

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

J.P.A. Molina¹, A. Moino Junior², R.S. Cavalcanti²

¹Universidade 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

²Universidade 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. morifor* *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 (DUIKY *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 ± 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.

-Tópica simples (ToS): Cada espécie de nematóide foi aplicada na concentração de 20 ± 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 ± 5 JIs diluída em $20 \mu\text{L}$ 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 $25 \pm 2^\circ \text{C}$ 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 $25 \pm 2^\circ \text{C}$, 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 $25 \pm 2^\circ \text{C}$ 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 $100 \mu\text{L}$, colocado em câmaras de contagem de acrílico de $4 \times 3 \text{ cm}$ 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 $100 \mu\text{L}$, 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 3×4 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 4 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.

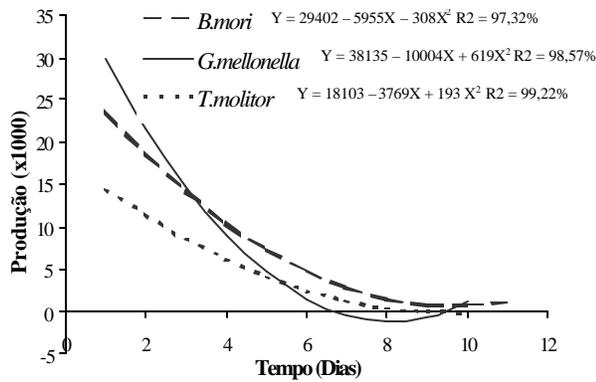


Fig. 1A - Produção acumulada estimada para *Steinerema carpocapsae* com o sistema de infecção tópica composta por hospedeiro (Temp. = $25 \pm 2^\circ\text{C}$, escuro constante e UR = $70 \pm 10\%$).

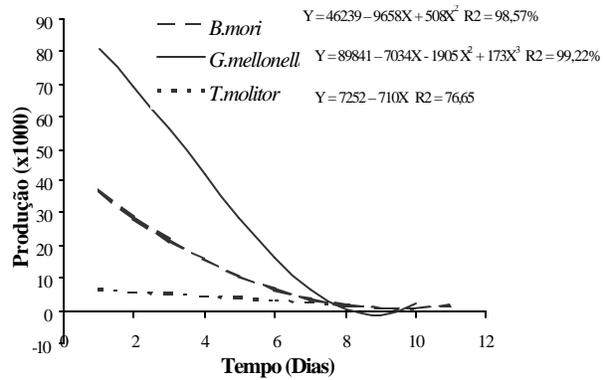


Fig. 1B - Produção acumulada estimada para *Steinerema carpocapsae* com o sistema de infecção tópica simples por hospedeiro (Temp. = $25 \pm 2^\circ\text{C}$, escuro constante e UR = $70 \pm 10\%$).

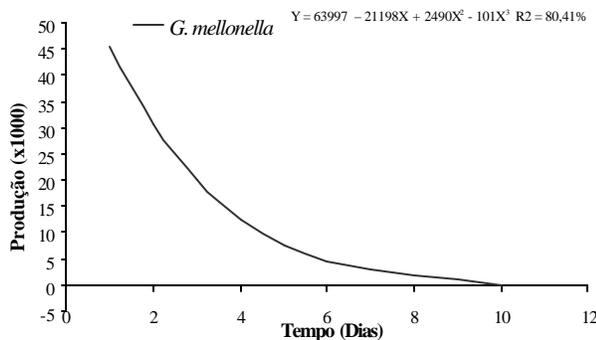


Fig. 2A - Produção acumulada estimada para *Steinerema glaseri* com o sistema de infecção tópica composta por hospedeiro (Temp. = $25 \pm 2^\circ\text{C}$, escuro constante e UR = $70 \pm 10\%$).

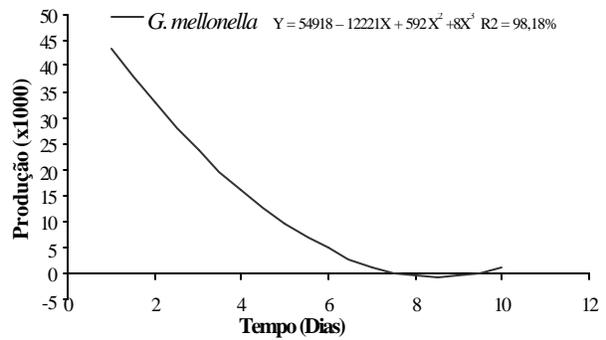


Fig. 2B - Produção acumulada estimada para *Steinerema glaseri* com o sistema de infecção tópica simples por hospedeiro (Temp. = $25 \pm 2^\circ\text{C}$, escuro constante e UR = $70 \pm 10\%$).

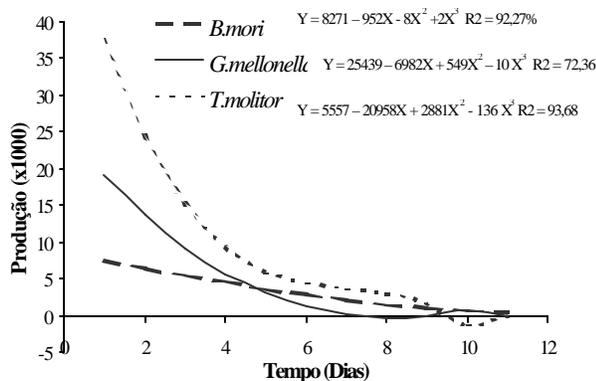


Fig. 3A - Produção acumulada estimada para *Steinerema arenarium* com o sistema de infecção tópica composta por hospedeiro (Temp. = $25 \pm 2^\circ\text{C}$, escuro constante e UR = $70 \pm 10\%$).

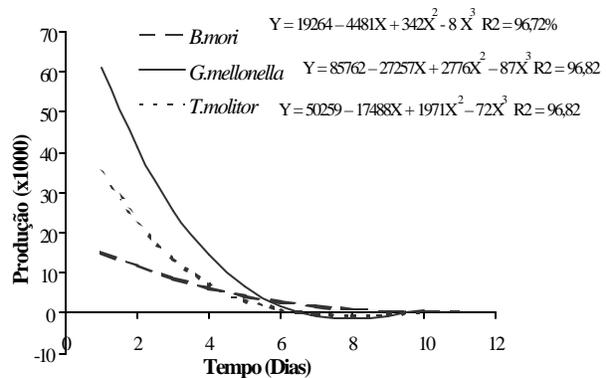


Fig. 3B - Produção acumulada estimada para *Steinerema arenarium* com o sistema de infecção tópica simples por hospedeiro (Temp. = $25 \pm 2^\circ\text{C}$, escuro constante e UR = $70 \pm 10\%$).

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. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques southern cooperative. *Arkansas Agric. Exp. Stn. Ser. Bull.*, n.331, 1988.

Recebido em 22/4/04
Aceito em 12/8/04