



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELA SOUZA DONEZE

**PRODUÇÃO E EFICIÊNCIA DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE *Dalbulus
maidis* (HOMOPTERA: CICADELLIDAE)**

GABRIELA SOUZA DONEZE

**PRODUÇÃO E EFICIÊNCIA DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE *Dalbulus
maidis* (HOMOPTERA: CICADELLIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Estadual de Londrina - UEL,
como requisito parcial para a obtenção do título
de Doutor em Agronomia

Orientador: Prof. Rui Pereira Leite
Coorientadora: Prof. Viviane Sandra Alves

Londrina

2026

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

DONEZE, GABRIELA .

PRODUÇÃO E EFICIÊNCIA DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO
CONTROLE DE *Dalbulus maidis* (HOMOPTERA: CICADELLIDAE) /
GABRIELA DONEZE. - Londrina, 2026.
120 f.

Orientador: Rui Pereira Leite.

Coorientador: Viviane Sandra Alves.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2026.

Inclui bibliografia.

1. nematoide enteropatogênico - Tese. 2. Controle biológico - Tese. 3.
cigarrinha do milho - Tese. 4. produção in vitro - Tese. I. Pereira Leite, Rui . II.
Sandra Alves, Viviane . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

GABRIELA SOUZA DONEZE

**PRODUÇÃO E EFICIÊNCIA DE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE DE *Dalbulus
maidis* (HOMOPTERA: CICADELLIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual de
Londrina - UEL, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Rui Pereira Leite
Instituto de Desenvolvimento Rural do
Paraná – IAPAR-EMATER (IDR-Paraná)

Prof. Dr Adeney de Freitas Bueno
Embrapa Soja

Prof. Dr. Amarildo Pasini
Universidade Estadual de Londrina

Profª Drª Michele Regina Lopes da Silva
Instituto de Desenvolvimento Rural do
Paraná – IAPAR-EMATER (IDR-Paraná)

Profª Drª Renata Katsuko Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de abril de 2026.

Dedico à minha avó, Paula Aparecida da
Silva de Souza,
pelo apoio constante e pelo desejo de que
fizéssemos aquilo que ela não pôde fazer.
Esta vitória também é sua.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças para mais essa caminhada.

Aos meus pais, Clovis e Marta, por serem o alicerce de minha vida, fazendo-se presentes em todos os momentos de minha formação e por sempre me incentivarem à acreditarem em meus sonhos.

Agradeço ao meu marido, Leonardo, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando em todas as fases, desde a faculdade até o doutorado. Sua presença constante, apoio e auxílio em meus trabalhos têm sido fundamentais ao longo dessa jornada.

À minha irmã Iara por sempre estar ao meu lado me auxiliando nas dificuldades na qual me espelho como pessoa e profissional.

Agradeço às minhas parceiras de laboratório Livia, Gabrielle, Cinthia, Gabi Amalia e Paloma por sempre me auxiliarem nos trabalhos realizados, e por cada momento de alegria e de sofrimento que vivemos juntas no laboratório.

Agradeço também à Dra. Michele, que está sempre disposta à auxiliar e esclarecer qualquer dúvida relacionada à pesquisa, demonstrando seu amor por essa área.

Em especial, agradeço aos meus orientadores, Dr. Rui Pereira Leite Júnior e Dra. Viviane Sandra Alves, por depositarem total confiança em mim ao longo desses quatro anos de doutorado. Sou profundamente grata pela oportunidade de estagiar em seus laboratórios, uma experiência que agregou imensamente à minha vida profissional.

Agradeço à CAPES pela concessão da Bolsa.

Muito obrigada à todos, pois se hoje concluo este trabalho devo isso a cada um de vocês por terem aceitado este desafio comigo.

“O coração do homem traça o seu
caminho, mas o Senhor lhe dirige os
passos.”

— Provérbios 16:9

RESUMO

DONEZE, Gabriela Souza. Produção e eficiência de nematoides entomopatogênicos no controle de *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae). 2026. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae), é o principal vetor dos agentes etiológicos do complexo de enfezamentos do milho, doenças responsáveis por perdas significativas na produtividade da cultura. Diante das limitações para o controle químico e da necessidade de estratégias mais sustentáveis, o objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de *D. maidis* à Nematoides Enteropatogênicos (NEPs), visando contribuir para uma estratégia sustentável de manejo do complexo de enfezamentos do milho (CEM). Inicialmente, foi avaliada a suscetibilidade de adultos de *D. maidis* a onze isolados de NEPs, pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, sob condições laboratoriais. Foram conduzidos ensaios de seleção de isolados, determinação de concentrações letais e estimativa do tempo letal (LT₅₀ e LT₉₀). Em seguida, os isolados mais promissores foram submetidos à avaliação da produção *in vivo*, utilizando larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* como hospedeiros, e a produção *in vitro* em meio semissólido, testando diferentes fontes lipídicas e proteicas. A infectividade dos juvenis infectantes (JIs) produzidos foi validada por bioensaios. Por fim, foi desenvolvido um protocolo de encapsulamento em alginato de sódio para formulação dos NEPs, avaliando-se a viabilidade, a infectividade e a eficácia dos nematoides encapsulados no controle de *D. maidis* em plantas de milho sob condições de casa-de-vegetação. Os resultados demonstraram que os isolados UENP06 e UENP02 apresentaram maior patogenicidade sobre *D. maidis*, promovendo mortalidades de até 80% e 76%, respectivamente, com LT₅₀ estimado em aproximadamente 72 horas. A

mortalidade aumentou de forma dependente da concentração, sendo que doses a partir de 75 Jls cm⁻² foram suficientes para alcançar elevados níveis de controle. Na produção *in vivo*, ambos os isolados (UENP02 e UENP06) apresentaram maior multiplicação em *G. mellonella*, com destaque para o isolado UENP06, que atingiu $5,51 \times 10^5$ Jls g⁻¹ de lagarta. Na produção *in vitro*, as fontes lipídicas não influenciaram significativamente o rendimento, enquanto no teste de fontes proteicas foi possível observar que as proteínas gema de ovo em pó, farinha de soja e farinha de tenébrio proporcionaram maiores produções, especialmente para o isolado UENP06, que alcançou até $5,62 \times 10^4$ Jls mL⁻¹. Os juvenis produzidos *in vitro* mantiveram elevada infectividade (>84% de mortalidade em *G. mellonella*). O encapsulamento em alginato de sódio preservou a viabilidade (>70% após 15 dias, chegando a 100% nas menores concentrações) e manteve a infectividade acima de 95%. Em casa-de-vegetação, os NEPs promoveram mortalidade significativa de *D. maidis*, com maior eficiência na aplicação em suspensão aquosa (60%), embora as formulações encapsuladas também tenham apresentado controle superior ao tratamento controle. De forma geral, os resultados evidenciam que os isolados UENP02 e, especialmente, UENP06, ambos pertencentes à espécie *Heterorhabditis amazonensis*, apresentam elevado potencial para o controle biológico de *D. maidis*, sendo viáveis tanto do ponto de vista de produção quanto de formulação, demonstrando potencial para o desenvolvimento de um bioinseticida voltado ao manejo da cigarrinha-do-milho.

Palavras chaves: Cigarrinha-do-milho, Controle biológico, Enfezamento; *Heterorhabditis*; *Steinernema*.

ABSTRACT

DONEZE, Gabriela Souza. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae). 2026. 120 p. Ph.D. Thesis (Doctorate in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, Brazil, 2026.

The corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae), is the main vector of the etiological agents associated with the corn stunt complex, diseases responsible for significant yield losses in maize crops. Given the limitations of chemical control and the need for more sustainable strategies, this study aimed to evaluate the susceptibility of *D. maidis* to entomopathogenic nematodes (EPNs), contributing to the development of a sustainable management strategy for the corn stunt complex. Initially, the susceptibility of *D. maidis* adults to eleven EPN isolates belonging to the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* was evaluated under laboratory conditions. Bioassays were conducted to select isolates, determine lethal concentrations, and estimate lethal time (LT₅₀ and LT₉₀). Subsequently, the most promising isolates were evaluated for *in vivo* production using larvae of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* as hosts, as well as for *in vitro* production in semisolid medium using different lipid and protein sources. The infectivity of the produced infective juveniles (IJs) was validated through bioassays. Finally, a sodium alginate encapsulation protocol was developed for EPN formulation, and the viability, infectivity, and efficacy of encapsulated nematodes against *D. maidis* on maize plants were evaluated under greenhouse conditions. The results demonstrated that isolates UENP06 and UENP02 showed the highest pathogenicity against *D. maidis*, promoting mortalities of up to 80% and 76%, respectively, with LT₅₀ estimated at approximately 72 hours. Mortality increased in a concentration-dependent manner, and doses from 75 IJs cm⁻² were sufficient to achieve high levels of

control. In *in vivo* production, both isolates showed greater multiplication in *G. mellonella*, especially UENP06, which reached 5.51×10^5 IJs g⁻¹ of larva. In *in vitro* production, lipid sources did not significantly influence yield, whereas powdered egg yolk, soybean flour, and mealworm flour provided the highest production levels, especially for UENP06, which reached up to 5.62×10^4 IJs mL⁻¹. The *in vitro*-produced juveniles maintained high infectivity (>84% mortality in *G. mellonella*). Sodium alginate encapsulation preserved viability (>70% after 15 days, reaching 100% at lower concentrations) and maintained infectivity above 95%. Under greenhouse conditions, EPNs promoted significant mortality of *D. maidis*, with greater efficiency observed in aqueous suspension applications (60%), although encapsulated formulations also provided superior control compared to the untreated control. Overall, the results demonstrate that isolates UENP02 and especially UENP06, both belonging to the species *Heterorhabditis amazonensis*, have high potential for the biological control of *D. maidis*, being viable from both production and formulation perspectives and showing promise for the development of a bioinsecticide for corn leafhopper management.

Key words: Corn leafhopper, Biological control, Corn Stunting; *Heterorhabditis*; *Steinernema*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Sintomas de enfezamento vermelho em milho, caracterizados por avermelhamento progressivo das folhas e redução do vigor vegetativo, associados à infecção por <i>Maize bushy stunt phytoplasma</i> (MBSP).	27
Figura 2.2. Sintomas característicos de enfezamento pálido em plantas de milho, evidenciando estrias cloróticas paralelas às nervuras foliares, associadas à infecção por <i>Spiroplasma kunkelii</i> , agente causal da doença. ...	29
Figura 2.3. Sintomas característicos da virose da risca do milho, evidenciando a presença de riscas cloróticas ao longo das nervuras foliares, associadas à infecção pelo <i>Maize rayado fino virus</i> (MRFV)	31
Figura 2.4. Principais práticas de manejo integrado recomendadas para o controle da cigarrinha-do-milho e dos enfezamentos.....	32
Figura 2.5. Cadáveres de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas por nematóides entomopatogênicos: A, infecção por <i>Steinernema</i> spp.; e B, infecção por <i>Heterorhabditis</i> spp.....	35
Figura 2.6. Ciclo de vida de nematóides entomopatogênicos do gênero <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	37
Figura 3.1. Criação de <i>Dalbulus maidis</i> em caixas adaptadas e mantidas sob condições de casa-de-vegetação pelo laboratório de Entomologia do IDR-Paraná, em Londrina, PR.....	53
Figura 3.2. Mortalidade acumulada (%) de adultos de <i>Dalbulus maidis</i> submetidos aos isolados UENP02 e UENP06 de nematoides entomopatogênicos ao longo de 168 horas após a inoculação.....	64
Figura 4.1. A, Placa com larvas de último instar de <i>Galleria mellonella</i> ; B, cadáveres de <i>Galleria mellonella</i> ; com sintomas de morte por NEP em' câmara seca; e C, cadáveres de <i>Galleria mellonella</i> ; em armadilha de White adaptada.	73

Figura 4.2. Comparação da produção in vivo de juvenis infectivos (JIs)/larva dos isolados UENP02 e UENP06 (<i>Heterorhabditis amazonensis</i>) usando como hospedeiros larvas de <i>Galleria mellonella</i> e <i>Tenebrio molitor</i>	77
Figura 4.3. Padrão temporal de produção de juvenis infectivos (JIs) do isolado UENP06 em lagartas de <i>Galleria mellonella</i> e <i>Tenebrio molitor</i> ao longo de três avaliações, compreendendo 15 dias após a inoculação.	79
Figura 4.4 Dinâmica temporal da produção de juvenis infectivos (JIs) do isolado UENP02 em lagartas de <i>Galleria mellonella</i> e <i>Tenebrio molitor</i> ao longo de três avaliações, compreendendo 15 dias após a inoculação.	80
Figura 5.1. Encapsulamento em cápsulas de alginato de sódio dos isolados de NEPs UENP 02 e UENP 06 de <i>Heterorhabditis amazonensis</i>	96
Figura 5.2. Avaliação da infectividade de JIs de NEPs da espécie <i>Heterorhabditis amazonensis</i> no controle <i>in planta</i> de <i>Dalbulus maidis</i> sob condições de casa-de-vegetação. A, Vasos contendo uma plântula de milho envolvida com folha de acetato transparente; B, cigarrinhas alimentando-se da plântula de milho; e C, vasos fechados na parte superior com tecido voal, fixado com elástico, para evitar a fuga das cigarrinhas.	98
Figura 5.3. Mortalidade de <i>Dalbulus maidis</i> causada pelos isolados UENP02 e UENP06 de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> aplicados em suspensão aquosa e encapsulados em alginato em casa-de-vegetação.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.1 Relação de isolados e local de origem dos NEPs utilizados na seleção para controle de <i>Dalbulus maidis</i> sob condições de laboratório.	55
Tabela 4.3. Meio de cultura base para avaliação de fonte de proteína. Adaptado de Neira-Monsalve et al. (2019).....	75
Tabela 4.4. Produção média de juvenis infectantes (JIs mL ⁻¹) dos isolados UENP02 e UENP06 de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> em função da fonte de gordura no cultivo <i>in vitro</i>	81
Tabela 4.5. Fator de multiplicação (x vezes) de juvenis infectantes (JIs mL ⁻¹) dos isolados UENP02 e UENP06 de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> em função da fonte de gordura em cultivo <i>in vitro</i> , considerando inóculo inicial de 1.000 JIs mL ⁻¹	83
Tabela 4.6. Produção média de juvenis infectantes (JIs mL ⁻¹) dos isolados UENP02 e UENP06 de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> em função de diferentes fontes de proteína no cultivo <i>in vitro</i>	84
Tabela 4.7. Mortalidade de lagartas de <i>Galleria mellonella</i> causada por juvenis infectivos (JIs) dos isolados UENP02 e UENP06 de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> produzidos <i>in vitro</i> em meios contendo diferentes fontes lipídicas.	86
Tabela 4.8. Mortalidade de lagartas de <i>Galleria mellonella</i> causada por juvenis infectivos (JIs) dos isolados UENP02 e UENP06 de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> produzidos <i>in vitro</i> em meios contendo diferentes fontes proteicas.....	87
Tabela 5.1. Sobrevivência de JIs dos isolados UENP02 e UENP06 de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> em cápsulas de alginato de sódio, 15 dias após o encapsulamento em diferentes concentrações.	99

Tabela 5.2. Infectividade para lagartas de <i>Galleria mellonella</i> de JIs dos NEPs UENP02 e UENP06 de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> encapsulados em cápsulas de alginato de sódio.	101
--	-----

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários

CEM – Complexo de enfezamentos do milho

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

CV – Coeficiente de Variação

DNA – Ácido desoxirribonucleico

IBCB – Instituto Biológico

IDR-Paraná – Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná

IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná

JI – Juvenil Infectante

JIs – Juvenis Infectantes

LabINP – Laboratório de Ensaaios com Inimigos Naturais de Pragas

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MBSP – *Maize bushy stunt phytoplasma*

MIP – Manejo Integrado de Pragas

MRfV – *Maize rayado fino virus*

NEPs – Nematóides entomopatogênicos

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RNA – Ácido ribonucleico

SISVAR – Sistema de Análise de Variância

UEL – Universidade Estadual de Londrina

UENP – Universidade Estadual do Norte do Paraná

UV – Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REFERENCIAL BIBLIOGRAFICO	23
2.1	CULTURA DO MILHO	23
2.2	CIGARRINHA-DO-MILHO <i>DALBULUS MAIDIS</i>	25
2.3	ENFEZAMENTOS DO MILHO.....	26
2.3.1	Enfezamento vermelho	26
2.3.2	Enfezamento pálido.....	28
2.3.3	Risca do Milho.....	30
2.4	MEDIDAS DE CONTROLE	31
2.4.1	Nematoides entomopatogênicos	33
2.4.2	Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos	35
2.4.3	Utilização de nematoides entomopatogenicos no controle de pragas	38
2.4.4	Produção de nematoides entomopatogênicos	40
2.4.5	Formulação e encapsulamento de nematoides entomopatogênicos.....	43
3	ARTIGO A: SUSCEPTIBILIDADE DE <i>Dalbulus maidis</i> À NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	46
3.1	RESUMO	46
3.2	INTRODUÇÃO	50
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.3.1	Criação de Insetos	52
3.3.2	Nematoides entomopatogênicos (NEPs)	54
3.3.3	Seleção de Isolados de NEPs para controle de <i>Dalbulus maidis</i>	54
3.3.4	Avaliação da atividade de diferentes concentrações de JIs de NEPs sobre <i>Dalbulus maidis</i>	57

3.3.5	Determinação do tempo letal (LT ₅₀ e LT ₉₀) de nematóides entomopatogênicos (NEPs) sobre <i>Dalbulus maidis</i>	57
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.4.1	Seleção de Isolados de NEPs.....	59
3.4.2	Eficiência de diferentes concentrações de juvenis infectantes (Jis) de NEPs na mortalidade de <i>D. maidis</i>	62
3.4.3	Determinação do tempo letal (LT ₅₀ e LT ₉₀) de nematóides entomopatogênicos sobre <i>Dalbulus maidis</i>	64
3.5	CONCLUSÕES.....	66
 4	 Artigo B - PRODUÇÃO <i>IN VIVO</i> E ALTERNATIVAS DE MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Heterorhabditis amazonensis</i> UENP02 e UENP06	 67
4.1	RESUMO	67
4.2	ABSTRACT.....	68
	INTRODUÇÃO	69
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
4.3.1	Criação de Insetos Visando a Produção <i>In Vivo</i> de NEPs	71
4.3.2	Avaliação da Produção <i>In Vivo</i> dos NEPs UENP02 e UENP06	72
4.3.3	Avaliação de Fontes de Gordura na Produção <i>In Vitro</i> de NEPs.....	74
4.3.4	Avaliação de Fontes Proteicas na Produção <i>In Vitro</i> de NEPs.....	75
4.3.5	Avaliação da Infectividade de JIs Produzidos <i>In Vitro</i>	76
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.4.1	Produção <i>In Vivo</i> dos NEPs UENP02 e UENP06	77
4.4.2	Avaliação de Fontes de Gordura para Produção <i>In Vitro</i> de NEPs.....	81
4.4.3	Avaliação de Fontes Proteicas para Produção <i>In Vitro</i> de NEPs.....	83

4.4.4	Avaliação da Infectividade de JIs Produzidos <i>In Vitro</i>	86
4.5	CONCLUSÕES	88
5	ARTIGO C: EFICÁCIA DE ISOLADOS DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS ENCAPSULADOS DA ESPÉCIE <i>Heterorhabditis amazonensis</i> NO CONTROLE DE <i>Dalbulus maidis</i> EM PLANTAS DE MILHO	89
5.1	RESUMO	89
5.2	ABSTRACT	91
5.3	INTRODUÇÃO	92
5.4	MATERIAL E MÉTODOS	95
5.4.1	Encapsulamento dos NEPs	95
5.4.2	Avaliação da Viabilidade e Infectividade de JIs de NEPs Encapsulados	96
5.4.3	Avaliação da Infectividade de JIs de NEPs no Controle <i>In Planta</i> de <i>Dalbulus maidis</i> sob Condições de Casa-de-vegetação	97
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.5.1	Viabilidade de JIs de NEPs Encapsulados em Cápsulas de Alginato de Sódio	99
5.5.2	Infectividade para Lagartas de <i>Galleria mellonella</i> de JIs de NEPs Encapsulados em Cápsulas de Alginato de Sódio	101
5.5.3	Avaliação da Infectividade de JIs de NEPs Encapsulados no Controle de <i>Dalbulus maidis</i> <i>In Planta</i> sob Condições de Casa-de-vegetação	103
5.6	CONCLUSÕES	106
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
7	REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, sendo amplamente utilizado na alimentação humana e animal, bem como na produção de etanol e diversos subprodutos industriais (FAO, 2023). No Brasil, a cultura apresenta elevada importância econômica, destacando-se entre os principais grãos produzidos no país (CONAB, 2024).

Entre os principais desafios fitossanitários da cultura do milho destaca-se o complexo de enfezamentos do milho, conjunto de doenças associado principalmente aos mollicutes *Spiroplasma kunkelii* e 'Candidatus *Phytoplasma asteris*', além do Maize rayado fino virus (MRFV). Esses patógenos são transmitidos pela cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae), reconhecida como o principal vetor dessas doenças no Brasil (OLIVEIRA; LOPES; NAULT, 2013; OLIVEIRA; SABATO, 2018).

Nas últimas décadas, a incidência dos enfezamentos tem aumentado significativamente em regiões produtoras de milho, especialmente em áreas de cultivo sucessivo e milho safrinha, favorecendo surtos epidêmicos e elevadas perdas de produtividade (OLIVEIRA et al., 2002; SABATO, 2017). Mesmo após mais de duas décadas dos primeiros relatos de severos prejuízos econômicos associados ao complexo, a doença continua sendo um dos principais problemas fitossanitários da cultura no Brasil (OLIVEIRA; SABATO, 2018).

O manejo de *D. maidis* baseia-se predominantemente na utilização de inseticidas químicos. Entretanto, essa estratégia apresenta limitações importantes, incluindo a necessidade de aplicações frequentes, riscos de seleção de populações resistentes, impactos ambientais e redução de organismos benéficos. Dessa forma, torna-se necessária a busca por alternativas sustentáveis para o manejo do vetor e, consequentemente, do complexo de enfezamentos do milho.

Entre as alternativas biológicas, destacam-se os nematoides entomopatogênicos (NEPs), pertencentes principalmente aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*. Esses organismos apresentam elevada capacidade de infectar insetos e associação mutualística com bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, responsáveis pela rápida morte do hospedeiro (GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005). Além disso, os NEPs apresentam potencial para utilização em programas de manejo integrado de pragas devido à segurança ambiental, facilidade de aplicação e compatibilidade com diferentes estratégias de controle biológico (SHAPIRO-ILAN et al., 2017).

Apesar do uso consolidado de NEPs no controle de diferentes insetos-praga, ainda existem poucas informações sobre sua utilização no controle de *D. maidis*. Estudos recentes demonstram que diferentes isolados podem causar elevada mortalidade da cigarrinha-do-milho em condições laboratoriais, evidenciando o potencial desses organismos para o manejo dessa praga (OLIVEIRA, 2024).

Entretanto, para viabilizar a utilização desses agentes em programas de controle biológico, tornam-se necessários estudos envolvendo seleção de isolados mais virulentos, avaliação de parâmetros biológicos relacionados à patogenicidade, desenvolvimento de sistemas eficientes de produção *in vivo* e *in vitro* e formulações capazes de manter a viabilidade e infectividade dos nematoides durante o armazenamento e aplicação.

Dessa forma, esta tese teve como objetivo avaliar o potencial de nematoides entomopatogênicos no controle biológico de *D. maidis*, por meio da seleção de isolados promissores, determinação da patogenicidade e virulência, estudos de produção *in vivo* e *in vitro* e desenvolvimento de formulações encapsuladas visando à aplicação em condições de casa-de-vegetação.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRAFICO

2.1 Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta pertencente à família Poaceae e destaca-se como uma das espécies vegetais com elevada capacidade de armazenamento de energia, em razão de sua alta eficiência na produção e no acúmulo de fotoassimilados. Atualmente, trata-se de uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, amplamente utilizada na alimentação humana, na nutrição animal e como matéria prima para diversas cadeias agroindustriais, desempenhando papel estratégico na segurança alimentar global (GARCÍA-LARA; SERNA-SALDIVAR, 2022). Originário da domesticação do teosinto (*Zea mays* subsp. *mexicana* (Schrad.) Iltis) na Mesoamérica, o milho apresentou ampla capacidade de adaptação à diferentes ambientes, o que favoreceu sua disseminação e consolidação como cultura de elevada relevância econômica e social ao longo da história (HUANG et al., 2022).

No Brasil, a cultura do milho ocupa atualmente área total estimada entre 21 e 23 milhões de hectares, considerando todas as safras (primavera/verão, safrinha e terceira safra) (CONAB, 2025). Isto representa expansão consistente nos últimos anos e reforça a importância econômica e estratégica da cultura no contexto agrícola nacional (CONAB, 2025). Essa ampla distribuição geográfica é favorecida pela adaptabilidade da cultura à diferentes condições edafoclimáticas, o que permite sua exploração em distintas regiões do país, desde pequenas propriedades até sistemas agrícolas altamente tecnificados. Além disso, o milho exerce papel estratégico na segurança alimentar e na produção de ração para os setores de avicultura e suinocultura, sendo um dos principais grãos responsáveis pela sustentação dessas cadeias produtivas.

Para que a cultura do milho expresse seu máximo potencial produtivo, alguns fatores ambientais são considerados essenciais, destacando-se a disponibilidade hídrica, a temperatura e a luminosidade (WANG, 2025). O

desenvolvimento adequado da planta depende do equilíbrio entre esses fatores ao longo do ciclo, uma vez que déficits hídricos, temperaturas extremas ou baixa luminosidade podem comprometer o crescimento vegetativo, a formação das estruturas reprodutivas e, conseqüentemente, a produtividade final.

O ciclo fenológico do milho é dividido em duas fases principais: a fase vegetativa (V) e a fase reprodutiva (R). A fase vegetativa compreende o período desde a emergência das plântulas (VE) até o pendoamento (VT), enquanto a fase reprodutiva se inicia no florescimento e polinização (R1) e se estende até a maturação fisiológica dos grãos (R6) (CIAMPITTI; SALMERÓN; VYN, 2016). A correta compreensão dessas fases é fundamental para o manejo da cultura, pois muitas práticas agrícolas, como adubação, irrigação e controle fitossanitário, são diretamente influenciadas pelo estágio fenológico da planta.

O Brasil apresenta condições climáticas favoráveis para o cultivo do milho em diferentes épocas do ano, possibilitando a realização de dois períodos de cultivo distintos: a safra de verão e a safrinha, também denominada safra de inverno. A partir da década de 1980, o cultivo do milho safrinha ganhou expressivo destaque, impulsionado pela crescente demanda do grão para a alimentação de suínos e aves, setores que anteriormente dependiam, em maior escala, de culturas como trigo e girassol (CRUZ et al., 2006). Esse sistema de sucessão das culturas permitiu o aumento da produção nacional de milho, mas também trouxe novos desafios fitossanitários.

Um dos principais problemas associados ao cultivo do milho é a incidência de insetos-praga, os quais podem causar expressivos prejuízos econômicos. Nesse contexto, a cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae), destaca-se como uma das principais pragas da cultura, não apenas pelos danos diretos causados pela sucção de seiva, mas principalmente pela sua capacidade de transmitir fitopatógenos associados ao complexo de enfezamentos do milho (CEM). A presença contínua de áreas cultivadas ao longo do ano favorece a manutenção das populações do inseto vetor, aumentando o risco de disseminação dos agentes

dessas doenças e reforça a necessidade de estratégias de manejo eficientes e sustentáveis (FERREIRA et al., 2026).

2.2 Cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis*

A cigarrinha-do-milho *D. maidis* é um inseto sugador de 3,7 a 4,3 mm de comprimento, sendo as fêmeas maiores que os machos. Ela possui como característica coloração amarelo-palha, e quando adultas apresentam duas manchas circulares negras na parte dorsal da cabeça (ZURITA; ANJOS; WAQUIL, 2006). A cigarrinha tem como habitat preferencial o cartucho da planta de milho e apresenta ciclo de vida de 24 a 45 dias, período que compreende de ovo à adulto. Ela passa pela fase de ninfa, onde possui 5 instares e o período compreende em média 14 a 17 dias. As ninfas têm hábito de se alimentarem nas folhas em forma estática, e só se movimentam quando incomodadas (OLIVEIRA; LOPES, 2000). As fêmeas fazem postura endofítica, na nervura principal das folhas da planta de milho e podem ovipositar em média 14 ovos/dia, totalizando cerca de 611 ovos durante seu ciclo.

O milho apresenta seu ciclo em torno de 180 dias, sendo assim, as populações de cigarrinha podem aumentar devido às várias gerações nesse período. Outro fator que pode preservar as cigarrinhas na cultura de milho é a migração do inseto de lavouras mais velhas para lavouras mais novas (COTA et al., 2021).

Além da *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923), existem outras espécies de cigarrinhas associadas ao complexo de enfezamentos do milho, como *Dalbulus eliminatus* (Ball, 1909), *Dalbulus guevarai* (DeLong, 1950), *Dalbulus quinquenotatus* (DeLong & Nault, 1984), *Dalbulus gelbus* (DeLong, 1950), *Dalbulus tripsacoides* (DeLong & Nault, 1984) e *Baldulus tripsaci* (Kramer, 1960) (Hemiptera: Cicadellidae) (HEADY; MADDEN; NAULT, 1985).

A cigarrinha-do-milho adquire os patógenos do CEM ao se alimentar de plantas de milho doentes, podendo adquirir um, ou até mesmo os três patógenos, que então se multiplicam em diversos órgãos do inseto, principalmente na glândula salivar, por um período de 3 a 4 semanas. Após esse período, as cigarrinhas passam a transmitir os patógenos do CEM ao se alimentarem de plântulas de milho, e a transmissão é do tipo persistente e propagativa (MOYA-RAYGOZA; NAULT, 1998; OLIVEIRA et al., 2007).

A sobrevivência no período da entressafra é favorecida pela possibilidade de realização de diapausa pelo inseto (LOPES; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA; LOPES, 2004). A cigarrinha pode ainda usar outras plantas como hospedeiro alternativos, principalmente outras gramíneas para abrigo e alimentação, além de realizar migração para outras regiões onde a cultura está presente (SABATO; KARAM; OLIVEIRA, 2018).

2.3 Enfezamentos do milho

2.3.1 Enfezamento vermelho

O enfezamento vermelho do milho foi inicialmente descrito em meados do século XX em países da América Latina, com registros de maior impacto a partir da década de 1970, quando a doença passou a causar prejuízos significativos em áreas comerciais de cultivo. No Brasil, sua importância epidemiológica aumentou com a intensificação dos sistemas produtivos e com a expansão do cultivo do milho safrinha, condição que favoreceu a manutenção contínua das populações da cigarrinha-do-milho, *D. maidis*, principal vetor dos patógenos associados ao complexo de enfezamentos (NAULT, 1980; WHITCOMB et al., 1986; OLIVEIRA; FRIZZAS, 2021).

O enfezamento vermelho é causado por um fitoplasma pertencente à classe Mollicutes, conhecido como *Maize bushy stunt phytoplasma* (MBSP),

que coloniza os vasos do floema das plantas. A infecção interfere na translocação de fotoassimilados e na regulação hormonal, provocando distúrbios fisiológicos que podem resultar em perdas severas de produtividade, especialmente quando a infecção ocorre em estádios iniciais de desenvolvimento da cultura (MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020).

Os sintomas tornam-se perceptíveis geralmente algumas semanas após a infecção e variam conforme o estágio fenológico da planta e das condições ambientais. Em estágios iniciais, observa-se avermelhamento progressivo das folhas, iniciando-se pelas margens e pelo ápice das folhas mais velhas (Figura 2.1). Com a evolução da doença, o avermelhamento pode se generalizar, acompanhado por clorose, redução do vigor vegetativo e encurtamento dos internódios. A coloração avermelhada está associada ao acúmulo de antocianinas decorrente de alterações metabólicas induzidas pela presença do fitoplasma (MASSOLA JÚNIOR, 2001; SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020).

Figura 2.1. Sintomas de enfezamento vermelho em milho, caracterizados por avermelhamento progressivo das folhas e redução do vigor vegetativo, associados à infecção por *Maize bushy stunt phytoplasma* (MBSP).



Fonte: SABATO; LANDAU; OLIVEIRA (2014).

Além dos sintomas foliares, a doença compromete significativamente o desenvolvimento reprodutivo das plantas. Indivíduos infectados frequentemente apresentam porte reduzido, proliferação de brotações laterais, espigas malformadas ou ausentes e enchimento deficiente de grãos. Essas alterações refletem a desorganização fisiológica provocada pelo patógeno, que afeta a distribuição de assimilados e o equilíbrio hormonal necessário à formação das estruturas reprodutivas (MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; OLIVEIRA; FRIZZAS, 2021).

Infecções mistas envolvendo o fitoplasma do enfezamento vermelho e outros patógenos do complexo de enfezamentos são frequentes, uma vez que compartilham o mesmo inseto-vetor. Nessas situações, os sintomas podem se intensificar e se sobrepor, dificultando a identificação visual precisa no campo. Por esse motivo, a confirmação diagnóstica requer, frequentemente, análises laboratoriais específicas. A elevada capacidade de disseminação do vetor e a severidade dos danos associados ao fitoplasma tornam o enfezamento vermelho um dos principais componentes epidemiológicos do complexo de enfezamentos do milho (GALVÃO; SABATO; BEDENDO, 2021; SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020).

2.3.2 Enfezamento pálido

O enfezamento pálido do milho é uma doença sistêmica causada pela bactéria helicoidal *Spiroplasma kunkelii*, pertencente à classe Mollicutes, cujo papel como agente etiológico foi descrito na década de 1970. No Brasil, a doença está diretamente associada à presença da cigarrinha-do-milho, principal vetor responsável pela aquisição e transmissão do patógeno entre plantas suscetíveis. A relevância epidemiológica do enfezamento pálido intensificou-se com a expansão dos sistemas produtivos e do cultivo do milho

safrinha, que favorecem a permanência do inseto vetor no agroecossistema ao longo do ano (OLIVEIRA; FRIZZAS, 2021; SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020; WHITCOMB et al., 1986).

Os sintomas do enfezamento pálido variam conforme o estágio fenológico da planta no momento da infecção e das condições ambientais, sendo mais frequentemente observados a partir do florescimento (Figura 2.2). A manifestação típica da doença inclui estrias cloróticas ou esbranquiçadas ao longo das folhas, geralmente paralelas às nervuras, iniciando-se próximas à nervura central e podendo se estender em direção ao ápice. Em infecções mais severas ou em plantas infectadas precocemente, esses sintomas podem ser acompanhados por leve avermelhamento nas margens foliares (MASSOLA JÚNIOR, 2001; SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020).

Figura 2.2. Sintomas característicos de enfezamento pálido em plantas de milho, evidenciando estrias cloróticas paralelas às nervuras foliares, associadas à infecção por *Spiroplasma kunkelii*, agente causal da doença.



Fonte: SABATO; LANDAU; OLIVEIRA (2014).

Além das alterações foliares, plantas acometidas pelo enfezamento pálido apresentam distúrbios morfofisiológicos importantes, como redução do porte, encurtamento dos internódios e comprometimento do desenvolvimento reprodutivo. As espigas formadas são, em geral, menores, com má formação e enchimento deficiente de grãos, refletindo em perdas significativas de produtividade. Esses efeitos decorrem da colonização do floema pelo patógeno, que interfere na translocação de fotoassimilados e no balanço hormonal da planta (MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; SABATO; LANDAU; COELHO, 2013).

2.3.3 Risca do Milho

A virose da risca do milho foi descrita pela primeira vez na Costa Rica na década de 1970, sendo posteriormente registrada em diversas regiões produtoras de milho nas Américas. A doença é causada pelo *Maize rayado fino virus* (MRFV), um vírus pertencente ao gênero *Marafivirus*, transmitido de forma persistente pela cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis*, durante o processo de alimentação do inseto em plantas infectadas e sadias (GÁMEZ, 1973; SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020).

Os sintomas da virose manifestam-se predominantemente em plantas jovens e caracterizam-se, inicialmente, pela presença de pequenos pontos cloróticos distribuídos ao longo das nervuras foliares. Com a evolução da infecção, esses pontos se alongam e se unem, formando riscas cloróticas contínuas que podem atingir vários centímetros de comprimento, sendo mais facilmente visualizadas quando as folhas são observadas contra a luz (Figura 2.3). A intensidade dos sintomas varia conforme o estágio fenológico da planta no momento da infecção e das condições ambientais, podendo persistir até as fases reprodutivas da cultura (DE LEÓN, 2004; SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020).

Figura 2.3. Sintomas característicos da virose da risca do milho, evidenciando a presença de riscas cloróticas ao longo das nervuras foliares, associadas à infecção pelo *Maize rayado fino virus* (MRFV)



Fonte: SABATO; LANDAU; COELHO (2018).

Além das alterações foliares, a infecção pelo MRFV pode comprometer o crescimento vegetativo e o desenvolvimento reprodutivo das plantas. Indivíduos infectados frequentemente apresentam redução de porte, abortamento de estruturas florais e formação de espigas menores, com enchimento deficiente de grãos. As perdas de produtividade associadas à virose da risca são variáveis e dependem principalmente da idade da planta no momento da infecção, sendo infecções precoces relacionadas à reduções mais severas no rendimento da cultura (SHURTLEFF, 1980; VÁSQUEZ; MORA, 2007).

2.4 Medidas de controle

O manejo dos enfezamentos do milho baseia-se predominantemente em estratégias preventivas, uma vez que não existem medidas curativas eficazes após a infecção das plantas. Dessa forma, o controle dessas doenças está

fundamentado nos princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP), que combina práticas culturais, monitoramento populacional e intervenções químicas e biológicas voltadas à redução das populações da cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*) (SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020; WAQUIL, 2004).

Entre as principais práticas recomendadas destacam-se a eliminação de plantas voluntárias de milho, a sincronização da semeadura, o uso de cultivares tolerantes e o monitoramento da presença do inseto vetor no campo (Figura 2.4). Essas medidas visam reduzir as fontes de inóculo e interromper a sobrevivência da cigarrinha durante a entressafra.

Figura 2.4. Principais práticas de manejo integrado recomendadas para o controle da cigarrinha-do-milho e dos enfezamentos.



Fonte: ÁVILA et al. (2021).

O controle químico é amplamente utilizado como ferramenta complementar no manejo de *D. maidis*, especialmente por meio do tratamento de sementes e da aplicação foliar de inseticidas. Atualmente, dezenas de produtos encontram-se registrados para o controle da cigarrinha no Brasil.

Entretanto, o uso intensivo de inseticidas pode favorecer a seleção de populações resistentes, além de gerar impactos ambientais, o que reforça a necessidade de estratégias alternativas e sustentáveis (AGROFIT, 2022; NEVES et al., 2022).

Nesse contexto, o controle biológico tem sido investigado como componente do manejo integrado. Estudos demonstram o potencial de parasitoides das famílias Mymaridae e Trichogrammatidae no parasitismo de ovos de *D. maidis*, bem como de espécies da família Dryinidae atuando sobre ninfas e adultos do inseto (OLIVEIRA; LOPES, 2000; MENESES et al., 2013). Além disso, fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* têm apresentado resultados promissores no controle da cigarrinha em condições experimentais (BUTT; WALDEN, 2000; RIBEIRO, 2019).

Apesar dos avanços obtidos com parasitoides e fungos, a busca por novos agentes de controle biológico permanece necessária. Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) destacam-se como organismos promissores no manejo de diversas pragas agrícolas de importância econômica, incluindo espécies dos gêneros *Agrotis*, *Spodoptera* e *Diabrotica* (GREWAL; NARDO; AGUILLERA, 2001). Contudo, ainda são escassos os estudos que avaliam o potencial dos NEPs no controle de *D. maidis*, evidenciando uma lacuna de conhecimento que justifica a investigação desses organismos no manejo da cigarrinha-do-milho.

2.4.1 Nematoides entomopatogênicos

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) pertencem principalmente à duas famílias: Steinernematidae, que inclui os gêneros *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinerinema* Nguyen & Smart, 1994, e Heterorhabditidae, representada pelo gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (BURNELL; STOCK, 2000). As espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são parasitas

obrigatórios de insetos e estabelecem associações simbióticas altamente especializadas com bactérias entomopatogênicas, formando um complexo biológico responsável pela infecção e morte rápida do hospedeiro (ADAMS; NGUYEN, 2002).

Os nematóides do gênero *Steinernema* mantêm associação com bactérias do gênero *Xenorhabdus*, localizadas na vesícula intestinal do nematóide, enquanto espécies do gênero *Heterorhabditis* estão associadas à bactérias do gênero *Photorhabdus*, distribuídas ao longo do intestino (BIRD; AKHURST, 1983; CICHE; ENSIGN, 2003). Durante o processo de infecção, os nematóides liberam essas bactérias no interior do inseto hospedeiro, onde elas se multiplicam rapidamente, promovendo septicemia e criando condições favoráveis ao desenvolvimento e à reprodução dos nematóides.

Uma característica marcante da infecção pelo complexo nematoide-bactéria é a alteração na coloração dos cadáveres dos insetos infectados. Insetos parasitados por *Heterorhabditis* associado à bactérias do gênero *Photorhabdus* geralmente apresentam coloração marrom-escura a avermelhada, enquanto infecções aqueles parasitados por *Steinernema* associadas à bactérias do gênero *Xenorhabdus* resultam em coloração marrom-clara (Figura 2.5) (ALVES; LOPES, 2008). Essa variação de coloração está associada à intensa produção de metabólitos secundários pelas bactérias simbiontes, incluindo toxinas, exoenzimas e compostos antimicrobianos sintetizados por *Photorhabdus*, os quais promovem a degradação dos tecidos do hospedeiro, inibem microrganismos competidores e contribuem para a preservação do cadáver como substrato para o desenvolvimento dos nematoides (CHACÓN-OROZCO, 2014).

Figura 2.5. Cadáveres de larvas de *Galleria mellonella* infectadas por nematóides entomopatogênicos: A, infecção por *Steinernema* spp.; e B, infecção por *Heterorhabditis* spp.



Fonte: Doneze (2022).

2.4.2 Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos

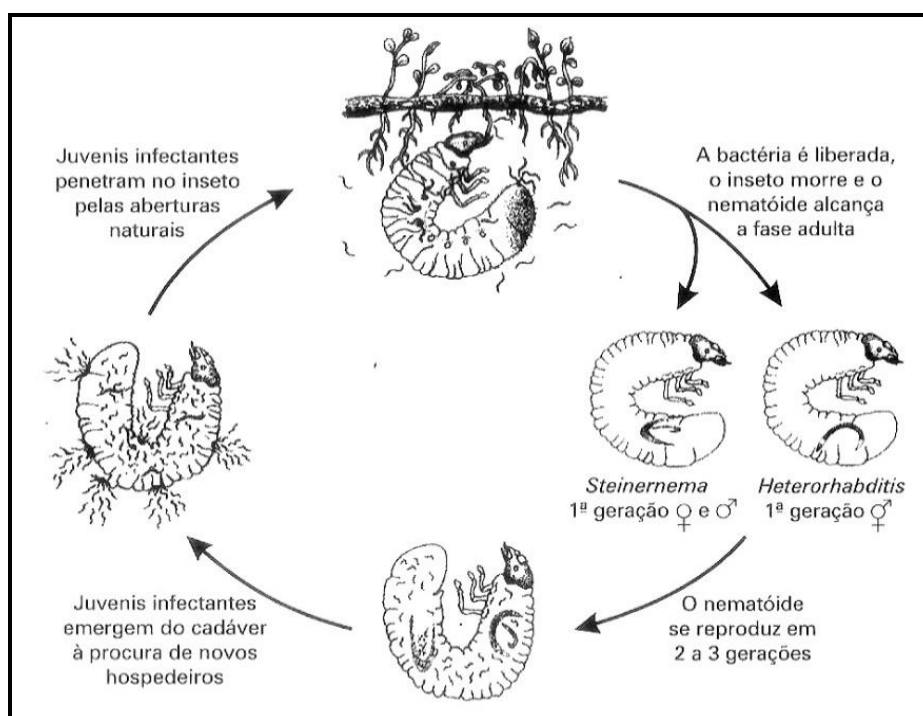
O ciclo de vida dos NEPs apresenta variações entre espécies e populações, influenciando diretamente sua patogenicidade e eficiência no controle de insetos (ANDALÓ; MOINO JUNIOR; SANTA-CECÍLIA, 2004). De modo geral, os NEPs dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* passam por estágios de ovo, quatro estádios juvenis (J1–J4) e fase adulta, sendo o juvenil infectante (JI), equivalente ao terceiro estágio juvenil modificado, a fase responsável pela busca e infecção do hospedeiro (ALMENARA et al., 2018).

O juvenil infectante é uma forma de resistência adaptada à sobrevivência no solo, apresentando metabolismo reduzido e retenção de bactérias simbiotes em seu intestino. A infecção do inseto ocorre principalmente por orifícios naturais, como abertura bucal, ânus e espiráculos, embora espécies de *Heterorhabditis* também possam penetrar diretamente

pela cutícula utilizando um dente córneo localizado na região anterior do corpo. Após a entrada no hemocelo do hospedeiro, os nematóides liberam as bactérias simbiotes, que se multiplicam rapidamente na hemolinfa e produzem toxinas e metabólitos secundários responsáveis pela morte do inseto em 24 a 72 horas (POINAR, 1990; CICHE; ENSIGN, 2003).

Após a morte do hospedeiro, os nematóides alimentam-se das bactérias e dos tecidos liquefeitos do inseto, completando seu desenvolvimento e reprodução no interior do cadáver. Diferenças importantes ocorrem entre os gêneros. Em *Heterorhabditis*, o juvenil infectante desenvolve-se inicialmente em uma fêmea hermafrodita capaz de autofecundação. As gerações subsequentes incluem machos e fêmeas, e o fenômeno de endotoquia matricida no qual os juvenis eclodem dentro do corpo materno, contribui para a transmissão eficiente das bactérias simbiotes à prole. Já em *Steinernema*, o desenvolvimento envolve diretamente machos e fêmeas, sem fase hermafrodita, e a transmissão bacteriana ocorre por mecanismos distintos, porém igualmente eficientes (Figura 2.6) (POINAR, 1990; ALMENARA et al., 2018).

Figura 2.6. Ciclo de vida de nematóides entomopatogênicos do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis*.



Fonte: FERRAZ et al. (2008).

A localização do hospedeiro pelos juvenis infectantes envolve estratégias comportamentais distintas. Espécies com comportamento “ambusher” adotam postura de emboscada, posicionando-se na superfície do solo para interceptar insetos móveis. Esse padrão é comum em espécies como *Steinernema carpocapsae*. Em contraste, espécies com comportamento “cruiser” deslocam-se ativamente no solo em busca do hospedeiro, como observado em *Heterorhabditis bacteriophora*. Algumas espécies apresentam estratégias intermediárias, combinando ambos os comportamentos (LEWIS; GAUGLER; HARRISON, 1992).

A orientação em direção ao hospedeiro é mediada por sinais químicos e físicos do ambiente. Os juvenis infectantes respondem a dióxido de carbono, vibrações e compostos orgânicos voláteis liberados por insetos e por plantas atacadas por herbívoros. Plantas infestadas liberam misturas específicas de voláteis induzidos por herbivoria que podem atrair NEPs, funcionando como

sinais indiretos de presença de hospedeiros. Esse fenômeno representa uma interação tritrófica entre plantas, insetos e nematóides, na qual os NEPs exploram pistas químicas para aumentar a eficiência de infecção (RASMANN et al., 2005).

2.4.3 Utilização de nematoides entomopatogenicos no controle de pragas

A utilização de NEPs no controle de pragas agrícolas tem se mostrado eficiente, demonstrando seu potencial no manejo de diferentes espécies de insetos, como pragas das culturas de milho, soja, trigo e mandioca, além de insetos vetores de doenças em aviários.

Resultados promissores foram obtidos utilizando NEPs sobre *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) (GIANNASI et al., 2018). Neste estudo foi realizada a seleção de isolados de NEPs, e a avaliação da suscetibilidade em diferentes estádios do inseto e em diferentes concentrações de JIs. Os testes foram realizados em laboratório, onde foi possível observar mortalidade de até 100% em *A. ipsilon* quando utilizado o isolado CH3 (*Steinernema* sp.).

Pragas das culturas de soja e trigo também foram estudadas. Guide et al. (2019) realizaram testes em percevejos de barriga verde, *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), onde foi avaliada em laboratório a patogenicidade e a virulência sobre adultos de *D. melacanthus*, realizando testes de concentrações de JIs, e testes em casa-de-vegetação no qual obteve-se resultados satisfatórios, apresentando patogenicidade e virulência para todos os isolados sobre adultos de *D. melacanthus*.

Cecconello (2020), por sua vez, desenvolveu testes em percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) visando o controle sustentável deste inseto. Para isso, avaliou o potencial dos NEPs sobre *E. heros* em condições de laboratório e campo, onde foi possível

observar que os isolados IBCB-n 46 e NEPET 11 foram os que causaram mortalidade de até 100% dos adultos de *Euschistus heros*.

Quanto à utilização de NEPs para o controle de *Dysmicoccus brevipes*, praga da cultura da mandioca, Zart et al. (2021) avaliaram o desempenho de nove isolados, incluindo as dispersões vertical e horizontal dos nematoides e as concentrações de JIs nos insetos. No desenvolvimento da pesquisa, o isolado que mais se destacou no controle de *D. brevipes* foi o NEPET11, visto que apresentou maior virulência em todas as concentrações avaliadas e alcançou maior mortalidade dos insetos no teste de dispersão.

Devido à dificuldade de controle e o grande prejuízo para a avicultura, foram realizados diferentes testes em laboratório para controle do cascudinho de aviário, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). Fernandes et al. (2021) selecionaram isolados nativos de NEPs e avaliou o efeito da cama de aviário em sua patogenicidade e virulência, visando o controle do cascudinho de aviário. Já Já Alves et al. (2012) avaliaram a virulência de 14 isolados em diferentes temperaturas. Em ambos os estudos todos os isolados de NEPs apresentaram mortalidade em cascudinhos, sendo um potencial agente para controle de *A. diaperinus*.

Recentemente, Oliveira (2024) avaliou o potencial de nematoides entomopatogênicos (NEPs) no controle de *Dalbulus maidis*, testando sete isolados pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*. Todos os isolados promoveram mortalidade das cigarrinhas, evidenciando sua patogenicidade ao inseto. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, indicando desempenho semelhante entre os isolados avaliados, apesar das variações numéricas nas taxas de mortalidade.

2.4.4 Produção de nematoides entomopatogênicos

A viabilidade comercial dos NEPs como agentes de controle biológico está diretamente condicionada ao desenvolvimento de tecnologias eficientes de produção em larga escala. Embora esses organismos apresentem elevado potencial para o manejo de pragas, sua produção ainda representa um dos principais gargalos para a ampliação do uso em programas de controle biológico, especialmente quando comparada a outros agentes microbianos (PETERS; FERRAZ; RIBEIRO, 2017).

Os NEPs podem ser produzidos por dois métodos principais: produção *in vivo*, utilizando insetos hospedeiros, e produção *in vitro*, realizada em meios artificiais sólidos ou líquidos. Cada abordagem apresenta vantagens e limitações relacionadas ao custo, escalabilidade, padronização e qualidade do produto (SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002).

2.4.4.1 Produção *in vivo* de nematoides entomopatogênicos

A produção *in vivo* consiste na multiplicação dos NEPs em insetos hospedeiros suscetíveis, sendo amplamente utilizada em pesquisas laboratoriais e na produção em pequena escala. Espécies como *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* e *Corcyra cephalonica* são frequentemente empregadas devido à alta suscetibilidade à infecção e à elevada produção de juvenis infectantes (JIs) (SHAPIRO-ILAN; GAUGLER; LEWIS, 2004).

O método baseia-se na inoculação dos insetos com JIs, seguida da incubação até a morte do hospedeiro e posterior coleta dos nematóides emergentes, geralmente pela técnica da armadilha de White. Apesar de ser relativamente simples e exigir baixo investimento em infraestrutura, a produção *in vivo* apresenta limitações quanto à automação, padronização e economia de

escala, sendo pouco viável para produção industrial em larga escala (SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002).

Estudos recentes demonstram que a escolha do inseto hospedeiro influencia significativamente o rendimento da produção. *Galleria mellonella*, por exemplo, tende a proporcionar maior produtividade de JIs quando comparada a outros hospedeiros alternativos, sendo considerada o padrão para produção experimental (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004).

2.4.4.2 Produção *in vitro*

A eficiência da produção *in vitro* depende da formulação adequada do meio de cultura, do controle rigoroso de contaminações e da manutenção da estabilidade da simbiose nematóide–bactéria. A composição do meio deve fornecer fontes equilibradas de proteínas, lipídios e carboidratos, além de condições físico-químicas que favoreçam o crescimento bacteriano e o desenvolvimento dos nematóides (EHLERS, 2001)

A produção em meio sólido foi uma das primeiras abordagens desenvolvidas para o cultivo *in vitro* de nematóides entomopatogênicos. Esse método utiliza substratos sólidos esterilizados, geralmente compostos por misturas à base de proteínas vegetais, extratos de levedura e fontes lipídicas, que são inicialmente colonizados pelas bactérias simbiontes e, posteriormente, inoculados com juvenis infectantes. Os primeiros sistemas eficientes de produção sólida foram descritos por Bedding (1981), estabelecendo as bases para o desenvolvimento de técnicas modernas de cultivo *in vitro* de NEPs (BEDDING, 1981; EHLERS, 2001).

Embora apresente custos relativamente menores e menor complexidade operacional em comparação aos sistemas líquidos, a produção em meio sólido enfrenta limitações relacionadas à uniformidade do crescimento, controle de umidade e automação do processo. Além disso, a produtividade por unidade de

volume é inferior à obtida em fermentação líquida (SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002)

A fermentação líquida em biorreatores representa o método mais avançado para produção em larga escala. Nesse sistema, os nematóides são cultivados em suspensão em meios líquidos sob condições controladas de aeração, agitação, temperatura e pH. Essa abordagem permite alta produtividade, padronização e escalabilidade industrial (EHLERS, 2001).

Entretanto, a produção líquida exige controle preciso de variáveis físicas e biológicas. O cisalhamento mecânico causado pela agitação pode afetar a sobrevivência dos nematóides, e o equilíbrio entre crescimento bacteriano e desenvolvimento dos JIs é crítico para o sucesso do processo. A seleção de isolados adaptados à fermentação líquida é um passo fundamental para viabilizar a produção comercial (CLAASEN; DUNN; MALAN, 2025)

A produção de espécies do gênero *Heterorhabditis* apresenta desafios adicionais quando comparada a *Steinernema*. Diferenças na biologia reprodutiva, na dinâmica da simbiose com *Photorhabdus* e na sensibilidade às condições de cultivo podem resultar em variações na produtividade e na qualidade dos juvenis infectantes, exigindo seleção criteriosa de isolados e maior controle dos parâmetros de fermentação (EHLERS, 2001; SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002).

A seleção de isolados com alta virulência e bom desempenho em sistemas de fermentação é considerada um dos fatores mais críticos para o sucesso da produção industrial. Estudos recentes destacam a importância da triagem de isolados nativos para identificar linhagens com maior adaptação aos cultivos líquidos e maior estabilidade produtiva (CLAASEN; DUNN; MALAN, 2025)

2.4.5 Formulação e encapsulamento de nematoides entomopatogênicos

A formulação de NEPs representa uma etapa crítica para viabilizar sua utilização comercial, pois influencia diretamente a estabilidade durante o armazenamento, a facilidade de transporte, a aplicação no campo e a sobrevivência dos juvenis infectantes (JIs). Formulações adequadas devem fornecer um ambiente que minimize a atividade metabólica dos nematóides, reduza perdas por dessecação e proteja contra radiação ultravioleta, além de permitir adequada troca gasosa (SHAPIRO-ILAN; LEWIS, 2024)

Diversos tipos de formulações têm sido desenvolvidos para NEPs, incluindo suspensões aquosas concentradas, géis poliméricos, substratos sólidos (vermiculita, turfa e diatomita), esponjas e formulações granulares dispersíveis em água. Entre essas abordagens, os sistemas baseados em polímeros e hidrogéis têm recebido atenção crescente por sua capacidade de manter elevada umidade e proteger os nematóides contra estresses ambientais (SHAPIRO-ILAN; LEWIS, 2024; GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005).

O encapsulamento consiste na imobilização dos NEPs em cápsulas ou esferas poliméricas que atuam como sistemas de liberação controlada. Essa estratégia visa aumentar a sobrevivência durante o armazenamento e proteger os nematóides após a aplicação, especialmente em ambientes expostos à radiação UV e à dessecação (PATEL; VORLOP, 1994; NXITYWA; MALAN, 2021).

Estudos pioneiros demonstraram a viabilidade do uso de géis iônicos biodegradáveis para encapsular espécies de *Heterorhabditis*, sendo o alginato de cálcio um dos materiais mais promissores devido à sua biocompatibilidade e capacidade de formar matrizes estáveis (PATEL; VORLOP, 1994). Posteriormente, diferentes pesquisas confirmaram que cápsulas de alginato podem funcionar como sistemas de liberação lenta, favorecendo a manutenção da viabilidade dos JIs e sua liberação gradual no ambiente (KAYA; NELSEN, 1985; RUIZ-VEGA; CORTÉS-MARTÍNEZ; GARCÍA-GUTIÉRREZ, 2018).

Estudos mais recentes destacam que a estabilidade das cápsulas depende fortemente da concentração do alginato, do agente reticulante e das condições de gelificação. Nxitywa e Malan (2021) ressaltam que, embora o alginato de sódio seja amplamente utilizado, a vida útil das cápsulas ainda representa um desafio, exigindo ajustes na composição para reduzir a taxa de escape dos nematóides e prolongar o armazenamento. Da mesma forma, Kim, Jaffuel e Turlings (2015) demonstraram que a temperatura de gelificação influencia a dureza das cápsulas e a retenção dos IJs, evidenciando a necessidade de otimização dos parâmetros físico-químicos do sistema.

O avanço das tecnologias de formulação possibilitou a comercialização de diversos produtos à base de NEPs em diferentes países (Tabela 2.1). Atualmente, os nematóides são disponibilizados principalmente em formulações gelificadas, pós úmidos, granulados dispersíveis em água e cápsulas (SHAPIRO-ILAN; LEWIS, 2024).

Tabela 2.1. Produtos comerciais registrados à base de nematóides entomopatogênicos disponíveis nos mercados brasileiro e internacional.

Empresa	Produto comercial	Espécie de NEP	Formulação	Praga alvo	País de registro
Koppert Brasil	Terranem	<i>Steinernema carpocapsae</i>	Suspensão em gel	<i>Sphenophorus levis</i>	BR
Koppert Biological Systems	Larvanem	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Suspensão aquosa concentrada	Larvas de coleópteros do solo	Holanda
e-nema GmbH	nemastar®	<i>Steinernema carpocapsae</i>	Pó dispersível em água	Lagartas e insetos móveis de solo	Alemanha
e-nema GmbH	nemaplus®	<i>Steinernema feltiae</i>	Pó dispersível em água	Moscas-dos-fungos (<i>Sciaridae</i>)	Alemanha
e-nema GmbH	nemaplus® depot	<i>Steinernema feltiae</i>	Cápsulas poliméricas (alginato)	Moscas-dos-fungos (<i>Sciaridae</i>)	Alemanha
Biobest	Nema-Control F	<i>Steinernema feltiae</i>	Gel refrigerado	Moscas-dos-fungos	Bélgica
Biobest	Nema-Control H	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Gel refrigerado	Larvas de coleópteros	Bélgica
BioWorks	Nemasys®	<i>Steinernema feltiae</i>	Suspensão em gel	Moscas-dos-fungos	EUA

Fonte: Elaborado pela autora com base em KOPPERT BRASIL (2026); E-NEMA GMBH (2026); BIOBEST GROUP (2026); BIOWORKS INC. (2026).

3 ARTIGO A: SUSCEPTIBILIDADE DE *Dalbulus maidis* À NEMATOIDES ENTOMOPATOGENICOS

3.1 RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar, em condições de laboratório, a eficiência de isolados de NEPs no controle de adultos de *D. maidis*, bem como selecionar os isolados mais virulentos, determinar a concentração letal de aplicação e estimar o tempo letal necessário para provocar a mortalidade da população-alvo. Para o teste de seleção, foram avaliados onze isolados de NEPs pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, aplicados sobre adultos da cigarrinha-do-milho em placas de Petri, sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo. A partir da seleção dos isolados mais promissores, foram conduzidos ensaios para determinação da concentração letal, testando-se as concentrações de 0, 25, 50, 75, 100 e 125 juvenis infectantes (JIs) por cm². Adicionalmente, foi realizada a determinação do tempo letal (LT₅₀ e LT₉₀), visando avaliar a velocidade de ação dos isolados selecionados ao longo de um período experimental de sete dias. Os resultados obtidos indicaram que os isolados UENP06 e UENP02, ambos da espécie *Heterorhabditis amazonensis* apresentaram os maiores níveis de eficiência no controle de *D. maidis*, promovendo taxas de mortalidade de 80,0% e 76,0%, respectivamente. Quanto à concentração, os maiores percentuais de mortalidade foram observados nas doses de 125, 100 e 75 JIs/cm², com mortalidades de 80,0%, 72,0% e 74,0%, respectivamente. No ensaio de tempo letal, os valores estimados de LT₅₀ para os isolados UENP02 e UENP06 foram de aproximadamente 72 horas e entre 72 e 80 horas, respectivamente, evidenciando ação relativamente rápida sobre adultos de *D. maidis*. Para o LT₉₀, não foi possível estimar o valor dentro do período experimental de 168 horas, uma vez que nenhum dos isolados atingiu 90% de mortalidade acumulada no intervalo avaliado. Esses resultados indicam

diferenças na dinâmica de infecção entre os isolados, com maior velocidade inicial para o UENP02 e maior mortalidade final acumulada para o UENP06.

Palavras-chave: Controle Biológico, Cigarrinha-do-milho, NEPs; *Heterorhabditis*; *Steinernema*.

3.2 ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate, under laboratory conditions, the efficiency of EPN isolates in the control of adults of *D. maidis*, as well as to select the most virulent isolates, determine the lethal concentration of application and estimate the lethal time necessary to cause mortality in the target population. For the selection test, eleven NEP isolates belonging to the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* were evaluated, applied to adults of the corn leafhopper in Petri dishes, under controlled conditions of temperature and photoperiod. From the selection of the most promising isolates, assays were conducted to determine the lethal concentration, testing the concentrations of 0, 25, 50, 75, 100 and 125 infecting juveniles (IJs) per cm². Additionally, the lethal time (LT₅₀ and LT₉₀) was determined, in order to evaluate the speed of action of the selected isolates over a seven-day experimental period. The results obtained indicated that the isolates UENP06 and UENP02, both of the species *Heterorhabditis amazonensis*, presented the highest levels of efficiency in the control of *D. maidis*, promoting mortality rates of 80.0% and 76.0%, respectively. Regarding concentration, the highest mortality percentages were observed at doses of 125, 100 and 75 IJs/cm², with mortalities of 80.0%, 72.0% and 74.0%, respectively. In the lethal time assay, the estimated values of LT₅₀ for the isolates UENP02 and UENP06 were approximately 72 hours and between 72 and 80 hours, respectively, showing a relatively rapid action on adults of *D. maidis*. For the LT₉₀, it was not possible to estimate the value within the experimental period of 168 hours, since none of the isolates reached 90% of accumulated mortality in the evaluated interval. These results indicate differences in the dynamics of infection among the isolates, with higher initial velocity for UENP02 and higher cumulative final mortality for UENP06.

Keywords: Biological Control, Corn leafhopper, NEPs; *Heterorhabditis*; *Steinernema*.

3.2 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) está entre as culturas agrícolas mais importantes do mundo, desempenhando papel essencial na alimentação humana e animal, além de ampla aplicação industrial. No Brasil, a relevância econômica da cultura é expressiva, porém sua produtividade é freqüentemente comprometida por doenças e pragas, destacando-se o complexo de enfezamentos do milho (CEM), responsável por perdas severas em diferentes regiões produtoras (OLIVEIRA; FRIZZAS, 2021; SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020).

O complexo de enfezamentos está associado à infecção por molícutes e vírus transmitidos pela cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae), reconhecida como o principal vetor desses patógenos no Brasil. Além dos danos diretos decorrentes da sucção de seiva, a elevada eficiência desse inseto na transmissão dos agentes causais do complexo de enfezamentos do milho favorece a rápida disseminação da doença, sendo que populações relativamente baixas já são suficientes para desencadear surtos epidêmicos na cultura (OLIVEIRA; LOPES; NAULT, 2013; OLIVEIRA; FRIZZAS, 2021).

O manejo de *D. maidis* baseia-se predominantemente no uso de inseticidas químicos. Contudo, essa estratégia apresenta limitações importantes, incluindo a necessidade de aplicações frequentes, impactos sobre organismos não alvos, riscos ambientais e à saúde humana, além da possibilidade de seleção de populações resistentes. Nesse contexto, o desenvolvimento de alternativas sustentáveis de controle torna-se fundamental para fortalecer programas de manejo integrado de pragas (MIP) na cultura do milho (WAQUIL, 2004; SABATO; OLIVEIRA, 2017).

Os nematóides entomopatogênicos (NEPs) destacam-se como agentes promissores de controle biológico, caracterizados por sua associação mutualística com bactérias simbiontes dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, que conferem elevada virulência e rápida mortalidade aos

insetos hospedeiros. A utilização desses organismos tem sido amplamente investigada como alternativa ambientalmente segura para o controle de insetos-praga de diferentes ordens, contribuindo para a redução da dependência de inseticidas químicos (GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005; PETERS; FERRAZ; RIBEIRO, 2017).

Apesar do uso consolidado de NEPs no controle biológico de pragas agrícolas de solo, especialmente em culturas como citros, hortaliças, cana-de-açúcar e gramados, sua aplicação contra *Dalbulus maidis* ainda é pouco explorada. Estudos recentes indicam o potencial patogênico desses organismos sobre a cigarrinha-do-milho. Avaliações laboratoriais demonstraram que diferentes isolados de NEPs podem causar níveis expressivos de mortalidade em *D. maidis*, evidenciando seu potencial para o controle biológico dessa espécie (OLIVEIRA, 2024). Entretanto, embora a identificação de isolados virulentos constitua etapa fundamental para o desenvolvimento de estratégias consistentes de controle biológico, ainda existem lacunas quanto à eficiência comparativa entre diferentes isolados de NEPs no controle de *D. maidis*, bem como sobre os parâmetros biológicos que influenciam sua eficácia (GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005; SHAPIRO-ILAN; LEWIS, 2024).

Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar a suscetibilidade de adultos de *D. maidis* à diferentes isolados de NEPs, bem como determinar a concentração eficaz de aplicação e o tempo necessário para causar mortalidade na população-alvo, com a finalidade de identificar isolados promissores para aplicação no manejo integrado da cigarrinha-do-milho.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Criação de Insetos

Para a realização dos bioensaios, foi necessária a criação e manutenção, sob condições controladas, dos insetos utilizados nos experimentos. Foram produzidas colônias da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis*, utilizada nos ensaios de avaliação da patogenicidade dos NEPs, bem como de *Galleria mellonella* L. 1758 (Lepidoptera: Pyralidae), empregada para a multiplicação *in vivo* e manutenção dos isolados de nematóides. A criação de ambas as espécies seguiu metodologias consolidadas, descritas a seguir.

3.3.1.1 Criação de *Dalbulus maidis*

Os espécimes de *D. maidis* que foram utilizados neste estudo são de colônias formadas a partir de indivíduos criados pelo laboratório de Entomologia do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR/Emater (IDR-Paraná) em Londrina, PR, e mantidas em plantas de milho sob condições de casa-de-vegetação (Figura 3.1).

Figura 3.1. Criação de *Dalbulus maidis* em caixas adaptadas e mantidas sob condições de casa-de-vegetação pelo laboratório de Entomologia do IDR-Paraná, em Londrina, PR.



3.3.1.2 Criação e Manutenção de *Galleria mellonella*

As larvas de *Galleria mellonella* utilizadas neste estudo foram provenientes de colônias mantidas em laboratório no IDR-Paraná, em Londrina, PR, sob temperatura ambiente, sendo alimentadas com dieta artificial adaptada de Parra (1998). Os adultos foram mantidos em recipientes de vidro com tampa plástica perfurada, contendo papel cartão disposto em forma de sanfona como substrato para oviposição. As posturas foram coletadas periodicamente e transferidas para recipientes contendo dieta artificial e fragmentos de favo de abelha para alimentação das larvas recém-eclodidas, as quais foram mantidas até atingirem o estágio adequado para utilização nos bioensaios.

3.3.2 Nematoides entomopatogênicos (NEPs)

Os isolados de NEPs utilizados neste estudo foram obtidos junto ao laboratório de Ensaio com Inimigos Naturais de Pragas (LabINP), da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), localizado em Cornélio Procopio, PR.

Para a manutenção e multiplicação dos NEPs, os isolados foram reproduzidos pelo método *in vivo*, conforme descrito por Molina e Lopez (2001), utilizando larvas de último ínstar de *Galleria mellonella*. Após a confirmação da infecção, as larvas foram transferidas para câmara seca e mantidas em câmara de germinação a 25 ± 1 °C, por um período de cinco dias. Em seguida, as larvas foram acondicionadas em armadilhas de White (WHITE, 1927) para a coleta dos juvenis infectantes (JIs), os quais permaneceram sob as mesmas condições até o uso nos ensaios.

3.3.3 Seleção de Isolados de NEPs para controle de *Dalbulus maidis*

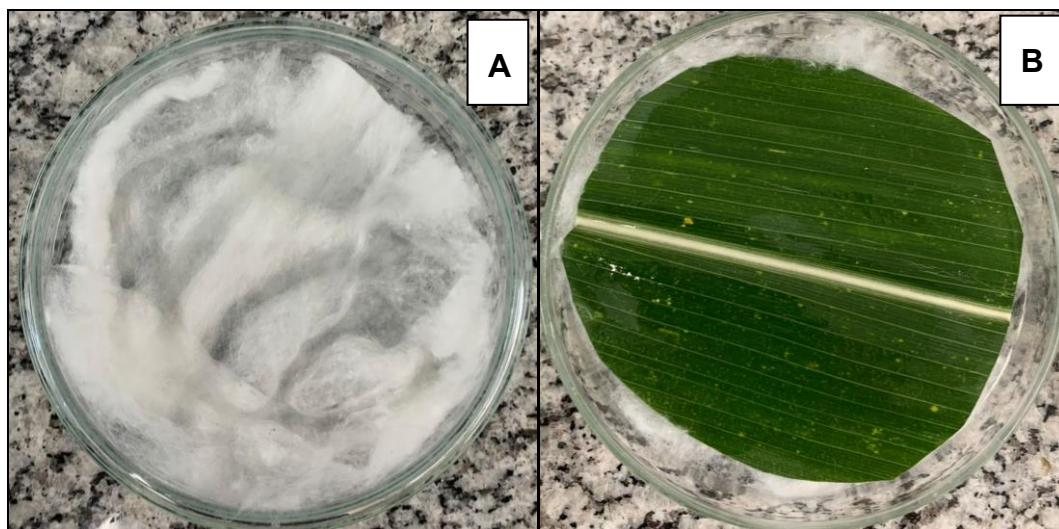
Isolados de NEPs dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* foram multiplicados pelo método *in vivo*, conforme descrito anteriormente, e armazenados em suspensão aquosa com aeração por um período máximo de uma semana antes de serem utilizados nos ensaios. Foram avaliados 11 isolados, originalmente coletados em diferentes municípios do estado do Paraná e de outros estados brasileiros, e também em outros países (Tabela 3.1).

Tabela 3.1.1 Relação de isolados e local de origem dos NEPs utilizados na seleção para controle de *Dalbulus maidis* sob condições de laboratório.

Gênero/Espécie	Isolado	Local de Origem
<i>Heterorhabditis</i> sp.	NEPET 11	Palmeira das Missões, RS, Brasil
<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	UENP 02	Ribeirão Claro, PR, Brasil
<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	UENP 06	Ribeirão Claro, PR, Brasil
<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	MC 01	Monte Carmelo, MG, Brasil
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	HB	Nova Jersey, EUA
<i>Steinernema carpocapsae</i>	IBCB 02	Florida, EUA
<i>Heterorhabditis</i> sp.	UENP 03	Ribeirão Claro, PR, Brasil
<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	UEL 07	Londrina, PR, Brasil
<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	UEL 08	Londrina, PR, Brasil
<i>Steinernema feltiae</i>	IBCB- n 47	Alemanha, DE
<i>Steinernema carpocapsae</i>	All	Florida, EUA

Cada isolado de NEP foi considerado um tratamento e os experimentos foram conduzidos com cinco repetições, utilizando placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Cada placa continha uma camada de algodão autoclavado e umedecido com água destilada, sobre a qual foi colocada uma folha de milho cortada. Isso foi feito para manter a folha de milho túrgida e permitir a alimentação da cigarrinha. Em cada placa, foram adicionados dez insetos adultos (Figura 3.2).

Figura 3.2. Montagem de ensaio para avaliação de NEPs no controle da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis*. A, Placas de Petri com algodão autoclavado e umedecido com água destilada; e B, folha de milho cortada em círculo e depositada sobre algodão úmido.



A inoculação dos NEPs foi realizada, com auxílio de micropipeta, na concentração de 100 Juvenis Infectantes (JIs)/cm², em suspensão em água destilada. O ensaio também incluiu um tratamento controle, no qual foi aplicada somente água destilada. As parcelas foram vedadas com filme plástico e armazenadas em câmara de germinação a 24 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias, os tratamentos foram avaliados, e a mortalidade dos insetos foi confirmada por dissecação.

Ao final do ensaio, os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade. Sendo os pressupostos atendidos, as médias foram comparadas pelo teste de Skott-Knott, utilizando o programa estatístico SISVAR ($P \leq 5\%$) (FERREIRA, 2011).

3.3.4 Avaliação da atividade de diferentes concentrações de JIs de NEPs sobre *Dalbulus maidis*

A metodologia utilizada para avaliar a atividade de diferentes concentrações de JIs foi a mesma empregada no experimento de seleção de isolados de NEPs. Foram utilizados adultos de *D. maidis* e os dois isolados de NEPs que apresentaram maiores eficiências no teste de seleção, UENP02 e UENP06. Esses dois NEPs foram avaliados nas concentrações de 0, 25, 50, 75, 100 e 125 (JIs)/cm².

Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). Esta análise teve por objetivo estimar a concentração letal máxima a partir da equação de regressão derivada, determinando o valor desejado no intervalo avaliado.

3.3.5 Determinação do tempo letal (LT₅₀ e LT₉₀) de nematóides entomopatogênicos (NEPs) sobre *Dalbulus maidis*

A determinação do tempo letal (LT₅₀ e LT₉₀) dos NEPs foi realizada utilizando a mesma metodologia empregada no experimento de seleção de isolados, com adaptações no período e na frequência das avaliações. Foram utilizados adultos de *D. maidis* e os dois isolados de NEPs que apresentaram maior eficiência no ensaio de seleção, UENP02 e UENP06.

Os bioensaios foram conduzidos em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo algodão autoclavado e umedecido com água destilada, sobre o qual foi disposta uma folha de milho recortada, a fim de manter o material vegetal túrgido para permitir a alimentação dos insetos. Em cada placa foram colocados dez adultos de *D. maidis*, sendo cada isolado considerado um tratamento, com cinco repetições.

A inoculação dos nematóides foi realizada com auxílio de micropipeta, utilizando a concentração de 100 JIs/cm², previamente definida como eficiente. O tratamento controle consistiu na aplicação exclusiva de água destilada. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara de germinação a 24 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente, durante sete dias, correspondendo aos intervalos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a inoculação. Em cada período de avaliação, os insetos mortos foram contabilizados, sendo a mortalidade confirmada por dissecação sob microscópio estereoscópico, para verificação da presença de nematóides no interior do corpo dos insetos.

Os dados de mortalidade acumulada ao longo do tempo foram submetidos à análise de regressão para estimativa dos tempos letais LT_{50} e LT_{90} , utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). As estimativas foram obtidas a partir das equações de regressão ajustadas, considerando o intervalo de tempo avaliado.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Seleção de Isolados de NEPs

Os onze isolados de NEPs avaliados apresentaram patogenicidade contra *D. maidis*, porém com diferenças marcantes no desempenho entre os tratamentos. Os isolados UENP 06 e UENP 02 se destacaram significativamente, promovendo mortalidades de 80,0% e 76,0%, respectivamente (Tabela 3.2). A ação dos NEPs sobre adultos da cigarrinha-do-milho pode ser observada na Figura 3.3. Esses valores foram substancialmente superiores aos observados para os demais isolados de NEPs (Tabela 3.2). Em contraste, os isolados IBCB-n 47 e ALL pertencentes ao gênero *Steinernema* apresentaram os menores níveis de mortalidade de adultos da cigarrinha-do-milho *D. maidis*, com valores iguais ou inferiores a 10,0% (Tabela 3.2). Esses resultados evidenciam variações expressivas na suscetibilidade da cigarrinha aos diferentes isolados e gêneros de NEPs.

Tabela 3.2. Porcentagem de mortalidade de indivíduos adultos de *Dalbulus maidis* causada por diferentes isolados de nematóides entomopatogênicos.

Isolado	Gênero/Espécie	Mortalidade (%)
UENP 06	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	80.0 ± 12,2 a*
UENP 02	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	76.0 ± 11,4 a
MC 01	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	54.0 ± 11,4 b
UENP 03	<i>Heterorhabditis</i> sp.	54.0 ± 11,4 b
UEL 08	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	32.0 ± 8,3 c
HB	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	24.0 ± 16,7 c
IBCB 02	<i>Steinernema carpocapsae</i>	18.0 ± 13,0 d
UEL 07	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	16.0 ± 8,9 d
IBCB- n 47	<i>Steinernema feltiae</i>	10.0 ± 10,0 e
All	<i>Steinernema carpocapsae</i>	10.0 ± 7,0 e

NEPET 11	<i>Heterorhabditis sp.</i>	8.0 ± 8,3 e
Controle		0.0 ± 0,0 e
C.V		28,78%

*Médias (± EPM) seguidas pela mesma letra minúscula não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

Figura 3.3. Adultos de *Dalbulus maidis* mortos por nematóides entomopatogênicos (NEPs). A, *H. amazonensis* UENP 02; e B, *H. amazonensis* UENP 06.



A maior eficiência dos isolados UENP 02 e UENP 06 em causar mortalidade de adultos de *Dalbulus maidis*, ambos pertencentes à espécie *Heterorhabditis amazonensis*, está em concordância com estudos que demonstram elevada virulência dessa espécie contra insetos hemípteros. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira (2024), que avaliou diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos em *D. maidis* e verificou elevadas taxas de mortalidade associadas aos isolados UENP2 e UENP6, com valores de 78,68% e 65,53%, respectivamente. Apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos no referido estudo,

esses isolados figuraram entre os mais promissores, corroborando os resultados do presente trabalho.

Cecconello et al. (2022) observaram que isolados de *Heterorhabditis amazonensis* causaram elevada mortalidade em adultos de *Euschistus heros*, reforçando o potencial dessa espécie de nematoide entomopatogênico para o controle de insetos sugadores. Esse padrão também foi observado no presente estudo, no qual os isolados pertencentes ao gênero *Heterorhabditis*, especialmente UENP 02 e UENP 06, apresentaram maior eficiência no controle de *Dalbulus maidis*. O desempenho superior desses isolados pode estar relacionado a características biológicas intrínsecas à espécie *H. amazonensis*, uma vez que juvenis infectantes (JIs) desse gênero são, em geral, menores e mais ativos no deslocamento quando comparados a algumas espécies de *Steinernema*, o que pode favorecer a penetração em hospedeiros de pequeno porte, como a cigarrinha-do-milho. Estudos morfológicos e ecológicos indicam que o tamanho corporal e o comportamento de busca do hospedeiro influenciam diretamente a eficiência de infecção pelos NEPs (KAYA; GAUGLER, 1993; GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005).

Outro fator relevante é a origem geográfica dos isolados. Os isolados UENP 02 e UENP 06 são nativos do estado do Paraná, tendo sido coletados em condições edafoclimáticas semelhantes às do ambiente de aplicação. A utilização de nematóides nativos tem sido amplamente recomendada em programas de controle biológico, pois esses organismos tendem a apresentar maior adaptação às condições ambientais locais e melhor compatibilidade com as populações de insetos hospedeiros presentes na região (DOLINSKI; MOINO JR., 2005; EHLERS, 2001). Essa adaptação ecológica pode contribuir para maior sobrevivência, persistência e eficiência de infecção sob condições de campo.

Além disso, a elevada mortalidade observada reforça a capacidade de *H. amazonensis* em infectar insetos de diferentes ordens. Trabalhos anteriores demonstraram a suscetibilidade de diversos artrópodes à essa espécie, incluindo *Galleria mellonella*, *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) e *Dichelops*

melacanthus (Dallas, 1851), indicando amplo espectro de ação (GUIDE et al., 2019). A confirmação da patogenicidade sobre *D. maidis* amplia o conhecimento sobre o potencial de aplicação desses nematóides no manejo de pragas associadas à cultura do milho.

3.4.2 Eficiência de diferentes concentrações de juvenis infectantes (JIs) de NEPs na mortalidade de *D. maidis*

A mortalidade de *D. maidis* aumentou progressivamente com o incremento da concentração de JIs para ambos os isolados de NEPs avaliados, evidenciando resposta dependente da dose. As maiores mortalidades foram observadas nas concentrações de 125, 100 e 75 JIs cm⁻², variando entre 72% e 80%, sem diferenças significativas entre os isolados UENP02 e UENP06 nessas faixas de concentrações. Em contraste, a redução da concentração para 50 e 25 JIs cm⁻² resultou em queda significativa da mortalidade de adultos de *D. maidis*, que atingiu valores entre 40% e 60% (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Mortalidade de adultos de *Dalbulus maidis* causada pelos nematóides entomopatogênicos (NEPs) UENP 02 e UENP 06 sob diferentes concentrações juvenis infectantes (JIs).

Concentração (JIs cm ⁻²)	Isolado	
	UENP02	UENP06
125	80,0 ± 7,0 ^a Aa ^b	80,0 ± 7,0 Aa
100	74,0 ± 11,4 Aa	72,0 ± 10,9 Aa
75	72,0 ± 5,4 Aa	74,0 ± 8,3 Aa
50	58,0 ± 8,3 Ba	60,0 ± 10,0 Aa
25	40,0 ± 7,0 Ba	44,0 ± 11,4 Ba
0	0,0 ± 0,0 Ba	0,0 ± 0,0 Ba
CV	13,02	

*Médias (± EPM) seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula nas linhas não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott com p≤0,05.

Esses resultados sugerem a existência de um limiar de concentração a partir do qual a eficiência de infecção pelos NEPs se estabiliza. A ausência de diferenças significativas entre as concentrações de 75 a 125 Jls cm⁻² indica que níveis intermediários podem ser suficientes para alcançar resultados elevados de controle. Esta informação tem implicações práticas para a otimização do uso desses agentes de controle biológico em programas de manejo de pragas agrícolas.

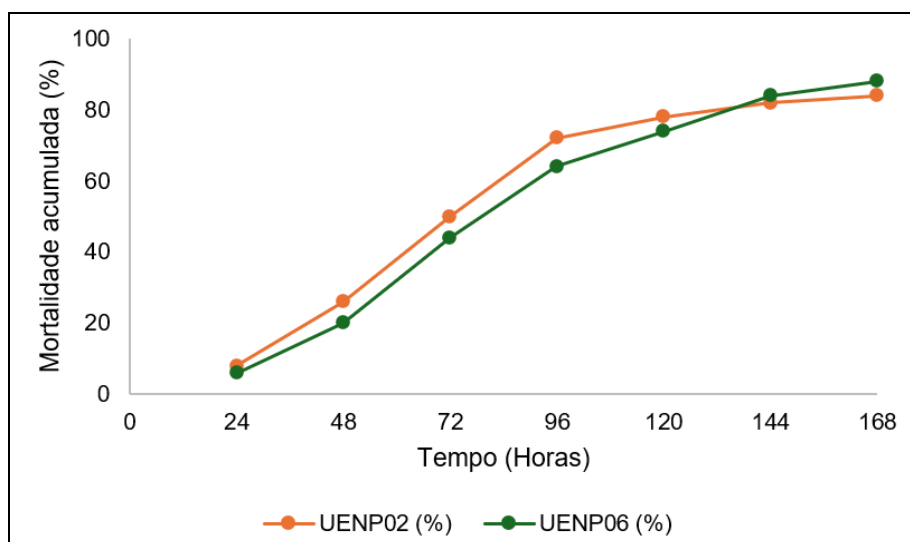
Resultados semelhantes de resposta dose-dependente têm sido reportados em estudos com diferentes espécies de NEPs e hospedeiros. Estudos conduzidos com *Heterorhabditis* spp. e *Steinernema* spp. demonstraram que o aumento da concentração de Jls geralmente eleva a probabilidade de contato e penetração no hospedeiro, resultando em maior mortalidade de insetos-alvo (GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005). Em experimentos laboratoriais com diferentes insetos-alvo, concentrações variando de dezenas a centenas de Jls por unidade experimental têm sido utilizadas para estimar curvas dose-resposta e parâmetros de virulência, evidenciando ampla variação na suscetibilidade entre hospedeiros e isolados (BÜTÜNER et al., 2024).

É importante ressaltar que a concentração ideal de aplicação é específica para cada isolado de NEP e sistema patógeno-hospedeiro. Diferenças genéticas entre isolados de NEPs influenciam a virulência, o comportamento de busca e a capacidade de penetração, resultando em variações nos parâmetros de concentração associados à mortalidade (DOLINSKI; MOINO JR., 2005; GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005). Dessa forma, a determinação experimental da concentração eficaz constitui etapa essencial para o desenvolvimento de protocolos de aplicação adequados para cada NEP.

3.4.3 Determinação do tempo letal (LT_{50} e LT_{90}) de nematóides entomopatogênicos sobre *Dalbulus maidis*

A mortalidade acumulada de adultos de *D. maidis* aumentou progressivamente ao longo do período experimental para ambos os isolados de NEPs avaliados (Figura 3.4).

Figura 3.2. Mortalidade acumulada (%) de adultos de *Dalbulus maidis* submetidos aos isolados UENP02 e UENP06 de nematoides entomopatogênicos ao longo de 168 horas após a inoculação



Nas primeiras 72 horas após a inoculação, observou-se incremento gradual na mortalidade, sendo que o isolado UENP02 atingiu 50% de mortalidade, enquanto o isolado UENP06 apresentou 44% no mesmo período, sem diferença significativa entre os tratamentos.

Em 96 horas após a inoculação, o isolado UENP02 apresentou 72% de mortalidade, enquanto o isolado UENP06 apresentou 64%, não sendo observada diferença significativa entre os isolados. Esses resultados indicam comportamento semelhante quanto à velocidade inicial de infecção.

Entretanto, a partir de 144 horas, o comportamento dos isolados apresentou inversão. O UENP06 apresentou 84% de mortalidade, superando o UENP02 que causou mortalidade de 82% de adultos de *D. maidis*. Ao final do período experimental (168 horas), o UENP06 atingiu 88% de mortalidade acumulada, enquanto o UENP02 apresentou 84%, evidenciando maior persistência e capacidade de infecção tardia do UENP06. Cabe salientar que nenhum dos isolados atingiu 90% de mortalidade dentro do período avaliado, não sendo possível estimar o LT_{90} no intervalo experimental considerado.

Com base na progressão da mortalidade acumulada, estima-se que o LT_{50} do isolado UENP02 ocorreu aproximadamente em 72 horas, enquanto para o UENP06 foi estimado entre 72 e 80 horas após a inoculação.

3.5 CONCLUSÕES

Os nematoides entomopatogênicos apresentam potencial para o controle de *D. maidis*, com destaque para os isolados UENP02 e UENP06, ambos da espécie *H. amazonensis*, que promoveram as maiores taxas de mortalidade entre os tratamentos avaliados, atingindo $80,0\% \pm 12,2$ (UENP 06) e $76,0\% \pm 11,4$ (UENP 02) de mortalidade de adultos, diferindo estatisticamente dos demais isolados testados.

A mortalidade aumentou com o incremento da concentração de juvenis infectantes, sendo que as maiores eficiências de controle foram observadas nas concentrações de 75, 100 e 125 Jls cm^{-2} , nas quais a mortalidade variou entre 72% e 80% para ambos os isolados. Nessas concentrações não houve diferenças estatísticas entre o UENP 02 e o UENP 06, indicando que doses a partir de 75 Jls cm^{-2} são suficientes para alcançar elevados níveis de controle.

Quanto ao tempo letal, ambos os isolados apresentaram ação em curto período, com LT_{50} estimado em aproximadamente 72 horas para o UENP02 e entre 72 e 80 horas para o UENP06, evidenciando eficiência na infecção e mortalidade de adultos de *D. maidis*.

De forma geral, os isolados UENP02 e UENP06 mostram-se promissores para o controle biológico de *D. maidis*, representando alternativa sustentável para o manejo dessa praga na cultura do milho.

4 Artigo B - PRODUÇÃO *IN VIVO* E ALTERNATIVAS DE MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DOS ISOLADOS DE *Heterorhabditis amazonensis* UENP02 e UENP06

4.1 RESUMO

A cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*) é o principal vetor dos agentes etiológicos do complexo de enfezamentos do milho, causando perdas expressivas na produtividade da cultura. A viabilização do uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) depende do desenvolvimento de sistemas eficientes de produção. Assim, o presente estudo teve como objetivo comparar a produção *in vivo* dos isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* e avaliar alternativas nutricionais para produção *in vitro* em meio semissólido. Na produção *in vivo*, larvas de último instar de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* foram inoculadas com 100 JIs cm⁻² e mantidas a 25 ± 1 °C, no escuro. Após três dias, os cadáveres foram transferidos para armadilhas de White, e a emergência de juvenis infectivos (JIs) foi monitorada por 15 dias. Na produção *in vitro*, os isolados foram cultivados em meio semissólido contendo diferentes fontes lipídicas e proteicas. Foram inoculados 1.000 JIs por frasco, com incubação a 25 °C sob agitação de 180 rpm por 15 dias. A produção foi determinada por contagem direta e os dados submetidos à análise de variância e teste de Scott-Knott. Na produção *in vivo*, ambos os isolados apresentaram maior multiplicação em *G. mellonella*, com destaque para o isolado UENP06, que atingiu 5,51 × 10⁵ JIs g⁻¹. Na produção *in vitro*, gema de ovo em pó, farinha de soja e farinha de tenébrio proporcionaram os maiores rendimentos. A infectividade dos juvenis produzidos *in vitro* manteve-se elevada (>84% de mortalidade em *G. mellonella*).

Palavras-chave: Nematóides entomopatogênicos; produção *in vivo*; produção *in vitro*; fontes nutricionais; *Heterorhabditis amazonensis*.

4.2 ABSTRACT

The corn leafhopper (*Dalbulus maidis*) is the main vector of the etiological agents of the corn stunt complex, causing significant losses in crop yield. The feasibility of the use of entomopathogenic nematodes (NEPs) depends on the development of efficient production systems. Thus, the present study aimed to compare the *in vivo* production of UENP02 and UENP06 isolates of *Heterorhabditis amazonensis* and to evaluate nutritional alternatives for *in vitro* production in semi-solid medium. In *vivo* production, larvae of last instar of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* were inoculated with 100 IJs cm⁻² and kept at 25 ± 1 °C in the dark. After three days, the cadavers were transferred to White's traps, and the emergence of juvenile infective animals (IJJs) was monitored for 15 days. In *vitro* production, the isolates were cultured in semi-solid medium containing different lipid and protein sources. 1,000 IJs were inoculated per vial, incubated at 25 °C under 180 rpm shaking for 15 days. The production was determined by direct counting and the data submitted to analysis of variance and Scott-Knott test. In *vivo* production, both isolates showed higher multiplication in *G. mellonella*, especially the isolate UENP06, which reached 5.51 × 10⁵ IJs g⁻¹. In *vitro* production, egg yolk powder, soybean flour and mealworm flour provided the highest yields. The infectivity of juveniles produced *in vitro* remained high (>84% mortality in *G. mellonella*).

Keywords: Entomopathogenic nematodes; *in vivo* production; *in vitro* production; nutritional sources; *Heterorhabditis amazonensis*.

INTRODUÇÃO

A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) é atualmente considerada um dos principais insetos-praga associados à cultura do milho na América Latina, por ser vetor de patógenos responsáveis pelo complexo de enfezamentos. A transmissão de *Spiroplasma kunkelii*, ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ e do vírus da risca do milho *Maize rayado fino vírus* (MRFV) compromete severamente o desenvolvimento das plantas de milho, reduzindo a produtividade e causando perdas econômicas expressivas para a cultura em diversas áreas produtoras (FANTIN et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2004). Diante das limitações do controle químico e dos riscos associados ao seu uso intensivo, o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo tem se tornado prioridade em sistemas agrícolas modernos.

Nesse contexto, os nematóides entomopatogênicos (NEPs), pertencentes principalmente aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, destacam-se como agentes promissores de controle biológico. Esses organismos atuam em associação simbiótica com bactérias entomopatogênicas e apresentam elevada virulência contra diversos insetos-praga. Estudos recentes demonstraram que isolados de *Heterorhabditis amazonensis*, incluindo UENP02 e UENP06, apresentam alta patogenicidade contra adultos de *D. maidis*, alcançando mortalidades superiores a 75% em condições laboratoriais (Artigo A). Esses resultados evidenciam o potencial da espécie para integrar programas de manejo biológico da cigarrinha-do-milho.

Apesar do potencial dos NEPs, sua adoção em larga escala depende diretamente do desenvolvimento de sistemas eficientes de produção. A produção de nematóides pode ser realizada por métodos *in vivo* ou *in vitro*, cada um com vantagens e limitações específicas. A produção *in vivo*, baseada na multiplicação dos nematóides em larvas de insetos hospedeiros suscetíveis, é amplamente utilizada em pesquisas laboratoriais devido à sua simplicidade e alta qualidade biológica dos juvenis infectantes produzidos. Espécies como

Galleria mellonella e *Tenebrio molitor* são frequentemente empregadas por apresentarem elevada suscetibilidade à infecção, facilidade de criação e boa produtividade de nematóides. Entretanto, a produção *in vivo* apresenta limitações quanto à escalabilidade, custos de mão de obra e padronizações do processo (SHAPIRO-ILAN et al., 2016; GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005).

Para viabilizar a produção em larga escala, métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos com base em meios artificiais sólidos, semissólidos ou líquidos. A produção em meio semissólido representa uma alternativa intermediária entre os sistemas artesanais e a fermentação líquida industrial, permitindo maior controle das condições nutricionais e microbiológicas. Estudos indicam que a composição do meio de cultura, especialmente as fontes de proteína e lipídios, influencia diretamente o crescimento bacteriano e a multiplicação dos nematóides (DONEZE, 2022; PETERS; FERRAZ; RIBEIRO, 2017). Já a fermentação líquida em biorreatores constitui o método mais avançado para produção comercial de NEPs, possibilitando alta produtividade e padronização, embora exija maior complexidade tecnológica (EHLERS, 2001; PETERS; FERRAZ; RIBEIRO, 2017).

Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção *in vivo* de *H. amazonensis* UENP02 e UENP06 em diferentes insetos hospedeiros e investigar alternativas de meios de cultura para produção *in vitro*, visando estabelecer protocolos eficientes para multiplicação desses isolados de NEPs com potencial aplicação no controle biológico da cigarrinha-do-milho.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Criação de Insetos Visando a Produção *In Vivo* de NEPs

4.3.1.1 Criação e Manutenção de *Galleria mellonella*

As lagartas de *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de colônia mantida em laboratório, sob temperatura ambiente, e alimentadas com dieta artificial adaptada de Parra (1998) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Ingredientes e quantidades utilizadas na dieta artificial para criação de *Galleria mellonella*.

Ingrediente	Quantidade
Farinha de trigo	200 g
Farelo de trigo	200 g
Leite em pó	400 g
Levedo de cerveja	120 g
Gérmen de trigo	200 g
Mel	240 g
Glicerina	130 g

Fonte: Parra (1998, p. 1022).

Os adultos de *G. mellonella* foram mantidos em potes de vidro com capacidade para três litros, fechados com tampa plástica perfurada para permitir ventilação. No interior dos recipientes foi inserido papel cartão dobrado em forma de sanfona, utilizado como substrato para oviposição pelas fêmeas.

As posturas foram coletadas em dias alternados e transferidas para potes de vidro contendo dieta artificial e fragmentos de favo de abelha, utilizados como fonte alimentar para as larvas recém-eclodidas. As larvas

permaneceram nessas condições até atingirem o estágio adequado para utilização nos bioensaios.

4.3.1.2 Criação e Manutenção de *Tenebrio molitor*

As lagartas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) utilizadas neste estudo foram provenientes de colônia mantida em laboratório, sob temperatura ambiente, e criadas em recipientes plásticos adequadamente ventilados. As larvas foram alimentadas com substrato à base de farinha de rosca e pão seco triturado, utilizados como fonte de carboidratos. Como complemento nutricional e fonte de umidade, foram adicionados periodicamente pedaços de batata ou cenoura *in natura*, previamente higienizados, os quais foram substituídos a cada dois a três dias para evitar fermentação e crescimento microbiano.

A manutenção da colônia foi realizada semanalmente, com a reposição do alimento seco e a remoção de resíduos. Pupas e adultos foram separados das larvas por peneiramento e transferência manual, com o objetivo de reduzir o canibalismo e garantir a manutenção adequada das diferentes fases de desenvolvimento. Os insetos foram mantidos nessas condições até atingirem o estágio desejado para utilização nos experimentos.

4.3.2 Avaliação da Produção *In Vivo* dos NEPs UENP02 e UENP06

Na avaliação da produção *in vivo* foram utilizados os isolados UENP02 e UENP06 de *H. amazonensis* obtidos junto ao laboratório de Ensaios com Inimigos Naturais de Pragas (LabINP), da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), localizado em Cornélio Procopio, PR. Como hospedeiros dos NEPs, foram utilizadas lagartas de último instar de *G. mellonella* e *T. molitor*. Para cada tratamento, dez larvas foram acondicionadas em placas de Petri de

9 cm de diâmetro contendo duas folhas de papel filtro previamente umedecidas, sendo as larvas pesadas em conjunto antes da inoculação.

Os nematóides foram inoculados na concentração de 100 JIs cm^{-2} , e as placas foram mantidas em câmara de germinação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, por três dias para avaliação da mortalidade e da sintomatologia de infecção. As larvas mortas que apresentaram coloração avermelhada característica da infecção por nematóides entomopatogênicos, ausência de odor putrefativo e exoesqueleto íntegro foram transferidas para placas limpas contendo papel filtro seco, onde permaneceram por cinco dias em câmara seca para completa colonização do hospedeiro.

Após esse período, os cadáveres foram transferidos para armadilhas de White adaptadas, contendo água destilada, para a coleta dos juvenis infectantes emergentes (Figura 4.1). As coletas foram realizadas diariamente, desde o início da emergência até o esgotamento da produção. A quantidade de juvenis infectantes produzidos foi quantificada e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão para determinação da curva de produção e da equação correspondente, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Figura 4.1. A, Placa com larvas de último instar de *Galleria mellonella*; B, cadáveres de *Galleria mellonella*; com sintomas de morte por NEP em câmara seca; e C, cadáveres de *Galleria mellonella*; em armadilha de White adaptada.



4.3.3 Avaliação de Fontes de Gordura na Produção *In Vitro* de NEPs

Para a produção *in vitro* foram utilizados os isolado UENP06 e UENP02 multiplicados em meio semi-sólido (Tabela 4.1). Foram avaliadas duas fontes de gordura (óleo de soja e óleo de milho) e o ensaio foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 120 mL, contendo 30 mL de meio previamente esterilizado. Em seguida, foi adicionado 2% (v/v) da suspensão da bactéria simbiote previamente cultivada em meio TBS suplementado com extrato de levedura (triptona 30 g L⁻¹ e extrato de levedura 3,72 g L⁻¹), incubados por 48 horas até atingirem a concentração de 10 na escala de McFarlande. Os frascos Erlenmeyer contendo o meio+inóculo da bactéria foram então acondicionados em incubadora refrigerada com agitação (Shaker) a 180rpm e a 25°C±1, pelo período de 48 horas para o crescimento das bactérias. Após esse período, foram adicionados 1000 JIs/frasco desinfestados.

Tabela 4.2. Meio de cultura base para avaliação de fonte de gordura. Adaptado de Neira-Monsalve et al. (2019).

Componente	Quantidade
Água destilada	1.000 mL
Glicose	3 g
Extrato de levedura	10 g
Peptona	10 g
Farinha de soja	3 g
Fonte de gordura	30 g
Gema de ovo	6 g
NaCl	4 g
KCl	0,35 g
CaCl ₂	0,3 g
MgSO ₄	0,2 g
FeSO ₄	0,05 g
Agar	2 g

Fonte: Modificado de Neira-Monsalve et al. (2019).

Após a adição dos JIs dos NEPs, os frascos foram mantidos novamente em incubadora refrigerada com agitação a 180 rpm e a 25±1 °C, pelo período

de 15 dias, quando foi realizada a avaliação da produção. Para a contagem dos JIs, foi acrescentado aproximadamente 120 mL de água destilada em cada Erlenmayer, e os frascos foram vigorosamente agitados para diluição do meio e suspensão dos JIs. Em seguida, alíquota de 1 mL foi retirada para realizar a contagem. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado contendo quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de média Scott-Knott utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

4.3.4 Avaliação de Fontes Proteicas na Produção *In Vitro* de NEPs

Para a avaliação de fontes proteicas foi utilizada a mesma metodologia descrita no teste anterior para fontes de gordura, porém sendo empregada somente a fonte de gordura que apresentou o melhor desempenho (óleo de soja ou óleo de milho). Neste experimento, foram testadas seis diferentes fontes de proteína, sendo leite em pó, farinha de tenébrio, farinha de ostra, farinha de soja, farinha de bicho-da-seda e gema de ovo em pó. A produção *in vitro* foi realizada em meio semi-sólido (Tabela 4.3), alterando-se apenas as fontes de proteína.

Tabela 4.1. Meio de cultura base para avaliação de fonte de proteína. Adaptado de Neira-Monsalve et al. (2019).

Componente	Quantidade
Água destilada	1.000 mL
Glicose	3 g
Extrato de levedura	10 g
Peptona	10 g
Fonte de gordura	30 g
Fonte de proteína	10 g
NaCl	4 g
KCl	0,35 g
CaCl ₂	0,3 g
MgSO ₄	0,2 g
FeSO ₄	0,05 g

Agar

2 g

Fonte: Modificado de Neira-Monsalve *et al.* (2019).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, utilizando o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

4.3.5 Avaliação da Infectividade de JIs Produzidos *In Vitro*

A viabilidade dos JIs produzidos pelo método *in vitro* foi realizada com base no teste de infectividade, com cinco repetições. Cada repetição contou com cinco larvas de *G. mellonella* dispostas em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo dois papéis filtros. Os NEPs UENP02 e UENP06 foram inoculados na concentração de 100 JIs/cm². As placas foram mantidas em câmara de germinação a 25±1 °C, no escuro por um período de três dias para a confirmação da mortalidade e sintomas apresentados pelas larvas de *G. mellonella*.

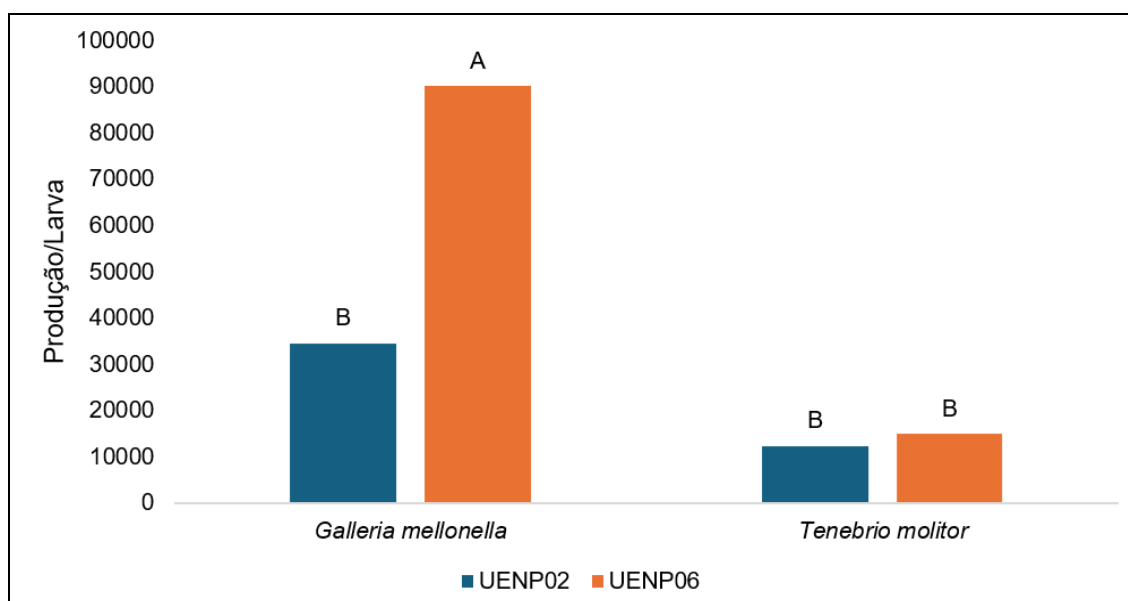
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Produção *In Vivo* dos NEPs UENP02 e UENP06

A avaliação da produção *in vivo* dos isolados UENP02 e UENP06 comprovou que ambos apresentaram capacidade de multiplicação nos dois hospedeiros testados. No entanto, diferenças significativas foram verificadas entre os tratamentos avaliados.

A maior produção de JIs foi registrada para o isolado UENP06 sobre larvas de *G. mellonella*, alcançando $9,01 \times 10^4$ JIs/larva. Esse tratamento diferiu estatisticamente dos demais, enquanto os outros tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 4.2).

Figura 4.2. Comparação da produção *in vivo* de juvenis infectivos (JIs)/larva dos isolados UENP02 e UENP06 (*Heterorhabditis amazonensis*) usando como hospedeiros larvas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*.



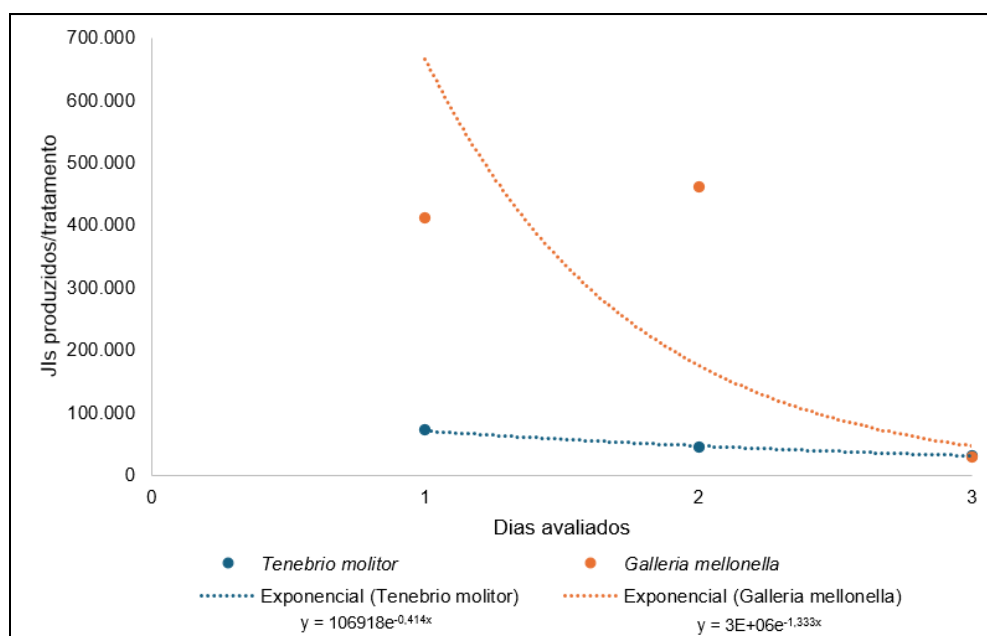
Quando observada a produção do isolado UENP06 nos dois hospedeiros avaliados, evidencia-se maior multiplicação em lagartas de *Galleria mellonella* em comparação às de *Tenebrio molitor*, alcançando valores de $5,51 \times 10^5$ Jls g^{-1} e de $1,91 \times 10^5$ Jls g^{-1} de lagarta, respectivamente. De forma semelhante, o isolado UENP02 também apresentou maior produção em lagartas de *G. mellonella*, com $2,27 \times 10^5$ Jls g^{-1} de lagarta, enquanto em *T. molitor* a produção foi de $1,61 \times 10^5$ Jls g^{-1} de lagarta.

Embora o UENP06 tenha apresentado valores absolutos superiores aos do UENP02, ambos os isolados exibiram o mesmo padrão de desempenho entre os hospedeiros, indicando que a diferença produtiva está fortemente relacionada às características intrínsecas do inseto hospedeiro. larvas de *G. mellonella* apresentam tegumento menos esclerosado e maior proporção de tecido adiposo, além de hemolinfa relativamente abundante quando comparadas as de *T. molitor*, cujo tegumento é mais espesso e mais quitinizado. Essas características podem favorecer tanto a penetração dos juvenis infectivos quanto o desenvolvimento e a multiplicação do complexo nematoide-bactéria no interior do hospedeiro. Além disso, a produção de Jls está diretamente associada à disponibilidade de recursos nutricionais e à eficiência da interação nematoide x hospedeiro (MOLINA; MOINO JUNIOR; CAVALCANTI, 2004).

Estudos clássicos demonstram esse padrão. Molina et al. (2004) observaram maior produção acumulada de NEPs em *G. mellonella* quando comparada à *T. molitor*, destacando que a interação hospedeiro x sistema de infecção influencia diretamente a produtividade. De forma semelhante, Dutky, Thompson e Cantwell (1964) e Woodring e Kaya (1988) relatam que *G. mellonella* é um dos hospedeiros mais eficientes para produção *in vivo* de NEPs, podendo atingir valores superiores a 1×10^5 Jls/lagarta. Embora *T. molitor* seja considerado hospedeiro alternativo viável, sua produção tende a ser inferior ou mais distribuída ao longo do tempo, possivelmente devido à maior resistência estrutural e diferenças na resposta imune.

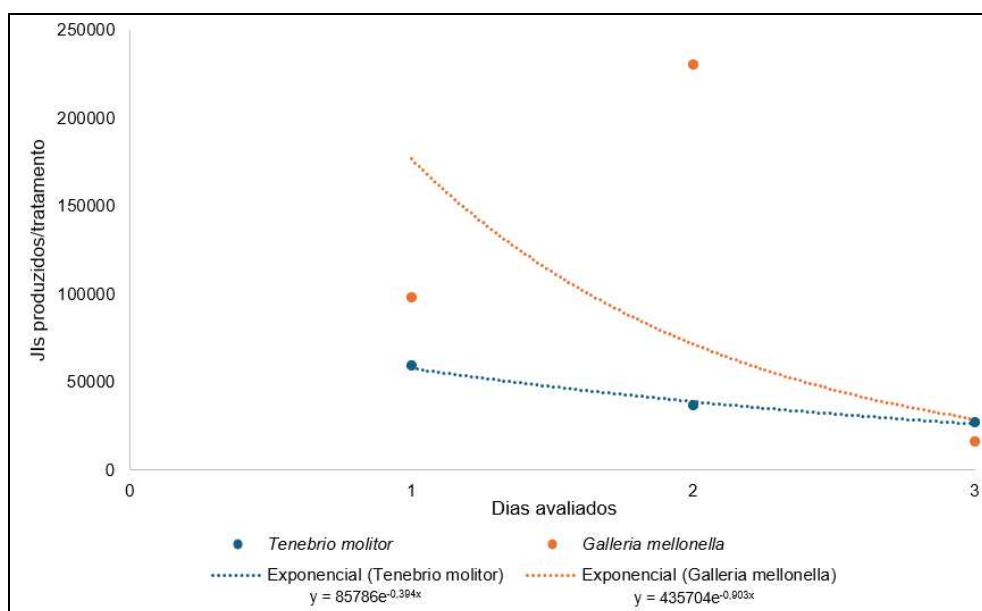
Quanto ao padrão temporal de emergência, foram realizadas três avaliações ao longo dos 15 dias experimentais. Observou-se que, para o isolado UENP06, o pico de produção em *G. mellonella* ocorreu na segunda avaliação (dias 6–10), enquanto em *T. molitor* o pico foi registrado na primeira avaliação (dias 1–5) (Figura 4.3). Esse comportamento indica que, embora lagartas de *G. mellonella* proporcionem maior produção total, o desenvolvimento do nematoide pode apresentar dinâmica temporal distinta entre hospedeiros.

Figura 4.3. Padrão temporal de produção de juvenis infectivos (JIs) do isolado UENP06 em lagartas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* ao longo de três avaliações, compreendendo 15 dias após a inoculação.



Esse mesmo padrão foi observado para o isolado UENP02 (Figura 4.4). Assim, a diferença no momento de pico de produção está mais relacionada às características do hospedeiro do que ao isolado de NEP em si. Semelhante ao verificado para o UENP06, o maior pico produtivo em *G. mellonella* ocorreu na segunda avaliação, aos 6–10 dias, enquanto em lagartas de *Tenebrio molitor* a maior produção concentrou-se na primeira avaliação, entre os dias 1 e 5 após a inoculação.

Figura 4.4 Dinâmica temporal da produção de juvenis infectivos (JIs) do isolado UENP02 em lagartas de *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* ao longo de três avaliações, compreendendo 15 dias após a inoculação.



Entretanto, na terceira avaliação, entre os 11 e 15 dias após a inoculação, observou-se inversão desse comportamento, sendo possível verificar que em lagartas de *T. molitor* a produção foi superior à obtida em lagartas de *G. mellonella*. Esse resultado sugere que, embora lagartas de *G. mellonella* proporcionem maior produção inicial e maior pico produtivo, o esgotamento do hospedeiro ocorre de forma mais precoce. Por outro lado, em lagartas de *T. molitor* a produção tende a ser mais distribuída ao longo do tempo.

4.4.2 Avaliação de Fontes de Gordura para Produção *In Vitro* de NEPs

A produção *in vitro* de JIs foi viável para ambos os isolados avaliados, independentemente da fonte lipídica utilizada, demonstrando que tanto o óleo de soja quanto o óleo de milho forneceram condições nutricionais adequadas para o desenvolvimento dos nematóides. As produções médias variaram de $1,72 \times 10^4$ a $2,66 \times 10^4$ JIs mL⁻¹, com ausência de diferença significativa entre as fontes de gordura dentro de cada isolado. Entretanto, foi observada diferença significativa entre os isolados, com o UENP06 apresentando desempenho produtivo superior ao do UENP02 em todos os tratamentos (Tabela 4.4).

Tabela 4.2. Produção média de juvenis infectantes (JIs mL⁻¹) dos isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* em função da fonte de gordura no cultivo *in vitro*.

Fonte de gordura	Isolado	
	UENP02 (JIs mL ⁻¹)	UENP06 (JIs mL ⁻¹)
Óleo de soja	20.000 ± 1.581 Aa	26.600 ± 4.219 Ab
Óleo de milho	17.200 ± 837 Aa	24.400 ± 2.881 Ab
C.V.	21.61	

*Médias (± EPM) seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

A ausência de diferença entre as fontes lipídicas sugere que ambos os óleos forneceram substratos energéticos suficientes para o crescimento bacteriano e subsequente multiplicação dos nematóides. Lipídios desempenham importância fundamental no metabolismo de NEPs, atuando como reservas energéticas essenciais para o desenvolvimento dos juvenis infectantes. Estudos sobre produção *in vitro* indicam que a composição nutricional do meio influencia diretamente a eficiência produtiva, mas que diferentes fontes lipídicas podem apresentar desempenho semelhante quando

atendem às exigências metabólicas do complexo nematóide-bactéria (EHLERS, 2001; PETERS; FERRAZ; RIBEIRO, 2017).

Resultados comparáveis foram observados por Doneze (2022), ao avaliar a produção *in vitro* do isolado UEL08 de *H. amazonensis* em meio semi-sólido. A autora relatou que variações na composição do meio influenciaram a produtividade, porém diferentes fontes nutricionais foram capazes de sustentar a multiplicação dos nematóides, reforçando que a adequação do balanço nutricional é mais determinante do que a natureza específica do componente lipídico. De forma semelhante, Leite et al. (2016) destacam que a concentração e a qualidade dos nutrientes presentes no meio são fatores críticos para a produção *in vitro*, sendo possível obter produções consistentes com diferentes formulações, desde que as exigências fisiológicas da bactéria simbiote sejam atendidas.

A superioridade produtiva do isolado UENP06 em relação ao UENP02 evidencia a influência de fatores intrínsecos ao isolado na eficiência de multiplicação. Diferenças genéticas podem afetar a interação simbiótica com *Photorhabdus* sp., a taxa de reprodução e a capacidade de conversão de nutrientes em biomassa nematóide. A variabilidade entre isolados de NEPs é um dos principais determinantes do sucesso da produção *in vitro*, mesmo sob condições ambientais idênticas (EHLERS, 2001; GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005).

O elevado fator de multiplicação observado dos NEPs de até 26,6 vezes o inóculo inicial, confirma a eficiência do sistema de cultivo utilizado (Tabela 4.5). Estudos sobre fermentação de NEPs relatam que fatores de multiplicação dessa magnitude são compatíveis com sistemas laboratoriais eficientes e representam etapas essenciais para viabilizar escalonamento produtivo (PETERS; FERRAZ; RIBEIRO, 2017). Embora sistemas industriais possam alcançar densidades superiores, os valores obtidos neste estudo demonstram que o meio avaliado é adequado para a multiplicação experimental de isolados de *H. amazonensis*.

Tabela 4.3. Fator de multiplicação (x vezes) de juvenis infectantes (JIs mL⁻¹) dos isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* em função da fonte de gordura em cultivo *in vitro*, considerando inóculo inicial de 1.000 JIs mL⁻¹.

Fonte de gordura	Isolado	
	UENP02 (x vezes o inóculo)	UENP06 (x vezes o inóculo)
Óleo de soja	20,0 ×	26,6 ×
Óleo de milho	17,2 ×	24,4 ×

Em conjunto, os resultados indicam que a fonte de gordura não foi o principal fator limitante na produção *in vitro*, enquanto a identidade do isolado exerceu influência decisiva sobre o rendimento final. Esses resultados reforçam a importância da seleção de isolados de NEPs com elevado potencial produtivo e da otimização nutricional do meio como etapas complementares no desenvolvimento de protocolos de produção desses organismos.

4.4.3 Avaliação de Fontes Proteicas para Produção *In Vitro* de NEPs

Neste estudo foi utilizado o óleo de soja como fonte lipídica do meio de cultivo. Embora no experimento anterior não tenham sido observadas diferenças significativas entre as fontes de gordura avaliadas, o óleo de soja apresentou tendência a maior produção de JIs. Além do desempenho produtivo ligeiramente superior, essa fonte lipídica apresenta menor custo e maior disponibilidade comercial. Considerando a perspectiva de produção em larga escala, fatores econômicos e logísticos constituem critérios relevantes na definição da formulação do meio de cultura, tornando o óleo de soja uma opção tecnicamente e economicamente mais viável.

Todas as fontes proteicas avaliadas possibilitaram a produção de JIs dos isolados UENP02 e UENP06 de *H. amazonensis* em cultivo *in vitro* (Tabela 4.6). Para o isolado UENP06 foram observadas diferenças significativas entre

as fontes de proteína utilizadas. As maiores produções médias de JIs foram obtidas nos meios contendo gema de ovo em pó, farinha de soja e farinha de tenébrio, acima de $5,0 \times 10^4$ JIs/mL⁻¹, as quais não diferiram significativamente entre si. Os meios de cultivo com farinha de bicho-da-seda e leite em pó apresentaram produção intermediárias, enquanto o meio com farinha de ostra resultou na menor produção, apenas $1,3 \times 10^4$ JIs mL⁻¹ (Tabela 4.6), diferindo significativamente das fontes com melhores desempenhos.

Para o isolado UENP02, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as diferentes fontes proteicas testadas. A produção de JIs variou de $3,28 \times 10^4$ JIs mL⁻¹ no meio contendo farinha de soja a $8,60 \times 10^3$ JIs mL⁻¹ no meio suplementado com farinha de ostra. Apesar da variação numérica entre os tratamentos, todas as fontes proteicas avaliadas foram capazes de sustentar o desenvolvimento e a multiplicação do isolado UENP02 em sistema *in vitro*, não havendo separação estatística entre elas.

Tabela 4.4. Produção média de juvenis infectantes (JIs mL⁻¹) dos isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* em função de diferentes fontes de proteína no cultivo *in vitro*.

Fonte de proteína	Isolado	
	UENP02 (JIs mL ⁻¹)	UENP06 (JIs mL ⁻¹)
Gema de ovo em pó	30.000 ± 1.581 Aa	56.200 ± 3.033 Ab
Farinha de soja	32.800 ± 1.924 Aa	53.800 ± 2.588 Ab
Farinha de tenébrio	28.000 ± 1.581 Aa	50.800 ± 2.775 Ab
Farinha de bicho-da-seda	23.000 ± 1.581 Aa	40.000 ± 1.581 Aa
Leite em pó	16.000 ± 1.581 Aa	27.000 ± 1.581 Ba
Farinha de ostra	8.600 ± 1.140 Aa	13.000 ± 1.581 Ba
C.V	50.30	

*Médias (± EPM) seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

Na comparação entre os isolados, verificou-se diferenças significativas, com o isolado UENP06 apresentando produções superiores às do UENP02 nos

meios com a maioria das fontes proteicas avaliadas. As maiores diferenças entre os isolados foram observadas nos meios contendo gema de ovo em pó, farinha de soja e farinha de tenébrio, nos quais o isolado UENP06 produziu aproximadamente 1,6 a 1,9 vezes mais JIs do que o isolado UENP02. Para os tratamentos com leite em pó e farinha de ostra, as diferenças também foram significativas, embora com valores absolutos menores. Esses resultados evidenciam a maior capacidade produtiva para o isolado UENP06 em cultivo *in vitro*, especialmente quando associada às fontes proteicas de maior valor nutricional.

Quando a produção *in vivo* é comparada com a produção *in vitro*, os maiores rendimentos para os isolados UENP06 e UENP02 foram obtidos na produção *in vivo* em lagartas de *G. mellonella*, atingindo $5,51 \times 10^5$ JIs g^{-1} de lagarta e $2,27 \times 10^5$ JIs g^{-1} de lagarta, respectivamente. Em contrapartida, na produção *in vitro*, utilizando gema de ovo como fonte proteica, os rendimentos máximos foram de $5,62 \times 10^4$ JIs mL^{-1} para o UENP06 e $3,00 \times 10^4$ JIs mL^{-1} para o UENP02.

Ao comparar a produção *in vivo* com a produção *in vitro* é importante considerar não apenas os rendimentos obtidos, mas também aspectos operacionais e econômicos envolvidos em cada metodologia. A produção *in vivo* exige a manutenção contínua da criação de insetos hospedeiros, o que demanda tempo, maior mão de obra especializada e custos adicionais com dietas e infraestrutura. Por outro lado, a produção *in vitro* em meio semissólido apresenta menor demanda de mão de obra, maior padronização do processo e melhor controle das condições de cultivo. Além disso, a possibilidade de escalonamento e expansão da produção em larga escala torna-se mais viável nesse sistema, especialmente quando se considera aplicação comercial.

Outro fator relevante nessa comparação é a concentração do inóculo utilizada em cada sistema. No ensaio *in vivo* foi empregado inóculo de 100 JIs cm^{-2} (aproximadamente 790 JIs por lagarta), enquanto no ensaio *in vitro* em meio semissólido foi utilizado inóculo de 33 JIs mL^{-1} de meio (1000 JIs/frasco).

Essas diferenças metodológicas devem ser consideradas na interpretação dos rendimentos obtidos entre os sistemas.

4.4.4 Avaliação da Infectividade de JIs Produzidos *In Vitro*

Para os JIs produzidos no experimento de avaliação de fontes lipídicas para produção *in vitro* de NEPs. Observou-se que, independentemente da fonte lipídica utilizada no meio de cultivo, os JIs obtidos apresentaram elevada infectividade para as larvas de *G. mellonella* causando mortalidade acima de 85% (Tabela 4.7).

Tabela 4.5. Mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella* causada por juvenis infectivos (JIs) dos isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* produzidos *in vitro* em meios contendo diferentes fontes lipídicas.

	Fonte lipídica	
	Óleo de milho	Óleo de soja
UENP02	92 ± 10,9 Aa*	88 ± 10,9 Aa
UENP06	88 ± 10,9 Aa	92 ± 10,9 Aa
C.V	11,56	

*Porcentagem de mortalidade (± EPM). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

Na segunda avaliação foi examinada a infectividade dos JIs produzidos no experimento de fontes proteicas para a produção *in vitro* de NEPs. Verificou-se que, independentemente da fonte proteica utilizada no meio de cultivo, os JIs obtidos apresentaram elevada infectividade às larvas de *G. mellonella* com mortalidade acima de 80%, porém não sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4.8).

Tabela 4.6. Mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella* causada por juvenis infectivos (JIs) dos isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* produzidos *in vitro* em meios contendo diferentes fontes proteicas.

Tratamento	Isolados	
	UENP06	UENP02
Gema de ovo em pó	92 ± 10,9 Aa*	92 ± 10,9 Aa
Farinha de soja	88 ± 10,9 Aa	88 ± 10,9 Aa
Farinha de tenébrio	84 ± 8,9 Aa	88 ± 10,9 Aa
Farinha de bicho-da-seda	88 ± 10,9 Aa	84 ± 8,9 Aa
Leite em pó	92 ± 10,9 Aa	88 ± 10,9 Aa
Farinha de ostra	92 ± 10,9 Aa	84 ± 8,9 Aa
C.V	11,96	

*Porcentagem de mortalidade (± EPM). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

Embora Cottrell et al. (2011) alertem para o risco de redução da infectividade de nematoides produzidos em meio líquido, os resultados do presente estudo demonstraram que os JIs produzidos *in vitro* em meio semissólido, suplementado com 2 g de ágar L⁻¹, mantiveram elevada infectividade às lagartas de *G. mellonella*, independentemente das fontes nutricionais avaliadas. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, tanto em relação às fontes lipídicas quanto às fontes proteicas. Esses resultados corroboram os estudos de Shapiro et al. (2000), que também não verificaram diferenças na mortalidade de insetos inoculados com JIs produzidos em diferentes sistemas de cultivo, reforçando que a produção *in vitro*, quando adequadamente conduzida, não compromete a infectividade dos JIs de nematóides entomopatogênicos.

4.5 CONCLUSÕES

Os isolados UENP02 e UENP06 de *H. amazonensis* apresentam capacidade de multiplicação e infectividade tanto em sistema de produção *in vivo* quanto em produção *in vitro*. A produção *in vivo* é superior em lagartas de *G. mellonella* quando comparada às de *T. molitor*, sendo o isolado UENP06 o mais produtivo.

Na produção *in vitro*, as fontes lipídicas não influenciam significativamente o rendimento, sendo observadas produções médias variando de $1,72 \times 10^4$ a $2,00 \times 10^4$ JIs mL⁻¹ e de $2,44 \times 10^4$ a $2,66 \times 10^4$ JIs mL⁻¹ para os isolados UENP02 e UENP06 de *H. amazonensis*, respectivamente, independentemente da fonte lipídica utilizada.

Entre as fontes proteicas, gema de ovo em pó, farinha de soja e farinha de tenébrio apresentam os melhores resultados produtivos, especialmente para o isolado UENP06 de *H. amazonensis*, com produções de $5,62 \times 10^4$, $5,38 \times 10^4$ e $5,08 \times 10^4$ JIs mL⁻¹, respectivamente.

Embora a produção *in vivo* apresente maiores rendimentos absolutos, o sistema *in vitro* em meio semissólido mostra-se viável, com potencial para escalonamento e sem comprometimento da infectividade dos JIs de isolados de *H. amazonensis*.

5 ARTIGO C: EFICÁCIA DE ISOLADOS DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS ENCAPSULADOS DA ESPÉCIE *Heterorhabditis amazonensis* NO CONTROLE DE *Dalbulus maidis* EM PLANTAS DE MILHO

5.1 RESUMO

A cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* é uma das principais pragas da cultura do milho, sendo responsável pela transmissão de mollicutes e vírus associados ao complexo de enfezamentos. Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) representam uma alternativa promissora para o controle biológico de insetos-praga; entretanto, sua aplicação depende do desenvolvimento de formulações que garantam viabilidade e eficiência em condições semi-controladas e de campo. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade, a infectividade e a eficiência dos isolados de *Heterorhabditis amazonensis* UENP02 e UENP06 encapsulados em alginato de sódio no controle de *D. maidis*. Foram produzidas cápsulas contendo diferentes concentrações de juvenis infectivos (JIs) (20, 50, 100, 150 e 200 JIs por cápsula), armazenadas a 25 °C até as avaliações. Após 15 dias, foram avaliadas a viabilidade dos nematoides e a infectividade sobre larvas de *Galleria mellonella*. Também foram conduzidos ensaios em casa-de-vegetação utilizando NEPs aplicados em suspensão aquosa, cápsulas dissolvidas e cápsulas intactas. Os resultados demonstraram que ambos os isolados permaneceram viáveis em todas as concentrações avaliadas, com sobrevivência de 100% nas concentrações de 20 e 50 JIs por cápsula. A infectividade manteve-se elevada, com mortalidade igual ou superior a 95% em *G. mellonella*. Em casa-de-vegetação, os tratamentos em suspensão aquosa apresentaram maior eficiência, destacando-se o isolado UENP06, com 60% de mortalidade de *D. maidis*. Os resultados indicam que a encapsulação em alginato de sódio mantém a viabilidade e

infectividade dos NEPs, representando uma estratégia promissora para o controle biológico da cigarrinha-do-milho.

Palavras-chave: Esfera de alginato de sódio; Controle biológico; *Heterorhabditis amazonensis*; Enfezamento do milho.

5.2 ABSTRACT

The corn leafhopper *Dalbulus maidis* is one of the main pests of the corn crop, being responsible for the transmission of mollicutes and viruses associated with the stunt complex. Entomopathogenic nematodes (EPNs) represent a promising alternative for the biological control of insect pests; however, its application depends on the development of formulations that ensure viability and efficiency under semi-controlled and field conditions. Thus, this study aimed to evaluate the viability, infectivity and efficiency of *Heterorhabditis amazonensis* isolates UENP02 and UENP06 encapsulated in sodium alginate in the control of *D. maidis*. Capsules containing different concentrations of infective juveniles (IJs) (20, 50, 100, 150 and 200 IJs per capsule) were produced, stored at 25 °C until evaluations. After 15 days, the viability of the nematodes and the infectivity on larvae of *Galleria mellonella* were evaluated. Greenhouse assays were also conducted using EPNs applied in aqueous suspension, dissolved capsules and intact capsules. The results showed that both isolates remained viable at all concentrations evaluated, with 100% survival at concentrations of 20 and 50 IJs per capsule. Infectivity remained high, with mortality equal to or greater than 95% in *G. mellonella*. In greenhouse, treatments in aqueous suspension showed higher efficiency, especially the isolate UENP06, with 60% mortality of *D. maidis*. The results indicate that encapsulation in sodium alginate maintains the viability and infectivity of EPNs, representing a promising strategy for the biological control of the corn leafhopper.

Keywords: Sodium alginate sphere; Biological control; *Heterorhabditis amazonensis*; Corn stunting.

5.3 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) possui elevada importância econômica e social, sendo amplamente cultivada em diferentes regiões do mundo. O milho é utilizado nas alimentações humana e animal, na indústria e na produção de biocombustíveis. No Brasil, o milho ocupa posição de destaque entre as principais *commodities* agrícolas, com expressiva área cultivada e elevada contribuição para o agronegócio nacional. Entretanto, a produção da cultura é fortemente influenciada por diversos fatores abióticos e bióticos, especialmente pela ocorrência de insetos-praga e doenças (SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020; OLIVEIRA; FRIZZAS, 2021).

Entre as principais pragas do milho, a cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae), destaca-se como vetor dos agentes etiológicos do complexo de enfezamentos, incluindo fitoplasmas, espiroplasmas e vírus. A transmissão desses patógenos compromete o crescimento das plantas de milho, reduz a produtividade e pode causar perdas econômicas expressivas em sistemas de produção intensivos. O manejo da cigarrinha *D. maidis* constitui, portanto, um dos principais desafios fitossanitários da cultura do milho (SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020; OLIVEIRA et al., 2003).

O controle dessa praga baseia-se predominantemente no uso de inseticidas químicos. Contudo, essa estratégia apresenta limitações importantes, como a necessidade de aplicações frequentes, o risco de seleção de populações resistentes e impactos negativos sobre organismos não alvo e ao ambiente. Nesse contexto, programas de manejo integrado de pragas (MIP) têm enfatizado a incorporação de métodos de controle biológico como alternativa sustentável (WAQUIL, 2004; SABATO; OLIVEIRA; LANDAU, 2020).

Os nematóides entomopatogênicos (NEPs), pertencentes principalmente aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, destacam-se como agentes promissores de controle biológico. Esses organismos atuam em associação

simbiótica com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, sendo capazes de causar rápida mortalidade em insetos hospedeiros. Além disso, apresentam segurança ambiental, facilidade de produção e compatibilidade com programas de manejo integrado (GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005; PETERS; FERRAZ; RIBEIRO, 2017).

Apesar do elevado potencial dos NEPs, sua eficácia em condições semi-controladas e de campo pode ser limitada pela sensibilidade à fatores ambientais, como radiação ultravioleta, dessecação e variações de temperatura. Quando aplicados em suspensão aquosa, os juvenis infectantes (JIs) frequentemente apresentam baixa persistência no ambiente, reduzindo a eficiência do controle. Dessa forma, o desenvolvimento de formulações capazes de proteger os nematóides e promover sua liberação gradual tem sido considerado um passo essencial para ampliar a viabilidade do uso desses agentes (EHLERS, 2001; SHAPIRO-ILAN; LEWIS, 2024).

A encapsulação em matrizes poliméricas naturais, especialmente em alginato de sódio, tem sido amplamente investigada como estratégia de formulação de NEPs. O alginato é um polímero biodegradável e atóxico capaz de formar cápsulas gelificadas que protegem os organismos encapsulados contra estresses ambientais e permitem maior estabilidade durante o armazenamento. Estudos pioneiros demonstraram que cápsulas de alginato podem preservar a viabilidade e a infectividade de espécies de *Heterorhabditis*, promovendo a liberação controlada dos juvenis infectantes (PATEL; VORLOP, 1994). Estudos mais recentes reforçam que a encapsulação pode aumentar a sobrevivência dos NEPs e melhorar sua persistência após a aplicação, embora desafios relacionados à estabilidade das cápsulas e à taxa de liberação ainda demandem investigações (NXITYWA; MALAN, 2021; SHAPIRO-ILAN; LEWIS, 2024).

Entre as espécies de NEPs, *Heterorhabditis amazonensis* tem se destacado pelo potencial de controle de diferentes insetos-praga em condições tropicais, apresentando elevada virulência e boa adaptação ambiental. No entanto, ainda são limitados os estudos que avaliam o desempenho de

isolados dessa espécie formulados em cápsulas de alginato, particularmente no controle de *D. maidis* em plantas de milho.

Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade, a infectividade e a eficiência dos isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* formulados em cápsulas de alginato de sódio no controle da cigarrinha-do-milho *D. maidis*. Adicionalmente, buscou-se comparar o desempenho dos isolados aplicados em suspensão aquosa, cápsulas dissolvidas e cápsulas intactas, visando contribuir para o desenvolvimento de formulações mais eficientes e sustentáveis de NEPs para o manejo dessa importante praga do milho.

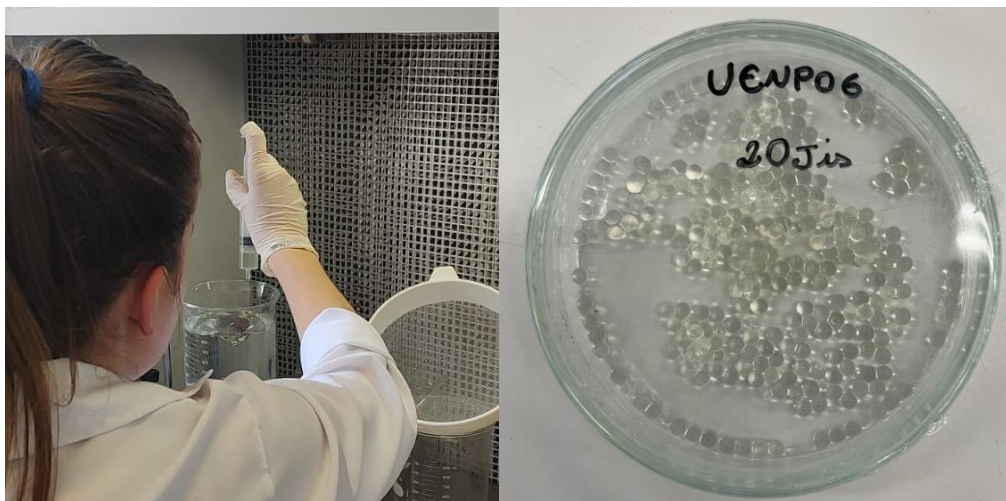
5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Encapsulamento dos NEPs

Neste estudo foram utilizados os isolados UENP02 e UENP06 de *H. amazonensis* obtidos junto ao laboratório de Ensaio com Inimigos Naturais de Pragas (LabINP), da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), localizado em Cornélio Procopio, PR. Os JIs utilizados foram multiplicados utilizando o método *in vitro*. Na produção das esferas de alginato de sódio para encapsulamento dos NEPs foi seguida metodologia adaptada de Chen e Glazer (2005) e Kim, Jaffuel e Turlings (2015). Assim, foram utilizados 10 mL de glicerol (v/v), 2 g de alginato de sódio (p/v), 75 µL de formol para a conservação do alginato de sódio e 100 mL de água destilada morna na temperatura de aproximadamente 50 °C.

A solução de alginato de sódio foi autoclavada à 121 °C por 20 min. Após autoclavagem, e resfriamento, os NEPs foram adicionados à solução de alginato de sódio para obter concentrações de 20, 50, 100, 150 e 200 JIs/cápsula, sendo que cada concentração de NEP foi considerada um tratamento. A solução contendo os NEPs foi transferida para seringa descartável de 10 mL, sem agulha. Cada concentração foi ajustada para 10 mL da solução, resultando em cerca de 200 cápsulas por tratamento. Em temperatura ambiente, a solução da seringa foi gotejada em Becker de 250 mL contendo solução de CaCl_2 , sob agitação contínua. As esferas formadas foram mantidas na solução de CaCl_2 em agitação por cerca de 10 minutos para completar o processo de cura. Após o período de cura, as esferas foram recuperadas com o auxílio de peneira, secas em papel toalha e armazenadas em placas de Petri autoclavadas, vedadas com plástico filme, sendo mantidas em câmara B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 dias (Figura 5.1)

Figura 5.1. Encapsulamento em cápsulas de alginato de sódio dos isolados de NEPs UENP 02 e UENP 06 de *Heterorhabditis amazonensis*.



5.4.2 Avaliação da Viabilidade e Infectividade de JIs de NEPs Encapsulados

Para avaliar a viabilidade dos NEPs encapsulados, as esferas de alginato de sódio contendo os nematóides foram dissolvidas utilizando solução de cloreto de sódio (Amalia Gabriela Moura, 2023, comunicação pessoal). Após a completa dissolução das cápsulas, foi realizada a contagem dos nematóides vivos e mortos para cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias de Scott-Knott, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

A infectividade dos JIs dos NEPs encapsulados foi avaliada em quatro repetições. Cada repetição foi constituída por cinco lagartas de *G. mellonella* dispostas em placa de Petri de 9 cm, contendo dois papeis filtros. Os NEPs UENP 02 e UENP 06 foram inoculados na concentração de 100 JIs/cm². As placas foram mantidas em câmara B.O.D. a 25±1 °C, no escuro por um período de três dias para confirmação da mortalidade e sintomas nas lagartas de *G. mellonella*.

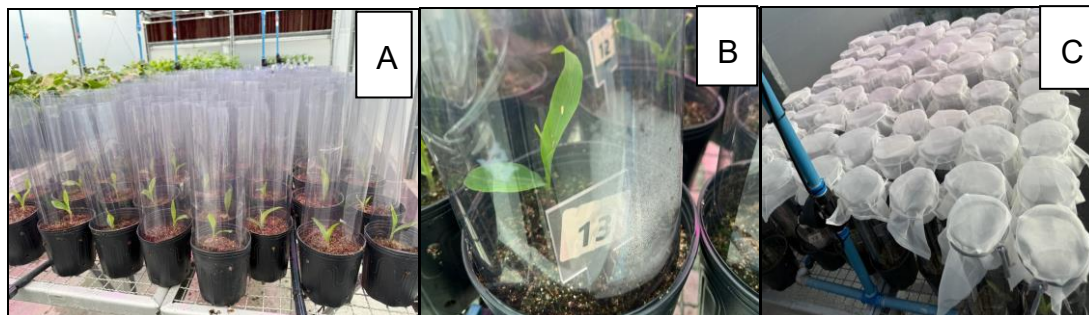
5.4.3 Avaliação da Infectividade de JIs de NEPs no Controle *In Planta* de *Dalbulus maidis* sob Condições de Casa-de-vegetação

Foram utilizadas plantas de milho da cultivar IPR 164, no estágio fenológico V1, cultivadas em vasos de polietileno com capacidade de 2,2 L, contendo mistura de solo, areia e esterco curtido na proporção de 3:1:1 (v/v/v). As sementes utilizadas nos experimentos foram fornecidas pelo Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR-Emater (IDR-Paraná), Londrina, PR, Brasil.

Foram utilizados no estudo de infectividade *in planta* os isolados UENP02 e UENP06 de *H. amazonensis*, produzidos *in vitro*. Os tratamentos consistiram em: T1, controle (água); T2, UENP02 em solução aquosa; T3, UENP06 em solução aquosa; T4, UENP02 encapsulado; T5, UENP06 encapsulado; T6, UENP02 capsulas dissolvidas; e T7, UENP06 capsulas dissolvidas. Em todos os tratamentos contendo NEPs foi utilizada a concentração de 100 juvenis infectantes (JIs) por cm², aplicados diretamente no cartucho das plantas de milho.

Após a aplicação dos tratamentos, foram liberadas 15 cigarrinhas adultas de *D. maidis* por planta, visando a infestação experimental. Para evitar a fuga dos insetos, cada vaso foi envolvido com folhas de acetato transparente (A3 – 30 × 42 cm) e fechado na parte superior com tecido voal, fixado com elástico. Os vasos foram irrigados diariamente de modo a manter condições adequadas para o desenvolvimento das plantas e a atividade dos nematóides (Figura 5.2).

Figura 5.2. Avaliação da infectividade de JIs de NEPs da espécie *Heterorhabditis amazonensis* no controle *in planta* de *Dalbulus maidis* sob condições de casa-de-vegetação. A, Vasos contendo uma plântula de milho envolvida com folha de acetato transparente; B, cigarrinhas alimentando-se da plântula de milho; e C, vasos fechados na parte superior com tecido voal, fixado com elástico, para evitar a fuga das cigarrinhas.



A avaliação da eficácia no controle da cigarrinha-do-milho *D. maidis* pelos NEPs da espécie *H. amazonensis* foi realizada sete dias após a aplicação dos tratamentos, pela contagem do número de cigarrinhas sobreviventes. As cigarrinhas mortas foram dissecadas para confirmação da infecção e da mortalidade atribuída aos nematóides entomopatogênicos.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Viabilidade de JIs de NEPs Encapsulados em Cápsulas de Alginato de Sódio

Embora não tenham sido detectadas diferenças significativas entre as concentrações dos JIs e nem entre os isolados UENP 02 e UENP 06 de *H. amazonensis* encapsulados em cápsulas de alginato de sódio, foi observada tendência de redução na sobrevivência dos JIs à medida que a concentração por cápsula aumentou. Nas concentrações mais baixas, de 20 e 50 JIs por cápsula, ambos os isolados apresentaram 100% de sobrevivência, evidenciando condições mais favoráveis à manutenção da viabilidade dos NEPs nessas densidades populacionais (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Sobrevivência de JIs dos isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* em cápsulas de alginato de sódio, 15 dias após o encapsulamento em diferentes concentrações.

Concentração (JIs/cápsula)	NEP (% de sobrevivência)	
	UENP02	UENP06
20	100 Aa*	100 Aa
50	100 Aa	100 Aa
100	88,31 Aa	81,81 Aa
150	83,87 Aa	70,00 Aa
200	76,59 Aa	72,41 Aa
C.V.		41,54

*Médias ($\pm$ EPM) seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

Em contrapartida, nas concentrações de 100, 150 e 200 JIs por cápsula, foram observadas reduções graduais na sobrevivência dos JIs dos NEPs. Assim, a sobrevivência dos JIs do isolado UENP02 apresentou reduções para 88,31%, 83,87% e 76,59%, respectivamente. Tendência semelhante foi observada para o isolado UENP06, com sobrevivência dos JIs na ordem de

81,81%, 70,00% e 72,41%, para as referidas concentrações. Apesar dessas reduções, os níveis de sobrevivência permaneceram relativamente elevados após 15 dias de armazenamento, indicando boa tolerância dos JIs dos NEPs ao processo de encapsulação. Resultados comparáveis foram descritos por Patel e Vorlop (1994), que observaram taxas de sobrevivência superiores a 70% para isolados de *Heterorhabditis* sp. encapsulados em alginato de cálcio após períodos de armazenamento de até duas semanas. Este desempenho foi atribuído à proteção conferida pela matriz polimérica contra dessecação. De forma semelhante, Ehlers (2001) relatou que formulações baseadas em alginato podem manter alta viabilidade de NEPs durante o armazenamento, especialmente quando a densidade populacional dentro da cápsula é controlada. Essa condição reduz o estresse fisiológico e a competição entre os JIs.

Embora não tenham sido detectadas diferenças significativas entre as concentrações de JIs dos NEPs, a tendência de redução na sobrevivência em maiores concentrações do agente por cápsula sugere que a densidade populacional dentro da matriz polimérica pode influenciar a troca gasosa e a disponibilidade de recursos nutricionais. Altas densidades de JIs podem aumentar a demanda metabólica e favorecer o acúmulo de metabólitos excretados, fatores já descritos como limitantes para a sobrevivência de NEPs em formulações concentradas (EHLERS, 2001; SHAPIRO-ILAN; LEWIS, 2024). Esse padrão também é coerente com observações de Nxitywa e Malan (2021). Os autores relatam que a longevidade de JIs de NEPs encapsulados depende diretamente da densidade de estocagem e das propriedades físico-químicas da cápsula. A manutenção de sobrevivência superior a 70% mesmo nas maiores concentrações indica, entretanto, que o protocolo desenvolvido apresenta boa eficiência operacional e potencial para ajustes visando otimizar o equilíbrio entre densidade e viabilidade.

Os resultados obtidos indicam que concentrações mais elevadas de JIs dos NEPs por cápsula tendem a reduzir gradativamente a sobrevivência, enquanto concentrações mais baixas favorecem a viabilidade. Assim, a escolha

da densidade de encapsulamento deve buscar um equilíbrio entre estabilidade biológica e carga infectiva por unidade de formulação. Esse aspecto é considerado fundamental no desenvolvimento de produtos comerciais à base de NEPs (EHLERS, 2001; SHAPIRO-ILAN; LEWIS, 2024).

5.5.2 Infectividade para Lagartas de *Galleria mellonella* de JIs de NEPs Encapsulados em Cápsulas de Alginato de Sódio.

Os JIs encapsulados de NEPs dos isolados UENP02 e UENP06 de *H. amazonensis* mantiveram elevada infectividade e patogenicidade para lagartas de *G. mellonella*, mesmo após 15 dias de encapsulamento em cápsulas de alginato de sódio (Tabela 5.2). Não foram observadas diferenças significativas na infectividade para as cápsulas com diferentes concentrações de JIs, nem entre os dois isolados de NEPs avaliados. Considerando as concentrações testadas, os resultados indicam que a quantidade de nematóides encapsulados não comprometeu a capacidade infectiva dos NEPs.

Tabela 5.2. Infectividade para lagartas de *Galleria mellonella* de JIs dos NEPs UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* encapsulados em cápsulas de alginato de sódio.

Concentração (JIs/cápsula)	NEP (% de mortalidade)	
	UENP06	UENP02
20	100±0 Aa*	95±10 Aa
50	95±10 Aa	95±10 Aa
100	95±10 Aa	100±0 Aa
150	100±0 Aa	95±10 Aa
200	100±0 Aa	100±0 Aa
C.V.		10,96

*Médias (± EPM) seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

De maneira geral, a mortalidade das lagartas de *G. mellonella* foi igual ou superior a 95% em todos os tratamentos, independentemente da

concentração de JIs, compreendendo de 20 a 200 JIs por cápsula, e do isolado de NEP. O isolado UENP06 promoveu 100% de mortalidade nas concentrações de 20, 150 e 200 JIs por cápsula, enquanto o isolado UENP02 alcançou 100% de mortalidade nas concentrações de 100 e 200 JIs por cápsula. Nas demais concentrações, ambos os isolados apresentaram mortalidade de 95%, com baixa variabilidade entre as repetições.

Os elevados níveis de mortalidade observados demonstram que o processo de encapsulamento em alginato de sódio não comprometeu a virulência nem a capacidade infectiva dos JIs dos dois NEPs, corroborando os resultados de viabilidade apresentados anteriormente. Esses dados indicam que os nematóides não apenas permaneceram vivos dentro das cápsulas, mas também mantiveram sua competência biológica para localizar, penetrar e infectar o hospedeiro após a liberação da matriz polimérica.

A ausência de diferenças entre concentrações sugere que, dentro da faixa avaliada, o aumento do número de JIs por cápsula não resulta necessariamente em incremento na mortalidade do hospedeiro, uma vez que *G. mellonella* é altamente suscetível à infecção por NEPs. Esse comportamento já foi relatado na literatura, na qual lagartas desse inseto são amplamente utilizadas como hospedeiro padrão justamente devido à sua alta sensibilidade e rápida resposta à infecção. Além disso, a manutenção de elevada infectividade após 15 dias de encapsulamento reforça o potencial da formulação encapsulada como estratégia para o armazenamento e transporte de NEPs. Essa condição protege os JIs contra fatores adversos e permite sua aplicação futura sem perda significativa de eficiência biológica. Esses resultados também são particularmente relevantes quando forem considerados em conjunto com os ensaios conduzidos em casa-de-vegetação para avaliar o controle da cigarrinha-do-milho *D. maidis*.

De forma geral, os resultados demonstram que os isolados UENP02 e UENP06 de *H. amazonensis* mantêm elevada infectividade após o encapsulamento em alginato de sódio. Isto também valida o uso de *Galleria mellonella* como organismo modelo para confirmar a eficiência biológica da

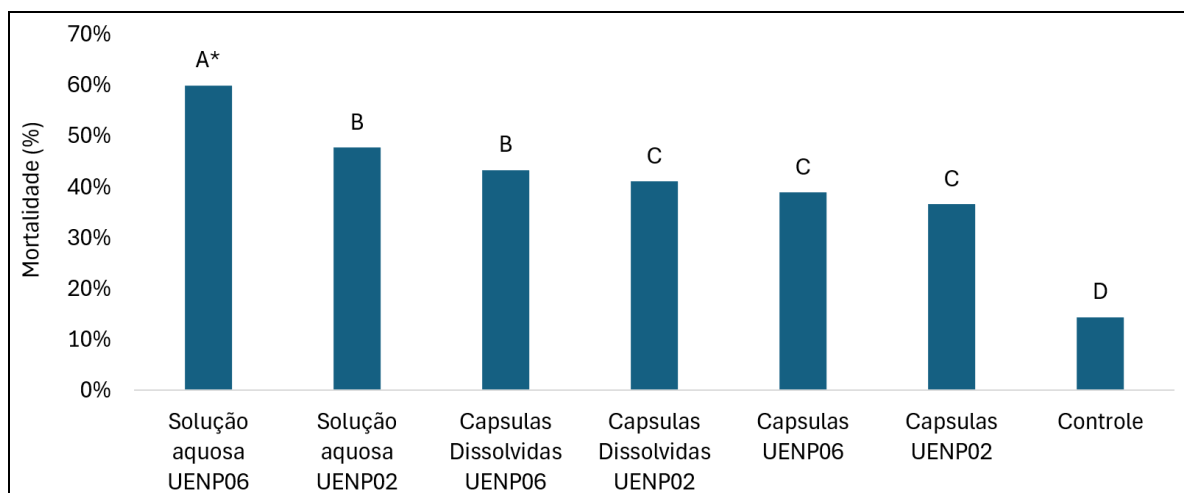
formulação, reforçando a viabilidade do encapsulamento como uma alternativa promissora para a aplicação de NEPs em programas de controle biológico de pragas agrícolas.

5.5.3 Avaliação da Infectividade de JIs de NEPs Encapsulados no Controle de *Dalbulus maidis* In Planta sob Condições de Casa-de-vegetação

Todos os tratamentos contendo JIs dos NEPs dos isolados UENP02 e UENP06 de *H. amazonensis* promoveram mortalidade significativa de adultos de *D. maidis* em plantas de milho sob condições de casa-de-vegetação, quando comparados ao controle (Figura 5.3). Esses resultados demonstram que os isolados UENP02 e UENP06 mantiveram sua infectividade tanto encapsulados como em suspensão aquosa nas avaliações *in planta* que é um sistema experimental mais complexo do que as condições de bioensaios em laboratório. A mortalidade observada confirma o potencial dos NEPs como agentes de controle biológico da cigarrinha-do-milho *D. maidis*, mesmo sob condições que envolvem interação planta–inseto–ambiente.

A aplicação do isolado UENP06 em suspensão aquosa apresentou a maior mortalidade (60%) de cigarrinhas-do-milho, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Figura 5.3). A melhor performance da suspensão aquosa pode estar associada à imediata disponibilidade dos JIs no cartucho da planta de milho, favorecendo o rápido contato com o hospedeiro, a cigarrinha. Em aplicações líquidas, os NEPs apresentam maior mobilidade inicial e dispersão homogênea, fatores que aumentam a probabilidade de encontro com o inseto-alvo (EHLERS, 2001; GRIFFIN; BOEMARE; LEWIS, 2005). O desempenho consistentemente superior do isolado UENP06 em todas as formas de aplicação reforça os resultados obtidos em experimentos anteriores deste estudo *in vitro* e *in vivo* sob condições de laboratório, indicando maior agressividade intrínseca desse isolado de NEP.

Figura 5.3. Mortalidade de *Dalbulus maidis* causada pelos isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* aplicados em suspensão aquosa e encapsulados em alginato em casa-de-vegetação.



*Médias ($\pm$ EPM) seguidas de mesma letra maiúscula não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott com $p \leq 0,05$.

Os tratamentos com cápsulas de alginato de sódio previamente dissolvidas apresentaram mortalidades intermediárias (≈ 41 – 43%), indicando que a dissolução parcial da matriz polimérica permitiu a liberação dos JIs, embora com menor eficiência do que a suspensão aquosa. Formulações encapsuladas podem modificar a dinâmica de liberação e dispersão dos juvenis infectantes, o que influenciaria a probabilidade de contato com o inseto-alvo em períodos iniciais após a aplicação (SHAPIRO-ILAN; LEWIS, 2024).

Nas aplicações com cápsulas intactas, as mortalidades foram menores (≈ 36 – 39%), porém ainda significativamente superiores ao controle, evidenciando que os NEPs dos dois isolados de *H. amazonensis* permaneceram viáveis e infectivos após o processo de encapsulação. A redução relativa da mortalidade do inseto-alvo a cigarrinha-do-milho pode ser atribuída ao mecanismo de liberação gradual dos JIs promovido pela matriz de alginato. Sistemas encapsulados são projetados para proteger os organismos e promover a liberação controlada do agente ao longo do tempo, o que pode

limitar a disponibilidade imediata dos JIs em avaliações realizadas poucos dias após a aplicação (PATEL; VORLOP, 1994; NXITYWA; MALAN, 2021).

Estudos sobre encapsulamento de NEPs demonstram que cápsulas de alginato de sódio podem preservar a viabilidade e a infectividade dos NEPs, além de aumentar sua persistência ambiental. Patel e Vorlop (1994) observaram que cápsulas de alginato proporcionaram liberação controlada eficiente de isolados de *Heterorhabditis* sp., enquanto Nxitywa e Malan (2021) destacam que a estabilidade das cápsulas e a taxa de escape dos nematóides são fatores críticos que influenciaram o desempenho em bioensaios. Dessa forma, a menor mortalidade observada no presente estudo não indica perda de patogenicidade, mas possivelmente reflete a dinâmica de liberação dos JIs dentro do período de avaliação.

A superioridade do isolado UENP06 em relação ao UENP02 em todas as estratégias de aplicação evidencia a importância da variabilidade intraespecífica na eficiência de controle. Diferenças genéticas e fisiológicas entre isolados de uma mesma espécie podem influenciar a virulência, o comportamento de busca do hospedeiro e a adaptação às condições ambientais. Em sistemas semi-controlados, como casa-de-vegetação, variações de temperatura, umidade e microambiente da planta podem interagir com essas características biológicas, influenciando a dinâmica de infecção pelos NEps (GREWAL; EHLERS; SHAPIRO-ILAN, 2005; PETERS et al., 2017).

Embora a aplicação em suspensão aquosa tenha proporcionado maior eficiência imediata no presente estudo, a encapsulação apresenta vantagens estratégicas importantes quando da aplicação prática desses agentes de biocontrole sob condições de campo. Formulações encapsuladas podem aumentar a proteção contra dessecação e radiação ultravioleta, melhorar a estabilidade durante o armazenamento e favorecer a persistência dos nematóides após a aplicação (EHLERS, 2001; SHAPIRO-ILAN; LEWIS, 2024).

5.6 CONCLUSÕES

O encapsulamento de juvenis infectantes (JIs) dos isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* em alginato de sódio mostra eficiência na manutenção da viabilidade e infectividade desses NEPs. A sobrevivência permanece elevada 15 dias após a encapsulação, mesmo nas maiores concentrações. Entretanto, é observada tendência de redução em densidades mais altas dos JIs.

A infectividade para *Galleria mellonella* se mantém acima de 95% em todos os tratamentos, demonstrando que o encapsulamento não compromete a patogenicidade dos JIs.

Sob condições de casa-de-vegetação, os NEPs promovem mortalidade significativa de *Dalbulus maidis*, com melhor desempenho na aplicação em suspensão aquosa. As formulações encapsuladas apresentam mortalidades intermediárias, possivelmente devido à liberação gradual dos JIs dos NEPs, mas mantem eficiência significativa.

Conclui-se que o encapsulamento em alginato de sódio representa uma estratégia promissora para armazenamento e aplicação de NEPs no controle biológico da cigarrinha-do-milho, especialmente para o isolado UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que nematoides entomopatogênicos (NEPs), especialmente os isolados UENP02 e UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis*, apresentam elevado potencial para o controle biológico da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis*, principal vetor dos agentes do complexo de enfezamentos do milho (CEM). Os ensaios laboratoriais evidenciaram que ambos os isolados de *H. amazonensis* promovem mortalidade significativa de adultos da cigarrinha-do-milho, com ação relativamente rápida ($LT_{50} \approx 72$ horas) e resposta dependente da concentração de inóculo, sendo que doses a partir de 75 JIs cm^{-2} são suficientes para alcançar níveis expressivos de controle do inseto-alvo.

A superioridade do isolado UENP06 foi consistente ao longo dos experimentos, tanto na agressividade quanto na capacidade produtiva, indicando que diferenças intraespecíficas são determinantes na eficiência de controle. Esses resultados reforçam a importância da seleção criteriosa de isolados de NEPs como etapa fundamental no desenvolvimento de estratégias de controle biológico para o manejo de pragas agrícolas.

No que se refere à viabilização produtiva, a produção *in vivo* apresentou maiores rendimentos em lagartas de *Galleria mellonella*, confirmando sua eficiência como hospedeiro padrão para multiplicação de NEPs. Entretanto, a produção *in vitro* em meio semissólido mostrou-se viável, com rendimentos consistentes e manutenção da infectividade dos juvenis infectantes, especialmente quando utilizadas fontes proteicas como gema de ovo em pó, farinha de soja e farinha de tenébrio. Essas informações indicam potencial para escalonamento produtivo, reduzindo a dependência de sistemas exclusivamente baseados em insetos hospedeiros.

O desenvolvimento da formulação encapsulada de JIs de NEPs em alginato de sódio demonstrou ser uma estratégia eficiente para preservação da

viabilidade e da infectividade desses nematoides. A encapsulação manteve elevadas taxas de sobrevivência e agressividade, evidenciando que o processo não compromete a qualidade biológica dos juvenis infectantes. Em condições de casa-de-vegetação, os NEPs da espécie *Heterorhabditis amazonensis* apresentaram mortalidade significativa de *D. maidis*, com melhor desempenho na aplicação em suspensão aquosa. Entretanto, as formulações encapsuladas também promoveram controle do inseto-alvo significativamente superior ao tratamento controle, indicando potencial para aprimoramento da tecnologia para liberação de JIs de NEPs.

De forma integrada, os resultados deste estudo demonstram que os isolados UENP02 e, especialmente, o UENP06 de *Heterorhabditis amazonensis* reúnem características desejáveis para aplicação no manejo da cigarrinha-do-milho: alta agressividade, viabilidade produtiva, manutenção da infectividade após cultivo *in vitro* e estabilidade em formulação encapsulada. Assim, esses isolados de NEPs configuram-se como alternativa sustentável para integrar programas de manejo integrado de pragas, contribuindo para a redução da dependência de inseticidas químicos no controle de insetos vetores de agentes do complexo de enfezamentos do milho.

Como perspectivas futuras, recomenda-se a realização de ensaios em condições de campo, a otimização da formulação encapsulada visando melhorar a dinâmica de liberação dos juvenis infectantes, e a avaliação da compatibilidade dos isolados de NEPs com outras estratégias de manejo, como controle químico seletivo e cultivares tolerantes. Esses avanços poderão consolidar a aplicação prática dos NEPs no sistema produtivo do milho.

7 REFERÊNCIAS

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (ed.). *Entomopathogenic nematology*. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 1–33.

AGROFIT – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Consulta de pragas e doenças. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: jun. 2022.

ALMENARA, D. P.; NEVES, M. R. C.; KAMITANI, F. L.; WINTER, C. E. Entomopathogenic nematodes: two sides of a symbiosis. *Revista da Biologia*, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 1–6, 2018. DOI: 10.11606/issn.1984-5154.v6p1-6. Disponível em: <https://revistas.usp.br/revbiologia/article/view/108624>. Acesso em: 22 fev. 2026.

ALVES, S. B. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: Manole, 1986.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Controle microbiano de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (org.). *Controle microbiano de pragas na América Latina*. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 171–202.

ALVES, V. S.; NEVES, P. M. J. O.; ALVES, L. F. A.; MOINO JUNIOR, A.; HOLZ, N. Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) screening for lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) control. *Revista Colombiana de Entomología*, v. 38, n. 1, p. 76–80, 2012.

ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C. Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro. *Nematologia Brasileira*, v. 28, p. 149–158, 2004.

ÁVILA, C. J. et al. A cigarrinha *Dalbulus maidis* e os enfezamentos do milho no Brasil. *Revista Plantio Direto*, v. 30, ed. 182, p. 18–25, 2021.

BEDDING, R. A. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica*, Leiden, v. 27, n. 1, p. 109–114, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02372671>.

BIOBEST GROUP. *Beneficial nematodes product portfolio*. Westerlo: Biobest Group, 2024. Disponível em: <https://www.biobestgroup.com>. Acesso em: 07 fev. 2026.

BIOWORKS INC. *Nemasys beneficial nematodes*. Victor: BioWorks Inc., 2024. Disponível em: <https://www.bioworksinc.com>. Acesso em: 07 fev. 2026.

BIRD, A. F.; AKHURST, R. J. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *International Journal for Parasitology*, v. 13, n. 6, p. 599–606, 1983.

BURNELL, A. M.; STOCK, S. P. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts – lethal pathogens of insects. *Nematology*, v. 2, p. 31–42, 2000.

BUTT, T. M.; WALDEN, S. Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook*, v. 11, p. 186–191, 2000.

BÜTÜNER, A. K. et al. Impact of some entomopathogenic nematode isolates on mortality and penetration rate of *Rhyzopertha dominica* and *Tenebrio molitor*. *Crop Protection*, v. 179, 106629, 2024.

CECCONELLO, D. M. *Nematóides entomopatogênicos no controle do percevejo Euschistus heros (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae)*. 2020. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2020.

CECCONELLO, D. M.; ROGGIA, S.; DONEZE, G. S.; MACEDO, M. F.; ALVES, V. S. *Heterorhabditis amazonensis* to control *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) in laboratory and field conditions. *Neotropical Entomology*, v. 51, p. 292–298, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13744-021-00936-5>.

CHACÓN-OROZCO, J. G. *Avaliação de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos e seus filtrados no manejo de Sclerotinia sclerotiorum de soja*. 2014. Tese (Doutorado) – Instituto Biológico, São Paulo, 2014.

CHEN, S.; GLAZER, I. A novel method for long-term storage of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. *Biological Control*, v. 32, p. 104–110, 2005.

CIAMPITTI, I. A.; SALMERÓN, M.; VYN, T. J. *Corn growth and development*. Manhattan: Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, 2016.

CICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which of a nematode is out. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 4, p. 1890–1897, 2003.

CLAASEN, N. J.; DUNN, M. D.; MALAN, A. P. Mass-culture technique of a South African *Heterorhabditis bacteriophora* isolate, using in vitro liquid culture. *African Entomology*, Pretoria, v. 33, e20609, 2025. DOI: <https://doi.org/10.17159/2254-8854/2025/a20609>.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2024/2025 – milho*. Brasília, DF: Conab, 2025. Disponível em: <https://www.conab.gov.br>. Acesso em: 07 fev. 2026.

COTA, L. V. et al. *Manejo da cigarrinha e enfezamentos na cultura do milho*. Brasília, DF: EMBRAPA; Sistema FAEP/SENAR-PR, 2021.

COTTRELL, T. E. et al. Laboratory virulence and orchard efficacy of entomopathogenic nematodes toward the lesser peachtree borer (Lepidoptera: Sesiidae). *Environmental Entomology*, v. 104, p. 47–53, 2011.

CRUZ, J. C. et al. *Manejo da cultura do milho*. Sete Lagoas, MG: MAPA, 2006. (Circular Técnica, 87).

DE LEÓN, C. *Maize diseases: a guide for field identification*. 4th ed. México: CIMMYT, 2004. 124 p.

DELGADO, C. L. Rising consumption of meat and milk in developing countries has created a new food revolution. *The Journal of Nutrition*, Baltimore, v. 133, n. 11, p. 3907S–3910S, 2003.

DOLINSKI, C.; MOINO JR., A. *Utilização de nematóides entomopatogênicos nativos ou exóticos: o perigo das introduções*. Campos dos Goytacazes, RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, CCTA, LEF, 2005.

DONEZE, G. S. *Avaliação da produção in vivo, alternativas de meio de cultura e diferentes concentrações de inóculo para produção in vitro de Heterorhabditis amazonensis (isolado UEL 08)*. 2022. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2022.

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

EHLERS, R.-U. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 39, p. 169–187, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.169>.

E-NEMA GMBH. *Biological pest control with beneficial nematodes*. Schwentinental: e-nema GmbH, 2024. Disponível em: <https://www.e-nema.de>. Acesso em: 07 fev. 2026.

FANTIN, G. M. et al. Resistência de cultivares precoces de milho safrinha ao enfezamento e à risca e efeito na produtividade no estado de São Paulo. In: SEMINÁRIO NACIONAL MILHO SAFRINHA, 14., 2017, Cuiabá, MT. *Anais [...]*. Cuiabá: [s. n.], 2017.

FERNANDES, T. A. P. et al. Native isolates and the effect of aviary litter on the pathogenicity and virulence of entomopathogenic nematodes for the control of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 42, n. 1, p. 1–18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n1p>.

FERRAZ, L. C. C. B. et al. Utilização de nematóides para o controle de pragas agrícolas e urbanas. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (org.). *Controle*

microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 6, p. 171–196.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>. Acesso em: 07 fev. 2026.

FERREIRA, J. et al. Dinâmica espaço-temporal de *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) e prevalência de infecção por mollicutes e vírus do nanismo do milho em Santa Catarina, Brasil. *Crop Protection*, v. 202, p. 107510, 2026.

GALVÃO, S. R.; SABATO, E. O.; BEDENDO, I. P. Occurrence and distribution of single or mixed infection of phytoplasma and spiroplasma causing corn stunting in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, v. 46, p. 152–155, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00381-6>.

GÁMEZ, R. Transmission of rayado fino virus of maize (*Zea mays*) by *Dalbulus maidis*. *Annals of Applied Biology*, v. 73, p. 285–292, 1973.

GARCÍA-LARA, S.; SERNA-SALDIVAR, S. O. Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. *Food Security*, v. 14, p. 1295–1319, 2022.

GIANNASI, A. D. O. et al. Assessment of entomopathogenic nematodes in *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and greenhouse conditions. *Revista Colombiana de Entomologia*, v. 44, p. 25–31, 2018.

GREWAL, P. S.; NARDO, E. B.; AGUILLERA, M. M. Nematóides entomopatogênicos: potencial para exploração e uso na América do Sul. *Neotropical Entomology*, v. 30, p. 191–205, 2001.

GRIFFIN, C. T.; BOEMARE, N. E.; LEWIS, E. E. Biology and behaviour. In: GREWAL, P. S.; EHLERS, R.-U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (ed.). *Nematodes as biocontrol agents*. Wallingford: CABI Publishing, 2005. p. 47–64.

GUIDE, B. A. et al. Pathogenicity and virulence of entomopathogenic nematodes against *Dichelops melacanthus* Dallas (Hemiptera: Pentatomidae). *Semina: Ciências Agrárias*, v. 40, n. 4, p. 1417–1426, 2019.

HEADY, S. E.; MADDEN, L. V.; NAULT, L. R. Oviposition behavior of *Dalbulus* leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, v. 78, p. 723–727, 1985.

HUANG, Y. et al. Population genomics of *Zea* species identifies selection signatures during maize domestication and adaptation. *BMC Plant Biology*, v. 22, 2022.

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

KAYA, H. K.; NELSEN, C. E. Encapsulation of steinernematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology*, v. 14, p. 572–574, 1985.

KIM, J.; JAFFUEL, G.; TURLINGS, T. C. J. Enhanced alginate capsule properties as a formulation of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, v. 60, p. 527–535, 2015.

KITAJIMA, E. W. Enfermidades de plantas associadas a organismos do tipo mycoplasma. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 2, p. 153–174, 1994.

KITAJIMA, E. W.; NAZARENO, N. R. X. Survey of maize viruses and mollicutes in the State of Paraná. [S.l.: s.n.], 1985.

KITAJIMA, S.; SAKAKIBARA, R.; UYEDA, K. Kinetic studies of fructose 6-phosphate, 2-kinase and fructose 2, 6-bisphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 259, n. 11, p. 6896–6903, 1984.

KOPPERT BRASIL. *Terranem: nematoides entomopatogênicos*. Piracicaba: Koppert Brasil, 2024. Disponível em: <https://www.koppert.com.br>. Acesso em: 07 fev. 2026.

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

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Entomopathogenic nematode foraging strategy. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 60, p. 162–168, 1992.

LOPES, J. R. S.; OLIVEIRA, C. M. Vetores de vírus e mollicutes em milho. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (ed.). *Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por Phaeosphaeria*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 35–60.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Enfezamento do milho*. Brasília, DF: MAPA, 2021. Disponível em: [inserir URL]. Acesso em: jul. 2022.

MASSOLA JR., N. S.; BEDENDO, I. P.; AMORIM, L.; LOPES, J. R. S. Fitoplasma e espiroplasma em milho: multiplicação e efeito na produção de genótipos resistente e suscetível. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v. 25, n. 4, p. 356–359, 1999.

MASSOLA JÚNIOR, N. S. Enfezamentos vermelho e pálido: doenças em milho causadas por mollicutes. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 2, p. 237–243, jul./dez. 2001.

MENESES, A. R. et al. Descoberta de *Gonatopus flavipes* (Olmi) como um novo parasitóide de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 13., 2013, Bonito, MS. *Anais [...]*. Bonito, MS: [s. n.], 2013.

MOLINA, J. P. A.; MOINO JUNIOR, A.; CAVALCANTI, R. S. Produção in vivo de nematoides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 347–354, jul./set. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v71p3472004>.

MOLINA, J. P.; LOPEZ, J. C. Desplazamiento y parasitismo de los entomonematodos *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) y *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) hacia frutos infestados con la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Revista Colombiana de Entomología*, v. 27, p. 145–151, 2001.

MOYA-RAYGOZA, G. N.; NAULT, L. R. Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, v. 91, p. 668–676, 1998.

NAULT, L. R.; DELONG, D. M. Evidence for co-evolution of leafhoppers in the genus *Dalbulus* (Cicadellidae: Homoptera) with maize and its ancestors. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 73, n. 4, p. 349–353, 1980.

NEIRA-MONSALVE, E. et al. In vitro production of the biological control agent *Heterorhabditis indica* SL0708 in different agar media. *Biocontrol Science and Technology*, v. 29, n. 11, p. 1090–1105, 2019.

NEVES, T. N. et al. Insecticide seed treatment against corn leafhopper: helping protect grain yield in critical plant growth stages. *Pest Management Science*, v. 78, n. 4, p. 1482–1491, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.6766>.

NXITYWA, A.; MALAN, A. M. Formulation of *Steinernema yirgalemense* by entrapment in alginate beads. *Russian Journal of Nematology*, v. 29, p. 49–58, 2021.

OLIVEIRA, A. C. de. *Nematóides e fungos entomopatogênicos no controle de Dalbulus maidis (DeLong & Wolcott) e seletividade de produtos fitossanitários registrados para a cultura do milho*. 2024. 61 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Informações Geoespaciais) – Universidade Federal de Uberlândia, Monte Carmelo, 2024.

OLIVEIRA, C. M. de et al. Controle químico da cigarrinha-do-milho e incidência dos enfezamentos causados por mollicutes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, n. 3, p. 297–303, 2007.

OLIVEIRA, C. M. de; LOPES, J. R. S. Parasitóides de ovos da cigarrinha-do-milho, *D. maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), em Piracicaba. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v. 75, n. 2, p. 263–270, 2000.

OLIVEIRA, C. M.; FRIZZAS, M. R. Eight decades of *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) in Brazil: what we know and what we need to know. *Neotropical Entomology*, v. 51, n. 1, p. 1–17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13744-021-009329>.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S. Cigarrinha-do-milho: aspectos taxonômicos e ecológicos, sobrevivência na entressafra. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (ed.). *Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por Phaeosphaeria*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 61–88.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S.; NAULT, L. R. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 147, n. 2, p. 141–153, 2013.

OLIVEIRA, C. M.; SABATO, E. O. Estratégias de manejo de *Dalbulus maidis* para o controle de enfezamentos e virose na cultura do milho. In: PAES, M. C. D.; PINHO, R. G. V.; MOREIRA, S. G. (org.). *Soluções integradas para o sistema de produção de milho e sorgo no Brasil*. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. p. 749–780.

OLIVEIRA, E. et al. Enfezamentos em milho: expressão de sintomas foliares, detecção dos mollicutes e interação com genótipos. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 1, n. 1, p. 53–62, 2002.

OLIVEIRA, E. et al. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, p. 19–25, 2003.

OLIVEIRA, E. et al. Mollicutes e vírus na cultura do milho no Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (ed.). *Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores e mancha por Phaeosphaeria*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 17–34.

PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. (ed.). *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: FEALQ, 1998. p. 1015–1038.

PATEL, A. V.; VORLOP, K.-D. Entrapment of biological control agents applied to entomopathogenic nematodes. *Biotechnology Techniques*, v. 8, p. 569–574, 1994.

PETERS, A.; FERRAZ, M.; RIBEIRO, D. Symbiotic bacteria in nematodes: the relationship and their roles in nematode biology. In: BEBER, J. C.; SANTOS, L. J.; BRITO, A. (ed.). *Nematology: advances and perspectives*. Amsterdam:

Elsevier, 2017. p. 123–145. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00010-X>.

POINAR, G. O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (ed.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 23–62.

RASMANN, S. et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, v. 434, p. 732–737, 2005.

RIBEIRO, J. M. *Eficiência de controle da cigarrinha-do-milho por dois fungos entomopatogênicos, associados com o indutor de resistência K_2SiO_3 , em plantas de Zea mays (var. saccharata) sob condições de campo*. 2019. 31 f. Dissertação – Instituto Federal Goiano, Urutaí, 2019.

RUIZ-VEGA, J.; CORTÉS-MARTÍNEZ, C. I.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C. Survival and infectivity of entomopathogenic nematodes formulated in sodium alginate beads. *Journal of Nematology*, v. 50, n. 4, p. 563–570, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21307/jofnem-2018-037>.

SABATO, E. O. Enfezamentos e viroses no milho. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, Cuiabá. *Construindo sistemas de produção sustentáveis e rentáveis: livro de palestras*. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2017. cap. 7, p. 196–219.

SABATO, E. O.; KARAM, D.; OLIVEIRA, C. M. de. *Sobrevivência da cigarrinha Dalbulus maidis (Hemiptera: Cicadellidae) em espécies de plantas da família Poaceae*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 12 p.

SABATO, E. O.; LANDAU, E. C.; COELHO, A. M. Effect of the corn stunt spiroplasma disease on maize production. *Acta Phytopathologica Sinica*, v. 43, suppl., p. 203–204, 2013. (Abstracts do 10th International Congress of Plant Pathology, Beijing, 2013).

SABATO, E. O.; LANDAU, E. C.; OLIVEIRA, C. M. de. *Recomendações para o manejo de doenças do milho disseminadas por insetos-vetores*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 15 p. (Circular Técnica, 205).

SABATO, E. O.; OLIVEIRA, C. M.; COELHO, A. M.; LANDAU, E. C. *O papel do milho tiguera na perpetuação e concentração da cigarrinha *Dalbulus maidis*, do inóculo de mollicutes e do vírus da risca*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 21 p. (Circular Técnica, 248).

SABATO, E. O.; OLIVEIRA, C. M.; LANDAU, E. C. *Cigarrinha, enfezamentos e viroses no milho: identificação e manejo do risco*. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 103 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1152076/1/DOC-149-2022-ONLINE-1.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2026.

SABATO, E. O.; OLIVEIRA, C. M.; SILVA, R. B. Q. Transmissão dos agentes causais de enfezamentos através da cigarrinha *Dalbulus maidis*, em milho. [S.l.: s.n.], 2015.

SHAPIRO-ILAN, D. I. et al. Effects of soil type on virulence and persistence of entomopathogenic nematodes in relation to control of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, v. 29, n. 5, p. 1083–1087, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1603/0046-225X-29.5.1083>.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 28, p. 137–146, 2002.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; LEWIS, E. E. (ed.). *Entomopathogenic nematodes as biological control agents*. Wallingford: CABI, 2024. ISBN 978-1-80062-030-8.

SHURTLEFF, M. C. *Compendium of corn diseases*. 2nd ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1980. 105 p.

VÁSQUEZ, J.; MORA, E. Incidence of and yield loss caused by maize rayado fino virus in maize cultivars in Ecuador. *Euphytica*, v. 153, n. 3, p. 339–342, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-006-3889-4>.

WANG, K. L. Insights into environmental factors affecting maize growth. *Maize Genomics and Genetics*, v. 16, n. 4, p. 167–181, 2025. DOI: <https://doi.org/10.5376/mgg.2025.16.0016>.

WAQUIL, J. M. *Cigarrinha-do-milho: vetor de mollicutes e vírus*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 6 p. (Circular Técnica, 41). Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25604/1/Circ-41.pdf>.

Acesso em: 16 jul. 2022.

WHITCOMB, R. F. et al. *Spiroplasma kunkelii* sp. nov.: characterization of the etiological agent of corn stunt disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 36, n. 2, p. 170–178, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-36-2-170>.

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

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. *Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques*. Fayetteville: Arkansas Agricultural Experiment Station, 1988. (Southern Cooperative Series Bulletin, 331).

ZART, M. et al. Performance of entomopathogenic nematodes on the mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae) and the compatibility of control agents with nematodes. *Journal of Nematology*, v. 53, 2021.

ZURITA, Y. A.; ANJOS, N.; WAQUIL, J. M. Aspectos biológicos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) em híbridos de milho (*Zea mays* L.). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 29, n. 2, p. 347–352, 2000.