



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

BRUNA APARECIDA GUIDE

**IDENTIFICAÇÃO E ASPECTOS BIOLÓGICOS DO
NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis*
amazonensis isolado UEL 08**

Londrina
2019

BRUNA APARECIDA GUIDE

**IDENTIFICAÇÃO E ASPECTOS BIOLÓGICOS DO
NEMATOIDE ENTOMOPATOGENICO *Heterorhabditis*
amazonensis isolado UEL 08**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Oliveira Janeiro Neves.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Viviane Sandra Alves

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Guide, Bruna Aparecida.

Identificação e Aspectos Biológicos do Nematóide Entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* isolado UEL 08 / Bruna Aparecida Guide. - Londrina, 2019.
67 f.

Orientador: Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves.

Coorientador: Viviane Sandra Alves.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Nematóides Entomopatogênicos - Tese. 2. *Heterorhabditis* - Tese. 3. Identificação - Tese. 4. Controle Biológico - Tese. I. Oliveira Janeiro Neves, Pedro Manuel. II. Alves, Viviane Sandra. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

BRUNA APARECIDA GUIDE

**IDENTIFICAÇÃO E ASPECTOS BIOLÓGICOS DO
NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO *Heterorhabditis amazonensis*
ISOLADO UEL 08**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Coorientadora: Prof^a. Dra. Viviane Sandra Alves
Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Prof^a Dra. Gislayne F. L. T. Vilas Boas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ayres Menezes de Oliveira Júnior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Dhiego Gomes Ferreira
Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Prof^a. Dra. Cristhiane Rohde
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 27 de Março de 2019.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Edson e Rosângela, por todo apoio, amor, carinho, dedicação e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda graça, bênçãos e forças concedidas a cada dia.

Aos meus amados Pais, Edson e Rosângela, por acreditarem em mim, serem meu alicerce e, por não medirem esforços para que eu pudesse finalizar mais esta etapa.

A minha irmã, Hauanna, por todo apoio e incentivo.

A toda minha família, vó Nice, vó Zulmira, vô Otávio, tios, tias, primos e primas, a minha sogra Ester que, de alguma forma contribuíram e torceram por mim.

Ao meu melhor amigo, companheiro e noivo, Thiago, por estar sempre comigo, nos momentos felizes, mas principalmente naqueles momentos em que pensei que não daria mais para continuar.

As minhas melhores amigas, Karine (*in memoria*), Bá e Diana, que sempre estiveram ao meu lado.

As minhas amigas do Muay Thai, GI, RÁ, MI, LIDY, GRA, DÉIA, RE e ALANA, que entraram na minha vida e estão sempre comigo dando forças para continuar e não desistir!

Aos amigos de laboratório, Hata, Matheus, Eduardo, Adriano, Tati, Ju, Joan, Alex, que fizeram os dias serem mais divertidos.

Ao meu primo-irmão, Willian, pela boa convivência durante esses anos, pelas alegrias e conquistas compartilhadas, pelas conversas e pela companhia diária.

Ao técnico do laboratório, Davi, por toda ajuda durante os experimentos.

A Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia. À todos os professores do programa, em especial aos da Entomologia, Prof. Mauricio, Prof. Amarildo e Prof. Ayres, por todo conhecimento passado durante as disciplinas e até mesmo fora delas.

A minha coorientadora, Vivi. Obrigada por tudo. Por sempre me atender, me ensinar e me apoiar. Pela confiança durante a graduação, durante o mestrado e doutorado. Obrigada também pela amizade, pelos conselhos e por fazer parte da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Pedro, pela confiança, pelos ensinamentos, pela dedicação, amizade, paciência, pelo exemplo de pessoa e profissional.

A todos que, de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, em especial, ao Prof. Dr. Dhiego e a Prof^a Dr^a Vanessa Andaló.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Epígrafe

Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei...

Almir Sater

GUIDE, Bruna Aparecida. **Identificação e aspectos biológicos do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* isolado UEL 08**. 2019. 67p. (Tese de Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Em diversos países, nematoides entomopatogênicos (NEPs) são amplamente utilizados no controle de pragas. Estes organismos vivem no solo sob a forma de juvenis infectantes (JIs), que carregam no seu intestino bactérias simbiotes, responsáveis pela morte do inseto hospedeiro. No Brasil, estudos relacionados ao isolamento, caracterização e identificação destes entomopatógenos são recentes e escassos. Assim, este trabalho teve como objetivos, a classificação taxonômica (molecular e morfológica), o estudo da biologia e também de armazenamento por meio de criopreservação em nitrogênio líquido (NL) de um isolado *Heterorhabditis* (isolado UEL 08) proveniente de área de pastagem, na região de Londrina, PR, Brasil. Para isolamento do nematoide utilizou-se o método de “isca-viva” com lagartas de último instar de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Para os estudos taxonômicos foi feita caracterização morfométrica por meio de microscopia de luz. A identificação foi realizada a partir da amplificação da região ITS; além de estudos de filogenia com outras sequências já publicadas na literatura. Posteriormente, realizou-se testes de patogenicidade sobre três diferentes insetos: lagartas de *G. mellonella*, adultos de *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) e larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). Também foi determinado o ciclo de vida, avaliação da produção *in vivo* em lagartas de *G. mellonella* e de criopreservação como um método de armazenamento para manutenção do isolado. Observou-se que a sequência obtida para o isolado UEL 08 é idêntica com a sequência de referência de *H. amazonensis* (DQ665222). Assim, pôde-se concluir por meio dos estudos morfológicos e moleculares que o nematoide isolado é da espécie *H. amazonensis*. Em relação ao teste de patogenicidade, concluiu-se que o nematoide foi patogênico aos três insetos, porém houve diferença na virulência, assim, lagartas de *G. mellonella* e larvas de *A. diaperinus* foram os insetos mais susceptíveis, com porcentagem de mortalidade de 100 e 85%, respectivamente. No teste de produção *in vivo* foi possível observar que *H. amazonensis* (UEL 08) produziu JIs ao longo de oito dias, com picos de produção no 1º e 2º dia e, a média da produção final por g/lagarta foi de 3×10^3 JIs. Com relação ao ciclo de vida, *H. amazonensis* (UEL 08) apresentou dois ciclos de vida distintos, um curto (216h) e um longo (288h), produzindo duas gerações. O ciclo curto foi observado na maior concentração (400 JIs/lagarta). No teste de criopreservação, *H. amazonensis* (UEL 08) sobreviveu quando exposto ao glicerol em todas as concentrações testadas e não teve sua infectividade influenciada. No entanto, após o congelamento em NL, observou-se baixa sobrevivência (6,5%) na concentração de 8% após 24 horas de congelamento, indicando que o glicerol, nas concentrações avaliadas não foi eficiente como crioprotetor para *H. amazonensis* (UEL 08).

Palavras-chave: Entomopatógeno, morfometria, taxonomia, análise molecular, controle biológico, criopreservação, produção *in vivo*.

GUIDE, Bruna Aparecida. **Identification and biological aspects of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis amazonensis* isolate UEL 08.** 2019. 67p. (Tese de Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

In several countries, entomopathogenic nematodes (EPNs) are widely used in pest control. These organisms live in the soil in the form of infective juvenile (IJs), which carries in their intestine symbiotic bacteria, responsible for the death of the host insect. In Brazil, studies related to the isolation, characterization and identification of these entomopathogens are recent and scarce. The objective of this work was the taxonomic classification (molecular and morphological, the biology study and also the cryopreservation of *Heterorhabditis* sp. (isolate UEL 08) from pasture area, in the region of Londrina, PR, Brazil. The nematode was collected by the “insect-baiting” method on *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. For the taxonomic studies morphometric characterization was carried out using light microscopy. The identification was made from the amplification of the ITS region; besides studies of phylogeny with other sequences already published in the literature. Later, pathogenicity tests were carried on three different insects: *G. mellonella*, *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) and larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). Life cycle, evaluation of *in vivo* production on *G. mellonella* larvae and cryopreservation as a storage method for maintenance of the isolate were also determined. It was observed that the sequence obtained for the UEL 08 isolate is identical with the reference sequence of *H. amazonensis* (DQ665222). Thus, it was concluded from the morphological and molecular studies that the nematode isolated is from the species *H. amazonensis*. In relation to the pathogenicity test, it was concluded that the nematode was pathogenic to the three insects, however, there was a difference in virulence, with *G. mellonella* and *A. diaperinus* larvae being the most susceptible insects, with a mortality rate of 100 and 85% respectively. *In vivo* production test it was possible to observe that *H. amazonensis* (UEL 08) produced IJs over eight days, production peaks were on the 1st and 2nd day, and the final production average per g/larvae was 3×10^3 IJs. *H. amazonensis* (UEL 08) presented two distinct life cycles, one short (216h) and one long (288h), producing two generations. The short cycle was observed at the highest concentration (400 IJs/larvae). In the cryopreservation test, *H. amazonensis* (UEL 08) survived when exposed to glycerol at all concentrations tested and did not have its infectivity influenced. However, after freezing in liquid nitrogen, low survival (6.5%) at 8% concentration was observed only after 24 hours of freezing, indicating that glycerol at the concentrations evaluated was not efficient as cryoprotectant for *H. amazonensis* (UEL 08).

Key words: Entomopathogen, morphometry, taxonomy, molecular analysis, biological control, cryopreservation, *in vivo* production.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1.** Relações filogenéticas de uma população de *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) baseadas na análise de regiões ITS do rDNA inferidas pela análise de Máxima Parcimônia (MP). *Oscheius chongmingensis*, *Pellioditis typica* e *Caenorhabditis elegans* foram usados como grupo externo.....32
- Figura 4.1.** Produção diária de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) em lagartas de *G. mellonella*.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Morfometria de <i>Heterorhabditis</i> sp. (UEL 08). As medidas são em μm na forma: média \pm dp (variação).....	29
Tabela 3.2. Morfometria comparativa (μm) do macho de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> isolados no Brasil (Andaló et al., 2006; 2009) e Venezuela (Morales et al., 2016).....	30
Tabela 3.3. Morfometria comparativa (μm) do juvenil infectante de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> isolados no Brasil (Andaló et al., 2006; 2009) e Venezuela (Morales et al., 2016).....	31
Tabela 3.4. Distâncias em pares das regiões ITS do rDNA entre espécies de <i>Heterorhabditis</i>	34
Tabela 4.1. Ciclo Curto: duração dos estágios de desenvolvimento de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> (UEL 08) em lagartas de <i>Galleria mellonella</i> (concentração de nematoide usada para inoculação foi de 400 JIs/lagarta)	41
Tabela 4.2. Ciclo Longo: duração dos estágios de desenvolvimento de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> (UEL 08) em lagartas de <i>Galleria mellonella</i> (concentração de nematoide usada para inoculação foi de 10 JIs/lagarta)	42
Tabela 4.3. Virulência de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> (UEL 08) a três diferentes insetos hospedeiros.....	43
Tabela 5.1. Porcentagem de viabilidade e infectividade (média \pm DP) dos juvenis infectantes de <i>H. amazonensis</i> (UEL 08) após exposição a diferentes concentrações de glicerol durante 48 horas a 23 ± 1 °C e sem fotoperíodo.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	14
2.1.1	Ciclo de Vida	15
2.1.2	Comportamento de Busca ao Hospedeiro	16
2.1.3	Produção <i>in vivo</i> de Nematoides Entomopatogênicos	17
2.2	NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO BRASIL	18
2.3	ISOLAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	20
2.4	IDENTIFICAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	21
3	ARTIGO A: Primeiro Registro de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> no estado do Paraná, Brasil	23
3.1	RESUMO	23
3.2	ABSTRACT	23
3.3	INTRODUÇÃO	24
3.4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.4.1	Criação de <i>Galleria mellonella</i>	25
3.4.2	Amostragem e Processamento das Amostras de Solo	25
3.4.3	Estudos Morfológicos e Morfométricos	26
3.4.3.1	Microscopia de luz	26
3.4.4	Identificação Molecular	27
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.5.1	Amostragem e Processamento das Amostras de Solo	28
3.5.2	Caracterização Morfométrica	28
3.5.3	Identificação Molecular e Análise Filogenética	32
3.6	CONCLUSÃO	33
4	ARTIGO B: Ciclo de Vida, Patogenicidade e Virulência e Produção <i>in vivo</i> de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> (UEL 08)	35
4.1	RESUMO	35
4.2	ABSTRACT	35
4.3	INTRODUÇÃO	36
4.4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.4.1	Multiplicação do Nematóide	38

4.4.2	Ciclo de Vida	38
4.4.3	Teste de Patogenicidade e Virulência.....	38
4.4.4	Produção <i>in vivo</i> de <i>H. amazonensis</i> (UEL 08) em lagartas de <i>G. mellonella</i>	39
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.5.1	Ciclo de Vida	41
4.5.2	Teste de Patogenicidade e Virulência.....	43
4.5.3	Produção <i>in vivo</i> de <i>H. amazonensis</i> (UEL 08) em lagartas de <i>G. mellonella</i>	44
4.6	CONCLUSÃO	45
5	ARTIGO C: Criopreservação como método de armazenamento do nematoide entomopatogênico <i>Heterorhabditis amazonensis</i> (UEL 8)	47
5.1	RESUMO.....	47
5.2	ABSTRACT	47
5.3	INTRODUÇÃO	48
5.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
5.4.1	Obtenção e Manutenção do Isolado de Nematoide Entomopatogênico	50
5.4.2	Exposição do Nematoide ao Crioprotetor.....	50
5.4.3	Criopreservação	51
5.4.4	Análises Estatísticas	52
5.5	RESULTADO E DISCUSSÃO	53
5.5.1	Exposição do Nematoide ao Crioprotetor.....	53
5.5.2	Criopreservação	54
5.6	CONCLUSÃO	55
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) estão sendo estudados cada vez mais como alternativa de controle de pragas e nos últimos anos, várias espécies e isolados de foram coletados em diferentes ecossistemas (DOLINSKI et al., 2017). Estes entomopatógenos apresentam atributos peculiares que os tornam ferramenta promissora em programas de manejo integrado de pragas (MIP), representando uma parte importante dos agentes de controle biológico.

Estes agentes estão entre os organismos mais numerosos do planeta, e as espécies de NEPs dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são cosmopolitas e estão distribuídas em uma grande diversidade de solos, áreas geográficas e ambientes, possuindo uma vasta gama de insetos hospedeiros (LEWIS et al., 2006). São conhecidas no mundo pelo menos 90 espécies do gênero *Steinernema* e 20 do gênero *Heterorhabditis* (SHAPIRO-ILAN et al., 2017).

O conhecimento da diversidade de espécies e isolados de NEPs nativos é fundamental, visto que organismos nativos são adaptados às condições locais, o que pode proporcionar maiores índices de mortalidade quando comparado aos exóticos, sendo um fator que favorece e potencializa a utilização desses agentes no MIP (DOLINSKI; MOINO JUNIOR, 2006; ANDALÓ, MOREIRA, MOINO JÚNIOR, 2009).

No Brasil, estudos envolvendo múltiplos aspectos desse grupo de organismos entomopatogênicos se tornaram mais frequentes nos últimos anos, entretanto, ainda são escassos estudos referentes à biodiversidade e identificação de NEPs. Assim, torna-se importante o isolamento e identificação de novas espécies e isolados nativos, bem como a realização de estudos à respeito da taxonomia, biologia, espectro de ação sobre insetos pragas e métodos de armazenamento a longo prazo.

Desta forma, este trabalho teve como objetivos o estudo taxonômico, da biologia e condições de armazenamento em nitrogênio líquido do isolado de nematoide *Heterorhabditis amazonensis* UEL 08, obtido em área de pastagem, na região de Londrina, Paraná, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Nematoides são vermes que apresentam corpo alongado e cilíndrico, pertencentes ao Filo Nematoda, (um grupo numeroso e diversificado), no qual podem ser encontradas espécies de vida livre (terrestres e aquáticos) e parasitas de vertebrados, invertebrados e plantas (DE LEY, 2006). Dentro dessa diversidade, encontram-se espécies de nematoides nocivas a ártropodes, das quais, algumas são utilizadas no controle biológico de insetos considerados pragas (ALMENARA et al., 2012).

São conhecidas mais de 30 famílias de nematoides que apresentam associação com insetos, no entanto, apenas quatro apresentam importância como agentes de controle biológico: Mermithidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae e Heterorhabditidae (POPIEL; HOMINICK, 1992), sendo as duas últimas as maiores famílias de nematoides entomopatogênicos e as mais utilizadas (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012).

A ordem Rhabditida, compreende a família Steinernematidae, que é composta pelos gêneros *Steinernema* Travassos, 1927 e a família Heterorhabditidae, que compreende apenas o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (ADAMS et al., 2006). Segundo Poinar (1993) os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* possuem história evolutiva independente, e estudos filogenéticos demonstram que esses dois gêneros não possuem um ancestral comum recente, refletindo em diferenças biológicas entre eles (ALMENARA et al., 2012).

As espécies de NEPs dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* são parasitos obrigatórios na natureza, associando-se simbioticamente com bactérias para causar a morte de seus hospedeiros. O juvenil infectante (JI) ou juvenil de terceiro estágio (J3) de *Heterorhabditis* e *Steinernema* leva consigo bactérias do gênero *Photorhabdus* Boemare, Akhurst & Mourant, 1983 e *Xenorhabdus* Thomas & Poinar, 1979, respectivamente (ADAMS; NGUYEN, 2002). Essas bactérias são da família Enterobacteriaceae, Gram-negativas, com respiração anaeróbica facultativa, locomoção por flagelo tipo peritríquios e ausência de esporos (BRENNER, 1999). Segundo Forst e Clarke (2002), a associação *Heterorhabditis* – *Photorhabdus* é específica, ou seja, uma espécie de nematoide tem como simbionte sempre e apenas uma única linhagem daquela bactéria. Já para *Steinernema* – *Xenorhabdus*, a especificidade é menos restritiva, assim, diferentes espécies de nematoides desse gênero podem apresentar a mesma espécie de bactéria.

A simbiose entre a bactéria e o nematoide é fundamental para ambos, uma vez que, a bactéria proporciona um ambiente favorável no interior do inseto para o nematoide se alimentar e reproduzir-se com êxito. Por sua vez, o nematoide garante abrigo e dispersão para a bactéria, transportando-a de um hospedeiro para outro (CLARKE, 2008). Todavia, vale ressaltar que apesar das bactérias serem a causa principal da morte dos insetos, os próprios NEPs também produzem toxinas que são letais aos insetos (BURMAN, 1982).

O resultado da infecção por NEPs desses gêneros pode ser observado de acordo com a coloração apresentada pelo inseto hospedeiro morto. Insetos infectados por heterorhabditídeos geralmente apresentam-se avermelhados ou marrom escuro. Já os esteinernematídeos podem apresentar coloração amarelada a marrom café (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004; VOSS et al., 2009; FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012). Essa variação de coloração está relacionada com substâncias produzidas pelas bactérias simbiotes que, como dito anteriormente, são específicas para cada gênero.

2.1.1 Ciclo de Vida

As fases de desenvolvimento dos NEPs (*Steinernema* e *Heterorhabditis*) são: ovo, quatro estádios juvenis (juvenis – J1, J2, J3, J4) e fase adulta (ALMENARA et al., 2012).

O ciclo de vida dos NEPs inicia-se após a infecção do hospedeiro pelo J1 ou J3. A penetração pode ocorrer através das aberturas naturais do inseto como boca, ânus e espiráculos, e para as espécies de *Heterorhabditis*, a penetração também pode ocorrer através da cutícula, pois eles possuem um dente córneo (GEDEN; AXTELL; BROOKS, 1985) que permite aos J1s perfurarem as regiões mais finas e flexíveis da cutícula do hospedeiro (FORST; CLARKE, 2002; ALMENARA et al., 2012).

O ciclo inicia quando os J1s que carregam a bactéria simbiótica na parte anterior do intestino, infectam um inseto, se deslocam até o hemoceloma, onde perdem a cutícula extra e liberam as bactérias, iniciando o processo de infecção. A seguir, as bactérias se multiplicam e provocam a morte do inseto entre 24 e 48 horas por septicemia (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012).

Após a morte do inseto, os NEPs se alimentam das bactérias simbiotes que estão se multiplicando no cadáver, tornando-se adultos de primeira geração (fêmeas e machos), ocorre a cópula e a oviposição dentro do hospedeiro. Dos ovos, eclodem juvenis de primeiro estágio (J1) que sucessivamente mudam para juvenis de segundo, terceiro e quarto

estádio. Os ciclos de reprodução no interior do inseto continuam até que as fontes de nutrientes provindas do inseto hospedeiro se esgotem. Uma vez esgotadas, os juvenis de segundo estadio ingerem as bactérias, passam para o terceiro estadio (JIs) retendo o exoesqueleto do segundo e deixam o cadáver em busca de outro hospedeiro. Na fase de JI, em que permanecem no solo, eles não se alimentam, uma vez que pela retenção do exoesqueleto, possuem a boca e o ânus obstruídos, mas mesmo assim podem sobreviver por longo período de tempo no solo (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004; DOLINSKI; MOINO JÚNIOR, 2006).

O ciclo de vida de *Heterorhabditis* é bastante semelhante ao de *Steinernema*, porém há algumas particularidades. Os JIs desse gênero regurgitam as bactérias simbiotes e, além de penetrar o hospedeiro pelas aberturas naturais, conseguem também penetrar no inseto através da cutícula, pois, possuem um dente cornéu, como já mencionado. Outra diferença entre os dois gêneros, é que na primeira geração dos heterorhabditídeos, formam-se adultos hermafroditas com morfologia de fêmeas (POINAR, 1990) e a diferenciação em macho e fêmea ocorre somente a partir da segunda geração (DOLINSKI; MOINO JUNIOR, 2006; FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012).

Os nematoides do gênero *Heterorhabditis* podem ter maior sucesso na penetração e posterior liberação das bactérias nos insetos hospedeiros. Neste caso, mesmo quando a penetração no hospedeiro ocorre apenas por um único JI, como a primeira geração é de adultos hermafroditas, não há necessidade de cópula para a produção de ovos fertilizados (ALMENARA et al., 2012). Além disso, no ciclo de *Heterorhabditis*, pode ocorrer o fenômeno de Endotoquia Matricida, ou seja, quando ocorre a eclosão de juvenis no interior do corpo da fêmea e estes rompem a parede, sendo liberados e causando a morte da fêmea.

2.1.2 Comportamento de Busca ao Hospedeiro

Os NEPs dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* têm capacidade de se mover, principalmente na lamina d'água do solo sendo uma característica que os destaca dos demais agentes de controle microbiano, havendo, no entanto, uma variação nas estratégias de busca (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012). O comportamento de busca pelo hospedeiro pode ser dividido em dois tipos: “cruiser” (rastreamento) e “ambusher” (emboscada) (LEWIS et al., 2006), e este varia de acordo com a espécie do nematoide (RAMOS-RODRIGUEZ; CAMPBELL; RAMASWAMY, 2007).

As espécies de hábito “cruiser” são móveis e se deslocam no solo em busca

de hospedeiros respondendo a sinais como compostos voláteis emitidos por plantas e CO₂ liberado pelo hospedeiro, e por isso têm uma maior probabilidade de encontrar hospedeiros sedentários. *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 e *Steinernema glaseri* Steiner, 1929 são exemplos de espécies com hábito “cruiser” (LEWIS et al., 2006).

Os NEPs de hábito “ambusher”, como a espécie *Steinernema carpocapse* (LEWIS; GAUGLER; HARRISON, 1993), se mantêm imóveis no solo e apresentam o comportamento de nictação que consiste na suspensão do corpo, apoiando-o apenas pela ponta da cauda. Desta forma, a parte anterior do corpo do nematoide fica livre aguardando um hospedeiro passar, para então saltar sobre ele (DOLINSKI; MOINO JUNIOR, 2006; LEWIS et al., 2006).

Há também NEPs que apresentam as duas estratégias de busca, intercalando a busca pelo hospedeiro com parada para realizar nictação, como é o caso da espécie *Steinernema feltiae* (GREWAL; SELVAN; GAUGLER, 1994).

Conhecer o tipo de comportamento de busca do nematoide é essencial para que ocorra o encontro deste com o hospedeiro. Nesse sentido, NEPs de hábito “cruiser” são indicados para o controle de insetos com hábito sedentário ou críptico. Já os de hábito “ambusher” apresentam maior probabilidade de sucesso no controle de insetos que se movimentam na superfície do solo (LEWIS et al., 2006).

2.1.3 Produção *in vivo* de Nematoides Entomopatogênicos

São conhecidos dois métodos de produção de NEPs: *in vitro* (meio sólido e líquido) e *in vivo* (utilizando hospedeiros alternativos). A produção *in vitro* tem como vantagens redução dos custos e possibilita um produto padrão, estável e viável devido à possibilidade de produção em larga escala (Neves et al., 1998). Já a produção *in vivo* é um método mais simples e indicado para produção em menor escala. Este método foi utilizado pela primeira vez por Glaser (1931), mas Dutky et al. (1964) foram os primeiros a obter sucesso na produção *in vivo* de NEPs utilizando lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).

O método de produção deve ser escolhido de acordo com objetivo do trabalho. A produção *in vivo* pode ser uma alternativa eficiente em laboratórios e pequenas empresas, pois requer uma demanda maior de espaço e mão-de-obra (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004).

A traça-dos-favos, *G. mellonella*, é o inseto comumente utilizado em laboratório para produção *in vivo*, pois é muito susceptível à maioria dos isolados de NEPs. Além disso, esse inseto é de fácil criação e pode ser produzido em grande escala (BARBOSA, 2005). Segundo Gaugler e Han (2002), este hospedeiro oferece produção considerável de juvenis infectantes ($> 1 \times 10^5$ JIs/lagarta). Poinar (1979) observou uma média de produção, nesse hospedeiro, entre 30.000 a 50.000 JIs por lagarta.

Outros trabalhos também avaliando a produção de NEPs em lagartas de *G. mellonella* demonstraram que este método pode atingir produções entre $0,5 \times 10^5$ e 4×10^5 JIs/lagarta, dependendo da espécie do nematoide (POINAR, 1990; GREWAL; NARDO; AGUILLERA, 2001) podendo chegar até a 200.000 JIs/lagarta (DUTKY et al., 1964).

No Brasil, trabalhos visando avaliar a produção *in vivo* destes entomopatogênicos usando os isolados *Steinernema carpocapse* e *Steinernema arenarium*, apresentaram produções de 149.213 e 302.124 JIs/lagarta respectivamente (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004). Em um outro trabalho, Barbosa (2005) avaliou dois sistemas de produção do isolado *Heterorhabditis bacteriophora* também em *G. mellonella*. Neste estudo, a produção foi feita em armadilha de White e em funis de Baermann na densidade de 200 lagartas. A produção de JIs em armadilha de White foi de 486.610 JIs/g de lagarta, já a produção em funis de Baermann foi superior, totalizando 3.984.758 JIs/g de lagarta, sendo este o melhor sistema de produção *in vivo* de JIs de *H. bacteriophora*.

A produção dos isolados *Heterorhabditis* sp. (NEPET11) e *Heterorhabditis amazonensis* (RSC05) em lagartas de *G. mellonella*, foi avaliada por Guide et al. (2016a) e foi observado que a produção final foi de aproximadamente 7×10^4 e $7,2 \times 10^4$ JIs/g de largarta, respectivamente.

A adoção de NEPs como agentes de controle de pragas não depende somente da infectividade destes sobre o inseto, mas também da sua produção em larga escala, para assim poderem ser incluídos em programas de manejo integrado de pragas (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004; BARBOSA, 2005; FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012).

2.2 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO BRASIL

A descoberta de espécies de nematoides entomopatogênicos tornou viável o seu uso no controle biológico de insetos em diversas culturas (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012). Estes organismos possuem diversas características vantajosas quando

comparados aos outros agentes de controle biológico de insetos. Dentre essas características, destacam-se: maior compatibilidade com produtos fitossanitários (NEGRISOLI JÚNIOR; BARBOSA; MOINO JÚNIOR, 2008); sinergismo com outros entomopatógenos como fungos e bactérias (ACEVEDO et al., 2007); especificidade a insetos, não sendo prejudiciais a vertebrados e plantas; podem ser produzidos em larga escala *in vivo* ou *in vitro* (VOSS et al., 2009); deslocam-se em busca do hospedeiro podendo se difundir pelo ambiente (LEWIS et al., 2006) e podem ser aplicados com equipamentos convencionais (ALVES et al., 2009a).

Estudos com nematoides entomopatogênicos no Brasil são recentes, porém, vários deles foram realizados com o objetivo de controlar não apenas problemas importantes de pragas na agricultura, mas também para entender a biodiversidade e assuntos relacionados a ela. Uma busca na base de dados Scopus realizada por DOLINSKI et al. (2017) utilizando a expressão de busca “Nematoides Entomopatogênicos”, mostrou que o Brasil ocupa o sétimo lugar no mundo em número de publicações, com 107 documentos, atrás dos Estados Unidos (914) Reino Unido (231), Alemanha (168), Índia (143), China (118) e Egito (109).

Trabalhos realizados em condições de laboratório demonstram bons resultados de controle para alguns insetos pragas, como a mosca-das-frutas, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) (ROHDE et al., 2012), o gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) (DOLINSKI; DEL VALLE; STUART, 2006), a broca-da-erva-mate, *Hedipathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae) (ALVES et al., 2009b; 2017), cascudinho-de-aviário, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) (ALVES et al., 2012), cochonilha-da-raiz-da-mandioca, *Dysmicoccus* sp. (GUIDE et al., 2016a). E, alguns trabalhos realizados em condições de campo e casa-de-vegetação também mostram o potencial destes entomopatógenos, como os realizados com o bicudo-da-cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) (LEITE et al., 2012), *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) (BELLINI; DOLINSKI, 2012), *C. psidii* (DEL VALLE et al., 2008).

Ainda, testes de seleção de isolados de fungos e nematoides entomopatogênicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-café, *Dysmicoccus texensis* (Hemiptera: Pseudococcidae), mostraram que os nematoides foram mais eficientes que os fungos, causando até 78% de mortalidade em laboratório (ANDALÓ et al., 2004), chegando a 65% de eficiência em campo (ALVES et al., 2009a)

Em outros trabalhos, utilizando *Heterorhabditis amazonensis* RSC05, *H. indica* e *Steinernema brazilense*, estes mostraram-se promissores no controle de *Spodoptera*

frugiperda, com taxas de mortalidade próximas a 90% utilizando concentrações relativamente baixas de nematoides (SOUZA et al., 2012; GARCIA et al., 2008).

Sabe-se que a utilização de NEPs no controle de insetos no contexto da agricultura sustentável ainda é um grande desafio, devido principalmente a escassez de estudos nas áreas de identificação, produção, formulação e comercialização destes entomopatógenos (DOLINSKI et al., 2017).

De acordo com Nguyen et al. (2010) uma alternativa para ampliar o uso de NEPs no controle biológico é o isolamento de novas espécies e isolados. O Brasil possui uma variedade de biomas e ampla biodiversidade, o que favorece a descoberta de novos isolados e espécies de NEPs (DOLINSKI et al., 2017). Além disso, há que se ressaltar que a busca por métodos alternativos ao químico é crescente e isso pode incentivar e impulsionar novos estudos a fim de desenvolver e implementar medidas de controle de pragas usando NEPs.

2.3 ISOLAMENTO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

A primeira descrição de um NEP no Brasil foi realizada por Lauro Travassos que, em 1927, descreveu o gênero *Steinernema* (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012). O gênero *Heterorhabditis* teve a primeira espécie brasileira classificada como *Rhabditis humbletoni*, descrita por Pereira (1937).

Posteriormente, *Steinernema glaseri* Steiner, 1929, que foi descrito inicialmente na América do Norte, foi também isolado a partir de ovos de uma fêmea de *Migdolus fryanus* (Coleoptera: Cerambycidae) coletada em campo no estado de São Paulo (PIZANO et al., 1985; NGUYEN et al., 2010). Acevedo et al. (2005) por meio de amostras de solo coletadas em área cultivada com abóbora em Minas Gerais, isolaram três NEPs do gênero *Heterorhabditis*. Também, foram isoladas as espécies *Heterorhabditis baujardi* e *Heterorhabditis indica* em solo da cidade de Monte Negro (RO) (DOLINSKI et al., 2008). No Estado do Amazonas, foi encontrado em amostras de solo a espécie *Heterorhabditis amazonensis* (ANDALÓ et al., 2006a) e, por último, o nematoide *Steinernema brazilense* n. sp., foi isolado a partir de uma única amostra de solo recolhida de uma floresta natural em Mato Grosso do Sul (NGUYEN et al., 2010).

O método mais utilizado para isolar NEPs baseia-se na técnica do inseto-armadilha ou inseto-isca, na maioria das vezes utilizando lagartas de *G. mellonella* como isca/hospedeiro. As lagartas são expostas à amostra de solo e monitoradas quanto à infecção (VOSS et al., 2009). A obtenção de nematoides é favorecida pela escolha do local de coleta e

pela repetição do processo de inseto-isca em amostras negativas, pois os JIs podem permanecer não infectantes durante algum período (HOMINICK, 2002; VOSS et al., 2009).

Espécies do gênero *Heterorhabditis* são mais frequentes em solos tropicais e subtropicais (POPIEL; HOMINICK, 1992), enquanto que *Steinernema* spp. ocorrem em maior abundância nas regiões temperadas. As características do solo são fatores que influenciam a ocorrência de NEPs em determinado ambiente, levando a uma correlação entre a presença de nematoide e a textura do solo, com maior ocorrência de NEPs em solos arenosos, embora, alguns isolados também sejam encontrados em solo argiloso. Isto ocorre, provavelmente porque solos com alto teor de areia/silte favorecem a mobilidade e sobrevivência dos NEPs, enquanto que os solos com alto teor de argila restringem os movimentos dos mesmos e também apresentam menor teor de O₂ disponível (TARASCO et al., 2015).

Outros fatores também podem influenciar a distribuição dos NEPs como, temperatura, presença de culturas agrícolas e disponibilidade de hospedeiros. Além disso, a presença de cobertura vegetal rasteira ou em decomposição, favorece a proteção do solo e a manutenção da umidade, sendo esta combinação a condição favorável para presença e persistência de NEPs (TARASCO et al., 2015).

2.4 IDENTIFICAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

A demanda por alternativas biológicas para o controle de insetos praga propiciara o aumento na identificação de novas espécies de nematoides entomopatogênicos com potencial de uso para o controle biológico (MALAN et al., 2008; ANDALÓ, 2010).

A identificação de NEPs pode ser realizada utilizando-se critérios morfológicos e morfométricos, por meio de microscopia óptica ou microscopia eletrônica de varredura, as quais podem ser combinadas com o uso de técnicas moleculares.

Estudos morfológicos e/ou morfométricos baseiam-se na identificação a partir da medição de estruturas do nematoide, que podem ser comparadas com chaves taxonômicas, identificando-se gêneros e espécies (ADAMS; NGUYEN, 2002). Para observação de NEPs em microscópio óptico de luz é necessária a fixação destes em TAF para preparo das lâminas semi-permanentes. A partir destas lâminas é possível observar caracteres morfológicos dos JIs, dos machos e também das fêmeas (KAYA; STOCK, 1997; ANDALÓ, 2010). Já as imagens obtidas na microscopia eletrônica de varredura possibilitam uma

visualização mais detalhada das estruturas externas do corpo do nematoide, o que auxilia na comparação e diferenciação entre esses organismos (ANDALÓ, 2010).

Com o advento do uso de técnicas moleculares, é possível identificar isolados ou mesmo novas espécies com maior precisão. Os métodos moleculares mais utilizados são a eletroforese, análise de restrição enzimática (RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*), amplificação polimórfica casual de DNA (RAPD – *Random amplification of polymorphic DNA*) e o teste de PCR (*Polymerase chain reaction*) (ALBERTS et al., 1994; ANDALÓ, 2010).

O primeiro passo para identificação molecular é a extração de DNA. O DNA é extraído de uma fêmea hermafrodita ou dos JIs, de acordo com metodologia descrita por Nguyen et al. (2001). Em seguida é feita a amplificação de PCR utilizando-se os iniciadores. Após a amplificação, é feito o sequenciamento e por último são realizadas as análises filogenéticas (ANDALÓ, 2010; NGUYEN et al., 2004).

3 ARTIGO A: Primeiro Registro de *Heterorhabditis amazonensis* no Estado do Paraná, Brasil

3.1 RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae são amplamente utilizados no controle de insetos-pragas. No Brasil, os estudos relacionados a caracterização e identificação destes entomopatógenos são recentes e escassos. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi isolar NEPs de amostras de solos coletadas em diferentes áreas no estado do Paraná, Brasil. Em uma coleta de solo em área de pastagem cultivada com braquiária, na Fazenda Figueira (23°34'311''S, 050°58'298''W) localizada no Distrito de Guairacá, Londrina, Paraná, Brasil foi encontrado um isolado de nematoide do gênero *Heterorhabditis* utilizando o método de “inseto-isca” com lagartas de *Galleria mellonella*. Para a identificação foram realizados estudos de morfometria e identificação molecular a partir da amplificação da região ITS. Algumas diferenças foram encontradas em termos de morfometria em comparação com a descrição original, entretanto, os dados moleculares demonstraram que a sequência obtida para o isolado UEL 08 é idêntica à sequência de referência de *H. amazonensis* (DQ665222). Assim, pôde-se concluir por meio dos estudos morfológicos e moleculares, que o nematoide isolado é da espécie *H. amazonensis*.

Palavras-chave: Entomopatógeno, morfometria, taxonomia, análise molecular, controle biológico.

3.2 ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) of Heterorhabditidae and Steinernematidae families are widely used in insect-pest control. In Brazil, studies related to the characterization and identification of these entomopathogens are recent and scarce. the objective of this study was to isolate EPNs from soil samples collected in different areas in the state of Paraná, Brazil. A nematode isolate of the genus *Heterorhabditis* was found in a soil sample collected in a pasture area cultivated with brachiaria, at Fazenda Figueira (23°34'311"S, 050°58'298"W) located in the District of Guairacá, Londrina, Paraná, using the “insect-baiting” technique with larvae *Galleria mellonella*. For the identification, morphometry and molecular identification studies were performed from the amplification of the ITS region. Some differences were found in terms of morphometry compared with the original description, however, the molecular data demonstrated that the sequence obtained for the UEL 08 isolate is identical with the reference sequence of *H. amazonensis* (DQ665222). Thus, morphological and molecular studies showed that nematode isolated is the species *H. amazonensis*.

Keywords: Entomopathogen, morphometry, taxonomy, molecular analysis, biological control.

3.3 INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) estão entre os organismos mais numerosos do planeta e encontram-se distribuídos em uma grande diversidade de solos, áreas geográficas e ambientes (LEWIS et al., 2006). As famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae infectam e matam insetos e apresentam grande potencial como agentes de controle biológico (GREWAL; NARDO; AGUILLERA, 2001), devido a associação com bactérias simbióticas dos gêneros *Photorhabdus* Boemare, Akhurst & Mourant, 1993 (para *Heterorhabditids*) e *Xenorhabdus* Thomas & Poinar, 1979 (para *Steinernema*), torna-os virulentos.

O gênero *Heterorhabditis* compreende 20 espécies, SHAPIRO-ILAN et al., 2017) e no Brasil, 27 isolados *Heterorhabditis* foram encontrados, pertencentes às espécies *H. amazonensis* Andaló et al., 2006, *H. indica* Poinar et al., 1992, *H. baujardi* Dolinski et al., 2008 e *H. bacteriophora* Poinar, 1975 (DOLINSKI et al., 2017).

A espécie *Heterorhabditis amazonensis* foi isolada pela primeira vez a partir do método inseto-armadilha ou inseto-isca (BEDDING; AKHURST, 1975) em amostras de solo coletadas na região norte do estado do Amazonas, próximo à cidade de Benjamin Constant, Brasil e a descrição foi feita por Andaló et al. (2006). Outros estudos realizados no Brasil com objetivo de isolar NEPs também demonstraram a presença de *H. amazonensis* em outras regiões (ANDALÓ et al., 2009c).

A descoberta de novas espécies ou populações de NEPs pode expandir ou melhorar o uso desses organismos em programas de controle biológico. Além disso, a variabilidade encontrada em espécies nativas de nematoides permite melhor adaptação às condições climáticas e controle mais eficaz da população local de insetos (DOLINSKI; MOINO JUNIOR, 2006; ANDALÓ et al. 2009c).

Assim, o objetivo deste estudo foi isolar NEPs de amostras de solos coletadas em diferentes áreas em Londrina, Paraná, Brasil e caracterizá-los por meio de estudos morfológicos e moleculares.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Criação de *Galleria mellonella*

As lagartas foram obtidas da criação de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano da UEL e acondicionadas em potes plásticos com tampas providas de tela e mantidas em câmara climatizada a 29 ± 1 °C e sem fotoperíodo. A manutenção e alimentação foram realizadas diariamente com dieta artificial adaptada de Parra (1998).

3.4.2 Amostragem e Processamento das Amostras de Solo

Um total de sessenta amostras de solo foram coletadas em diferentes áreas (áreas agrícolas com sistema de cultivo convencional e de plantio direto; área de cultivo orgânico; pastagem e áreas florestais) nas cidades de Londrina, Marumbi, Marilândia do Sul, Jandaía do Sul e São Sebastião da Amoreira no estado do Paraná entre os meses de agosto de 2016 a fevereiro de 2018.

Em cada local de coleta, a área amostrada foi selecionada aleatoriamente e extraiu-se as amostras a uma profundidade entre 15-20 cm com auxílio de uma pá ou trado, coletando aproximadamente 500g de solo. O solo foi armazenado em um saco plástico, etiquetado com as seguintes informações: data e local de coleta, textura do solo e cultura/vegetação associada (ANDALÓ et al., 2009; MOLINA et al., 2005). As amostras recolhidas, foram mantidas em caixa térmica contendo gelo a uma temperatura aproximada de 10 a 15 °C durante o transporte do local de coleta até o laboratório.

Para isolamento do nematoide, lagartas de último instar de *G. mellonella* foram usadas como “inseto-isca” de acordo com a metodologia de Bedding e Akhurst (1975). Desta forma, no laboratório, cada amostra foi dividida em cinco sub-amostras (aproximadamente 100g de solo), colocadas em um pote plástico (500 mL e 11,5 cm Ø) e umedecidas com água destilada (15% v/w). Em seguida, foram adicionadas cinco lagartas em cada pote. Os potes foram fechados e mantidos em câmara climatizada a 25 ± 1 °C e sem fotoperíodo por 72 horas.

As lagartas mortas e com sintomas de infecção foram lavadas com solução de Ringer, transferidas para câmara seca (placa de Petri de 9 cm Ø com um papel de filtro) e mantidas em câmara climatizada a 25 ± 1 °C e sem fotoperíodo por cinco dias e após esse

período foram colocadas em armadilha de White (WHITE, 1927) para emergência e coleta dos JIs.

3.4.3 Estudos Morfológicos e Morfométricos

Heterorhabditis amazonensis, isolado UEL 08, foi obtido a partir de uma amostra de solo retirada em área de pastagem cultivada com braquiária, na Fazenda Figueira (23°34'311''S, 050°58'298''W) localizada no Distrito de Guairacá, Londrina, Paraná. Os juvenis infectantes, obtidos a partir do isolamento, foram mantidos em laboratório e a cada 30 dias foram multiplicados em lagartas de *G. mellonella* segundo metodologia de Molina e Lopes (2001), coletados durante a primeira semana de emergência e armazenados em potes plásticos com 200 mL de água destilada. Os potes foram mantidos em câmara climatizada a 18°C e sem fotoperíodo.

Para os estudos morfológicos, os nematoides foram multiplicados *in vivo* em lagartas de *G. mellonella*. Dez lagartas foram dispostas em uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, com dois papéis filtro na parte inferior da placa, na qual foram aplicados aproximadamente 1000 juvenis infectantes (JIs). Após três dias, as lagartas mortas foram transferidas para uma nova placa de Petri com um papel de filtro seco e limpo.

As fêmeas de primeira geração (hermafroditas) foram obtidas por meio da dissecação das lagartas infectadas 5-6 dias após a morte das lagartas. Machos e fêmeas de segunda geração (afimíticas) foram obtidos após 7-8 dias. Os juvenis de terceiro estágio (infectantes) foram coletados após a emergência destes dos cadáveres das lagartas.

3.4.3.1 Microscopia de luz

Para microscopia de luz, 25 espécimes dos diferentes estágios (hermafroditas, fêmeas, machos, JIs) foram observados. Com exceção dos JIs, os demais estágios foram mortos e fixados em TAF (7 mL de formalina; 2 mL de Trietanolamina; 91 mL de água destilada) (COURTENY et al., 1955) ou lactofenol (FRANKLIN; GOODEY, 1949) no caso das fêmeas, a fim de que estruturas morfológicas como esôfago, anel nervoso e poro excretor fossem melhor observadas. Os espécimes fixados foram montados em suportes para lamínula para evitar o achatamento dos nematoides (ANDALÓ et al., 2006a). As lâminas e os nematoides foram observados utilizando o microscópio de luz (Motic BA 310, objetivas de 4x, 10x e 40x). Os dados foram comparados com a descrição original (ANDALÓ et al.,

2006a) e outros dois trabalhos com populações de *H. amazonensis* (ANDALÓ et al., 2009c; MORALES et al., 2016).

3.4.4 Identificação Molecular

Para a análise molecular do isolado UEL 08, o DNA foi extraído de juvenis infectantes utilizando o kit comercial “NucleoSpin® Tissue” (Macherey-Nagel), seguindo o protocolo do fabricante. Um fragmento do rDNA contendo as regiões (ITS1, 5.8S, ITS2) foi amplificado via PCR a partir dos primers 18S: 5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3'(forward) e 26S: 5' TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3'(reverse) (VRAIN et al., 1992).

As reações de PCR foram preparadas em volume final de 25µl, incluindo 1x PCR Master Mix (Promega), 0,5µM de cada primer e aproximadamente 10 ng de DNA. As amplificações foram conduzidas em termociclador MJ Research PTC-100, com uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos, compostos por: 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. O último passo foi a 72°C por 10 minutos. Após a purificação dos produtos da PCR com 0,5µl da enzima Illustra Exo-Star 1-Step PCR Clean Up Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), os fragmentos de DNA foram sequenciados bidirecionalmente a partir do Kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), seguindo as especificações do fabricante. A sequência de bases foi obtida em um sequenciador automático ABI-PRISM 3500 XL (Applied Biosystems) e depositada no GenBank, sob o número de acesso MK262740.

A sequência obtida para o isolado UEL 08 foi editada e alinhada com outras sequências do mesmo trecho, disponíveis para outros *Heterorhabditis* no GenBank (números de acesso na árvore filogenética), usando o software MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). O mesmo software também foi utilizado para calcular as distâncias em pares (Pairwise Distances) e conduzir as seguintes análises: *i* – Sinal filogenético dos dados, o qual foi testado a partir de método de máxima parcimônia (MP), usando os seguintes parâmetros: Árvore de MP inferida a partir de 1000 repetições, usando o algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) com o nível de pesquisa 1, no qual as árvores iniciais foram obtidas pela adição aleatória de sequências (10 réplicas); *ii* – Relações filogenéticas a partir do método de *maximum likelihood* (ML). A árvore de ML foi inferida usando uma árvore inicial *neighbour-joining*, incluindo pesquisa heurística do espaço da árvore a cada troca de ramo TBR (tree bisection-reconnection). Todas as análises foram conduzidas com 1000 repetições de *bootstrap*.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Amostragem e Processamento das Amostras de Solo

Das sessenta amostras coletas apenas uma foi positiva para presença de nematoide. A sintomatologia apresentada pelas lagartas de *G. mellonella* mortas pelo isolado UEL 08 foi característica da infecção por nematoides do gênero *Heterorhabditis*, apresentando coloração vermelho-escuro. Insetos parasitados por heterorhabditídeos apresentam essa coloração devido à presença da bactéria simbiote *Photorhabdus* sp. (POINAR, 1990). O isolado foi nomeado neste trabalho como *Heterorhabditis* sp. (UEL 08).

3.5.2 Caracterização Morfométrica

Heterorhabditis sp. (UEL 8) foi caracterizado por uma combinação de caracteres morfológicos e morfométricos de 25 espécimes de machos, fêmeas, e juvenis infectantes (Tabela 3.1).

A análise das características morfológicas do isolado UEL 08 mostra que, quando comparado morfológicamente com as outras populações de *H. amazonensis*, este difere em algumas características como comprimento total do corpo (L), maior diâmetro do corpo (W), comprimento da cauda (T) e diâmetro do corpo na região anal (ABD) para machos (Tabela 3.2) e comprimento do esôfago (ES) para juvenis infectantes (Tabela 3.3). Por outro lado, a distância da extremidade anterior ao poro excretor (EP), comprimento da cauda (T) e o E% são similares aos juvenis infectantes da população Tipo de *H. amazonensis* Andaló, Nguyen e Moino, 2006 (Tabela 3.3).

De acordo com Stock et al. (2000), as diferenças intraespecíficas encontradas podem ser atribuídas à origem geográfica do nematoide em estudo, às diferentes condições ambientais e também às interações com o hospedeiro. Morales et al. (2016) também observaram encontraram diferenças entre populações venezuelanas de *H. amazonensis*. Poinar (1992) e Stock et al. (1996) também relataram diferenças intraespecíficas com espécies de steinernematídeos.

Tabela 3.1. Morfometria de *Heterorhabditis amazonensis* UEL 8. As medidas são em μm na forma: média \pm dp (variação) (N= 25).

Character	Macho	Hermafrodita (1ª geração)	Fêmea (2ª geração)	Juvenis Infectantes
N	25	25	25	25
L	890 \pm 33.3 (825-936)	3933 \pm 408.4 (3384-4807)	1988 \pm 132.0 (1794-2285)	554 \pm 35.5 (508-634)
A				23 \pm 3.0 (19-28)
B				4.3 \pm 0.4 (3.6-5.6)
C				5.1 \pm 0.3 (4.5-5.8)
V		44 \pm 3.3 (37-53)	48 \pm 2.9 (43-55)	
Max. body diam. (W)	66 \pm 6.6 (63-79)	247 \pm 26.4 (206-307)	134.8 \pm 12.7 (112-158)	24 \pm 3.7 (20-32)
Stoma length		11.2 \pm 2.0 (8-16)	11.8 \pm 1.3 (8-14)	
Stoma diam.		11.7 \pm 2.0 (8-16)	11.8 \pm 1.1 (8-14)	
EP	91 \pm 9.0 (68-104)	144 \pm 15.3 (104-164)	116 \pm 12.5 (92-140)	106 \pm 10.2 (92-128)
NR	67 \pm 10.1 (44-84)	107 \pm 14.1 (84-136)	89 \pm 9.0 (68-104)	83 \pm 9.5 (72-104)
ES	112 \pm 3.9 (108-120)	179 \pm 17.3 (160-216)	143 \pm 10.6 (124-160)	130 \pm 10.8 (100 \pm 144)
Testis reflexion	67 \pm 13.2 (44-88)			
Tail length with sheath (T)	62 \pm 10.8 (36-80)	116 \pm 19.7 (88-164)	87 \pm 12.2 (72-116)	108 \pm 8.4 (96-128)
Tail length without sheath				75 \pm 7.9 (60-92)
Anal body diam. (ABD)	39 \pm 3.9 (32-48)	57 \pm 15.8 (40-96)	34 \pm 4.0 (28-48)	16 \pm 3.5 (12-24)
Spicule length (SP)	43 \pm 4.9 (36-52)			
Gubernaculum length (GU)	22 \pm 3.1 (16-28)			
D% = EP/ES \times 100	81 \pm 8.1 (61-96)			82 \pm 5.7 (71-92)
E% = EP/T \times 100				99 \pm 11.1 (86-129)
SW% = SP/ABD \times 100	110 \pm 17.0 (82-144)			
GS% = GU/SP \times 100	52 \pm 8.2 (42-67)			
Hyaline/tail \times 100				69.8 \pm 4.6 (63-77)

L= comprimento total do corpo; NR= distância da extremidade anterior ao anel nervoso; EP= distância da extremidade anterior ao poro excretor; ES= comprimento do esôfago; V= distância da vulva à extremidade anterior; A= L/W; B= L/ES; C= L/T.

Tabela 3.2. Morfometria comparativa (μm) de machos de *Heterorhabditis amazonensis* isolados no Brasil (Andaló et al., 2006; 2009) e Venezuela (Morales et al., 2016).

Character	Andaló et al. (2009)		Morales et al. (2016)			Presente Estudo	
	Andaló et al., (2006)	GL population	SG population	LPV081	LPV156	LPV498	UEL 08
	Type population (Brasil)	(Brasil)	(Brasil)	(Venezuela)	(Venezuela)	(Venezuela)	(Brasil)
L	752 \pm 43 (692–826)	739.2 \pm 23.4 (694–790)	820.4 \pm 32.7 (771–879)	798 \pm 128 (719–905)	788 \pm 144 (687–873)	832 \pm 160 (669–977)	890 \pm 33.3 (825–936)
W	41 \pm 2.3 (36–43)	35.4 \pm 4 (28–42)	44.2 \pm 2.7 (41–49)	46 \pm 10 (40–50)	45 \pm 8 (43–50)	47 \pm 10 (43–54)	66 \pm 6.6 (63–79)
EP	109 \pm 6 (96–116)	83.6 \pm 5.2 (73–98)	95.5 \pm 4 (91–104)	93 \pm 4 (89–96)	87 \pm 6 (81–90)	96 \pm 6 (84–101)	91 \pm 9 (68–104)
NR	79 \pm 5 (71–88)	68.2 \pm 4.7 (60–81)	76.9 \pm 5.4 (70–89)	81 \pm 6 (71–87)	74 \pm 7 (69–80)	80 \pm 6 (71–88)	67 \pm 10.1 (44–84)
ES	105 \pm 5 (97–114)	97.3 \pm 4 (91–107)	107.7 \pm 3.7 (102–114)	107 \pm 12 (101–113)	105 \pm 16 (101–110)	110 \pm 10 (100–117)	112 \pm 3.9 (108–120)
T	33 \pm 2.7 (29–41)	39 \pm 2 (34–42)	42.4 \pm 3 (37–47)	34 \pm 3 (31–38)	36 \pm 5 (33–39)	36 \pm 2 (28–40)	62 \pm 10.8 (36–82)
ABD	27 \pm 2.6 (23–33)	22.9 \pm 1.9 (20–26)	25.6 \pm 1.6 (23–28)	26 \pm 2 (23–28)	27 \pm 6 (24–30)	29 \pm 3 (26–37)	39 \pm 3.9 (32–48)
SP	41 \pm 2.9 (35–45)	36.5 \pm 2.1 (33–41)	35.2 \pm 2.5 (31–39)	42 \pm 4 (39–44)	42 \pm 4 (40–46)	41 \pm 2 (36–45)	43 \pm 4.9 (36–52)
GU	21 \pm 1.5 (19–23)	18.2 \pm 1.7 (16–21)	19 \pm 1.8 (15–21)	21 \pm 2 (18–22)	21 \pm 2 (19–22)	21 \pm 2 (18–25)	22 \pm 3.1 (16–28)
D%	103 \pm 3.7 (95–109)	85.8 \pm 3.2 (77.9–91.6)	88.7 \pm 3.1 (80–93)	86 \pm 7 (82–90)	82 \pm 9 (74–87)	87 \pm 5 (79–95)	81 \pm 8.1 (61–96)
SW%	152 \pm 20 (120–187)	90 \pm 5.9 (81–99)	138.5 \pm 15.2 (111–163)	162 \pm 24 (144–184)	156 \pm 37 (131–191)	140 \pm 20 (115–163)	110 \pm 17 (82–144)
GS%	51 \pm 32 (44–56)	49.8 \pm 4.1 (43.2–54.1)	53.9 \pm 4.1 (47–64)	51 \pm 2 (46–54)	49 \pm 5 (45–54)	50 \pm 3 (44–60)	52 \pm 8.2 (42–67)

L= comprimento do corpo, W= largura do corpo, NR= distância da extremidade anterior ao anel nervoso, EP= distância da extremidade anterior ao poro excretor, ES= distância da extremidade anterior ao final da faringe, T= comprimento da cauda, ABD= largura do corpo na região anal, D(%)= (EP/ES), SW(%)= (SP/ABD), GS(%)=GU/SP.

Tabela 3.3. Morfometria comparativa (μm) do juvenil infectante de *Heterorhabditis amazonensis* isolados no Brasil (Andaló et al., 2006; 2009) e Venezuela (Morales et al., 2016).

Character	Andaló et al. (2009)		Morales et al. (2016)			Presente Estudo	
	Andaló et al., (2006)	GL population	SG population	LPV081	LPV156	LPV498	UEL 08
	Type population (Brasil)	(Brasil)	(Brasil)	(Venezuela)	(Venezuela)	(Venezuela)	(Brasil)
L	589 ± 12 (567–612)	598 ± 12.7 (567–618)	506 ± 19.7 (465–541)	503 ± 225 (454-549)	497 ± 148 (462-540)	542 ± 280 (514-582)	554 ± 35.5 (508-634)
A	26 ± 1.3 (24-29)	26 ± 1 (24.4–28.5)	22.2 ± 1.6 (20–25)	20 ± 3 (17-22)	21 ± 2 (19-24)	21 ± 3 (19-23)	23 ± 3 (19-28)
B	4.9 ± 0.3 (4.4-5.5)	5.1 ± 0.3 (4.6–5.5)	4.4 ± 0.4 (3.8–5)	4.4 ± 0.4 (3.9-5.3)	4.6 ± 0.7 (4.3-4.9)	5.4 ± 0.5 (4.9-6.2)	4.3 ± 0.4 (3.6-5.6)
C	5.5 ± 0.2 (5.1–6.1)	5.3 ± 0.1 (5–5.5)	5.1 ± 0.3 (4.6–5.7)	5.1 ± 0.6 (4.8-5.9)	5 ± 0.5 (4.1-5.6)	6.1 ± 0.8 (5.1-7.2)	5.1 ± 0.3 (4.5-5.8)
W	23 ± 1.2 (20–24)	23 ± 0.9 (21–24)	22 ± 1.7 (21–26)	24 ± 6 (24-25)	22 ± 3 (21-25)	26 ± 4 (22-27)	24 ± 3.7 (20-32)
EP	107 ± 6.1 (89–115)	102 ± 6.4 (91–112)	103 ± 11.4 (86-124)	92 ± 7 (85-98)	91 ± 9 (85-98)	78 ± 5 (66-97)	106 ± 10.2 (92-128)
NR	85 ± 4.9 (76–93)	92.9 ± 6.1 (83–104)	86 ± 11.4 (74-106)	77 ± 4 (72-88)	78 ± 11 (73-81)	67 ± 2 (58-78)	83 ± 9.5 (72-104)
ES	121 ± 6.6 (107–132)	118 ± 5.8 (111–128)	115 ± 10.5 (99-135)	114 ± 13 (104-122)	105 ± 15 (94-109)	99 ± 8 (88-107)	130 ± 10.8 (100-144)
T	107 ± 4.7 (98–115)	113 ± 3.2 (106–119)	99 ± 6.2 (89-112)	97 ± 7 (89-105)	97 ± 4 (86-110)	87 ± 6 (81-103)	108 ± 8.4 (96-128)
ABD	14 ± 1.4 (13–17)	16 ± 0.8 (15–18)	16 ± 1.7 (13-20)	15 ± 1.7 (14-16)	14 ± 2.5 (13-18)	15 ± 1.5 (14-17)	16 ± 3.5 (12-24)
D%	88 ± 2.7 (83–92)	86 ± 2.2 (81–90)	89 ± 2.7 (85-94)	81 ± 6 (73-87)	87 ± 6 (78-97)	78 ± 4 (66-91)	82 ± 5.7 (71-92)
E%	100 ± 6.0 (89–109)	90 ± 5.9 (81–99)	104 ± 9.9 (87-120)	95 ± 11 (86-104)	94 ± 5 (86-99)	86 ± 5 (63-103)	99 ± 11.1 (86-129)

L=comprimento do corpo, a=(L/W), b= (L/ES), c= (L/T), W= largura do corpo, NR= distância da extremidade anterior ao anel nervoso, EP= distância da extremidade anterior ao poro excretor, ES= distância da extremidade anterior ao final da faringe, T= comprimento da cauda, ABD= largura do corpo na região anal, D(%)=(EP/ES), E(%)=(EP/T).

3.5.3 Identificação Molecular e Análise Filogenética

A análise molecular obteve 962 pares de bases (pb) de um trecho do gene ribossomal ITS1, 5,8S, 1ITS2, incluindo 214 sítios polimórficos (292 singletons).

A amplificação e sequenciamento de parte do gene de rDNA (ITS1, 5,8S, 1ITS2) para o isolado UEL 08 forneceu uma sequência idêntica a sequência de referência de *H. amazonensis* (DQ665222) (Tabela 3.4). Na análise filogenética a topologia representada pela árvore de Máxima Parcimônia mostrou um grupo monofilético bem suportado (100%) pela análise *bootstrap*, formado por *H. amazonensis* UEL 08 junto com os demais isolados brasileiros e venezuelanos de *H. amazonensis* e as espécies *H. baujardi*, *H. floridensis*, *H. mexicana* e *H. taysearae* (Figura 3.1).

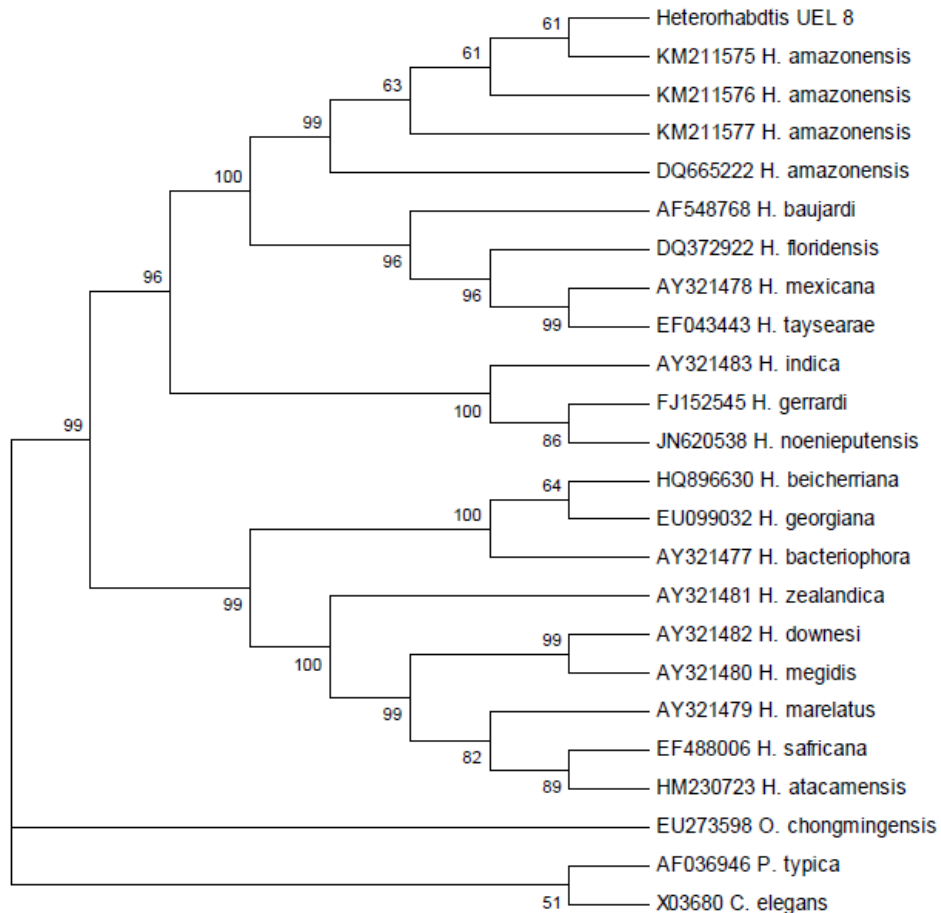


Figura 3.1. Relações filogenéticas de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) baseadas na análise de regiões ITS do rDNA inferidas pela análise de Máxima Parcimônia (MP). *Oscheius chongmingensis*, *Pellioditis typica* e *Caenorhabditis elegans* foram usados como grupo externo.

Alguns estudos relataram variabilidade intraespecífica na sequência ITS de

espécies *Heterorhabditis* (MANEESAKORN et al., 2011; LI et al., 2012). De acordo com Morales et al. (2016) mais populações de *H. amazonensis* e outras espécies do mesmo gênero devem ser analisadas, a fim de que a baixa variação intraespecífica da sequência ITS entre populações da mesma espécie, porém separadas geograficamente, seja suportada.

O uso do gene ITS permitiu a identificação segura do isolado UEL 08 como pertencente a espécie *H. amazonensis*. Assim, estudos futuros com as populações de *H. amazonensis* já conhecidas no Brasil, podem ser bastante interessantes, possibilitando várias inferências sobre a distribuição desta espécie no Brasil e como estas populações estão relacionadas. Ainda, outros genes poderão ser potencialmente utilizados para estudar a variabilidade genética entre populações de *H. amazonensis*.

3.6 CONCLUSÃO

Concluiu-se a partir dos dados moleculares e morfológicos, que o nematoide *Heterorhabditis* UEL 08 obtido de Londrina, PR, Brasil, é um isolado da espécie *H. amazonensis*.

Tabela 3.4. Distâncias em pares das regiões ITS do rDNA entre espécies de *Heterorhabditis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 MK262740 <i>H. amazonensis</i> UEL 08		99	100	100	100	88,3	88,9	88,2	87,9	87,2	87,0	87,7	88,0	88,1	92,4	92,4	92,2	95,9	95,4	95,6	96,2	85,9	88,2	85,7
2 DQ665222 <i>H. amazonensis</i>	1		100	100	100	88,3	88,9	88,2	87,8	87,2	87,0	87,7	87,9	88,0	92,4	92,3	92,2	96,0	95,4	95,5	96,2	86,0	88,2	85,4
3 KM211575 <i>H. amazonensis</i> LPV081	0	0		100	100	88,5	86,0	88,2	88,1	87,3	87,5	87,7	88,0	88,2	92,5	92,5	92,3	96,0	95,4	95,7	96,2	86,4	89,3	86,6
4 KM211576 <i>H. amazonensis</i> LPV156	0	0	0		100	88,5	86,0	88,2	88,1	87,3	87,5	87,7	88,0	88,2	92,5	92,5	92,3	96,0	95,4	95,7	96,2	86,4	89,3	86,6
5 KM211577 <i>H. amazonensis</i> LPV498	0	0	0	0		88,5	86,0	88,2	88,1	87,3	87,5	87,7	88,0	88,2	92,5	92,5	92,3	96,0	95,4	95,7	96,2	86,4	89,3	86,6
6 EF488006 <i>H. safricana</i>	172	171	163	163	163		96,0	95,3	94,6	92,1	91,4	88,9	89,0	88,6	89,0	89,2	88,7	88,2	88,3	88,5	88,4	85,6	87,6	84,5
7 HM230723 <i>H. atacamensis</i>	151	151	150	150	150	13		95,4	95,1	92,5	91,7	89,6	89,6	88,9	89,5	89,8	89,3	88,9	89,0	89,2	88,9	86,1	88,7	85,5
8 AY321479 <i>H. marelatus</i>	170	169	161	161	161	24	21		94,3	92,3	91,2	88,6	88,6	88,3	88,8	88,9	88,5	88,1	88,0	88,2	88,1	85,4	87,8	83,9
9 AY321482 <i>H. downesi</i>	169	168	161	161	161	31	27	37		93,9	91,3	89,2	89,1	88,6	88,7	89,0	88,5	87,8	87,8	88,1	88,0	85,5	87,6	84,6
10 AY321480 <i>H. megidis</i>	178	177	170	170	170	58	55	63	41		90,3	88,1	88,3	88,1	88,0	88,3	87,9	87,4	87,5	87,8	87,6	85,0	87,5	84,4
11 AY321481 <i>H. zealandica</i>	195	195	185	185	185	83	71	78	81	104		87,7	87,6	87,3	87,6	87,9	87,5	87,1	87,0	87,2	87,5	84,9	87,6	83,6
12 AY321477 <i>H. bacteriophora</i>	162	161	155	155	155	138	121	136	140	152	175		94,1	93,9	88,2	88,1	87,9	87,8	87,5	87,1	87,9	84,8	88,0	84,1
13 HQ896630 <i>H. beicherriana</i>	162	161	154	154	154	133	116	132	136	152	170	39		93,7	88,4	88,5	88,1	87,8	87,4	87,4	88,0	84,7	87,9	84,3
14 EU099032 <i>H. georgiana</i>	161	160	154	154	154	142	127	142	141	154	175	45	43		88,6	89,0	88,7	88,1	87,9	87,7	88,2	84,9	87,8	84,5
15 AY321483 <i>H. indica</i>	70	69	68	68	68	160	139	164	162	173	191	146	141	144		96,7	95,7	92,2	92,1	91,9	92,3	85,4	88,2	85,6
16 FJ152545 <i>H. gerrardi</i>	67	67	65	65	65	154	135	158	157	169	183	148	141	139	12		96,6	92,0	91,8	91,6	92,4	85,8	89,0	86,3
17 JN620538 <i>H. noenieputensis</i>	73	72	71	71	71	164	143	168	165	177	194	156	148	145	20	12		92,1	91,7	91,4	92,1	85,6	88,3	85,4
18 DQ372922 <i>H. floridensis</i>	18	17	17	17	17	178	157	177	175	183	202	168	169	165	81	78	80		96,0	95,9	96,2	86,4	88,1	85,4
19 AY321478 <i>H. mexicana</i>	22	21	20	20	20	176	155	175	173	179	200	170	172	169	82	80	84	14		96,6	95,4	86,4	88,1	85,5
20 EF043443 <i>H. taysearae</i>	21	21	19	19	19	174	152	175	171	177	202	175	172	171	84	81	85	16	11		95,5	86,2	88,0	85,7
21 AF548768 <i>H. baujardi</i>	15	15	15	15	15	166	150	165	164	174	186	160	161	156	76	70	77	16	23	23		86,6	89,3	86,5
22 EU273598 <i>O. chongmingensis</i>	283	281	263	263	263	309	277	301	302	306	325	316	320	317	290	271	284	280	283	283	268		87,4	85,0
23 AF036946 <i>P. typica</i>	178	178	146	146	146	195	157	192	195	204	195	192	194	192	177	156	177	179	178	180	154	218		87,3
24 X03680 <i>C. elegans</i>	281	284	250	250	250	297	245	295	293	308	313	313	318	317	288	257	289	279	281	281	252	388	213	

Diagonal abaixo: diferenças totais de pares de bases. Diagonal acima: porcentagem de similaridade.

4 ARTIGO B: Ciclo de Vida, Patogenicidade e Virulência e Produção *in vivo* de *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08)

4.1 RESUMO

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* representam uma alternativa de controle biológico de insetos, e estudos de laboratório que avaliem a biologia e comportamento desses organismos são necessários, para que se conheça o potencial dos isolados, bem como a viabilidade de seu uso em programas de controle. Desta forma, objetivou-se estudar aspectos biológicos do nematoide *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08). Para tanto, foi observado o ciclo de vida em lagartas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), sua virulência e patogenicidade sobre três diferentes insetos: lagartas de *G. mellonella*, larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) e adultos de *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) e a produção *in vivo* em *G. mellonella*. *H. amazonensis* (UEL 08) apresentou dois ciclos de vida distintos, um curto (216h) e um longo (288h), produzindo duas gerações em ambos os ciclos. Observou-se que *H. amazonensis* (UEL 08) foi patogênico e virulento aos três insetos avaliados, porém houve diferença na virulência. *G. mellonella* e *A. diaperinus* foram mais susceptíveis com porcentagens de mortalidade de 100 e 85%, respectivamente. A produção *in vivo* de *H. amazonensis* (UEL 08) se deu ao longo de oito dias com uma produção média diária de $3,4 \times 10^3$ juvenis infectantes/g de lagarta.

Palavras-chaves: nematoides entomopatogênicos, biologia, entomopatógeno, multiplicação, controle biológico.

4.2 ABSTRACT

The entomopathogenic nematodes (EPNs) of the genus *Heterorhabditis* and *Steinernema* represent an alternative for the biological control of insects, and laboratory studies that evaluate the biology and behavior of these organisms are necessary to know the potential of the isolates as well as the viability of its use in control programs. Thus, the objective was to study biological aspects of the nematode *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08). It was observed its life cycle in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae, its virulence on three different insects: *G. mellonella* and *Alphitobius diaperinus* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) and adults of *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) and their *in vivo* production in *G. mellonella*. *H. amazonensis* (UEL 08) presented two distinct life cycles, one short (216h) and one long (288h), producing two generations in both cycles. It was observed that *H. amazonensis* (UEL 08) was pathogenic and virulent to the three evaluated hosts, but there was a difference in virulence. *G. mellonella* and *A. diaperinus* were more susceptible with mortality percentages of 100 and 85%, respectively. In the *in vivo* production assay, a mean daily yield of 3.4×10^3 infective juveniles/g of larvae was observed.

Key words: entomopathogenic nematodes, biology, entomopathogen, multiplication, biological control.

4.3 INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são alternativas promissoras no controle biológico e podem atuar como ferramentas no manejo de insetos pragas (GREWAL; NARDO, AGUILLERA, 2001). A habilidade dos NEPs em matar insetos é atribuída à associação simbiótica entre seus juvenis infectantes (JIs) e bactérias do gênero *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* que são letais aos insetos levando-os morte em até 48 horas após o processo infeccioso (ADAMS et al., 2006; NGUYEN; HUNT, 2007).

O desenvolvimento dos NEPs inclui três fases: ovo, juvenil e adulto (machos e fêmeas). A fase juvenil é composta por quatro estádios comumente chamados de J1, J2, J3 ou J4 (juvenil infectante) e J4 (ALMENARA et al., 2012). O ciclo de vida inicia-se após os JIs penetrarem o hospedeiro através das aberturas naturais como boca, ânus e espiráculos (LEWIS et al., 2006) e liberarem as bactérias simbióticas, que matam o hospedeiro por septicemia. No cadáver, o nematoide pode completar de duas a três gerações dependendo da quantidade de alimento fornecida pelo mesmo (ANDALÓ et al., 2009b).

O ciclo de vida dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* é bastante semelhante, no entanto, para *Heterorhabditis*, na primeira geração formam-se adultos hermafroditas com morfologia de fêmeas (POINAR, 1990) e, se mais de uma geração for produzida no hospedeiro ocorre então, a diferenciação em macho e fêmea (ADAMS; NGUYEN, 2002; FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012). Os sternernematídeos por sua vez, possuem machos e fêmeas desde a primeira geração.

Segundo Zioni et al. (1992) conhecer o ciclo de vida, potencial de reprodução e virulência são pré-requisitos para melhorar e ampliar o uso desses entomopatógenos em condições de campo, visto que essas características variam em relação ao gênero, espécies e também entre populações da mesma espécie, e o conhecimento das especificidades de cada isolado, pode aumentar a chance de sucesso do uso desses agentes em programas de controle (ANDALÓ et al., 2004).

Outra característica importante é a possibilidade de produção *in vivo*, já que este método é a base para estudos com NEPs, como isolamento de espécies, estudos da biologia e produção em pequena escala para testes em laboratório, casa-de-vegetação e campo (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004).

Para produção *in vivo* o inseto mais utilizado são lagartas de *Galleria mellonella* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae), que propiciam boa produção de JIs/lagarta (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004; BORTOLUZZI et al., 2013; GUIDE et al., 2016a) e podem ser usadas para produção da maioria das espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (GAUGLER; HAN, 2002).

Assim, este trabalho teve como objetivos avaliar o ciclo de vida do nematoide *H. amazonensis* (UEL 08), sua patogenicidade e virulência sobre diferentes insetos, bem como a produção *in vivo* em lagartas de *G. mellonella*.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Multiplicação do Nematóide

Os nematóides foram multiplicados em lagartas de *G. mellonella* de acordo com Molina e Lopes (2001). Para tanto, 10 lagartas foram colocadas em placas de Petri de vidro de 9 cm de diâmetro contendo dois papéis de filtro onde aplicou-se 2 mL de suspensão de nematóide (aproximadamente 2000 JIs). As placas foram mantidas em câmara climatizada a 24 ± 1 °C por 72 horas. As lagartas mortas foram então transferidas para novas placas de Petri com um papel de filtro seco e armazenadas nas mesmas condições por sete dias. Após esse período, as lagartas foram colocadas em armadilha de White (WHITE, 1927), e os nematóides foram coletados diariamente, e armazenados em suspensão aquosa sob condições controladas (18°C e sem fotoperíodo), por no máximo uma semana para serem utilizados nos bioensaios.

4.4.2 Ciclo de Vida

A metodologia para observar o ciclo de vida foi adaptada de Andaló et al. (2009b), como descrito abaixo.

O nematóide foi multiplicado em lagartas de *G. mellonella* e as concentrações utilizadas para inoculação nas lagartas foram 400 JIs/lagarta (4000 JIs/placa) (ciclo curto) ou 10 JIs/lagarta (100 JIs/placa) (ciclo longo). Cada tratamento constituiu de 20 repetições e cada repetição foi formada por uma placa de Petri com 10 lagartas. As placas foram colocadas em câmara climatizada a 24 ± 1 °C por 48 horas e, após este período, o desenvolvimento do nematóide foi avaliado a cada 24 horas, dissecando dez lagartas de cada tratamento sob microscópio estereoscópio. O desenvolvimento foi observado até que o nematóide completasse o ciclo de vida e se esgotassem todos os nutrientes disponíveis nas lagartas.

4.4.3 Teste de Patogenicidade e Virulência

A patogenicidade e virulência de *H. amazonensis* (UEL 08) foi avaliada em lagartas de último instar de *G. mellonella*, em larvas de cascudinho, *Alphitobius diaperinus*

(Coleoptera: Tenebrionidae) e sobre adultos do percevejo barriga-verde, *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae).

As lagartas de *G. mellonella* foram obtidas de criação estabelecida do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano da UEL e os percevejos foram obtidos da criação do Laboratório de Entomologia do IAPAR – Londrina.

No experimento com *G. mellonella* e *D. melacanthus* foram realizadas cinco repetições e cada repetição constituiu de uma placa de Petri de vidro (9 cm Ø) contendo dois papéis filtro na parte inferior e 10 lagartas (último instar) ou percevejos. Em seguida, foram aplicados com auxílio de micropipeta, os isolados na concentração de 100 JIs/cm² (6361JIs/placa). No tratamento testemunha aplicou-se 2 mL de água destilada. As placas com *G. mellonella* foram mantidas em câmara climatizada a 25±1°C e sem fotoperíodo. Já as placas com *D. melacanthus* foram armazenadas em câmara climatizada a 26±1°C e fotoperíodo de 14h de luz: 10h de escuro.

As larvas de cacudinho foram obtidas a partir de coletas em galpão de criação de aves de corte com piso de solo, no município de Londrina, Paraná (23°18'37''S – 51°09'46''O), junto a amostras de cama-de-aviário de 5º lote (cerca de 7 meses) infectadas com o inseto. O experimento constituiu de quatro repetições e cada repetição correspondeu a uma placa para cultivo de células de 12 poços de fundo chato. Cada poço recebeu dois discos de papel filtro e uma larva de 6º instar (aproximadamente 1 cm de comprimento). O isolado de NEP foi aplicado na concentração de 100 JIs/cm² (380 JIs/poço). Na testemunha foram aplicados 180 µL de água destilada em cada poço. As placas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada a 25±1°C e sem fotoperíodo.

Para os três insetos, a mortalidade foi verificada após cinco dias e os insetos mortos e com sintomas de infecção (coloração marrom-escuro) foram dissecados para a confirmação da morte por nematoide.

O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos aos testes de normalidade (ShapiroWilk) e homocedasticidade (Hartley) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

4.4.4 Produção *in vivo* de *H. amazonensis* (UEL 8) em lagartas de *G. mellonella*

Para o teste de produção *in vivo* foi utilizada a metodologia de Guide et al. (2016a). O ensaio foi composto por cinco repetições e cada repetição constituiu-se de uma placa de Petri de plástico (9 cm Ø), contendo dois papéis de filtro e dez lagartas de *G. mellonella* que foram selecionadas previamente por peso ($\pm 0,18$ g) e tamanho (± 2 cm de comprimento). Em seguida, com auxílio de micropipeta, aplicou-se o isolado na concentração de 50 JIs/cm². As placas foram tampadas, vedadas com filme de PVC e mantidas em câmara climática a 24 \pm 1°C e sem fotoperíodo por cinco dias. As lagartas mortas foram transferidas para novas placas de Petri contendo um papel de filtro limpo e seco e mantidas por sete dias sob as mesmas condições e após este período foram colocadas em armadilhas de White (WHITE, 1927) (uma repetição por armadilha).

As armadilhas de White foram vistoriadas diariamente, e após o início da emergência dos JIs nos cadáveres das lagartas, estes foram coletados diariamente em suspensão de água destilada, e a seguir estas suspensões foram quantificadas, estimando a quantidade de JIs/mL para avaliação da produção diária. O processo de coleta e de quantificação foi repetido até a exaustão da produção nas lagartas.

As variáveis avaliadas foram produção diária (número total de JIs emergidos em um dia), produção acumulada (número total de JIs que emergiram até o esgotamento das lagartas (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004), média da produção total por lagarta e média da produção por g/lagarta. O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados de produção diária foram submetidos a análise de regressão pelo programa Excel para determinar a curva da produção ao longo do tempo.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Ciclo de Vida

O ciclo de vida de *H. amazonensis* (UEL 08) inclui três fases de desenvolvimento: ovo, juvenil (diferenciada em quatro estádios J1, J2, J3 e J4) e adulto. Na fase adulta, a primeira geração é composta por fêmeas hermafroditas e a segunda geração por macho e fêmeas anfimíticas, semelhante ao observado para outras espécies de *Heterorhabditis* (ADAMS; NGUYEN, 2002; MOLINA et al., 2005) e por *H. amazonensis* RSC 05 (ANDALÓ et al., 2009b).

Durante as primeiras 96h observou-se, que os estágios juvenis do ciclo longo e curto foram semelhantes, porém, após este tempo o ciclo longo apresentou um atraso em comparação com o ciclo curto, fato também observado por Andaló et al. (2009b) e Molina et al. (2005). Em ambos os ciclos, foi possível distinguir fêmeas hermafroditas (primeira geração) e machos e fêmeas de segunda geração (Tabelas 4.1 e 4.2).

O ciclo curto foi desenvolvido em um tempo total de 216h (nove dias) (Tabela 4.1), já a duração total do ciclo longo foi de 288h (12 dias) (Tabela 4.2). Entretanto, observou-se em ambos os ciclos a produção de duas gerações, diferente de Andaló et al. (2009b) que observaram no ciclo curto de *H. amazonensis* (RSC 05) a produção de três gerações também utilizando lagartas de último instar de *G. mellonella*. Poinar (1976) observou que *H. bacteriophora* apresenta um ciclo curto e um longo com duas gerações, corroborando o resultado deste estudo.

Tabela 4.1. Ciclo Curto: duração dos estágios de desenvolvimento de *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) em lagartas de *Galleria mellonella* (concentração de nematoide usada para inoculação foi de 400 JIs/lagarta)

Estágios de Desenvolvimento	Tempo (h)*	
	1ª Geração	2ª Geração
J ₄	0-24	
Hermafroditas	48	
Hermafroditas + ovos / J ₁	72	
Hermafroditas + J ₂	96	
Machos e Fêmeas		144
Fêmeas + J ₂		192
J ₃ ou JIs		216

*Os tempos apresentados são aproximados e incluem o tempo gasto na dissecação das lagartas.

Tabela 4.2. Ciclo Longo: duração dos estágios de desenvolvimento de *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) em lagartas de *Galleria mellonella* (concentração de nematoide usada para inoculação foi de 10 JIs/lagarta)

Estágios de Desenvolvimento	Tempo (h)	
	1ª Geração	2ª Geração
J ₄	0-24*	
Hermafroditas	48	
Hermafroditas + ovos / J ₁	72	
Hermafroditas + J ₂	96	
Machos e Fêmeas		144
Fêmeas + ovos / J ₁		168-192
Fêmeas + J ₂		216
Fêmeas + J ₂ / J ₃		240-264
J ₃ ou JIs		288

*Os tempos apresentados são aproximados e incluem o tempo gasto na dissecação das lagartas.

O ciclo de vida de *H. amazonensis* (UEL 08) é diferente do observado por Molina et al. (2005) e Andaló et al. (2009b) para *H. amazonensis* (JMP4) e *H. amazonensis* (RSC 05), respectivamente, pois o período de tempo para a conclusão completa dos ciclos, bem como a duração dos estágios de desenvolvimento neste estudo foram mais curtos do que os relatados pelos demais autores.

De acordo com Adams e Nguyen (2002) os ciclos de vida dos NEPs, bem como o número de gerações produzidas pode variar de acordo com a quantidade de alimento disponível e o tamanho do corpo do inseto, visto que insetos de tamanhos maiores favorecem ciclos mais longos e um maior número de gerações, por existir uma reserva maior de nutrientes.

É evidente a variabilidade que pode eventualmente existir entre espécies de nematoides do mesmo gênero e, até mesmo entre isolados da mesma espécie. Grewal et al. (1994) sugerem que fatores ambientais como temperatura, aeração e umidade também podem afetar a duração do ciclo de vida. A temperatura ótima está relacionada ao clima de origem do nematoide (GREWAL et al., 1994). A aeração também pode influenciar, visto que é necessária para o desenvolvimento do nematoide (BURMAN; PYE, 1980). Ainda, de acordo com Woodring e Kaya (1988), a umidade é outro componente essencial, pois, altos níveis de umidade devem ser mantidos durante todo o ciclo de desenvolvimento a fim de evitar o dessecação do inseto.

4.5.2 Teste de Patogenicidade e Virulência

Os juvenis infectantes de *H. amazonensis* (UEL 08) foram patogênicos à lagartas *G. mellonella*, adultos de *D. melacanthus* e larvas de *A. diaperinus* e foi encontrada diferença na virulência do nematoide para os diferentes hospedeiros, com porcentagens de mortalidade de 100, 46, e 85% respectivamente (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Virulência de *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) aplicados na concentração de 100 JIs/cm² sob três diferentes insetos.

Inseto Hospedeiro	<i>H. amazonensis</i> (UEL 8)	Controle
	Mortalidade (%) ± SD	
<i>Galleria mellonella</i>	100,0 ± 0,0 A*	0,0 ± 0,0
<i>Alphitobius diaperinus</i>	85,0 ± 8,0 A	0,0 ± 0,0
<i>Dichelops melacanthus</i>	46,0 ± 17,3 B	0,0 ± 0,0
CV (%) = 13,15		

*Média seguida de mesma letra maíuscula na coluna não diferem entre si pelo teste de média de Tukey (p= 0,05).

Outros trabalhos também demonstraram que isolados do gênero *Heterorhabditis* foram patogênicos à lagartas de *G. mellonella* como Molina et al. (2005) que observaram mortalidade entre 100 e 89%. Andaló et al. (2009c) encontraram 73 e 80% de mortalidade causada pelos nematoides *Heterorhabditis* sp. (GL) e *Heterorhabditis* sp. (SG) respectivamente. Esses trabalhos sugerem que *G. mellonella* é um hospedeiro susceptível e corroborando com os resultados encontrados para *H. amazonensis* (UEL 08).

As larvas de cascudinho, *A. diaperinus*, também foram susceptíveis à *H. amazonensis* (UEL 08) (Tabela 4.3). Outros trabalhos realizados em condições semelhantes também evidenciaram a suscetibilidade deste inseto aos NEPs dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* (PEZOWICZ, 2003; ALVES; ROHDE; ALVES, 2005; ALVES et al., 2012).

Por outro lado, os adultos de *D. melacanthus* foram menos susceptíveis ao nematoide avaliado. Esse resultado difere dos obtidos por Guide et al. (2015) que avaliaram diferentes isolados *Heterorhabditis* sobre adultos do mesmo percevejo e encontraram porcentagens de mortalidade de até 76%.

A diferença de virulência entre isolados, até mesmo de uma mesma espécie,

pode ser justificada por vários fatores. Um deles está relacionado ao fato de que isolados diferentes podem estar adaptados a diferentes condições climáticas ou mesmo ter desenvolvido especificidade a hospedeiros locais (ALVES et al., 2009a).

De acordo com Almenara et al. (2012) e De Doucet et al. (1999) a variação de susceptibilidade é esperada, pois, diferentes isolados coevoluíram com diferentes espécies de hospedeiro e, portanto, possuem especificidades que os tornam mais ou menos virulentos sobre determinado inseto, o que pode explicar a diferença encontrada no presente trabalho.

4.5.3 Produção *in vivo* de *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 8) em Lagartas de *G. mellonella*

A produção de JIs de *H. amazonensis* (UEL 08) em lagartas de *G. mellonella* se deu ao longo de oito dias, e as maiores produções foram observadas no 1º ($1,1 \times 10^6$) e 2º ($8,0 \times 10^5$ JIs) dia (Figura 4.1), representando 38 e 27% respectivamente da produção total acumulada que foi de $2,9 \times 10^6$ JIs. A média de produção por lagarta foi $5,8 \times 10^4$ JIs/lagarta e a produção por g/lagarta foi $3,4 \times 10^3$ JIs.

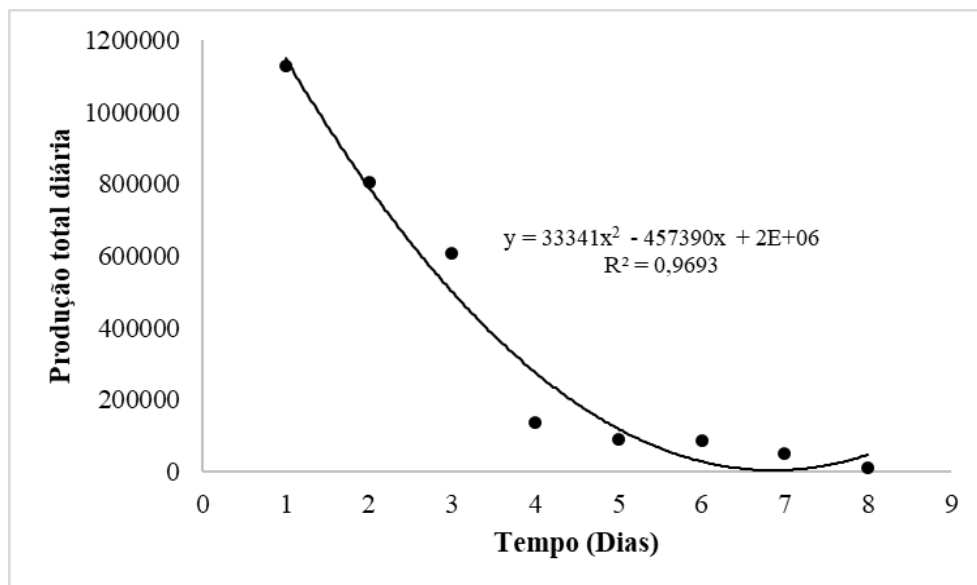


Figura 4.1. Produção diária de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) em 50 lagartas de *G. mellonella* sob condições controladas ($24 \pm 1^\circ\text{C}$ e sem fotoperíodo).

Os valores aqui obtidos foram menores do que os reportados por outros autores usando o mesmo método de produção. Guide et al. (2016a) encontraram 7×10^4 e $7,2 \times 10^4$ JIs/g de lagarta para *Heterorhabditis* sp. (NEPE)T 11) e *H. amazonensis* (RSC 05).

Bortolluzi et al. (2013) observaram uma média de produção de $2,2 \times 10^6$ JIs/g para dois isolados *Heterorhabditis* (IBCBn-24 e IBCBn-40) e Costa et al. (2007) obtiveram uma média de $1,6 \times 10^5$ JIs/g para *H. riobraves*.

Vários fatores podem afetar a produção *in vivo* de NEPs, e esses fatores interagem de formas imprevisíveis (ZERVOS et al., 1991; SHAPIRO-ILAN et al., 2004).

Diferenças de infectividade e produção de espécies de nematoides podem ser maiores ou menores, mesmo em um hospedeiro considerado susceptível como no caso de *G. mellonella* (OZER et al., 2003). Além disso, a disponibilidade de alimento pode influenciar a permanência dos JIs no interior do inseto e também na formação de novas gerações (EHLERS, 2001).

Ainda, segundo Boff et al. (2000) a taxa de metabolismo no processamento do tecido do hospedeiro pelas bactérias simbiotes difere entre espécies de nematoides e podem também influenciar na sobrevivência e reprodução dos mesmos, afetando assim a produção.

Os fatores dependentes da concentração de JIs também desempenham um papel importante na produção dos nematoides entomopatogênicos e podem agir diretamente afetando o número de JIs produzidos por cadáveres infectados, ou indiretamente, influenciando a longevidade dos juvenis (SELVAN et al., 1993; ZERVOS et al., 1991).

De acordo com Poinar (1979) a média de produção em lagartas de *G. mellonella* é entre 30.000 a 50.000 JIs/lagarta, mas pode chegar a 2×10^5 (DUTKY et al., 1964; GAUGLER; HAN, 2002). Estes valores são semelhantes aos observados para média de produção de *H. amazonensis* (UEL 08) em *G. mellonella*, indicando um ponto positivo, principalmente quando se pensa na utilização deste isolado em programas de controle de pragas.

4.6 CONCLUSÃO

Observou-se dois ciclos de vida (curto e longo) para *H. amazonensis* (UEL 08) e estes apresentam tempos duração diferentes, influenciados pela concentração de JIs utilizada.

Os juvenis infectantes de *H. amazonensis* (UEL 08) são patogênicos à *G. mellonella*, *D. melacanthus* e larvas de *A. Diaperinus*. No entanto, as lagartas de *G.*

mellonella são o hospedeiro mais susceptível.

A produção de JIs de *H. amazonensis* (UEL 08) em *G. mellonella* ocorre durante oito dias e os picos de produções são observados no 1º e 2º dia com 38 e 46% respectivamente.

5 ARTIGO C: Criopreservação como método de armazenamento do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08)

5.1 RESUMO

A dificuldade de armazenar e conservar os nematoides entomopatogênicos (NEPs) por longo período é um dos principais obstáculos para ampliar seu uso no controle biológico de pragas bem como na manutenção de coleções destes organismos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade da criopreservação como método de armazenamento e conservação de *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) utilizando o glicerol como crioprotetor. Para isso, juvenis infectantes (JIs) do nematoide foram submetidos aos seguintes tratamentos: (A) imersão em glicerol por 48 horas em diferentes concentrações (2, 4, 6 e 8%) e três períodos de congelamento em nitrogênio líquido (NL) a -196 °C (1, 30 e 60 dias). Cada tratamento teve quatro repetições e o delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x3 (concentrações de glicerol x tempo de congelamento). A sobrevivência e virulência dos JIs foram avaliadas após cada tempo de exposição ao glicerol e tempo de congelamento em NL. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. *H. amazonensis* (UEL 08) sobreviveu quando exposto ao glicerol a 2, 4, 6 e 8% por 48 horas e não teve sua infectividade influenciada pelo crioprotetor. Na criopreservação, foi observada sobrevivência (6,5%) na concentração de 8% mas, apenas após 24 horas de congelamento. Nos demais tempos de congelamento (30 e 60 dias) não houve sobrevivência, indicando que o glicerol, nas concentrações avaliadas não foi eficiente como crioprotetor para *H. amazonensis* (UEL 08), sugerindo que concentrações mais altas são necessárias.

Palavras-chave: Armazenamento, controle biológico, nitrogênio líquido.

5.2 ABSTRACT

The difficulty of store and conserve entomopathogenic nematodes (EPNs) for a long time is one of the major obstacles for the expansion of its use in the control of biological pest and in the maintenance of collections of these organisms. Thus, the objective of this study was to evaluate the viability of cryopreservation as a storage and conservation method for *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) using glycerol as cryoprotectant. For this, infective juveniles (IJs) of the nematode were subjected to the following treatments: (A) immersion in glycerol for 48 hours in different concentrations (2, 4, 6 e 8%); and (B) three freezing periods in liquid nitrogen (LN) at -196 °C (1, 30 and 60 days). Each treatment had four replicates and the design were completely randomized in a factorial 4x3 (glycerol concentrations x freezing time in LN). IJs survival and virulence were evaluated after each exposure time to glycerol and freezing time in LN. Data were subjected to analysis of variance, and means were compared by the Tukey test. *H. amazonensis* (UEL 08) survived when exposed to glycerol at 2, 4, 6 and 8% for 48 hours and did not have its infectivity influenced by the cryoprotectant. In cryopreservation, survival (6.5%) was observed at 8% concentration but only after 24 hours of freezing. In the other freezing times (30 and 60 days) there was no survival, indicating that glycerol in the evaluated concentrations was not as efficient cryoprotectant for *H. amazonensis* (UEL 08), suggesting that higher concentrations are necessary.

Key words: Storage, biological control, liquid nitrogen.

5.3 INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são agentes eficazes de controle biológico, pois têm uma ampla gama de insetos hospedeiros (KAYA; GAUGLER, 1993), podem ser produzidos em larga escala (LEITE et al., 2016), têm distribuição global (LEWIS et al., 2006) e são seguros para organismos não alvo (BATHON et al., 1996). No entanto, a dificuldade de armazenar e conservar estes entomopatógenos é um dos principais impedimentos para aumentar o seu uso em programas de controle biológico (ANDALÓ et al., 2010) e para manutenção de coleções, pois sua vida útil é limitada (GREWAL, 2000).

Os métodos utilizados para armazenar os nematoides baseiam-se em substratos como alginato, argila, esponja de poliuretano, géis (poliacrilamida e fluido) e grânulos. Estes possuem função de preservação e atuam como inibidores metabólicos, diminuindo a mobilidade e o metabolismo dos nematoides, de maneira a evitar a perda de lipídeos que são fontes de energia destes organismos, aumentando desta forma, sua vida útil (SHAPIRO-ILAN et al., 2006; ALMENARA et al., 2012). Entretanto, a qualidade desses substratos pode ser afetada por contaminação no meio, influenciando a viabilidade dos juvenis infectantes (ANDALÓ et al., 2006b; GREWAL, 2000).

Há também outros meios de armazenamento como suspensões aquosas, esponjas encharcadas e substâncias sintéticas (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012). Contudo, a necessidade de adequação da temperatura e necessidade de aeração para cada espécie de nematoide são algumas desvantagens, pois são fatores que podem influenciar tanto a viabilidade como a infectividade (ANDALÓ et al., 2010; ALI; WHARTON, 2013).

Ainda, quando um agente de controle biológico é isolado da natureza e mantido em laboratório, ou produzido em massa para fins comerciais, ele pode perder características benéficas devido a processos genéticos (HOPPER et al., 1993). Assim, multiplicações sucessivas de nematoides podem resultar na redução de caracteres de qualidade, como virulência, tolerância ambiental ou capacidade reprodutiva (SHAPIRO et al., 1996; STUART; GAUGLER, 1996). Portanto, precauções contra a deterioração devem ser empregadas, um exemplo é a criopreservação (CURRAN et al., 1992).

A criopreservação, segundo PEGG (2007) consiste em diminuir a temperatura para que o metabolismo celular seja reduzido, permitindo a conservação de células ou tecidos por longos períodos, possibilitando a retomada do desenvolvimento após o

descongelamento, podendo assim, ser uma alternativa viável para armazenar e conservar a longo prazo nematoides entomopatogênicos.

O congelamento utilizando nitrogênio líquido (NL) a -196°C já foi avaliado como método de armazenamento de nematoides do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* (OHBA et al., 1989; POPIEL; VAZQUEZ, 1991; CURRAN et al., 1992; NUGENT et al., 1996). Nestes estudos, foi observado que o tempo de exposição e a concentração do crioprotetor são os principais fatores que influenciam a viabilidade dos nematoides.

No trabalho de Guide et al. (2016b) foi avaliada a criopreservação para as espécies *H. amazonensis* (RSC 05) e *H. bacteriophora* (HP88) e os autores observaram que os mesmos não sobreviveram à exposição ao glicerol nas concentrações testadas (10, 13 e 15%). De acordo com Popiel e Vasquez (1991) os heterorhabditídeos são mais susceptíveis ao glicerol. No entanto, a capacidade de sobreviver ou não às possíveis alterações causadas pelo glicerol é uma característica específica de cada espécie ou isolado de nematoide, e tanto a concentração, quanto o tempo de exposição pode influenciar.

As concentrações de glicerol e os tempos de incubação podem ser alterados para otimizar a sobrevivência de diferentes espécies de nematoides entomopatogênicos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a criopreservação como método de armazenamento do nematoide *H. amazonensis* (UEL 08) utilizando o glicerol como crioprotetor em diferentes concentrações.

5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

5.4.1 Obtenção e Manutenção do Isolado de Nematóide Entomopatogênico

O nematóide *H. amazonensis* (UEL 08) foi multiplicado *in vivo*, de acordo com a metodologia de Molina e Lopes (2001), utilizando lagartas de último instar de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Depois de confirmada a infecção das lagartas pelos nematóides, estas foram transferidas para câmara seca e mantidas em câmara climática a 23 ± 1 °C no escuro, por cinco dias. Após este período, foram colocadas em armadilhas de White (WHITE, 1927) para coleta dos JIs e mantidas sob as mesmas condições mencionadas. O isolado em suspensão aquosa foi coletado diariamente e armazenado em suspensão aquosa sob condições controladas (18°C e sem fotoperíodo) por até sete dias após a emergência para utilização nos bioensaios.

Os JIs do nematóide foram submetidos aos seguintes tratamentos: (A) imersão no crioprotetor glicerol por 48 horas em diferentes concentrações (2, 4, 6 e 8%) e (B) três tempos de congelamento em nitrogênio líquido (NL) a -196 °C (1, 30 e 60 dias).

5.4.2 Exposição do Nematóide ao Crioprotetor

A suspensão do nematóide obtida foi previamente quantificada e padronizada em aproximadamente 5.000 JIs/mL. Posteriormente, misturou-se igual quantidade de suspensão de nematóide e do glicerol (UltraPure™ Glycerol, Invitrogen) a 4, 8, 12 e 16%, obtendo-se concentrações finais de 2, 4, 6 e 8%. Após a quantificação, 10 mL da suspensão de cada tratamento foram distribuídos em placas de Petri (9 cm Ø). No tratamento controle, os JIs foram diluídos em água destilada. Foram realizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição uma placa de Petri. As placas foram mantidas em câmara climatizada a 23 ± 1 °C e no escuro por 48 horas. Posteriormente retirou-se uma alíquota de 50µL de cada repetição para avaliação da viabilidade, por meio da contagem dos JIs vivos.

Para avaliação da infectividade dos JIs, 10 lagartas de último instar de *G. mellonella* foram dispostas em placas de Petri (9 cm Ø) contendo dois papéis filtro na base e em seguida, foi aplicado 1 mL de cada tratamento. Foram realizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição uma placa de Petri. As placas foram mantidas em câmara

climatizada a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e no escuro cinco dias, quando foi feita a contagem das lagartas mortas e a confirmação por meio de dissecação.

5.4.3 Criopreservação

Após a exposição dos JIs de *H. amazonensis* (UEL 08) ao crioprotetor, eles foram submetidos ao congelamento em NL. Para tanto, foram vertidos 50 mL das suspensões de JIs com glicerol sobre disco de papel de filtro (Whatman nº 42) em funil de Buchner submetido à sucção através de Kitasato, conectado a bomba de vácuo para eliminação do excesso de água.

O papel filtro contendo os nematoides foi colocado em 30 mL de água destilada à temperatura próxima de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ em placa de Petri, com a base imersa parcialmente no gelo por 10 minutos. Logo após, o papel filtro foi retirado permanecendo na placa os JIs em suspensão.

A suspensão de JIs foi colocada em tubo de fundo chato e homogeneizada em vortex quando foram colocados 3 mL sobre um disco de papel filtro (Whatman nº 42) de 2 cm de diâmetro, em funil de Buchner, para retirar o excesso de água, por sucção. Em seguida, transferiu-se o disco de papel com JIs para criotubo de 2 mL com tampa provida de anel de silicone e, imediatamente após o acondicionamento do disco, os criotubos foram mergulhados em bandejas com gelo até o término do processo com todos os tratamentos. Por fim, os criotubos foram colocados em perfil de alumínio e inseridos em um botijão criogênico de 20 litros contendo nitrogênio líquido.

Todo o procedimento foi realizado individualmente para cada tempo de congelamento em NL. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x3 (concentrações de glicerol x tempo de criopreservação) com quatro repetições. Não foi feito tratamento controle.

Após 1, 30 e 60 dias de incubação no nitrogênio realizou-se o descongelamento a fim de avaliar a viabilidade e infectividade dos JIs. Para tanto, 2 mL de solução salina na concentração de 0,7% de NaCl a 23°C foram adicionados em cada criotubo e em seguida o volume obtido foi colocado em uma placa de Petri de 5,5 cm de diâmetro contendo 20 mL da mesma solução salina por 24 horas. Após este período, foram observados e contados 100 JIs. Consideraram-se vivos aqueles que apresentaram movimentação ou reação ao toque com estilete, e mortos, aqueles que estavam com o corpo reto e imóvel. A

infectividade foi avaliada em lagartas de *G. mellonella* utilizando a mesma metodologia descrita no ensaio de exposição ao glicerol.

5.4.4 Análises Estatísticas

Os dados de todos os testes foram submetidos à análise de variância e as médias de viabilidade e infectividade comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o programa estatístico SISVAR, versão 5.4 (FERREIRA, 2011).

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Exposição do Nematóide ao Crioprotetor

O isolado *H. amazonensis* (UEL 08) sobreviveu à exposição ao glicerol e foi capaz de infectar e se reproduzir em lagartas de *G. mellonella* após 48 horas de exposição e em todas as concentrações avaliadas. As porcentagens de viabilidade variaram entre 96,4 e 99,8%, e foi observada diferença significativa apenas para a concentração 4%. Já para infectividade, observou-se mortalidade entre 62 e 97,5% e não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Porcentagem de viabilidade e infectividade (média \pm DP) dos juvenis infectantes de *H. amazonensis* (UEL 08) após exposição a diferentes concentrações de glicerol durante 48 horas a 23 ± 1 °C e sem fotoperíodo.

Tratamento (Concentrações)	% Viabilidade	% Infectividade
Testemunha	97,6 \pm 2,4 b	95,0 \pm 5,8 a*
2%	99,4 \pm 0,5 b	62,5 \pm 26,3 a
4%	99,8 \pm 0,4 a	75,0 \pm 17,3 a
6%	98,6 \pm 1,7 b	97,5 \pm 5,0 a
8%	96,4 \pm 2,2 b	90,0 \pm 20,0 a
CV=	1,70	20,27

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em trabalho realizado por Guide et al. (2016b) foi constatado que as espécies *H. amazonensis* (RSC 05) e *H. bacteriophora* (HP88) não sobreviveram à exposição por 48 horas ao glicerol nas concentrações de 10, 13 e 15%. Popiel e Vasquez (1991) observaram também que JIs de *H. bacteriophora* (HP88) foram mais sensíveis a exposição ao glicerol quando comparados com a espécie *Steinernema carpocapsae* (All), diferente do observado neste trabalho, visto que os JIs de *H. amazonensis* (UEL 08) sobreviveram a exposição ao crioprotetor, mesmo na maior concentração (8%).

Os NEPs do gênero *Heterorhabditis* são considerados mais susceptíveis ao possível efeito tóxico do glicerol e sobrevivem apenas em concentrações mais baixas do crioprotetor (POPIEL; VASQUEZ, 1991), fato que pode explicar a sobrevivência apresentada neste trabalho por JIs de *H. amazonensis* (UEL 08).

A viabilidade e infectividade de *H. bacteriophora* também foi avaliada por Curran et al. (1992) no qual observaram, após exposição ao glicerol na concentração de 17%, sobrevivência dos JIs e que estes conseguiram infectar e se reproduzir em lagartas de *G. mellonella*, semelhante ao observado neste trabalho, mesmo as concentrações do crioprotetor sendo mais baixas.

O glicerol pode ser metabolizado por todas as células e não há informações concretas sobre sua toxicidade (CASTRO et al., 2011). Entretanto, Hammerstedt e Graham (1992) relatam que alguns eventos físicos no citoplasma, como a organização citoplasmática, alteração na permeabilidade e estabilidade da bicamada lipídica, podem ser alterados pelo glicerol, afetando a homeostase celular. A capacidade de sobreviver ou não às possíveis alterações causadas pelo glicerol é uma característica específica de cada espécie ou isolado de nematoide, e tanto a concentração, quanto o tempo de exposição pode influenciar (GUIDE et al., 2016b).

5.5.2 Criopreservação

Embora *H. amazonensis* (UEL 08) tenha sobrevivido à exposição ao crioprotetor em todas as concentrações avaliadas, o mesmo não foi observado quando submetido à criopreservação. Observou-se uma baixa porcentagem de sobrevivência (6,5%) apenas na concentração de 8% quando congelado por 24 horas em NL a -196 °C.

Estes resultados diferem dos obtidos por Popiel e Vasquez (1991), os quais observaram sobrevivência dos JIs de *H. bacteriophora* após armazenamento em NL e os resultados variaram entre 15 e 65%. Também Curran et al. (1992) observaram 68% de sobrevivência para isolados de *Heterorhabditis* após exposição ao glicerol a 15% por 48 horas e criopreservados por 24 horas, dados superiores aos obtidos neste trabalho.

Vários fatores podem atuar contribuindo para a sobrevivência do isolado durante a criopreservação, ou ainda, durante o descongelamento.

Como dito anteriormente, a concentração do crioprotetor pode influenciar a sobrevivência, pois, embora não tenha afetado a viabilidade, esta pode não ter sido suficiente para proteger os JIs e evitar a morte após o congelamento. Resultados semelhantes foram observados por Guide et al. (2016b), nos quais, o isolado *S. carpocapsae* sobreviveu à exposição ao glicerol, mas não à criopreservação.

Além disso, a não sobrevivência à criopreservação pode ser afetada durante o processo de descongelamento, pois a velocidade de descongelamento é considerada um dos passos mais críticos no protocolo de criopreservação, e mesmo pequenos atrasos durante o descongelamento podem resultar em uma queda acentuada na sobrevivência (CURRAN et al.,1992). No entanto, os autores não citam os tempos de descongelamento ideais ou deletérios.

A baixa sobrevivência observada após congelamento por 24 horas, na concentração de 8% sugere que, talvez, concentrações mais altas possam proporcionar sobrevivência maior com a possibilidade de criopreservação por um período de tempo maior. Dessa forma, as concentrações de glicerol e os tempos de exposição podem ser alterados a fim de otimizar a sobrevivência do isolado UEL 08, pois, como já citado, as alterações causadas pelo glicerol é uma característica específica de cada espécie ou isolado de nematoide.

5.6 CONCLUSÃO

O glicerol nas concentrações 2, 4, 6 e 8% não afeta a viabilidade e infectividade de *H. amazonensis* (UEL 08) a 23°C exposto por 48 horas, mas não é eficiente como crioprotetor.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pouco se sabe a respeito da distribuição das espécies de nematoides entomopatogênicos que ocorrem no estado do Paraná. Isto se deve aos poucos estudos voltados para este grupo de organismos. Além disso, sabe-se que, o número de espécies já isoladas não representa o modo como estas podem estar distribuídas.

Conhecer as espécies que aqui ocorrem é uma das alternativas que pode possibilitar e aumentar o uso destes organismos como agentes de controle biológico. Portanto, a otimização dos estudos de identificação, aspectos biológicos e estabelecimento de protocolos de armazenamento a longo prazo é necessária. Neste contexto, o presente trabalho gerou conhecimentos que permitem avanço no que se refere à uma das espécies que ocorre no Estado do Paraná. Ainda, obteve-se informações que podem contribuir para utilização do nematoide em campo.

As coletas realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho permitiram o isolamento de uma espécie de nematoide, aqui identificada como *H. amazonensis* (UEL 08). A virulência do nematoide à insetos de diferentes ordens (Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera) foi comprovada nos experimentos conduzidos neste estudo, demonstrando o potencial de controle e também o amplo espectro de ação que este apresenta.

O estudo sobre aspectos biológicos, como o ciclo de vida, possibilitou observar que o isolado UEL 08 apresenta dois ciclos distintos (longo e curto) e comprovou-se que a duração do ciclo está relacionada com a concentração de nematoide utilizada. Assim, concentrações mais baixas proporcionam um ciclo longo, enquanto concentrações elevadas, um ciclo curto. Outro aspecto estudado foi a produção *in vivo* de *H. amazonensis* (UEL 08), no qual, observou-se que os picos de produção ocorrem no 1º e 2º dia após o início de emergência do juvenis. Todas essas informações obtidas podem ser utilizadas para aperfeiçoar estudos futuros sobre produção massal do nematoide utilizando o método *in vivo*.

Os bioensaios que avaliaram a criopreservação como método para armazenamento deste nematoide comprovaram que a sobrevivência após o congelamento está intimamente relacionada à concentração do crioprotetor, neste caso, o glicerol. No entanto, a concentração considerada ideal varia de acordo com a espécie ou isolado de nematoide e podem ser alteradas a fim de otimizar a sobrevivência após o congelamento. Os resultados obtidos sugerem que outras concentrações de glicerol sejam avaliadas, para que um protocolo de criopreservação seja estabelecido para o nematoide *H. amazonensis* (UEL 08).

Observando as variações existentes entre espécies ou isolados da mesma espécie, confirma-se a importância da identificação dos nematoides entomopatogênicos para que possam ser utilizados corretamente. Com isso, o estudo dos parâmetros biológicos é um aspecto importante, principalmente quando se pensa em eficiência e possibilidade de liberação a campo em programas de controle de insetos.

Apesar de todos os avanços obtidos durante o desenvolvimento dessa tese de Doutorado, ressalta-se a necessidade de estudos adicionais, sobre isolamento e identificação de espécies ou populações nativas a fim de aumentar o uso desses agentes no controle biológico, bem como potencializar o conhecimento das espécies que ocorrem no estado do Paraná. Ainda, pesquisas com as populações de *Heterorhabditis amazonensis* já conhecidas no Brasil podem possibilitar várias inferências sobre como esta espécie encontra-se distribuída no Brasil e como estas populações estão relacionadas.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, J. P. M.; MOINO Jr, A.; CAVALCANTI, R. S.; DOLINSKI, C.; CARVALHO, F. A. Amostragem e avaliação de técnicas para isolamento de nematóides entomopatogênicos nativos obtidos em Lavras, Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 17-23, 2005.

ACEVEDO, J.P.M.; SAMUELS, R.I.; MACHADO, I.R.; DOLINSKI, C. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 2, p. 187-192, 2007.

ADAMS, B. J.; FODOR, A.; KLEIN, M. G. H. L.; STACKEBRANDT, E.; STOCK, S. P. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. **Biological Control**, 38: 4-21, 2006.

ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and Systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.), **Entomopathogenic Nematology**. Cambridge, CABI Publishing, p.1-33, 2002.

ADAMS, B. J.; PEAT, S. M.; DILLMAN, A. R. Phylogeny and evolution. In: NGUYEN, K.; B.; HUNT, D. J (eds). **Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts**. The Netherlands: Brill, p.693-733, 2007.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland, 1294p, 1994.

ALI, F.; WHARTON, D. A. Cold tolerance abilities of two entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. **Cryobiology**, v. 66, n. 1, p. 24-29, 2013.

ALMENARA, D.P.; ROSSI, C.; NEVES, C.M.R.; WINTER, C.E. Nematoides Entomopatogênicos. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. INCT-EM, p.1-40, 2012.

ALVES, V.S.; ALVES, L.F.A.; QUADROS, J. C.; LEITE, L.G. Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) ao nematoide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 479-482, 2009b.

ALVES, V. S.; ALVES, L. F. A.; FANTI, A. L. P.; ALVES, M. S. Potential of entomopathogenic nematodes for control of the erva-mate pest *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae). **Floresta**, v. 47, n.1, p.113-120, 2017.

ALVES, V. S., MOINO, J. A., SANTA-CECILIA, L. V. C., ANDALÓ, V., SOUZA, G. C. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 67-73, 2009a.

ALVES, V.S.; NEVES, P.M.J.O.; ALVES, L.F.A.; MOINO JUNIOR, A.; HOLZ. Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) screening for lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) control. **Revista Colombiana de Entomologia**, v.38, p. 76-80, 2012.

ALVES, L.F.A.; ROHDE, C.; ALVES, V.S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p.139-141, 2005.

ANDALÓ, V. III Identificação de nematoides. In: VOSS, M. (Ed). **Manual de Técnicas Laboratoriais para Obtenção, Manutenção e Caracterização de Nematoides Entomopatogênicos**. ed. Embrapa Trigo. Documentos 97, p. 9-17, 2009.

ANDALÓ, V.; CAVALCANTI, R. S.; MOLINA, J. P.; MOINO JUNIOR, A. Substrates for storing entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 3, p. 342-347, 2010.

ANDALÓ, V.; MOINO Jr. A.; SANTA-CECILIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Seleção de isolados de fungos e nematoides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.2, p. 181-187, 2004.

ANDALÓ, V.; MOREIRA, F. G.; CAVALCANTI, R. S.; MOINO JUNIOR, A. Observations on the Life Cycle and Pathogenicity of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, 194-197, 2009b.

ANDALÓ, V.; MOREIRA, F. G.; MOINO JUNIOR, A. Studies of two new populations of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematropica**, v. 39, n. 2, p. 199-211, 2009c.

ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. B.; MOINO JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, v. 8, n. 6, p. 853-867, 2006a.

ANDALÓ, V.; CAVALCANTI, R. S.; MOLINA, J.; MOINO, A.; MAGALHAES, F. H. Influência da aeração no armazenamento de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida) em condições de laboratório. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 45-50, 2006b.

BARBOSA, C. R. C. **Técnicas de produção *in vivo* de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) em *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) e hospedeiros alternativos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Entomologia), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

BATHON, H. Impact of Entomopathogenic Nematodes on Non-target Hosts. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, n. 3, p. 421-434, 1996.

BEDDING, R. A.; AKHURST, R. J. A. Simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**, v. 21, p. 109-110, 1975.

BELLINI, L. L.; DOLINSKI, C. Foliar application of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the control of *Diatraea saccharalis* in greenhouse. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.3, p. 997-1004, 2012.

BOFF, M.; WIEGERS, G.L.; GERRITSEN, L.J.M.; SMITS, P.H. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. **Nematology**, v.2, p.303-308, 2000.

BORTOLUZZI, L.; ALVES, L. F. A.; ALVES, V. S.; HOLZ, N. Entomopathogenic nematodes and their interaction with chemical insecticide aiming at the control of banana weevil borer, *Cosmopolites Sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 183-192, 2013.

BRENNER, D.J. Additional Genera of Enterobacteriaceae. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.-H., STACKEBRANDT, E. (Eds.). **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, 3ed. Springer, NY. release 3.4, 1999.

BURMAN, M. *Neoaplectana carpocapse*: toxin production by axenic insect parasitic nematodes. **Nematológica**, v. 78, p.62-70, 1982.

BURMAN, M.; PYE, A. E. *Neoaplectana carpocapsae*: respiration of infective juveniles. **Nematologica**, v. 26, p. 214-219, 1980.

CASTRO, S. V.; ANDRADE CARVALHO, A. de; SILVA, C. M. G. da; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO J. R. de; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.

COSTA, J.C.R.; DIAS, R.J.P.; MORENZ, M.J.F. Determining the adaptation potential of entomopathogenic nematode multiplication of *Heterorhabditis riobravus* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Parasitology Research**, v.102, p.139-144, 2007.

CLARKE, D.J. Photorhabdus: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. **Cellular Microbiology**, 10: 2159-2167, 2008.

COURTNEY, W. D.; POLLEY, D.; MILLER, V. L. TAF, an improved fixative in nematode techniques. **Plant Disease Reporter**, De Doucet, v. 39, p. 570–571, 1955.

CURRAN, J.; GILBERT, C.; BUTLER, K. Routine cryopreservation of isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. **Journal of Nematology**, Loudonville, v. 24, n. 2, p. 269-270, 1992.

DE DOUCET, M.M.A.; BERTOLOTTI, A.L.; GIAYETTO, A.L.; MIRANDA, M.B. Host range, specificity, and virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum*, and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. **Journal Invertebrate Pathology**, v.73, n.3, p.237-242, 1999.

DE LEY, P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. In: WormBook, eds. The *C. elegans* Research Community, 2006. <http://www.wormbook.org>

DEL VALLE, E. E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E. L. S.; SOUZA, M. R.; SAMUELS, R. I. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii*, (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 33-41, 2008.

DOLINSKI, C.; DEL VALLE, E.; STUART, R. J. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. **Biological Control**, v.38, n.3, p.422-427, 2006.

DOLINSKI, C.; KAMITANI, F. L.; MACHADO, I. R.; WINTER, C. E. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n.2, p. 150-159, 2008.

DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALÓ, V.; LEITE, L.G. Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. **Nematoda**, v.4, p.1-14, 2017.

DOLINSKI, C.; MOINO JUNIOR, A. Utilização de nematóides entomopatogênicos Nativos ou Exóticos: O Perigo das Introduções. **Nematologia Brasileira**, v. 30, p. 139-149, 2006.

DUTKY, S. R. THOMPSON, J. V.; CANTWE, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal Insect Pathology**, v. 6, n. 4, p. 417-422, 1964.

EHLERS, R. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 623-633, 2001.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. In: GAUGLER, R., editor. **Entomopathogenic Nematology**, CABI Publishing, New York, NY, p. 57-77, 2002.

FRANKLIN, M.; GOODEY, J.B. (1949). A cotton blue lactophenol technique for mounting plant-parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, v. 23, n. 3-4, p.175-178, 1949.

FUGA, C.A.G.; FERNANDES, R.H; LOPES, E. A. Nematoides entomopatogênicos. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 3, p. 56-75, 2012.

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

GARCIA, L.C.; RAETANO, C.G.; LEITE, L.G. Application technology for the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae: Steinernematidae) to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Corn. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 3, p. 305-311, 2008.

GEDEN, C. J.; AXTELL, R. C.; BROOKS, W. M. Susceptibility of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) to the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae*, *S. glaseri* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). **Journal of Entomological Science**, v. 20, n. 3, p. 331-339, 1985.

GLASER, R. W. The cultivation of a nematode parasite of an insect. **Science**, v. 73, p. 614-615, 1931.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal of Parasitology**, v. 30, p. 995-1000, 2000.

GREWAL, P. S.; NARDO, E. A. B. DE; AGUILLERA, M. Entomopathogenic nematodes: Potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 191-205, 2001.

GREWAL, P. S.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment and reproduction. **Journal of Thermal Biology**, v. 19, n.4, 245-253, 1994.

GUIDE, B. A.; FERNANDES, T. A. P.; CHIESA, A. C. M.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, V. S.; MENEGUIN, A. M. Nematodos entomopatogénos (Rhabditida: Heterorhabditidae y Steinernematidae) en el control de *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Entomología Mexicana**, v. 2, p. 180-185, 2015.

GUIDE, B. A.; SOARES, E. A.; ITIMURA, C. R. B.; ALVES, V. S. Entomopathogenic nematodes in the control of cassava root mealybug *Dysmicoccus* sp. (Hemiptera: Pseudococcidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 42, n. 1, p. 16-21, 2016a.

GUIDE, B.A.; ALVES, V.S.; FERNANDES, T. A. P.; FERREIRA, F. P.; NEVES, P. M. O. J. Glycerol as a cryoprotectant agent to the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3017-3026, 2016b.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, Ottawa, v. 29, n. 1, p. 26-38, 1992.

HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed). **Entomopatogenic entomology**. Wallingford, UK: CAB International, p. 115-143, 2002.

HOPPER, K. R.; ROUSH, R. T.; POWELL, W. Management of genetics of biological-control introductions. **Annual Review of Entomology**, v. 38, p.27-51, 1993.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v. 38, n. 1, p. 181-206, 1993.

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

LEITE, L. G.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; HAZIR, S.; JACKSON, A. M. A New medium por liquid fermentation of *Steinernema feltiae*: selection of lipid and protein sources. **Nematropica**, v. 46, n. 02, p. 147-153, 2016.

LEITE, L.G.; TAVARES, F.M.; BOTELHO, P.S.M.; BATISTA FILHO, A.; POLANCZYK, R.A.; SCHMIDT, F.S. Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus Levis* e *Leucothyreus* sp. em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, p. 40-48, 2012.

LEWIS, E.D.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.38, n.1, p. 66-79, 2006.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) in host volatile cues. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 71, n.4, p. 765-769, 1993.

LI XING-YUE.; LIU QI-ZHI.; NERMUT, J.; PUZA, V.; MRACEK, Z. *Heterorhabditis beicherriana* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from the Shunyi district of Beijing, China. **Zootaxa**, v. 3569, p. 25-40, 2012.

MALAN, A. P.; NGUYEN, K. B.; WAAL, J. Y.; TIEDT, L. *Heterorhabditis safricana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**, v. 10, p. 381-396, 2008.

MANEESAKORN, P.; AN, R.; DANESHVAR, H.; TAYLOR, K.; BAI, X.; ADAMS, B. J.; CHANDRAPATYA, A. Phylogenetic and cophylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditis: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (*Photorhabdus*: Enterobacteriaceae). **Molecular Phylogenetic and Evolution**, v. 59, p. 271–280, 2011.

MOLINA, J. P.; LOPEZ, N. J. C. Producción *in vivo* de três entomonematodos con dos sistemas de infección em dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 27, n. 1-2, p. 73-79, 2001.

MOLINA, J. P. A.; MOINO JR, A.; CAVALCANTI, R. S. Produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n.3, p. 347-354, 2004.

MOLINA, J. P. A.; MOINO JUNIOR, A.; CAVALCANTE, C. D.; CARVALHO, F. A. Patogenicidade, Multiplicação e Biologia de Isolados Nativos de Nematoides Entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) Provenientes de Lavras, MG. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 25-30, 2005.

MORALES, N.; MORALES-MONTERO, P.; PUZA, V.; SAN-BLAS, E. First report of *Heterorhabditis amazonensis* from Venezuela and characterization of three populations. **Journal of Nematology**, v. 48, n. 3, p. 139-147, 2016.

NEGRISOLI JR, A. S.; BARBOSA, C. R.C; MOINO JUNIOR. A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida:

Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 111-116, 2008.

NGUYEN, K. B.; GINARTE, C. M. A.; LEITE, L. G.; DOS SANTOS, J. M.; HARAKAVA, R. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 8-20, 2010.

NGUYEN, K. B.; HUNT, D. J. **Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts**. In: Hunt DJ, Perry RN, editors. Leiden-Boston: Brill, 2007.

NGUYEN, K. B.; MARUNIAK, J.; ADAMS, B. J. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. **Journal of Nematology**, v. 33, p. 73-82, 2001.

NGUYEN, K. B.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; STUART, R. J.; MCCOY, C. W.; JAMES, R. R.; ADAMS, B. J. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. **Nematology**, v. 6, p. 231-244, 2004.

NUGENT, M. J.; O'LEARY, S. A.; BURNELL, A. M. Optimised procedures for the cryopreservation of different species of *Heterorhabditis*. **Fundamental Applied Nematology**, Leiden, v. 19, n. 1, p. 1-6, 1996.

OHBA, K.; ISHIGURO, T.; HAYASAH, Y. Freeze-thaw survival of the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *S. glaseri* in brief comparison with survival of *Caenorhabditis elegans* and *Aphelenchus avenae*. **Japanese journal of nematology**, Tokyo, v. 18, n. 1, p. 30-35, 1989.

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

PEGG, D. E. Cryopreservation and freeze-drying protocols methods. In: DAY, J. G.; GLYN, N.; STACEY, G. N. (Ed.). Molecular biology. **Totowa: Humana Press**, p. 39-57, 2007.

PEREIRA, C. *Rhabditis hambletoni* n.sp., nema aparentemente semi-parasito da "bróca do algodoeiro" (*Gasterocercodes brasiliensis*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 8, p. 214-230, 1937.

PEZOWICZ, E. Effects of Steinernematidae and Heterorhabditidae on the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **IOBC WPRS BULLETIN**, v.26, n.1, p.193-196, 2003.

PIZANO, M. A.; AGUILERA, M. M.; MONTEIRO, A. R.; FERROY, L. C. C. B. Incidência de *Neoaplectana glaseri* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) parasitando ovo de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Col: Cerambycidae). **Reunião da Sociedade Brasileira de Nematologia**, p. 9-10, 1985.

- POINAR JR, G.O. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. fam.). **Nematologica**, v. 21, p. 463-470, 1976.
- POINAR, G.O. Nematodes for biological control of insects. **Boca Raton: CRC Press**, p.143-148, 1979.
- POINAR JR., G. O. Biology and Taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae, In: GLAUGLER. R.; KAYA, H.K. (eds). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, CRC Press, v. 365, p. 23-61, 1990.
- POINAR JR., G. O. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Fundamental Applied Nematology**, v.16, p. 333 – 338, 1993.
- POINAR, JR. G.O.; KARUNAKAR, G. K.; DAVID, H. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida, Nematoda) from India: separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 15, p. 467-472, 1992.
- POPIEL, I. D.; HOMINICK, W.M. Nematodes as biological control agents: part II. **Advances in Parasitology**, v.31, p. 381-431, 1992.
- POPIEL, I.; VASQUEZ, E. M. Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. **Journal of Nematology**, Loudonville, v. 23, n. 4, p. 432-437, 1991.
- RAMOS-RODRIGUEZ, O.; CAMPBELL, J. F.; RAMASWAMY, S. B. Efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* against the stored-product insect pests *Tribolium castaneum* and *Plodia interpunctella*, **Biological Control**, v. 40, n.1, p. 15–21, 2007.
- ROHDE, C.; MOINO JUNIOR, A.; CARVALHO, F. D.; DA SILVA, M. A. Selection of entomopathogenic nematodes for the control of the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, p.797-802, 2012.
- SAN-BLAS, E., ROSALES, C., AND TORRES, A. Entomopathogenic nematodes in tropical agriculture: current uses and their future in Venezuela. In: CAMPOS-HERRERA, R. (ed). **Nematode pathogenesis of insects and other pests: ecology and applied technologies for sustainable plant and crop protection**. Switzerland: Springer International Publishing, p. 365–389, 2015.
- SELVAN, S.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Density-dependant effects on entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis* and *Steinernematidis*) within an insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 278-284, 1993.
- SHAPIRO, D. I.; GLAZER, I. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. **Environmental Entomology**, v. 25, p.1455-1461, 1996.

- SHAPIRO ILAN, D.I.; HAZIR, S.; GLAZER, I. 2017. Basic and applied research: Entomopathogenic nematodes. IN: LACEY, L. A. (Ed.). *Microbial Agents for Control of Insect Pests: from discovery to commercial development and use*. Academic Press, Amsterdam, p. 91-105.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; GOUGE, D. H.; PIGGOTT, S. J.; FIFE, J. P. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. **Biological Control**, Boca Raton, v. 38, n. 1, p. 124-133, 2006.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R.; LEWIS, E. E. In vivo production of entomopathogenic nematodes. **International Journal of Nematology**, v.14, p. 13-18, 2004.
- SOUZA, L. M., JÚNIOR, A. M., MERTZ, N. R., SILVA, M. A. T., SOARES, F. M., FILHO, R. Z. B. Nematoides Entomopatogênicos e Compatibilidade com Imidaclopride Visando ao Controle de *Spodoptera frugiperda* em Viveiro Florestal. **Nematologia Brasileira**, v. 36, n. 1-2, p. 32-40, 2012.
- STOCK, P. S.; STRONG, D.; GARDNER, S. L. Identification of *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from California with a new species isolated from the larvae of the ghost moth *Hepialis californicus* (Lepidoptera: Hepialidae) from the Bodega Bay Natural Reserve. **Fundamental & Applied Nematology**, v. 19, n. 6, p. 585-592, 1996.
- STOCK, S. P., MRÁČEK, Z.; WEBSTER, J. M. Morphological variation between allopatric populations of *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923). (Rhabditida: Steinernematidae). **Nematology**, v. 2, p. 143– 152, 2000.
- STUART, R. J.; GAUGLER, R. Genetic adaptation and founder effect in laboratory populations of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 74, p.164-170, 1996.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.
- TARASCO, E.; CLAUSI, M.; RAPPAZZO, G.; PANZAVOLTA, T.; CURTO, G.; SORINO, R.; Vinciguerra, M. T. Biodiversity of entomopathogenic nematodes in Italy. **Journal of Helminthology**, v.89, n.3, p. 359-366, 2015.
- VOSS, M. Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) como Agentes de Controle Biológico de Insetos. In: _____. **Manual de Técnicas Laboratoriais para Obtenção, Manutenção e Caracterização de Nematoides Entomopatogênicos**. ed. Embrapa Trigo. Documentos 97, p. 9-17, 2009.
- VRAIN, T. C.; WAKARCHUK, D. A.; LEVESQUE, A. C.; HAMILTON, R. I. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 15, p. 563–573, 1992.

WOODRING, L.J.; KAYA, K.H. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. A Handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin. 28p. Arkansas Agricultural Experimental Station, Fayetteville Arkansas. **Cooperatives Series Bulletin**, n.331, 1988.

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

ZERVOS, S.; JOHNSON, S. C.; WEBSTER, J. M. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glasseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 69, p.1261-1264, 1991.

ZIONI, S. Z.; NISSAN, C.; GLAZER, I.; SEGAL, D. Life Cycle and Reproductive Potential of the Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Strain HP88¹. **Journal of Nematology**, v. 24, n. 3, p. 352-358, 1992.