-cadáveres (Figura 3). Contudo, a persistência provavelmente está associada à presença e quantidade de reservas lipídicas e condições de solo (umidade, textura e temperatura) (Grant e Villani, 2003; Koppenhöfer *et al.*, 1995; Koppenhöfer e Fuzy, 2006). Além disso, inimigos naturais também influenciam os níveis populacionais de NEPs (Strong, 2002). Regressões foram feitas para mostrar a infectividade de *H. baujardi* LPP7 ao longo do tempo. Quando dois insetos-cadáveres foram aplicados por parcela, a infectividade decresceu seguindo uma resposta logarítmica, enquanto quando quatro e seis insetos-cadáveres foram aplicados a queda de infectividade apresentou resposta linear (Figura 4). Sugere-se que seis semanas de persistência de JIs nos pomares de goiaba sejam suficientes para controlar a maior parte das larvas do gorgulho-da-goiaba no solo.

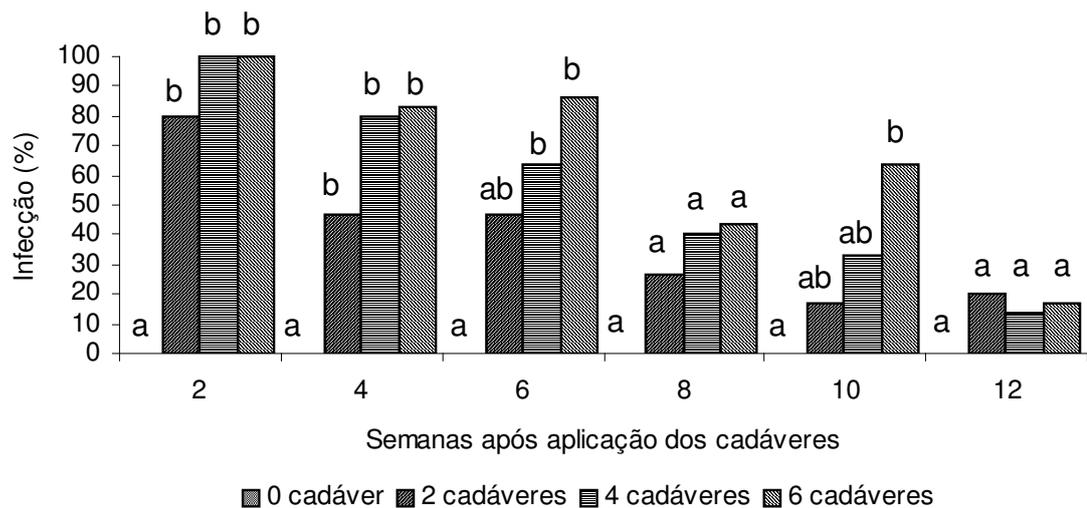


Figura 3: Mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* após a aplicação de quatro concentrações de cadáveres de *G. mellonella* infectados com *Heterorhabditis baujardi* LPP7, avaliada em diferentes períodos de tempo após aplicação. Médias contendo a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,05$).

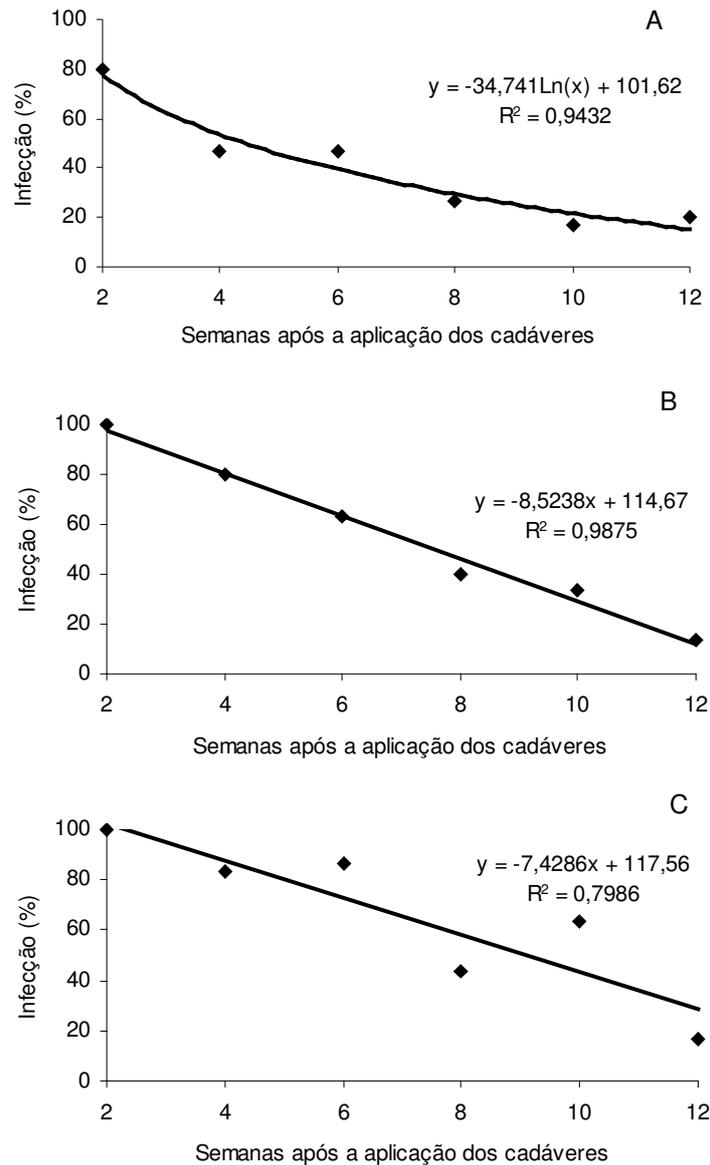


Figura 4: Infectividade de JIs de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 diante de larvas de *Galleria mellonella* ao longo de 12 semanas para três concentrações de insetos-cadáveres (A: dois cadáveres; B: quatro cadáveres e C: seis cadáveres).

O controle de pragas utilizando NEPs formulados como insetos-cadáveres deve ser recomendado por várias razões. Juvenis infectantes emergidos de cadáveres são mais infectivos e possuem maior capacidade dispersiva em condições de laboratório quando comparados a JIs aplicados em suspensão aquosa (Shapiro e Glazer, 1996; Shapiro e Lewis, 1999; Shapiro-Ilan *et al.*, 2003).

A utilização de insetos-cadáveres evita os custos de armazenamento dos JIs e evita o gasto energético associado ao metabolismo dos JIs. Esta “otimização” no uso das reservas energéticas dos JIs favorece a procura de hospedeiros e aumenta a tolerância contra estresses ambientais. Por outro lado, JIs emergem no mesmo local onde os hospedeiros se encontram, facilitando o contato nematóide-hospedeiro. Adicionalmente, a efetividade da aplicação pode ser incrementada mediante a utilização de coberturas dos cadáveres (Shapiro-Ilan *et al.*, 2001). A implementação desta tecnologia é simples e envolve baixo custo econômico, podendo ser aproveitada por produtores agrícolas de diferentes realidades tecnológicas.

Concluindo, demonstra-se com este trabalho a susceptibilidade das larvas no quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba frente a JIs de *H. baujardi* LPP7 emergidos de cadáveres infectados de *G. mellonella*. Também a longa persistência de JIs foi comprovada. Sugerimos o NEP *H. baujardi* LPP7 como uma espécie confiável para seu uso como biopesticida no controle desta praga agrícola.

Agradecimentos

Agradece-se a Grace Kelly pela assistência técnica em nosso estudo e ao Dr. Harry Kaya pela revisão deste manuscrito. E.E. Del Valle recebeu bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Governo do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). O presente trabalho foi financiado por CNPq (473803/03-8).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bailez OE, Viana-Bailez AM, Lima JOG, Moreira DDO. 2003. Life-history of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera:Curculionidae), under laboratory conditions. Neotropical Entomology 32: 203–207.

- Boscán de Martínez N, Cásares R. 1982. Distribución en el tiempo de las fases del gorgojo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) en el campo. *Agronomía Tropical* 31: 123–130.
- Del Valle EE, Dolinski C, Souza RM, Samuels RI. 2005. Performance de *Heterorhabditis baujardi* LPP7(28) (Nematoda:Rhabditida), seleccionada para tolerância a elevadas temperaturas, no controle de *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Nematologia Brasileira* 29: 199-205.
- Dolinski C, Del Valle EE, Stuart RJ. 2006. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera:Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control* 38: 422–427.
- Dolinski C, Del Valle EE, Burla RS, Machado IR. 2007. Biological traits of two native Brazilian entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Nematologia Brasileira* 31(3): 180-185.
- Fan X, Hominick WM. 1991. Efficiency of the Galleria (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from sand and soil. *Revue Nematology* 14: 381–387.
- Forst S, Clark D. 2002. Bacteria-nematode symbiosis. In: Gaugler R, editor. *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, New York, NY. pp. 57-77.
- Grant JA, Villani MG. 2003. Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. *Environmental Entomology* 32: 80–87.
- Griffin CT, Boemare NE, Lewis EE. 2005. Biology and behaviour. In: Grewal PS, Ehlers RU, Shapiro-Ilan DI, editors. *Nematodes as biocontrol agents*. CABI, Wallingford, UK. pp. 47–64.
- Kaya HK, Stock P. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey LA, editor. *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, San Diego,CA. pp. 281-324.
- Koppenhöfer AM, Fuzy EM. 2006. Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal Invertebrate Pathology* 92: 11–22.

- Koppenhöfer AM, Kaya HK, Taormino SP. 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal Invertebrate Pathology* 65: 193–199.
- Orlando A, Sampaio ASM, De Carvalho A, Scaranari HJ, Arruda HV. 1974. Notas sobre o "gorgulho das goiabas" *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae) e experimentos de combate. *O Biológico* 40: 281-289.
- SAEG- Sistema de Análises Estatísticas. 1990. Universidade Federal de Viçosa: Version 6.0.
- Shapiro DI, Glazer I. 1996. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. *Environmental Entomology* 25: 1455–1461.
- Shapiro DI, Lewis EE. 1999. Comparisons of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. *Environmental Entomology* 28: 907-911.
- Shapiro-Ilan DI, Lewis EE, Tedders WL. 2003. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspensions. *Journal Invertebrate Pathology* 83: 270-272.
- Shapiro-Ilan DI, Lewis EE, Behle RW, McGuire MR. 2001. Formulation of entomopathogenic nematode-infected-cadavers. *Journal Invertebrate Pathology* 78: 17–23.
- Strong DR. 2002. Populations of entomopathogenic nematodes in foodwebs. In: Gaugler R, editor. *Entomopathogenic Nematology*. CABI, Wallingford, UK. pp. 225–240.
- White GF. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302–303.
- Wright DJ, Peters A, Schrer S, Fife, JP. 2005. Application technology. In: Grewal PS, Ehlers R-U, Shapiro-Ilan DI, editors. *Nematodes as biocontrol agents*. CABI Publishing, Oxfordshire, UK. pp. 91-106.
- Woodring L, Kaya HK. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas. Series Bulletin 331. 30 p.

**EFEITO DA PROTEÇÃO DE CADÁVERES DE *Galleria mellonella* L.
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) NA EMERGÊNCIA E NA INFECTIVIDADE DE
Heterorhabditis baujardi LPP7 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) E NA
SUA REMOÇÃO POR *Ectatomma* spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

RESUMO

Danos físicos em cadáveres de insetos hospedeiros infectados por nematóides entomopatogênicos (NEPs) são freqüentes durante a manipulação e aplicação desses para o controle biológico de pragas agrícolas. No solo, estes se encontram sujeitos à ação de organismos, como formigas, que podem alterar a eficácia da aplicação. Objetivou-se no presente trabalho determinar o efeito de diferentes coberturas protetoras de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados por *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e avaliar o comportamento de formigas do gênero *Ectatomma* spp. frente aos cadáveres. Os tratamentos de cobertura foram calcáreo comercial, talco e cápsulas de gelatina. Avaliou-se a emergência e infectividade de juvenis infectantes (JIs) dos insetos-cadáveres formulados. O número de JIs extraídos das amostras procedentes de insetos-cadáveres formulados com talco em pó ($9721,6 \pm 1382,3$) e em cápsulas de gelatina ($7892,0 \pm 1072,4$) não apresenta diferenças em relação à testemunha ($6346,4 \pm 1310,7$), indicando que essas coberturas não interferem na emergência dos JIs. A cobertura com calcário em pó afetou negativamente a emergência dos JIs. Elevada infectividade foi observada nos JIs emergidos das diferentes coberturas

analisadas. Quando os cadáveres formulados foram colocados próximos às aberturas dos ninhos de formigas do gênero *Ectatomma* spp., estas carregaram mais do que 20 cm de raio os insetos cadáveres com as distintas coberturas para longe das aberturas dos respectivos ninhos, com exceção dos formulados em cápsulas de gelatina, que não sofreram remoção.

ABSTRACT

Physical damages on insect cadavers infected with entomopathogenic nematodes (EPNs) are frequent during manipulation and application for biological control of agricultural pests. In soil, these insect cadavers are exposed to organisms, that can alter the application effectiveness. Our objective was determine the effect of different protective coverings on emergence and virulence of infective juveniles from *Galleria mellonella* insect cadavers, infected with *Heterorhabditis baujardi* LPP7, and also to evaluate their removing by *Ectatomma* spp.. The covering treatments were commercial calcareous, commercial talc and gelatin capsules. The number of emerging IJs from insect cadavers formulated with talc ($9,721.6 \pm 1,382.3$) and gelatin capsules ($7,892.0 \pm 1,072.4$) was similar to the control ($6,346.4 \pm 1,310.7$), indicating that those coverings do not interfere on IJs emergency. The coverings with powdered calcareous affected negatively the IJs emergency. High infectivity was observed in IJs emerged from tested coverings. *Ectatomma* spp. removed insect cadavers from the nests' entrance as far as 20 cm, with exception of insect cadavers formulated in gelatin capsules, which did not suffer removal.

INTRODUÇÃO

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) pertencentes aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) vêm sendo utilizados no controle de pragas agrícolas como parte de programas de manejo integrado de pragas (MIP) ou como alternativa ao controle. A utilização de NEPs é considerada de sucesso no controle de numerosas pragas que possuem alguma parte do seu ciclo de vida no solo ou ambientes crípticos (Klein, 1990).

Nematóides entomopatogênicos são comumente preservados e aplicados em suspensão aquosa. Nas últimas décadas, a aplicação de NEPs formulados em insetos-cadáveres vêm chamando a atenção de pesquisadores ao redor do mundo. Em experimentos de campo, Jansson *et al.* (1993) e Parkman *et al.* (1993), demonstraram que a aplicação de cadáveres é confiável e eficiente para o controle do gorgulho-da-batata doce (*Cylas formicarius* Fabricius) e grilos (*Scapteriscus* spp.), respectivamente. Trabalhos conduzidos a campo por Del Valle *et al.* (2008 a,b) demonstraram a elevada capacidade migratória de JIs emergidos de cadáveres infectados com *H. baujardi* LPP7 Phan, Subbotin, Nguyen e Moens, assim como a sua patogenicidade frente a larvas de quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii*). Estudos realizados com JIs emergidos de insetos-cadáveres mostram que estes nematóides apresentam maior capacidade migratória, infectividade e persistência no solo em relação a JIs aplicados em suspensão aquosa (Shapiro e Glazer, 1996; Shapiro e Lewis, 1999).

Cadáveres de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) infectados por NEPs são utilizados para introduzir JIs diretamente no solo. Insetos-cadáveres podem ser formulados com coberturas protetoras visando aumentar a facilidade de manuseio e aplicação, evitando os danos físicos provocados pela fricção e ruptura dos cadáveres (Shapiro *et al.*, 2001). Adicionalmente, as coberturas podem atuar amenizando o estresse gerado por condições adversas do ambiente (Hussaini *et al.*, 2004). Coberturas com calcário podem alterar o ambiente ao redor dos cadáveres, evitando a proliferação de microrganismos que compõem a biota do solo e pelo efeito osmótico gerado (Andrén e Lagerlöf, 1983). Talcos comerciais contêm enxofre em sua composição química, de ação fungicida

(Williams e Cooper, 2004). As cápsulas de gelatina podem gerar um isolamento maior entre o cadáver e as partículas do solo.

Insetos-cadáveres no solo estão expostos à ação de artrópodes e microrganismos (Kaya, 2002). Algumas espécies de formigas diminuem a eficácia da aplicação dos cadáveres por se alimentarem destes ou os removerem dos locais de aplicação quando colocados próximos a seus ninhos (Kaya, 2002). Baur *et al.* (1998) constatou que formigas não possuem preferência para consumir cadáveres infectados com heterorhabditídeos, mas os pequenos orifícios produzidos na cutícula do cadáver como consequência da ação delas pode desencadear a dessecação dos cadáveres, com a subsequente morte dos JIs em desenvolvimento e das bactérias associadas.

Formigas do gênero *Ectatomma* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) apresentam uma ampla distribuição no Brasil. Esse gênero é composto por 12 espécies que são representadas por formigas moderadamente grandes (aproximadamente entre 8 a 11 mm de comprimento), sendo endêmicas em regiões neotropicais e de ocorrência em habitats naturais e alterados pelo homem (Brown, 1958; Kugler e Brown, 1982; Levings e Franks, 1982). Essas formigas ocorrem nos extratos hipógeo e epígeo, tanto para nidificação como para forrageamento (Fernández, 1991). Possuem ninhos simples, pouco polimórfico entre a casta das operárias e a rainha, e a sua comunicação química é incipiente (Wilson, 1971). Consideradas polípagas, essas formigas são predadoras generalistas de uma variedade de pequenos artrópodes e anelídeos, eventualmente coletando néctar extrafloral e exudados de homópteros (Fernández, 1991; Del-Claro e Oliveira, 1999; Oliveira e Pie, 1998; Pie, 2004; Schmidt e Morais, 2007). Duas espécies deste gênero foram observadas no campo removendo insetos-cadáveres localizados 5 cm abaixo da superfície do solo.

O objetivo no presente trabalho foi testar diferentes coberturas protetoras de cadáveres de *G. mellonella* infectados por *H. baujardi* LPP7, avaliando a viabilidade e infectividade dos JIs emergidos, observando a reação de duas espécies de formigas do gênero *Ectatomma* a insetos-cadáveres colocados próximos à abertura de seus ninhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Nematóides entomopatogênicos e insetos-cadáveres

Juvenis infectantes dos NEPs *H. baujardi* LPP7, originalmente isolados da Floresta Amazônica em Rondônia, Brasil, foram utilizados para infectar larvas no sétimo ínstar de *G. mellonella*. As larvas apresentaram em média 300 mg de massa e foram infectadas, em grupos de cinco, através da adição de 1000 JIs/mL em placas de Petri (90 mm de diâmetro), com papel de filtro (Whatman N^o1) na base e incubadas em câmara de germinação a 25 °C e 80 % de umidade. Após quatro dias, os cadáveres foram colocados em armadilhas de White modificadas (White, 1927). Os JIs foram coletados das armadilhas por 6 dias consecutivos e armazenados em água destilada por no máximo uma semana a 16 °C antes da utilização.

Os insetos-cadáveres foram obtidos pela exposição de larvas do sétimo ínstar de *G. mellonella* da mesma forma descrita acima.

Coberturas de cadáveres

Para as coberturas foram utilizados calcário calcítico comercial (carbonato de cálcio – PRNT 80%) da empresa Heringer nas formulações pó e solução aquosa (10 %), talco (Granado®) na formulação pó e solução aquosa (10 %) e cápsulas de gelatina. A composição química do talco era tipo veneza (42,341 g), ácido ortoxibenzóico (0,352 g), enxofre (17,602 g), ácido ortobórico (3 g), óxido de zinco (11,735 g), amido (23,470 g) e aromatizante (1,5 g). As cápsulas de gelatina (100% gelatina, peso médio de 118 mg, tamanho: 000) foram adquiridas do Laboratórios Pfizer Ltda.. Para formular os cadáveres nos pós, esses foram suavemente passados em 10 g do produto até que uma fina camada os cobrisse totalmente. As formulações aquosas foram obtidas mediante a imersão dos insetos-cadáveres por 10 segundos em Beckers de 50 mL contendo o produto diluído a 10% em água estéril. As cápsulas de gelatina foram preparadas colocando os cadáveres individualmente no seu interior e em seguida fechadas. Nos tratamentos controle, os insetos-cadáveres não receberam cobertura.

Emergência e infectividade dos juvenis infectantes

Copos plásticos (200 mL de capacidade) foram preenchidos com 120 g de solo procedente de uma lavoura comercial de goiaba (58% de areia, 23% de argila e 19% de silte; pH 4,6; 2,43% de matéria orgânica). Insetos-cadáveres com as diferentes coberturas foram colocados individualmente a 2 cm da superfície do solo. Os insetos-cadáveres foram formulados como descrito anteriormente aos 4 e 8 dias de infecção. Os copos foram umedecidos a cada 2 dias, visando manter o conteúdo hídrico próximo à capacidade de campo ao longo do experimento. Vinte dias após a montagem do experimento foi feita a extração de JIs seguindo o procedimento de Jenkins modificado (Jenkins, 1964). Juvenis infectantes vivos foram diferenciados de outras espécies de nematóides pela sua locomoção característica, tamanho e morfologia bucal, e contados em microscópio estereoscópico com o auxílio da lâmina de Peters.

O desenho experimental foi inteiramente casualizado e repetido quatro vezes no tempo, com 25 repetições por tratamento. Foi feita a análise de variância (ANOVA) dos dados e as diferenças entre tratamentos foram determinadas utilizando o teste Tukey a 5% de significância (Sistema de Análises Estatística e Genéticas, 1990).

Adicionalmente foi avaliada a infectividade dos JIs emergidos dos insetos-cadáveres formulados. Para isso, copos plásticos de 200 mL de capacidade foram preenchidos com 120 g de solo (acima descrito) e um cadáver de cada tratamento formulado aos oito dias, preparados como explicado anteriormente. Após 12 dias, a infectividade dos JIs dos cadáveres foi testada. Cada 120 g de solo foi colocado em potes plásticos de 1,5 L, acrescidos de 1,5 kg de solo testado negativamente para NEPs e com cinco larvas no sétimo ínstar de *G. mellonella*. Os potes foram invertidos e mantidos à temperatura ambiente (25 ± 3 °C). O número de larvas mortas de *G. mellonella* com sintomas e presença de nematóides no interior foi registrado após dez dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições para cada tratamento. O teste de infectividade foi repetido 3 vezes. Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as médias dos

tratamentos comparadas utilizando o teste Tukey a 5 % de significância (Sistema de Análises Estatística e Genéticas, 1990).

Observação de *Ectatomma* spp. na presença de insetos-cadáveres

A observação de duas espécies de *Ectatomma* sp. foi feita no pomar de goiaba pertencente ao campo experimental da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes-RJ. No local, foram escolhidos aleatoriamente três formigueiros de cada espécie. Insetos-cadáveres com oito dias de infecção foram formulados com os diferentes tratamentos anteriormente descritos. Um inseto-cadáver de cada tratamento foi colocado aleatoriamente sobre a superfície do solo a um raio de 5 cm da entrada dos formigueiros. Os insetos-cadáveres foram considerados “removidos” quando as formigas carregavam os cadáveres para pelo menos 20 cm de distância da abertura dos formigueiros. As observações foram realizadas a partir das 17:00 horas de cada um dos cinco dias de avaliação. Foi também registrado o tempo em que as formigas demoravam em remover os insetos-cadáveres ao longo de 90 minutos.

O desenho experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial, com 3 repetições por tratamento. O experimento foi repetido 4 vezes no tempo. Foi feita a análise da variância dos dados (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas utilizando o teste Tukey a 5 % de significância (Sistema de Análises Estatística e Genéticas, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes formulações testadas não apresentaram diferenças significativas quanto ao número de JIs emergidos quando formulados aos quatro dias após a infecção das larvas de *G. mellonella* ($F = 0,68$; $gl = 144$; $P = 0,6414$). Houve diferenças estatísticas entre os tratamentos quando as coberturas foram aplicadas oito dias após a infecção (Tabela 1). O efeito das coberturas nos insetos-cadáveres é mais evidente à medida que se aumenta o período de pós-infecção, pois os cadáveres começam a perder a firmeza e a turgidez devido ao processo de degradação que está ocorrendo no cadáver. Insetos-cadáveres formulados oito dias após a infecção das larvas de *G. mellonella* apresentaram diferenças estatísticas no número de JIs emergidos entre as coberturas testadas ($F = 2,68$; $gl = 144$; $P = 0,0239$). A emergência de JIs observada nos insetos-cadáveres formulados com talco em pó ($9.721,6 \pm 1.382,3$) indica que essa cobertura não interfere na emergência dos JIs no solo e ainda poderia favorecê-la, pois mantém o cadáver íntegro.

Estes resultados diferem de Shapiro-Ilan *et al.* (2001), os quais testaram coberturas de argila, glúten, lignina e amido em larvas de *G. mellonella* infectadas com *H. bacteriophora* isolado Hb, encontrando maior tolerância à dessecação e sobrevivência de JIs quando foram formulados aos quatro dias em relação aos formulados aos oito dias. Essa diferença pode ser causada pela diferença no início da emergência dos JIs em insetos-cadáveres infectados com ambas as espécies de NEPs. Cadáveres infectados com *H. bacteriophora* com nove dias de infecção sofrem níveis superiores a 80% de ruptura física (Shapiro-Ilan *et al.*, 2001). No oitavo dia, insetos-cadáveres infectados com *H. baujardi* LPP7 ainda possuem consistência firme, permitindo a formulação com coberturas, já que os JIs só começam a emergir com 12 dias de infecção (Dolinski *et al.*, 2007).

O calcário pode ter influenciado negativamente a sobrevivência de JIs devido aos efeitos prejudiciais do potencial osmótico por ele criado (Andrén e Lagerlöf, 1983). As formulações com calcário aplicadas aos oito dias após a infecção afetaram mais os JIs, talvez em consequência do menor período entre formulação e o início da emergência de JIs. A menor concentração de calcário em torno dos cadáveres formulados na forma aquosa resultou no incremento de JIs emergidos.

Aparentemente, o potencial osmótico é amenizado através do tempo e quando diluído. Portanto, em aplicações a campo, deve-se observar as características físico-químicas dos solos, pois as coberturas utilizadas nos cadáveres poderão ser influenciadas por elas (Barbercheck, 1992).

As cápsulas de gelatina protegeram os cadáveres e a emergência não foi afetada. Contudo, não foi significativamente diferente da testemunha.

Tabela 1: Número médio de juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 emergidos de insetos-cadáveres formulados com diferentes coberturas aos 4 e 8 dias após infecção (média \pm erro padrão). Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tratamento de cobertura	4 dias	8 dias
Calcário em pó	6.956,0 \pm 1.029,2 a	4.153,6 \pm 942,3 a
Talco aquoso a 10%	7.100,0 \pm 931,7 a	6.038,4 \pm 986,4 ab
Calcário aquoso a 10%	5.359,2 \pm 923,4 a	6.071,2 \pm 1.189,5 ab
Testemunha	6.396,8 \pm 963,9 a	6.346,4 \pm 1.310,7 ab
Cápsulas de gelatina	7.815,2 \pm 1.189,6 a	7.892,0 \pm 1.072,4 ab
Talco em pó	6.755,2 \pm 906,1 a	9.721,6 \pm 1.382,3 b

Uma elevada infectividade às larvas de *G. mellonella* foi observada nos JIs emergidos das diferentes coberturas analisadas. Não foram observadas diferenças significativas nas porcentagens de infecções provocadas pelas coberturas testadas ($F = 1,38$; $gl = 18$; $P = 0,2768$) (Figura 1). Estes dados sugerem que os tratamentos de cobertura podem afetar o número de JIs que emergem, mas não há efeito sobre a patogenicidade dos mesmos.

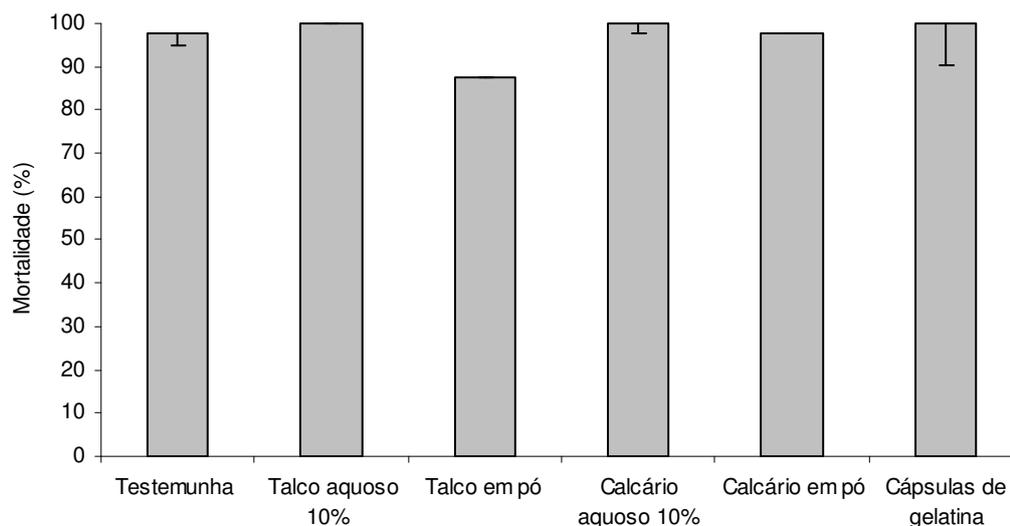


Figura 1: Porcentagem de mortalidade de larvas no sétimo ínstar de *Galleria mellonella* utilizadas como insetos-armadilhas em solo no qual previamente haviam sido adicionados insetos-cadáveres infectados com *Heterorhabditis baujardi* LPP7 e formulados com diferentes coberturas aos oito dias após infecção (n=30).

No experimento em que se observou o comportamento de *Ectatomma* spp. em relação aos insetos-cadáveres com diferentes coberturas testadas, foram observados elevados índices de remoção (Figura 2). Contudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos, com exceção das cápsulas de gelatina, neste caso *Ectatomma* spp. não respondeu a sua presença e não efetuou nenhuma remoção ($F = 5,50$; $gl = 54$; $P = 0,0004$). Em geral, as porcentagens de remoção foram elevadas em todos os tratamentos. As porcentagens de cadáveres removidos por *Ectatomma* sp. 1 variaram entre 73 e 80%, enquanto que para *Ectatomma* sp. 2 oscilaram entre 40 e 67% (Figura 2).

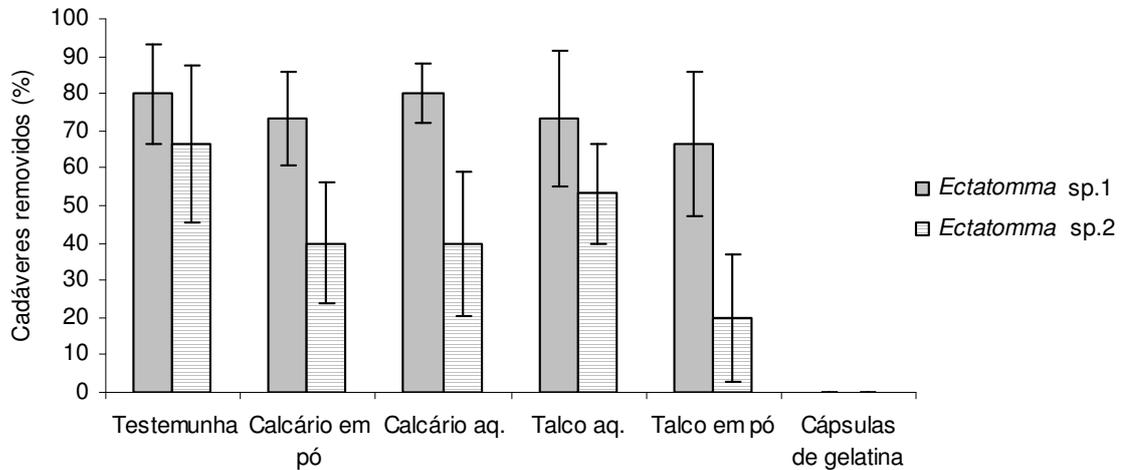


Figura 2: Porcentagens de insetos-cadáveres formulados com diferentes coberturas e removidos por *Ectatomma* spp. da proximidade de seus ninhos.

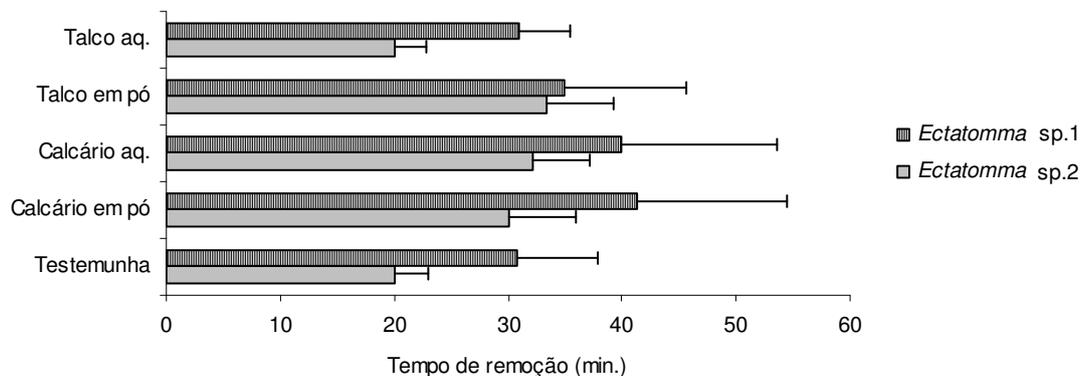


Figura 3: Tempo utilizado por *Ectatomma* spp. para a remoção de insetos-cadáveres formulados.

Esses resultados indicam que ambas as espécies são atraídas pelos insetos-cadáveres, removendo estes a uma distância superior a 20 cm de raio em relação à abertura dos ninhos. *Ectatomma* sp.1 apresentou um comportamento mais

agressivo na presença de insetos-cadáveres, pois os retirou em maior quantidade e com maior rapidez. Hospedeiros infectados com NEPs produzem compostos voláteis e secreções que são liberados no ambiente (Grewal *et al.*, 1997; Glazer, 1997), que podem interferir no comportamento das formigas desse gênero.

Embora no presente trabalho tenham sido considerados como removidos os insetos-cadáveres transportados a uma distância de pelo menos 20 cm, a maior parte dos cadáveres foram transportados pelas formigas a uma distância superior a 1 metro de distância do ninho, chegando até 4 metros. Alguns insetos-cadáveres da testemunha foram transportados para o interior dos ninhos, principalmente pelas formigas da espécie *Ectatomma* sp.1. Este comportamento pode ser conseqüência do hábito polífago dessa espécie (Schmidt e Morais, 2007). Experimentos a campo desenvolvidos por Baur *et al.* (1998) demonstraram que a formiga *Linepithema humile* (Mayr) se alimenta de cadáveres infectados por steinernamatídeos, mas raramente de cadáveres infectados por heterorhabditídeos. Estes resultados coincidem com os obtidos no nosso trabalho, confirmando que cadáveres infectados por *Heterorhabditis* não são atraentes para a alimentação de formigas. Supõe-se que as bactérias do gênero *Photorhabdus*, existentes em grande quantidade no cadáver, estejam causando esse comportamento de repelência (Akhurst e Boemare, 1990).

Em relação ao tempo de remoção dos cadáveres, observou-se a atração que geraram os insetos cadáveres pertencentes ao tratamento testemunha (sem coberturas) em comparação aos insetos-cadáveres dos diferentes tratamentos, pois *Ectatomma* spp. primeiramente removeram as testemunhas (Figura 3). Isso indica que as diferentes coberturas testadas podem diminuir a atratividade dos cadáveres, exercendo uma proteção contra as formigas desse gênero.

A facilidade de manipulação, aplicação, a diminuição dos danos físicos sofridos, somado à aceitável emergência de JIs e alta infectividade dos JIs emergidos dos insetos-cadáveres formulados em cápsulas de gelatina justificam a sua utilização no controle biológico de pragas agrícolas com estágios de vida no solo. O comportamento das formigas do gênero *Ectatomma* spp. prejudica a utilização de cadáveres infectados, principalmente *Ectatomma* sp.1. Por isso, sugere-se evitar a aplicação de insetos-cadáveres em áreas com alta densidade populacional destas formigas ou fazê-lo formulando os cadáveres em cápsulas de

gelatina. Contudo, a tecnologia para facilitar essa formulação ainda precisa ser desenvolvida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhurst, R.J., Boemare, N.E. (1990) Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, p. 75-90.
- Andrén, O., Lagerlöf, J. (1983) Soil fauna (microarthropods, enchytraeids, nematodes) in Swedish agricultural cropping systems. *Acta Agric. Scand.* 33:33-52.
- Barbercheck, M.E. (1992) Effect of soil physical factors on biological control agents of soil pests. *Fla. Entomol.* 75:539-548.
- Baur, M.E., Kaya, H.K., Strong, D.R. (1998) Foraging ants as scavengers of entomopathogenic nematode-killed insects. *Biological Control* 12:231-236.
- Brown Jr., W.R. (1958) Contributions toward a reclassification of the formicidae. II Tribe Ectatomminae (Hymenoptera). *Bull. Mus. Comp. Zool. Harv.* 118: 175-362.
- Del-Claro, K., Oliveira, P.S. (1999) Ant-Homoptera interactions in a neotropical savanna: The honeydew-producing treehopper *Guayaquila xiphias* (Membracidae) and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosium* (Araliaceae). *Biotropica* 31: 135-144.
- Del Valle, E.E.; Dolinski, C.M.; Souza, R.M. (2008a) Dispersal of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied to the soil as infected host cadavers. *Int. J. Pest Manag.* 54(2): 115-122.
- Del Valle E.E, Dolinski C, Barreto, E.L.S, Souza R.M., Samuels R.I. (2008b) Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Bio. Sci. & Tech.* 18(1): 33-41.
- Dolinski, C., Del Valle, E.E., Burla, R.S., Machado, I.R. (2007) Biological traits of two native brazilian entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematol. Bras.* 31: 180-185.

- Fernández, F., (1991) Las hormigas cazadoras de genero *Ectatomma* (Hymenoptera: Formicidae) en Colombia. *Caldasia* 16: 551-564.
- Glazer, I. (1997) Effects of infected insects on secondary invasion of steinernematid entomopathogenic nematodes. *Parasitol.* 114: 597-604.
- Grewal, P., Lewis, E.E., Gaugler R. (1997) Response of infective stage parasites (Rhabditida: Steinernematidae) to volatile cues from infected hosts. *J. Chem. Ecol.* 23: 503-515.
- Hussaini, S.S., Nagesh, M., Rajeshwari, R., Dar, M.H. (2004) Formulation of host cadavers infected with indigenous *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Heterorhabditidae: Rhabditida) isolates. *Entomon.* 29(4):339-344.
- Jansson, R.K., Lecrone, S.H., Gaugler, R. (1993) Field efficacy and persistence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) for control of sweetpotato weevil (Coleoptera: Apionidae) in southern Florida. *J. Econ. Entomol.* 86:1055-1063.
- Jenkins, W.R., (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis. Rep.* 48:692.
- Kaya, H.K. (2002) Natural enemies and other antagonists. In: Gaugler R. (ed.) *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK. p.189–204.
- Klein, M. G. (1990) Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: Gaugler, R., Kaya, H. K. (eds.) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, p. 195-214.
- Kugler, C., Brown Jr., W.R. (1982) Revisionary and other studies on the ant genus *Ectatomma*, including the descriptions of two new species. *Search Agric. N. Y. State Agric. Exp. Snt. Ithaca.* 24:1-7.
- Levings, S.C., Franks, N.R. (1982) Patterns of nest dispersion in a tropical ground ant community. *Ecology* 63: 338–344.
- Oliveira, P.S., Pie, M.S. (1998) Interactions between ants and plants bearing extrafloral nectaries in cerrado vegetation. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 27:161-176.
- Parkman, J.P., Hudson. W.G., Frank, J.H., Nguyen, K.B., Smart Jr., G.C. (1993) Establishment and persistence of *Steinernema scapterisci* (Rhabditida: Steinernematidae) in field populations of *Scapteriscus* spp. mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae). *J. Entomol. Sci.* 28: 182–190.

- Pie, M. R. (2004) Foraging ecology and behaviour of the Ponerinae ant *Ectatomma opaciventre* Roger in a Brazilian savanna. *Journal of Natural History* 38:717-729.
- SAEG- Sistema de Análises Estatísticas. 1990. Universidade Federal de Viçosa: Version 6.0.
- Schmidt, K., Morais, H.C. (2007) Modelagem da distribuição potencial de *Ectatomma tuberculatum* (Ectatomminae) e *Pachycondyla marginata* (Ponerinae) empregando algoritmo genético. XVIII Congresso de Mirmecologia, São Paulo, *O Biológico* 69(2):305-307.
- Shapiro-Ilan, D.I., Lewis, E.E., Behle, R.W., McGuire, M.R. (2001) Formulation of entomopathogenic nematodes-infected cadavers. *J. Invert. Path.* 78: 17-23.
- Shapiro, D.I., Glazer, I. (1996) Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. *Environ. Entomol.* 25: 1455–1461.
- Shapiro, D.I., Lewis, E.E. (1999) Comparisons of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. *Environ. Entomol.* 28:907-911.
- White, G.F. (1927) A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66:302-303.
- Williams, J. S., Cooper, R. M. (2004) The oldest fungicide and newest phytoalexin -a reappraisal of the fungitoxicity of elemental sulphur. *Plant Pathology* 53:263-279.
- Wilson, E. O. (1971) *The insect societies*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

**INFLUÊNCIA DO PERÍODO DE TEMPO ENTRE INFECÇÃO E APLICAÇÃO
DOS INSETOS-CADÁVERES DE *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA:
PYRALIDAE) INFECTADOS POR *Heterorhabditis baujardi* LPP7
(RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) NA EMERGÊNCIA DE JUVENIS
INFECTANTES⁴**

RESUMO

A aplicação de nematóides entomopatogênicos (NEPs) formulados como insetos-cadáveres são uma alternativa para o controle biológico de pragas agrícolas com estágios de desenvolvimento no solo. Objetivou-se neste trabalho determinar a influência de diferentes períodos de tempo entre infecção e aplicação no solo de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *Heterorhabditis baujardi* LPP7 sobre a emergência de juvenis infectantes. Cadáveres de larvas de *G. mellonella* infectados com *H. baujardi* LPP7 foram colocados individualmente a 1 cm de profundidade em relação à superfície do solo contido nos copos plásticos (200 mL de capacidade) com 120 g de solo aos 6, 8, 10 e 12 dias após infecção. Vinte dias após a infecção das larvas de *G. mellonella*, realizou-se a extração de JIs seguindo o procedimento de Jenkins modificado. Juvenis infectantes recuperados

⁴ Preparado de acordo com as normas do periódico "Nematologia Brasileira".

foram contados em microscópio estereoscópico com o auxílio de lâminas de Peters. Insetos-cadáveres aplicados no solo seis dias após infecção apresentaram emergência significativamente maior do que os demais períodos avaliados ($4.816,7 \pm 427,8$). A menor emergência foi registrada quando os cadáveres foram aplicados aos 12 dias após infecção ($1.951,7 \pm 538,2$). O período de tempo de seis dias entre infecção e aplicação apresentou-se como adequado para aplicação dos insetos-cadáveres com esta espécie.

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) applied as insect cadavers are an alternative for biological control of agricultural pests with any soil stage. The objective of this study was to determinate the influence of different time periods between infection and soil *Galleria mellonella* cadaver infected with *Heterorhabditis baujardi* LPP7 on the IJs emergency. *Galleria mellonella* cadavers infected with *H. baujardi* LPP7 were placed individually 1 cm below surface on plastic cups (200 mL capacity) with 120 g soil at 6, 8, 10 and 12 days post-infection. Twenty days after *G. mellonella* larvae infection, IJs were recovered following a modified Jenkins procedure. Infective juveniles recovered were counted in stereoscopic microscope with Peters slide. Soil applied insect cadavers with six days post-infection presented higher emergency than remaining periods ($4,816.7 \pm 427.8$). The smallest emergency was when the cadavers were applied at 12 days post-infection ($1,951.7 \pm 538.2$). Six days between infection and application seems to be appropriate for applying insect-cadavers with this species.

CONTEÚDO

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são parasitas obrigatórios de insetos. Estes nematóides possuem uma associação simbiótica com bactérias patogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp., associadas aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, respectivamente (Poinar, 1990). Os juvenis infectantes (JIs), considerados como o único estágio de vida-livre dos NEPs, penetram no inseto-hospedeiro através de suas aberturas naturais (cavidade oral, ânus e espiráculos) ou, em alguns casos, perfurando a cutícula com um “dente” localizado em sua extremidade anterior. Após a entrada na hemocele do hospedeiro, JIs liberam as bactérias simbióticas que vão causar a morte do hospedeiro, servir de base para nutrição dos nematóides e para defesa contra invasores secundários (Poinar, 1990). Esses nematóides completam seu desenvolvimento e permanecem 2 ou 3 gerações dentro do hospedeiro. Quando o alimento se exaure, os JIs saem do hospedeiro-cadáver à procura de novos hospedeiros (Grewal e Georgis, 1998).

Nos últimos anos, a aplicação de NEPs formulados como insetos-cadáveres tornaram-se uma alternativa aos produtos químicos para o controle de pragas agrícolas com estágios no solo, principalmente para pequenos e médios produtores. O custo de produção dos mesmos é baixo, porque evita-se os custos relacionados à concentração, formulação e armazenamento dos JIs, necessário nas suspensões aquosas. Juvenis infectantes emergidos deste tipo de formulação dispõem de maiores proporção de reservas energéticas, aumentando sua capacidade de procura de hospedeiros, sobrevivência e tolerância a estresses ambientais. Adicionalmente, JIs emergidos de cadáveres infectados mostraram maior infectividade e sobrevivência quando comparados à aplicação em suspensão aquosa (Shapiro-Ilan *et al.*, 2003). Outro benefício da aplicação de insetos-cadáveres é que os JIs emergem diretamente no solo, facilitando o contato nematóide-hospedeiro (Shapiro e Lewis, 1999; Shapiro-Ilan *et al.*, 2003). No Brasil, pesquisas avaliando este tipo de formulação vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos. A campo, Del Valle *et al.* (2008a) comprovaram que JIs de *H. baujardi* LPP7 emergidos de cadáveres possuem capacidade migratória superior

a 120 cm em relação ao ponto de aplicação, destacando-se que o incremento no número de insetos-cadáveres aplicados atinge maior uniformidade de JIs nas áreas de aplicação. Aplicações a campo de cadáveres infectados com *H. baujardi* LPP7 demonstraram ser eficazes no controle de larvas de quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* (Marshall) (Del Valle *et al.*, 2008b). Esse trabalho enfatizou a persistência e infectividade dos JIs originados de insetos-cadáveres após três meses da aplicação dos mesmos. Entretanto, aplicações a campo de cadáveres infectados com *Heterorhabditis* sp. CCA e JPM3, visando controlar a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro, *Dysmicoccus texensis* (Tinsley), não apresentaram níveis satisfatórios de controle (Alves, 2006).

Vários aspectos relacionados à biologia e fisiologia dos NEPs em aplicações de insetos-cadáveres são desconhecidos até o momento. Entre esses, o conhecimento do efeito do período de tempo entre a infecção e a aplicação no solo na emergência de JIs é crucial para estabelecer o momento de aplicação em programas de controle de pragas com NEPs.

Neste trabalho objetivou-se determinar a influência de diferentes períodos de tempo transcurrido entre infecção e aplicação de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *Heterorhabditis baujardi* LPP7 sobre a emergência dos juvenis infectantes.

Insetos-cadáveres foram obtidos pela exposição de larvas do sétimo ínstar de *G. mellonella*, em grupos de cinco, a 1000 JIs/mL de *H. baujardi* LPP7 em placas de Petri (90 mm de diâmetro) com papel filtro (Whatman N^o1) na base e estas depois foram incubadas em câmara de germinação aproximadamente a 25 °C e a 80 % de umidade. Após 6, 8, 10 ou 12 dias, os cadáveres foram retirados para os experimentos.

Copos plásticos de 200 mL de capacidade foram preenchidos com 120 g de solo procedente de uma lavoura comercial de goiaba (58% de areia, 23% de argila e 19% de silte; pH 4,6; 2,43% de matéria orgânica). Cadáveres de larvas de *G. mellonella* infectados com *H. baujardi* LPP7 foram colocados individualmente a 1 cm de profundidade em relação à superfície superior do solo. Os copos foram umedecidos a cada dois dias, visando manter o conteúdo hídrico próximo à capacidade de campo ao longo do experimento, e foram mantidos em câmara de germinação aproximadamente a 25 °C e 80 % de umidade relativa. A umidade do solo manteve-se em valores próximos ao 10% em peso. Vinte dias após a

infecção das larvas de *G. mellonella*, foi feita a extração de JIs seguindo o procedimento de Jenkins modificado (Jenkins, 1964). Juvenis infectantes vivos foram diferenciados de outras espécies de nematóides pela sua locomoção característica, tamanho e morfologia bucal e contados em microscópio estereoscópico com o auxílio de lâminas de Peters.

O desenho experimental foi inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento. Os resultados foram analisados por análise da variância e as médias entre tratamentos foram separadas utilizando o teste Tukey a 5% de significância.

O tempo entre a infecção das larvas de *G. mellonella* por *H. baujardi* LPP7 e a aplicação dos insetos-cadáveres influenciou significativamente a emergência dos JIs no solo ($F = 4,36$; $gl = 76$; $P = 0,0069$) (Figura 1). Em insetos-cadáveres aplicados no solo seis dias pós-infecção a emergência foi significativamente maior que nos restantes dos períodos avaliados ($4.816,7 \pm 427,8$).

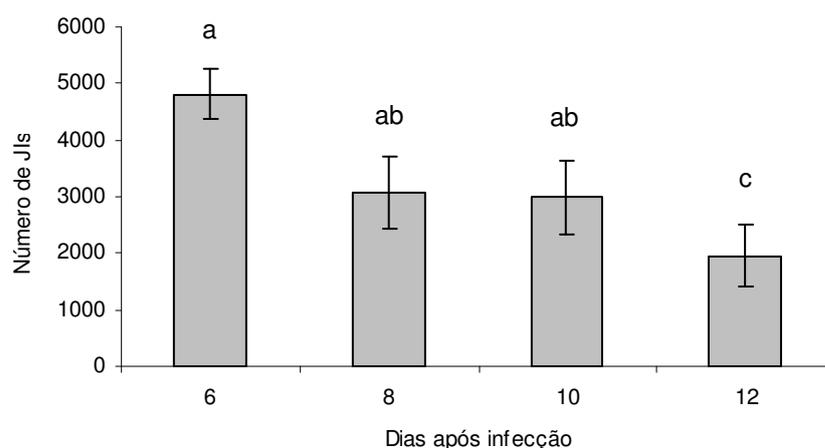


Figura 1: Número de juvenis infectantes recuperados no solo após aplicação de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados por *Heterorhabditis baujardi* LPP7 com 6, 8, 10 e 12 dias após a infecção.

Aplicações com períodos de incubação superiores a dez dias podem ter diminuído a emergência de JIs devido aos efeitos negativos da dessecação. O cadáver do hospedeiro atua como proteção dos JIs contra estresses (Koppenhöfer *et al.*, 1995). Quando o tempo entre infecção e aplicação é aumentado, os efeitos da dessecação dos cadáveres são mais evidentes. A

cutícula do cadáver se retrai e endurece, incrementando a dificuldade de saída dos JIs do interior dos cadáveres, e em conseqüência, menor número de JIs emergem. Também, com o aumento dos dias após infecção, os cadáveres vão perdendo turgescência devido ao processo digestivo de nematóides e bactérias simbiotes, facilitando a ruptura física das cutículas dos cadáveres (Kaya e Gaugler, 1993). Danos físicos podem permitir a saída de JIs do interior do cadáver, deter ou impedir o normal desenvolvimentos dos JIs devido a contaminações (Stuart *et al.*, 2006). Isto poderia ser a causa da baixa emergência de JIs aos 12 dias pós-infecção ($1.951,7 \pm 538,2$).

O período de tempo de seis e dez dias entre infecção e aplicação de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *H. baujardi* LPP7 permite as maiores emergências de JIs no solo, sendo recomendado esse período após infecção para aplicações a campo desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, V.S. (2006) Biologia e controle da cochonilha-da-raiz-docafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae). *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Lavras, 118p.
- Del Valle, E.E.; Dolinski, C.M.; Souza, R.M. (2008a) Dispersal of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied to the soil as infected host cadavers. *Int. J. Pest Manag.* 54(2): 115-122.
- Del Valle E.E, Dolinski C, Barreto, E.L.S, Souza R.M., Samuels R.I. (2008b) Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Bio. Sci. & Tech.* 18(1): 33-41.
- Grewal, P.S., Georgis, R. (1998) Entomopathogenic nematodes. *In*: Hall, F.R., Menn, J.J.(Eds). *Biopesticides: Uses and Delivery*. Methods Biotechnol. Totowa, Humana Press Inc. 15- 271.

- Jenkins, W.R., (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis. Rep.* 48:692.
- Kaya, H.K., Gaugler, R. (1993) Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Koppenhöfer, A.M., Kaya, H.K., Taormino, S.P. (1995) Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *J. Invertebr. Pathol.* 65:193-199.
- Poinar, G.O., Jr. (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. p. 23-61.
- Shapiro, D.I., Lewis, E.E. (1999) Comparisons of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. *Environ. Entomol.* 28:907-911.
- Shapiro-Ilan, D.I., Lewis, E.E., Tedders, W.L. (2003) Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 270-272.
- Stuart, R.J., Barbercheck, M.E., Grewal, P.S., Taylor R.A.J., Hoy, C.W. (2006) Population Biology of Entomopathogenic Nematodes: Concepts, Issues and Models. *Biological Control* 38: 80-102.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

- Juvenis infectantes emergidos de cadáveres de *Galleria mellonella* infectados com *Heterorhabditis baujardi* LPP7 apresenta persistência e distribuição temporal espacial satisfatória para sua utilização no controle de pragas de solo.
- A aplicação de 2, 4 ou 6 insetos-cadáveres em superfícies de 0.25 m², apresentou-se eficaz no controle de larvas de quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba.
- A persistência no solo dos JIs emergidos dos cadáveres é superior a três meses.
- As coberturas de insetos-cadáveres com talco em pó e em cápsulas de gelatina não prejudicam a emergência de JIs e facilitam a manipulação destes.
- Formigas do gênero *Ectatomma* removem insetos-cadáveres aplicados no solo.
- O período de tempo de seis dias entre infecção e aplicação no solo de cadáveres gera a maior emergência de JIs.
- É viável a utilização de cadáveres de *G. mellonella* infectados por *H. baujardi* LPP7 para o controle de larvas de quarto ínstar do gorgulho-da-goiaba.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, V. S. (2006) Biologia e controle da cochonilha-da-raiz-docafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae). *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Lavras, 118p.
- Adams, B. J., Fodor, A., Koppenhöfer, H. S., Stackebrandt, E., Stock, S. P., Klein, M.G. (2006) Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37:32-49.
- Adams, B. J., Nguyen, K.B. (2002) Taxonomy and systematics. *In*: Gaugler, R. (Ed.) *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 1-33.
- Akhurst, R. J. (1986) Controlling insects in soil with entomopathogenic nematodes. *In*: Samson R. A., Vlak, J. M., Peters, D. (eds.) *Fundamental applied aspects of invertebrate pathology*. Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, The Netherlands, p. 265-267.
- Akhurst, R. J. (1990) Safety to nontarget invertebrates of nematodes of economically important pests. *In*: Laird M., Lacey L.A., Davidson E.W. (eds.) *Safety of Microbial Insecticides*. p. 234-38.
- Bailez, O. E., Viana-Bailez, A. M., Lima, J. O. G., Moreira, D. D. O. (2003) Life-history of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera:Curculionidae), under laboratory conditions. *Neotropical Entomology* 32(2): 203-207.
- Barelli, N. L., Galli, J. C. (1998) Avaliação de danos causados por *Anastrepha* spp. (Dip. Tephritidae) e por *Conotrachelus psidii* (Marshall, 1922) (Col.,

- Curculionidae) em frutas de goiaba da cultivar 'paluma'. *XVII Congresso Brasileiro de Entomologia*. Rio de Janeiro, p. 12.
- Bathon, H. (1996) Impact of entomopathogenic nematodes on nontarget hosts. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 421-434.
- Bedding, R. A., Molyneux, A.S. (1982) Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica* 28: 354-359.
- Boemare, N. (2002) Biology, Taxonomy and Systematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. (ed.) *Entomopathogenic Nematology*, p. 35-55.
- Campbell, J. F., Gaugler, R. (1993) Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour* 126: 155-169.
- Campbell, J. F., Gaugler, R. (1997) Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: dichotomy or variation along a continuum? *Fundamental and Applied Nematology* 20: 393-398.
- Campbell, L. R., Gaugler, R. (1991a) Mechanisms for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *Int. J. Parasitol.* 21: 219-224.
- Campbell, L. R., Gaugler, R. (1991b) Role of the sheath in desiccation tolerance of two entomopathogenic nematodes. *Nematologica* 37: 324-332.
- Choudhury, M., Costa, T. S., Araújo, J. L. P. (2001) Goiaba Pós-colheita. Embrapa Informação Tecnológica *Série Frutas do Brasil* 19, Brasília, p. 9.
- Cui, L., Gaugler, R., Wang, Y. (1993) Penetration of Steinernematid nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 73-78.
- Del Valle, E. E., Dolinski, C., Souza, R. M., Samuels, R.I. (2005a) Avaliação de Metodologias de Seleção para Tolerância a Elevadas Temperaturas em *Heterorhabditis baujardi* (Nematoda: Rhabditida). *Nematol. Bras.* 29: 207-214.
- 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., Del Valle E. E., Stuart R. J. (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of guava weevil, *Conotrachelus psidii*

- (Coleoptera:Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control* 38: 422–427.
- Dolinski, C. M., Samuels, R. I. (2002) Comparative efficiency of different species of entomopathogenic nematodes for the control of guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Proceedings of the XXXV Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology e VIII International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*, Foz do Iguazu, p. 54-55.
- Dunphy, G. B., Webster, J. M. (1986) Temperature effects on the growth and virulence of *Steinernema feltiae* strains and *Heterorhabditis heliothidis*. *J. Nematology* 18: 270-272.
- Dutky, S. R. (1974) Nematode parasites. In: Maxwell, F. G., Harris, F. A. (eds.) *Proceeding of the summer institute on biological control of plant insects and diseases*. Jackson, University Press of Mississippi, p. 576-590.
- Eidt, D. C., Thurston, G. S. (1995) Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworm (Coleoptera: Elateridae) and other soil pests. *Canadian Entomologist* 127: 423-429.
- FNP Consultoria & Comercio (2004) Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 545p.
- Forst S., Clarke, D. (2002) Bacteria-Nematode Symbiosis In: Gaugler, R. (ed.) *Entomopathogenic Nematology*. p. 57-77.
- Gaugler, R. (1981) Biological control potential of neoaplectanid nematodes. *J. Nematol.* 13(3): 241-249.
- Gaugler, R. (1988) Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects pests with entomopathogenic nematodes. *Agr. Ecosyst. Environ.* 24(1-3): 351-360.
- Gaugler, R., Molloy, D. (1981) Instar susceptibility of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to the entomopathogenic nematode *Neoaplectana carpocapsae*. *Journal of Nematology* 13: 1-5.
- Georgis, R. (1990a) Formulation and application technology. In: Gaugler, R., Kaya H. K. (eds) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. p. 173-194.
- Georgis, R. (1990b) Commercialization of Steinernematid and Heterorhabditid entomopathogenic nematodes. *Brighton Crop Prot. Conf. Insectic. Fungic.* 1: 275-80.

- Georgis, R. (1992) Present and future prospects for entomopathogenic nematodes products. *Biocontrol Sci. Technol.* 2: 83-99.
- Georgis, R., Hague, N. G. M. (1981) A neoaplectanid nematode in the larch sawfly *Cephalicia lariciphila* (Hymenoptera: Pamphillidae). *Ann. appl. Biol.* 99: 171-177.
- Georgis, R., Hague, N. G. M. (1991) Nematodes as biological insecticides. *Pesticide Outlook* 2: 29-32.
- Georgis, R., Poinar, G. O. Jr. (1994) Nematodes as bioinsecticides in turf and ornamentals. In: Leslie, A.R., EPA U.S., (eds.) *Handbook of integrated pest management for turf and ornamentals*. p. 477-489.
- Glazer, I. (2002) Survival Biology. In: Gaugler, R. (ed.) *Entomopathogenic Nematology*, p. 169-187.
- Glazer, I., Gaugler, R., Segal, D. (1991) Genetics of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88: The diversity of beneficial traits. *J. Nematol.* 23: 324-333.
- Grewal, P. S., Lewis, E. E., Gaugler, R., Campbell, J. F. (1994a) Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitol.* 108: 207-215.
- Grewal, P. S., Selvan, S., Gaugler, R. (1994b) Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment and reproduction. *J. Therm. Biol.* 19: 245-253.
- Grewal, P. S., Georgis, R. (1999) Entomopathogenic nematodes. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (eds.) *Bipesticides: Uses and Delivery*. Methods Biotechnol. Totowa, Humana Press Inc. 5: 15- 271.
- Hominick, W. M., Reid, A. P., Bohan, D. A., Briscoe, B. R. (1996) Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology* 6: 317-331.
- Hussaini, S. S., Nagesh, M., Rajeshwari, R., Dar, M. H. (2004) Formulation of host cadavers infected with indigenous *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Heterorhabditidae: Rhabditida) isolates. *Entomon.* 29(4):339-344.
- Kaya, H. K. (1990) Soil ecology. In: Gaugler, R., Kaya H. K. (eds.) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. p. 93-115.

- Kaya, H. K., Gaugler, R. (1993) Entomopathogenic nematodes. *Annual Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Lacey, L. A., Goettel, M. S. (1995) Current development in microbial control of insect pest and prospects for the early 21st century, Review. *Entomophaga* 40(1): 3-27.
- Lewis, E. E., Gaugler, R., Harrison, R. (1993) Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Canadian Journal of Zoology* 71: 765-769.
- Lewis, E. E., Gaugler, R., Harrison, R. (1992) Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitol.* 105: 109-115.
- Lewis, E. E., Selvan, S., Campbell, J. F., Gaugler, R. (1995) Changes in foraging behaviour during the infective stage of entomopathogenic nematodes *Parasitology* 110: 583-590.
- Manica, I., Icuma, I. M., Junqueira, N. T. V., Salvador, J. O., Moreira, A., Malavolta E. (2000) *Fruticultura tropical: 6. Goiaba*. Ed. Cinco continentes, 374 p.
- Nickle, W. R. (1984) History, development and importance of insect nematology. *In: Nickel, W.R. (Ed.) Plant and insect nematodes*. p. 627-653.
- Norton, D. C. (1978) Ecology of Plant-Parasitic Nematodes. John Wiley (ed.) New York, p. 128-132.
- Orlando, A., Sampaio, A. S. M., De Carvalho, A., Scaranari, H. J., Arruda, H. V. (1974) Notas sobre o "gorgulho das goiabas" *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae) e experimentos de combate. *O Biológico (Brasil)* 40(10): 281-289.
- Pereira, F. M., Martinez Jr., M. (1986) Goiabas para industrialização. Jaboticabal: UNESP. p. 13-22.
- Peters, A. (1996) The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 389-402.
- Peters, A., Ehlers, R. U. (1994) Susceptibility of leatherjackets (*Tipula paludosa* and *T. oleraceae*, Tipulidae: Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 163-171.
- Poinar, G. O., Jr. (1979) *Nematodes for biological control of insects*. 277 p.

- Poinar, G. O., Jr. (1989) Non-insect host for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Rev Nematol.* 12: 423-28.
- Poinar, G. O., Jr. (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. p. 23-61.
- Rovesti, L., Deseo K. V. (1990) Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica* 36: 237-245.
- Rovesti, L., Deseo, K. V. (1991) Compatibility of pesticides with entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis heliothidis*. *Nematologica* 37: 113-116.
- Rovesti, L., Heinzpeter, E. W., Tabliente, F., Deseo, K.V. (1988) Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica* 34: 462-476.
- Sampaio A. (1977) Gorgulho-da-goiaba tem agora um moderno controle. *Agricultura e Pecuária* 619: 40-41.
- Selvan, S., Gaugler, R., Lewis, E. E. (1993) Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *J. Parasitol.* 79: 167-172.
- Shapiro-Ilan, D. I., Lewis, E. E., Tedders, W. L. (2003) Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 270-272.
- Shapiro-Ilan, D. I., Mizell, R. F., Campbell J. F. (2002) Susceptibility of the plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, to entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology* 34: 246-249.
- Shapiro-Ilan, D. I., Glazer, I. (1996) Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected host versus aqueous suspension. *Environmental Entomology* 25:1455-1461.
- Sudhaus, W. (1993) The nematode genera *Heterorhabditis* and *Steinernema*, both entomopathogenic by means of symbiotic bacteria, are not sister taxa. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 86, p. 146.

- Timper, P., Kaya, H. K. (1989) Role of the 2nd-stage cuticle of entomogenous nematode preventing infection by Nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 314-321.
- Tomalak, M. (1994) Selective breeding of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Nematoda: Steinernematidae) for improved efficacy in control of a mushroom fly, *Lycoriella solani* Winnertz (Diptera: Sciaridae). *Biocontr. Sci. Technol.* 4: 187-198.
- Westerman, P. R. (1992) The influence of time of storage on performance of the insect parasitic nematode *Heterorhabditis* sp. *Fundam. Appl. Nematol.* 15: 407-412.
- Zimmerman, R. J., Cranshaw, W. S. (1990) Compatibility of three entomogenous nematodes (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. *J. Econ. Entomol.* 83: 97-100.
- Zioni (Cohen-Nissan), S., Glazer, I., Segal, D. (1992) Life cycle and reproductive potential of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88. *Journal of Nematology* 24: 352-358.