

# PRODUÇÃO *IN VIVO* DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM DIFERENTES INSETOS HOSPEDEIROS

J.P.A. Molina<sup>1</sup>, A. Moino Junior<sup>2</sup>, R.S. Cavalcanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro", Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Proteção de Plantas, Av. Alberto Lamego 2.000, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. E-mail: juanpamolina@uenf.br

## RESUMO

Os nematóides entomopatogênicos (NEPs) podem ser uma ferramenta efetiva no manejo integrado de praga. No entanto, sua produção *in vivo* para bioensaios no laboratório ainda é difícil, necessitando que novos hospedeiros e diferentes técnicas de infecção sejam testadas para melhorar a produção. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a multiplicação *in vivo* de 3 espécies de NEPs: *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema glaseri* e *Steinernema arenarium* (Rhaditida: Steinernemariidae) em larvas de último ínstar de *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Spodoptera frugiperda* e *Bombyx mori* com 3 sistemas de infecção (injeção, tópica simples e composta). Assim, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas no tempo, com um fatorial 3 x 4 na parcela (3 sistemas de infecção e 4 hospedeiros). Cada tratamento contou com 6 repetições (larvas). As maiores produções aconteceram nos primeiros 3 dias depois da emergência dos juvenis infectantes (JIs). Os tratamentos *S. carpocapsae* e *S. arenarium* tópica simples em *G. mellonella* apresentaram as maiores produções totais de JIs/larva, com 302.124 e 149.213, respectivamente. *S. arenarium* multiplicou-se por injeção em *G. mellonella*, mas com uma produção baixa (1.076 JIs/larva), sendo um sistema pouco eficiente para produção desta espécie. Um hospedeiro alternativo para produção *in vivo* é *T. molitor*, já que no tratamento *S. arenarium* tópica composta obteve-se uma produção de 103.059 JIs/larva. *S. glaseri* não se multiplicou em nenhum dos sistemas em *T. molitor*, *S. frugiperda* e *B. mori*. A multiplicação desta espécie com o sistema tópica simples em *G. mellonella* alcançou uma produção total de 132.065 JIs/larva. Os sistemas tópica simples e composta apresentaram as maiores produções por larva. *T. molitor* para a espécie *S. arenarium* e *B. mori* para *S. carpocapsae* apresentam boas possibilidades como hospedeiros alternativos para produção *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVE: Controle microbiano, multiplicação, entomonematóides, insetos praga.

## ABSTRACT

PRODUCTION *IN VIVO* OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN DIFFERENT HOST INSECTS. Entomopathogenic nematodes (EPNs) can be an effective tool in Integrated Pest Management programs (IPM). However, *in vivo* production for laboratory bioassays is still difficult, requiring tests with new host insects and different infection techniques aiming to improve the production. Thus, this work was aimed at evaluating the *in vivo* multiplication of 3 EPN species: *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema glaseri*, and *Steinernema arenarium*, in last instar larvae of *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Spodoptera frugiperda* and *Bombyx mori* with three infection systems (injection, topic simple and topic complex). A 3x4 factored (3 infection systems and 4 hosts) randomized experimental design was used. Each treatment had 6 replicates (larvae). The largest productions took place in the first 3 days of IJ emergence. The treatments *S. carpocapsae* and *S. arenarium* with simple topic method in *G. mellonella* yielded the largest productions of IJs/larva, with 302,124 and 149,213 IJs/larva, respectively. *S. arenarium* was the only species to multiply by injection in *G. mellonella*, although with low production (1,076 IJs/larva), being a rather inefficient system for production of these species. An alternative host for *in vivo* production is *T. molitor*, since the treatment *S. arenarium* by topic complex yielded high production (103,059 IJs/larva). *S. glaseri* did not multiply by any infection system in *T. molitor* and *B. mori*. The multiplication of this species with the simple topic system in *G. mellonella* achieved a total production of 132,065 IJs/larva. The

<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia. Lavras, MG, Brasil.

simple topic and complex systems presented the largest productions per larva. *T. molitor* for the species *S. arenarium* and *B. morifera* for *S. carpocapsae* presented great possibilities as alternative hosts for *in vivo* production.

KEY WORDS: Microbial control, multiplication, entomonematodes, insect pest.

## INTRODUÇÃO

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) possuem alta potencialidade como agentes biológicos para controle de insetos praga, sendo considerados, nos últimos anos, ferramentas efetivas a serem incorporadas em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) em diferentes culturas.

A produção *in vivo* é a base para estudos básicos com NEPs, já que é utilizada no isolamento de espécies, no estudo da biologia e na produção em pequena escala para trabalhos exploratórios de laboratório, casa-de-vegetação e campo.

Segundo GAUGLER & HAN (2002), para produção *in vivo* convencionalmente são utilizadas larvas de *Galleria mellonella* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). Este hospedeiro oferece elevada produção de juvenis infectantes (JIs) ( $> 1 \times 10^5$  JIs/larva) e podem ser usados na multiplicação da maioria das espécies de NEPs dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*. A média de produção, nesse hospedeiro, está entre 30.000 a 50.000 JIs por larva (POINAR, 1979), podendo chegar até a 200.000 JIs (DUICKY et al., 1964). Outros hospedeiros alternativos são conhecidos para este fim, entre eles *Spodoptera frugiperda* (Smith), (Lepidoptera: Noctuidae), *Amyelios transitella* (Walker) e *Tenebrio* spp. (Coleoptera: Tenebrionidae), sendo ambos criados facilmente a baixo custo (SIRJUSINGH, 1990; BLINOVA & IVANOVA, 1987 citados por GAUGLER & HAN, 2002).

Outro problema referente à produção *in vivo* de nematóides é a falta de padronização nas técnicas de produção, impedindo assim, que os NEPs sejam incorporados em programas de controle biológico. Dessa maneira, torna-se necessário buscar alternativas para a produção *in vivo*, padronizando-as e/ou melhorando os atuais métodos (FLANDERS et al., 1996; MOLINA & LÓPEZ, 2001). Por essa razão, este trabalho teve como objetivos avaliar três sistemas de infecção *in vivo* para três espécies de NEPs, avaliar quatro possíveis hospedeiros para produção de NEPs *in vivo* e padronizar as técnicas de produção para as diferentes espécies de nematóides e hospedeiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado no Município de Lavras, Estado de Minas Gerais.

Foram utilizadas 3 espécies de nematóides do gênero *Steinernema*: *S. carpocapsae* Weiser (1955), *S. glaseri* Steiner (1929) e *S. arenarium* Artyukhovsky (1967), cedidas pela Dra. Marineide Aguilera, da Universidade Federal de São Carlos, armazenadas em geladeira no laboratório, a uma temperatura de  $8 \pm 2^\circ \text{C}$ . Antes da execução dos experimentos, os JIs destes nematóides foram multiplicados em larvas de último instar de *G. mellonella* para reativar sua virulência, de acordo com a metodologia descrita por POINAR (1979).

Foram utilizadas 4 espécies de insetos obtidas de criação no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia-UFLA: larvas de último instar de *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae), *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Bombyx mori* (Linnaeus) (Lepidoptera: Bombycidae), com peso médio de  $0,24 \pm 0,09 \text{ g}$ ,  $0,53 \pm 0,13 \text{ g}$ ,  $0,48 \pm 0,07 \text{ g}$  e  $2,07 \pm 0,28 \text{ g}$ , respectivamente.

### Desinfecção superficial e ajuste das concentrações de JIs

O acondicionamento dos JIs foi feito à temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , durante 24h. Posteriormente, 1.000 JIs/mL foram adicionados a 1,5 mL de solução desinfetante (Timerosal, Sigma®) a 0,1% em água destilada esterilizada (ADE) durante 10 min, para a desinfecção superficial dos JIs. Finalmente foi retirado o máximo possível do volume do desinfetante, substituindo-o por solução salina em ADE (NaCl 0,5%), ajustando as concentrações desejadas determinadas com contagens diretas dos JIs, para o uso nos sistemas de infecção tópica e injeção.

### Sistemas de infecção empregados no experimento

-Tópica composta (ToC): Cada espécie de nematóide foi aplicada na concentração de  $100 \pm 10$  JIs diluída em 0,5 mL de ADE; em seguida, transferiram-se 5 larvas de cada hospedeiro para placas de Petri (diâmetro = 9 cm) contendo papel filtro Whatman # 1 umedecido com 1 mL de ADE e o inóculo.

-Tópicas simples (ToS): Cada espécie de nematóide foi aplicada na concentração de  $20 \pm 5$  JIs diluída em 0,5 mL de ADE, em placas de Petri (diâmetro = 5 cm) com papel filtro Whatman # 1, onde em seguida foram colocadas as larvas de cada hospedeiro individualizadas.

-Injeção (Inj): Utilizando uma seringa para aplicação de insulina de 1 mL foi injetada uma concentração

de  $20 \pm 5$  JIs diluída em 20  $\mu$ L de ADE, aplicados por hospedeiro, nos últimos segmentos da região posterior-ventral das larvas.

Todas as larvas, uma vez infectadas, foram mantidas sob temperatura de  $25 \pm 2^\circ$  C e escuro constante durante 48h, de acordo com metodologia de TAYLOR & SHIELDS (1990).

### **Desenvolvimento de sintomas, emergência e contagens diárias de nematóides**

As larvas infectadas dos diferentes hospedeiros foram colocadas em placas de Petri sobre papel filtro (câmara seca), em incubação a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ$  C, UR de 70% e fotofase de 12h por 5 dias, tempo no qual se observou a sintomatologia típica de infecção por NEPs do gênero *Steinernema*: cor amarela até cor café. As larvas que não apresentaram essa sintomatologia foram descartadas.

Ao final de 120h, com o uso de armadilhas de White, para facilitar a emergência e recuperação dos NEPs, foram separadas individualmente as larvas de *G. mellonella* e *B. mori* que apresentaram sintomatologia, e estas foram colocadas à temperatura de  $25 \pm 2^\circ$  C em incubadora. As larvas mortas de *T. molitor* e *S. frugiperda*, por não apresentarem sintomatologia visível em virtude de terem cutículas escuras, foram colocadas diretamente em armadilhas de White. Uma vez observada a emergência de JIs, estes foram coletados diariamente até a observação do esgotamento da larva. Os nematóides coletados diariamente foram submetidos a contagens, para avaliação da produção. A coleta dos NEPs foi feita através de lavagens sucessivas dos hospedeiros de cada armadilha de White, utilizando-se água destilada e vertendo o conteúdo da armadilha numa proveta graduada para estabelecer o volume total empregado na recuperação dos JIs.

Posteriormente, o volume total foi agitado, do qual tomou-se um volume de 100  $\mu$ L, colocado em câmaras de contagem de acrílico de 4 x 3 cm com 49 quadrantes para contabilizar o número de JIs produzidos. Esse procedimento foi realizado quatro vezes para cada repetição. Conhecendo o volume total e o número total de nematóides em 100  $\mu$ L, estabeleceu-se o número de JIs por mL, possibilitando realizar o cálculo do número de juvenis emergidos do hospedeiro por dia.

### **Delineamento experimental e variáveis avaliadas**

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas no tempo (dias), em esquema fatorial 3 x 4 na parcela (3 sistemas de infecção e 4 hospedeiros). Cada tratamento contou com 6 repetições (larvas). As avaliações foram feitas a cada 24h desde a emergência dos JIs até o esgotamento do hospedeiro.

As variáveis avaliadas foram produção diária (número total de JIs que emergiram em um dia) e produção acumulada (número total de JIs que emergiram até o esgotamento do hospedeiro). Para cada variável, foi realizada a análise de variância. As médias das espécies de hospedeiros e os sistemas de infecção foram comparados através do teste Scott-Knott. Para os dias de produção foi testado o ajuste de equações de regressão.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Produção diária de nematóides entomopatogênicos**

Verificou-se para a variável produção diária, que a interação tripla entre os fatores hospedeiro, sistema de infecção e dias de produção foi significativa ( $P < 0,05$ ) para as 3 espécies de nematóides.

Para a espécie *S. carpocapsae*, o modo de infecção injeção (Inj) não apresentou produção em nenhum dos hospedeiros avaliados. Quanto à produção observada nos sistemas de infecção tópica composta (ToC) e tópica simples (ToS), esta foi diferente para os 3 primeiros dias e o 6º dia. Assim, para *G. mellonella*, *B. mori* e *T. molitor* o sistema de infecção tópica simples apresentou diferença (Scott-Knott  $P < 0,05$ ) em relação ao sistema tópica composta, obtendo as maiores produções diárias (Figs. 1A e B). Para o hospedeiro *S. frugiperda* não houve diferenças por sistema de infecção durante os 3 dias de produção. Quanto a *G. mellonella* com os dois sistemas de infecção nos 4 primeiros dias de produção, houve diferença (Scott-Knott  $P < 0,05$ ) comparados aos outros hospedeiros, apresentando as maiores produções diárias, destacando-se o tratamento tópica simples para o 2º e 3º dias com uma produção de 72.304 e 89.342 JIs, respectivamente. O hospedeiro *B. mori* produziu por mais tempo (9 dias) nos 2 sistemas de infecção e só apresentou diferenças para o sistema tópica composta do 4º dia até o 9º dia com relação aos demais hospedeiros. A produção de *T. molitor* foi semelhante a partir do 4º dia com relação a *G. mellonella* (Fig. 1A).

Para a espécie *S. glaseri*, em geral o modo de infecção injeção não apresentou diferenças (Figs. 2A e B). A maior produção observada foi no sistema tópica composta (ToC) em *G. mellonella*, apresentando diferenças (Scott-Knott  $P < 0,05$ ) com relação ao sistema tópica simples para os 3 primeiros dias; do 5º ao 9º dia não ocorreram diferenças. As maiores produções diárias foram observadas para o 1º dia no sistema tópica simples e composta com 49.856 e 43.356 JIs, respectivamente, sendo importantes pela alta produção obtida. Quanto ao hospedeiro *G. mellonella*, foi o único que permitiu a multiplicação do nematóide nos 2 sistemas empregados até o 7º e 10º dia.

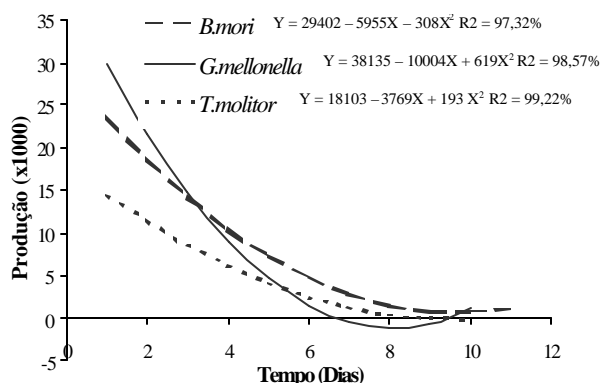


Fig. 1A - Produção acumulada estimada para *Steinerema carpocapsae* com o sistema de infecção tópica composta por hospedeiro (Temp. =  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , escuro constante e UR =  $70 \pm 10\%$ ).

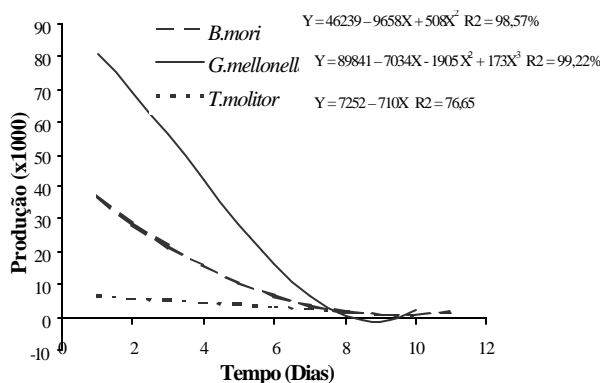


Fig. 1B - Produção acumulada estimada para *Steinerema carpocapsae* com o sistema de infecção tópica simples por hospedeiro (Temp. =  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , escuro constante e UR =  $70 \pm 10\%$ ).

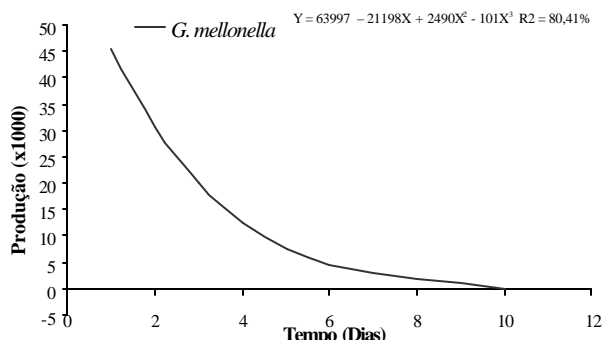


Fig. 2A - Produção acumulada estimada para *Steinerema glaseri* com o sistema de infecção tópica composta por hospedeiro (Temp. =  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , escuro constante e UR =  $70 \pm 10\%$ ).

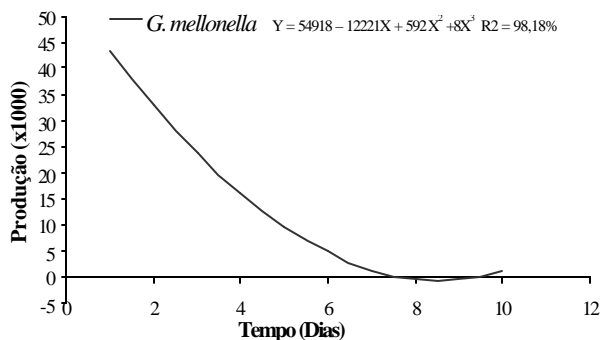


Fig. 2B - Produção acumulada estimada para *Steinerema glaseri* com o sistema de infecção tópica simples por hospedeiro (Temp. =  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , escuro constante e UR =  $70 \pm 10\%$ ).

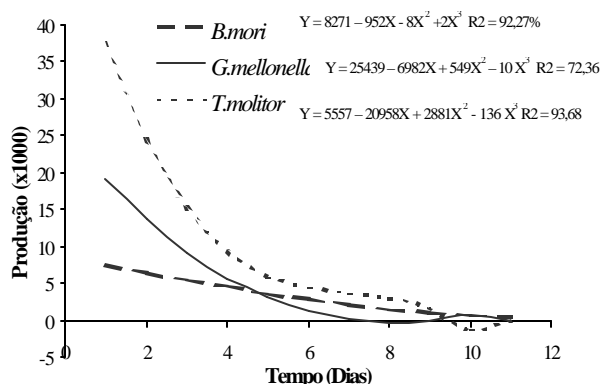


Fig. 3A - Produção acumulada estimada para *Steinerema arenarium* com o sistema de infecção tópica composta por hospedeiro (Temp. =  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , escuro constante e UR =  $70 \pm 10\%$ ).

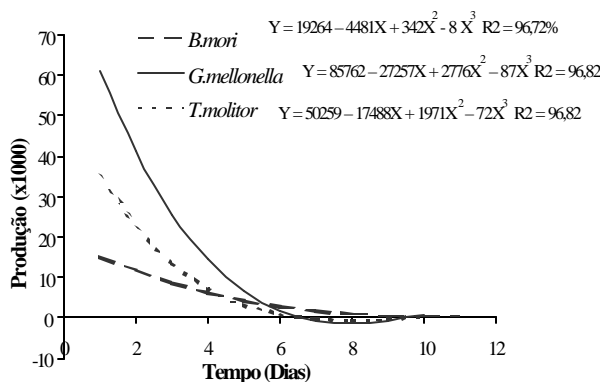


Fig. 3B - Produção acumulada estimada para *Steinerema arenarium* com o sistema de infecção tópica simples por hospedeiro (Temp. =  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , escuro constante e UR =  $70 \pm 10\%$ ).

Finalmente, para a espécie *S. arenarium* não houve produção no modo de infecção por injeção, com exceção a uma baixa produção em *G. mellonella* nos 3 primeiros dias (Figs. 3A e B). Quanto à produção observada nos sistemas de infecção tópica composta

(ToC) e tópica simples (ToS) houve diferença para os 3 primeiros dias. Assim, para *T. molitor*, *G. mellonella* e *B. mori* com o sistema de infecção tópica simples houve diferença (Scott-Knott  $P < 0,05$ ) em relação ao sistema tópica composta, obtendo as maiores produ-

ções diárias. Para o hospedeiro *S. frugiperda*, não houve produção em nenhum dos sistemas de infecção. Quanto ao hospedeiro *T. molitor*, o sistema de infecção composta foi diferente dos outros hospedeiros, apresentando as maiores produções diárias, destacando-se a produção obtida para o 1º e 2º dias com 37.394 e 27.158 JIs, respectivamente. O hospedeiro *B. mori* foi o hospedeiro que produziu por maior tempo (até o 10º dia) nos 2 sistemas de infecção (Tabela 3).

Tabela 1 - Produção média diária de *Steinernema carpocapsae* em diferentes hospedeiros e sistemas de infecção (Temp. = 25 ± 2° C, escuro constante e UR = 70 ± 10%) - Desdobramento da interação Hospedeiro x Infecção.

Hospedeiro	Sistema de infecção		
	Inj	ToC	ToS
<i>B. mori</i>	0 a A	86.012 c B	128.923 C C
<i>G. mellonella</i>	0 a A	79.607 c B	302.124 D C
<i>S. frugiperda</i>	0 a A	3.418 a A	4.231 A A
<i>T. molitor</i>	0 a A	48.134 b B	33.471 B B

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Tabela 2 - Produção média diária de *Steinernema glaseri* em diferentes hospedeiros e sistemas de infecção (Temp. = 25 ± 2° C, escuro constante e UR = 70 ± 10%) - Desdobramento da interação Hospedeiro x Infecção.

Hospedeiro	Sistema de infecção		
	Inj	ToC	ToS
<i>B. mori</i>	0 a A	0 a A	0 A A
<i>G. mellonella</i>	0 a A	126.672 b B	132.025 b B
<i>S. frugiperda</i>	0 a A	0 a A	0 a A
<i>T. molitor</i>	0 a A	0 a A	0 a A

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Tabela 3 - Produção média diária de *Steinernema arenarium* em diferentes hospedeiros e sistemas de infecção (Temp = 25 ± 2° C, escuro constante e UR = 70 ± 10%) - Desdobramento da interação Hospedeiro x Infecção.

Hospedeiro	Sistema de Infecção		
	Inj	ToC	ToS
<i>B. mori</i>	0 a A	35.281 b B	53.265 b C
<i>G. mellonella</i>	1.076 a A	51.624 c B	149.212 d C
<i>S. frugiperda</i>	0 a A	0 a A	0 a A
<i>T. molitor</i>	0 a A	103.059 d B	81.460 c C

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Como foram encontradas diferenças na interação tripla com relação aos dias de produção de nematóides, foi realizada uma segunda análise de variância para o desdobramento dos dias de produção dentro de cada nível dos fatores hospedeiro e sistemas de infecção, a qual foi significativa ( $P < 0,05$ ) para alguns tratamentos nas 3 espécies avaliadas.

Para a espécie *S. carpocapsae* com o sistema tópica composta obteve-se uma alta produção diária nos 3 hospedeiros, sendo a maior produção nos primeiros dias, com esgotamento no 7º dia. *G. mellonella* e *B. mori* obtiveram as maiores produções diárias estimadas em 29.779 e 23.754 JIs, respectivamente. Para *B. mori* e *T. molitor*, o decréscimo da produção foi uniforme, prolongando-se até o esgotamento final no 8º e 11º dia, respectivamente. A produção em *G. mellonella* decresceu mais rapidamente do 3º até o 7º dia, concentrando-se nos primeiros dias (Fig. 1A).

Com relação ao sistema tópica simples, foi o mais efetivo para a produção de *S. carpocapsae* nos hospedeiros *G. mellonella* e *B. mori*, obtendo-se as maiores produções estimadas no 1º dia com 81.075 e 37.139 JIs, respectivamente, sendo superiores para os mesmos hospedeiros com relação ao sistema tópica composta (Fig. 1B). A produção em *T. molitor* foi baixa com relação ao sistema tópica composta, mas foi distribuída mais uniformemente durante os 10 dias em que apresentou produção. Para *G. mellonella* e *B. mori*, obteve-se uma boa produção nos primeiros 6 dias, apresentando-se um decréscimo uniforme da produção até o 8º dia, com o esgotamento final para o 10º e 11º dias, respectivamente. Assim, para produção desta espécie, no sistema de infecção tópica simples, *G. mellonella* apresenta as melhores condições e pode-se complementar com o uso de um hospedeiro alternativo como *B. mori*, coletando-se os JIs nos 3 primeiros dias após a emergência inicial.

Para a espécie *S. glaseri* com o sistema tópica composta obteve-se produção diária só no hospedeiro *G. mellonella*, sendo a maior produção nos 2 primeiros dias, com produções diárias estimadas de 45.188 e 30.754 JIs/larva respectivamente, tornando-se esgotada no 8º dia (Fig. 2A).

Com relação ao sistema tópica simples, da mesma forma *G. mellonella* foi o único hospedeiro que permitiu a multiplicação de *S. carpocapsae*, sendo as maiores produções diárias obtidas nos 3 primeiros dias, com 43.298, 32.915 e 23.824 JIs/larva respectivamente, tornando-se esgotada no 6º dia (Fig. 2B). Assim, para produção desta espécie, os sistemas de infecção tópica simples e composta em *G. mellonella* foram semelhantes e apresentam as melhores condições para implementação, sendo feitas coletas de JIs de *S. glaseri* nos três primeiros dias principalmente.

Para a espécie *S. arenarium* com o sistema tópica composta obteve-se uma boa produção diária em 2

hospedeiros, sendo a maior produção nos 3 primeiros dias, tornando-se esgotada no 6º dia. *T. molitor* e *G. mellonella* obtiveram as maiores produções diárias, com 37.455 e 18.995 JIs, respectivamente. Para estes hospedeiros, o decréscimo da produção foi uniforme, prolongando-a até o esgotamento final no 9º dia. A produção em *G. mellonella* decresceu mais rapidamente do 3º até o 5º dia, com relação a *T. molitor*, cujo decréscimo de produção foi mais prolongado (Fig. 3A). *B. mori* não apresentou uma baixa produção diária para *S. arenarium*, com um leve incremento só no 1º dia (7.313 JIs), sendo esta produção semelhante durante os primeiros 4 dias, e com um decréscimo uniforme até o 11º dia.

O sistema tópica simples foi mais efetivo para a produção de *S. carpocapsae* nos hospedeiros *G. mellonella* e *T. molitor*, obtendo-se as maiores produções estimadas no primeiro dia, com 60.924 e 34.900 JIs, respectivamente, sendo superiores para os mesmos hospedeiros com relação ao sistema tópica composta (Fig. 3B). Aliás, com este sistema, *G. mellonella* superou a produção de *T. molitor*, o que reafirma a interação significativa entre hospedeiro e sistema de infecção. Para *G. mellonellae T. molitor*, obteve-se uma boa produção nos primeiros 4 dias, apresentando-se um rápido esgotamento final no sétimo dia para as duas espécies em comparação com o sistema tópica composta, o qual se prolongou até o 9º dia.

Quanto à produção em *B. mori*, foi da mesma forma baixa com relação ao sistema tópica composta, mas apresentou um leve incremento nos 2 primeiros dias, com 15.116 e 11.603 JIs, diminuindo nos dias seguintes até o esgotamento no 12º dia.

Para a maioria das espécies de NEPs, a produção diária concentrou-se nos 3 primeiros dias, acumulando-se aproximadamente entre 51 e 74% do total emergido para esse tempo. O decréscimo da emergência variou entre o 7º e o 11º dia. Foi observado que hospedeiros menores como *G. mellonella*, *T. molitor* e *S. frugiperda*, produzem um maior número de JIs nos primeiros 3 dias, com decréscimo até esgotamento total entre o 7º e 8º dia aproximadamente, ao contrário de *Bombyx mori*, que teve a produção distribuída mais uniformemente no tempo e prolongou o esgotamento até um máximo de ias.

Segundo DUTKY *et al.* (1964) e ADAMS & NGUYEN (2002), a principal causa da redução na produção dos JIs deve-se, principalmente, ao tamanho do hospedeiro, já que insetos de tamanhos maiores favorecem ciclos mais longos e um maior número de gerações, por existir uma reserva maior de nutrientes.

GOUGE & HAGUE (1994) encontraram, em seus resultados, que o tempo de emergência dos JIs é dependente também do tamanho do hospedeiro; em hospedeiros menores como larvas de *Bradysia paupera* (Diptera: Sciaridae), a emergência de nematóides ocor-

reu até o 6º dia, ao contrário de um hospedeiro como *G. mellonella*, para o qual a emergência pode se prolongar em até duas semanas.

As coletas, para a maioria das espécies de nematóides, devem ser feitas nos dias de maior emergência, já que possivelmente os JIs coletados nos últimos dias são produto de hospedeiros esgotados nos quais, possivelmente, a qualidade e virulência dos JIs podem ser baixas. Também segundo STOCK (1998), nematóides coletados de últimas emergências são menos virulentos, já que são produtos de hospedeiros esgotados, nos quais o consumo de nutrientes é reduzido, recomendando-se a coleta de nematóides emergidos nos 1º dias. Assim, a coleta, de modo geral, independentemente do hospedeiro deve ser feita nos quatro primeiros dias, quando ocorrem as maiores emergências.

Quanto à reprodução em diferentes hospedeiros, foi observado que *S. glaseri* não conseguiu se multiplicar em hospedeiros como *B. mori*, *S. frugiperda* e *T. molitor*; da mesma forma, *S. arenarium* não conseguiu se multiplicar em *S. frugiperda*, sendo que estas duas espécies de nematóides multiplicaram-se satisfatoriamente em *G. mellonella*. Talvez estes hospedeiros alternativos não tenham oferecido as condições ideais para a produção *in vivo* para tais espécies de nematóides, possivelmente pela ação do sistema de defesa do inseto, que impediu o desenvolvimento dos nematóides e/ou de suas bactérias simbióticas.

Segundo DE DOUCET *et al.* (1999), a especificidade acontece somente em algumas espécies de NEPs, nas quais a interação nematóide/hospedeiro, que é uma associação co-evolutiva, reduz a faixa de hospedeiros. MAXWELL *et al.* (1994) afirmam que a falta de especificidade deriva da variação de fases das bactérias simbióticas, as quais em hospedeiros não-específicos, não produzem as quantidades suficientes de antibióticos (xenocoumacina e xenorhabdinas), fazendo com que o nematóide seja patogênico, mas não virulento, com baixa capacidade de multiplicação.

OZER & UNLU (2003) afirmam que as diferenças de virulência e multiplicação entre as espécies de nematóides podem ser maiores ou menores para um hospedeiro suscetível, como no caso *G. mellonella*, que permitiu a multiplicação de todas as espécies de nematóides.

### **Produção acumulada de nematóides entomopatogênicos**

Para a variável produção acumulada, a análise de variância foi significativa para a interação dupla entre os fatores hospedeiro e sistemas de infecção.

Para a espécie *S. carpocapsae*, o sistema de infecção tópica simples apresentou diferenças (Scott-Knott  $P < 0,05$ ) com relação aos outros sistemas empregados, na

maioria dos hospedeiros, com exceção de *S. frugiperda*. Quanto ao hospedeiro, principalmente no sistema tópica simples, *G. mellonella* apresentou a maior produção obtida nos experimentos, com 302.124 JIs. *B. mori*, para o mesmo sistema de infecção, apresentou alta produção com 128.923 JIs (Tabela 1). Para a espécie *S. glaseri* só houve produção com os sistemas de infecção tópica simples e composta em *G. mellonella*, com 132.025 e 125.672 JIs, sem apresentar diferença (Tabela 2).

Finalmente, para *S. arenarium*, o sistema de infecção tópica simples apresentou diferença (Scott-Knott  $P < 0,05$ ) em relação aos outros sistemas empregados, com exceção de *T. molitor*, o qual se destacou no sistema tópica composta. Quanto ao hospedeiro *G. mellonella*, houve diferença com o sistema tópica simples (149.212 JIs) e *T. molitor* foi diferente com o sistema tópica composta (103.059 JIs) (Tabela 3). Por outro lado, as maiores produções acumuladas das espécies de nematóides testadas foram determinadas pela interação sistema de infecção e hospedeiro, o que aconteceu principalmente com o sistema de infecção tópica simples em *G. mellonella*, destacando-se as produções obtidas para *S. carpocapsae* com 302.124 JIs (novo registro), para *S. glaseri*, (132.025 JIs), e para *S. arenarium* (149.212 JIs). Como hospedeiros alternativos, podem ser empregados *B. mori* com o sistema de infecção tópica simples para multiplicar *S. carpocapsae* com uma produção de 128.923 JIs, e *T. molitor* com o sistema tópica composta, com 103.059 JIs.

Estes resultados registram produções aproximadas às encontradas por DUTKY *et al.* (1964), com 160.000 JIs para *Steinernema carpocapsae* "Mexican strain" em *G. mellonella*, e com as registradas por MOLINA & LÓPEZ (2001) para *S. carpocapsae*, com 149.258 JIs/larva. Quanto às altas produções acumuladas, somente estavam registradas para heterorhabditídeos em *G. mellonella*, como é apresentado em diversos trabalhos, tais como JANSSON (1996) que obteve para *Heterorhabditis bacteriophora* Bacardis e FL2122, uma produção de 137.229 e 238.692 JIs/larva em *G. mellonella* respectivamente, e OZER & UNLU (2003), que obtiveram, para *H. bacteriophora*, 141.562 a 271.593 JIs, inclusive chegando a atingir a produção de 350.000 JIs para esta espécie em *G. mellonella* (WOODRING & KAYA, 1988).

Também é importante ressaltar que o tamanho do hospedeiro não foi determinante na produção obtida. *G. mellonella*, sendo um hospedeiro menor (1/9) com relação a *B. mori*, promoveu as maiores produções dos experimentos. Como já dito anteriormente, em contraposição, alguns autores, como ADAMS & NGUYEN (2002) e OZER & UNLU (2003), afirmam que a produção é dependente de forma direta do tamanho do corpo do hospedeiro.

## AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Juan Carlos López Núñez, do Departamento de Entomologia do Centro Nacional de Investigaciones de Café "Cenicafé" (Chinchiná, Caldas, Colômbia) e Claudia Dolinski, do Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense "UENF" (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil) por suas sugestões durante a pesquisa e contribuição na versão final do documento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B.J. & NGUYEN, K.B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. New Jersey: Rutgers University, 2002. p.1-28.
- DEDOUCET, M.M.A.; BERTOLOTTI, A.L.; GIAYETTO, A.L.; MIRANDA, M.B. Host range, specificity, and virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum*, and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. *J. Invertebr. Pathol.*, v.73, n.3, p.237-242, 1999.
- DUTKY, S.R. THOMPSON, J.V.; CANTWE, G.E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *J. Insect Pathol.*, v.6, n.4, p.417-422, 1964.
- FLANDERS, L.K.; MILLER, M.J.; SHIELDS, J.E. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *J. Econ. Entomol.*, v.89, n.2, p.373-380, 1996.
- GAUGLER, R. & HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. New Jersey: Rutgers University, 2002. p.289-310.
- GOUGE, D.H. & HAGUE, N.G.M. Development of *Steinernema feltiae* (Steinernematidae: Nematoda) in *Bradysia paupera* (Sciaridae: Diptera). *Ann. Appl. Biol.*, v.126, n.2, p.395-401, 1994.
- JANSSON, K.R. Infectivity and reproduction of three *Heterorhabditid* nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) in two insect host. *Fla. Entomol.*, v.79, n.3, p.363-368, 1996.
- MAXWELL, P.W.; CHEN, G.; WEBSTER, J.M.; DUNPHY, G.B. Stability and activities of antibiotics produced during infection of the Insect *Galleria mellonella* by two isolates of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.60, n.2, p.715-721, 1994.
- MOLINA, A.J.P. & LÓPEZ, N.J.C. Producción *in vivo* de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. *Rev. Colomb. Entomol.*, v.27, n.1-2, p.73-78, 2001.
- OZER, N. & UNLU, I.O. Evaluation of the reproductive potential and competition between two entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Turk. J. Biol.*, v.27, p.149-155, 2003.
- POINAR, G.O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R. & KAYA, H.K. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.23-58.

- POINAR, G.O. *Nematodes for biological control of insects*. Boca Raton: CRC Press, 1979. p.143-148.
- STOCK, S.P. *Sistemática y biología de nematodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica*. Santa Fe: Universidad Nacional del Litoral Esperanza, 1998. 88p.
- TAYLOR, P.S.; SHIELDS, E.J.A Microcomputer-controlled system of environmental chambers suitable for the study of thermoperiodic effects. *Environ. Entomol.*, v.19, n.4, p.866-873, 1990.
- WOODRING, J.L. & KAYA, H.K. Steinrnematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques soulhern cooperative. *Arkansas Agric. Exp. Stn. Ser. Bull.*, n.331, 1988.
- Recebido em 22/4/04  
Aceito em 12/8/04