

**TÉCNICAS DE PRODUÇÃO *in vivo* DE NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA:
HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE) EM
Galleria mellonella (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) E
HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS**

CARLA RUTH DE CARVALHO BARBOSA

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CARLA RUTH DE CARVALHO BARBOSA

**TÉCNICAS DE PRODUÇÃO *in vivo* DE NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)
EM *Galleria mellonella* (L.) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) E
HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “stricto sensu” em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador
Prof. Dr. Alcides Moino Junior

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2005

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Barbosa, Carla Ruth de Carvalho

Técnicas de produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos
(Rhabditida: Heterorhabditidae) em *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera:
Pyralidae) e hospedeiros alternativos / Carla Ruth de Carvalho Barbosa. --
Lavras : UFLA, 2005.

91 p. : il.

Orientador: Alcides Moino Junior.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Heterorhabditis*. 2. Controle microbiano. 3. *Anticarsia gemmatilis*.
4. *Agrotis ipsilon*. 5. *Diatraea saccharalis*. 6. Multiplicação *in vivo*. 7.
Patogenicidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-595.182

CARLA RUTH DE CARVALHO BARBOSA

**TÉCNICAS DE PRODUÇÃO *in vivo* DE NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE)
EM *Galleria mellonella* (L.) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) E
HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação “stricto sensu” Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 11 de fevereiro de 2005

Profa. Dra. Marineide Mendonça Aguilera UFSCar

Dr. Luís Garrigós Leite Instituto Biológico Campinas

Prof. Dr. Alcides Moino Junior
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

À minha mãe, Ione Ruth de Carvalho Barbosa, não somente pela concretização deste trabalho, mas pelo amor, respeito e confiança depositados em mim em todos os momentos da minha vida; ao meu pai, Carlos Alberto Barbosa pela sábia lição de vida e aos meus irmãos, Carlos e Carline, pelo carinho e compreensão.

DEDICO

A Deus pela força interior capaz de superar momentos difíceis e oportunidade de desfrutar o sucesso de cada etapa da vida; à prof.(a) Ms. Maria de Fátima Veras Araújo Carvalho, pelo incentivo e ajuda no meu ingresso no campo da pesquisa; ao meu amigo e pesquisador, Dr. Paulo Henrique Soares da Silva, pela amizade e dedicação à pesquisa.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela grande oportunidade na pesquisa e conhecimentos adquiridos.

Ao Departamento de Entomologia (DEN), pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alcides Moino Junior, pela amizade e orientação segura na realização dos experimentos, disponibilizando-se por diversas vezes no interesse de resolver problemas apresentados neste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Entomologia da UFLA, bem como aos secretários Lisiane O. Orlandi e Fábio P. Carriço, pela amizade e colaboração.

Ao Prof. Antonio João dos Reis do Departamento de Administração da UFLA, pela valiosa contribuição na análise de custo da produção do nematóide utilizado nos experimentos.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e a Neide Zerio do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), pela disposição no fornecimento de material, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho.

Aos colegas de turma Ester Azevedo, Lucia Mendonça, Fabrícia Zimerman, Danila Néri, Jean Patrick Bonani, Leonardo Pierre, Marçal Pedro Neto, Marcelo Reis e Paulo Henrique da Silva.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Insetos, Vanessa A. de Carvalho, Ricardo Cavalcanti, Giselle C. Souza e Flaviane A. de Carvalho, pelo apoio e consideração durante os trabalhos.

Em especial ao meu grande amigo Aldomario Santo Negrisoni Junior, pela paciência, sugestões para melhoria deste trabalho, além dos ensinamentos e agradável convívio.

Ao meu esposo, Laí Alves Dantas Filho que, embora à distância, impulsionou-me grandemente para a concretização dessa fase da minha vida.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução Geral	01
2 Referencial Teórico.....	04
2.1 Produção de nematóides entomopatogênicos	04
2.1.1 Produção <i>in vitro</i> : meio sólido	04
2.1.1.1 Fatores que afetam a produção	06
2.1.2 Produção <i>in vitro</i> : meio líquido	07
2.1.2.1 Fatores que afetam a produção	09
2.1.3 Produção <i>in vivo</i>	10
2.1.3.1 Metodologia para produção <i>in vivo</i>	13
2.1.3.2 Fatores que afetam a produção	13
2.2 Formulação e armazenamento	17
2.3 Hospedeiros alternativos: patogenicidade e virulência.....	22
3 Referências Bibliográficas	28
CAPITULO 2.....	40
1 Resumo	40
2 Abstract.....	41
3 Introdução	42
4 Material e Métodos	44
4.1 Nematóides entomopatogênicos	44
4.2 Criação e manutenção de <i>G. mellonella</i>	44
4.3 Produção do inóculo de nematóides	45
4.4 Confirmação da sintomatologia, emergência de JIs e contagens de nematóides	45
4.5 Determinação da concentração letal máxima (Cl ₉₉).....	45
4.6 Armadilhas de White	46
4.7 Funil de Baermann.....	46
4.8 Delineamento experimental e variáveis analisadas.....	47
4.9 Custo de produção de JIs nos diferentes sistemas.....	48
4.9.1 Custo fixo (CF).....	48
4.9.2 Componentes do custo fixo.....	49
4.9.3 Custo variável (CV).....	51
4.9.4 Componentes do custo variável.....	52

4.9.5 Dados para análise econômica simplificada	53
5 Resultados e Discussão	56
5.1 Estimativa da concentração letal máxima (CL ₉₉).....	56
5.2 Produção total de nematóides entomopatogênicos	57
5.3 Custo de produção de JIs nos diferentes sistemas.....	59
5.3.1 Custo fixo (CF).....	59
5.3.2 Custo variável (CV).....	61
5.3.3 Custo total (CT).....	63
6 Conclusões	65
7 Referências Bibliográficas.....	66
CAPITULO 3.....	69
1 Resumo	69
2 Abstract.....	70
3 Introdução	71
4 Material e Métodos	73
4.1 Nematóides entomopatogênicos	74
4.2 Criação dos hospedeiros alternativos.....	74
4.3 Produção dos nematóides.....	75
4.4 Determinação da concentração letal máxima (Cl ₉₉).....	76
4.5 Produção de juvenis infectivos em hospedeiros alternativos.....	76
4.6 Delineamento experimental e variáveis analisadas.....	77
5 Resultados e Discussão.....	78
5.1 Estimativa da concentração letal máxima (CL ₉₉).....	78
5.2 Produção de JIs do nematóide nos insetos hospedeiros.....	80
5.3 Custo de produção de JIs nos hospedeiros alternativos	82
5.3.1 Custo fixo (CF).....	83
5.3.2 Custo variável (CV).....	83
5.3.3 Custo total (CT).....	84
6 Conclusões	86
7 Referências Bibliográficas.....	87
Considerações finais	91

RESUMO

BARBOSA, Carla Ruth de Carvalho. **Técnicas de produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) em *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) e hospedeiros alternativos.** Lavras: UFLA, 2005. 91p. (Dissertação - Mestrado em Entomologia)*

Diversas pesquisas têm evidenciado o potencial dos nematóides dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* como agentes de controle biológico de insetos-praga. Este trabalho teve como objetivos avaliar diferentes sistemas de produção de *Heterorhabditis bacteriophora* em *Galleria mellonella* e em hospedeiros alternativos, bem como analisar o custo de produção dos sistemas. Foi utilizado delineamento fatorial inteiramente casualizado para a estimativa da concentração letal máxima (CL₉₉) de *H. bacteriophora* em lagartas de *Galleria mellonella*, *Agrotis ipsilon*, *Diatraea saccharalis* e *Anticarsia gemmatalis* para a determinação do inóculo de produção. A multiplicação do nematóide foi realizada em armadilha de White com todos os hospedeiros e somente *G. mellonella* em funil de Baermann. Os dados de patogenicidade e produção de JIs por peso de lagarta foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial. A (CL₉₉) estimada foi de 2.404; 2.322; 1.793 e 1.685 JIs/placa de petri de 9 cm de diâmetro em lagartas de *G. mellonella*, *A. ipsilon*, *D. saccharalis* e *A. gemmatalis*, respectivamente. No sistema de armadilha de White a produção foi de 486.610; 351.868; 227.848 e 24.928 JIs/g de lagarta de *G. mellonella*, *D. saccharalis*, *A. gemmatalis* e *A. ipsilon*, respectivamente. Em funil de Baermann, a produção do nematóide em *G. mellonella* foi de 3.984.758 JIs/g de lagarta. O menor custo de produção do nematóide no sistema de armadilha de White foi de R\$ 49,86 (US\$ 16,62)/g de lagarta de *A. ipsilon* e em funil de Baermann de R\$ 7,36 (US\$ 2,45)/g de lagarta de *G. mellonella*. Os resultados indicaram que o melhor hospedeiro é *G. mellonella*, apresentando maior produção de *H. bacteriophora* a baixo custo e o melhor sistema de produção *in vivo* desse nematóide é o funil de Baermann.

* Orientador: Alcides Moino Junior - UFLA

ABSTRACT

BARBOSA, Carla Ruth de Carvalho. **Entomopathogenic nematodes production techniques *in vivo* (Rhabditida: Heterorhabditidae) in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) and alternative hosts.** Lavras: UFLA, 2005. 91p. (Dissertation - Master in Entomology)*

Several researches have shown the potential of nematodes belonging to genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* as biological control agents of insect pests. This study had as objectives, to evaluate different production systems of *Heterorhabditis bacteriophora* in *Galleria mellonella* and in alternative hosts, as well to analyze the production system costs. A factorial completely randomized was used delineation to estimate the maximum lethal concentration (LC₉₉) of *H. bacteriophora* in *G. mellonella*, *Agrotis ipsilon*, *Diatraea saccharalis* and *Anticarsia gemmatalis* caterpillars to determine inoculum production. The multiplication of the nematode was performed in White's trap with all the hosts and only *G. mellonella* in Baermann funnels. The pathogenicity data and JIs production per caterpillar weight were submitted to variance analysis and polynomial regression. The estimated LC₉₉ was 2.404; 2.322; 1.793 and 1.685 JIs/petri's dish in *G. mellonella*, *A. ipsilon*, *D. saccharalis*, and *A. gemmatalis* caterpillars, respectively. In White's trap system the production was 486.610; 351.868; 227.848; and 24.928 JIs/g *G. mellonella*, *D. saccharalis*, *A. gemmatalis* and *A. ipsilon* caterpillar, respectively. In Baermann's funnel, the nematode production in *G. mellonella* was 3.984.758 JIs/g of caterpillar. The least cost of nematode production in White's trap system was R\$ 32,53 (US\$ 10,84)/g of *A. ipsilon* caterpillar and in Baermann's funnel, R\$ 6,69 (US\$ 2,23)/g *G. mellonella* caterpillar. The results indicated that the best host is *G. mellonella*, showing higher *H. bacteriophora* production at low cost and the best production system *in vivo* of that nematode is the Baermann's funnel.

* Adviser: Alcides Moino Junior - UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O manejo integrado de pragas (MIP) é definido como sendo um sistema de decisão para uso de táticas de controle, isoladamente ou associadas harmoniosamente, numa estratégia de manejo baseada em análises de custo/benefício que levam em conta o interesse e ou impacto nos produtores, sociedade e ambiente (Gallo et al., 2002).

O controle biológico deve ser considerado como um componente inter e multidisciplinar em programas de MIP, conjuntamente com outras medidas de controle de insetos-praga. O controle microbiano, como um ramo do controle biológico, visando a utilização de entomopatógenos (bactérias, fungos, vírus, protozoários e nematóides) no controle de insetos-praga, pode ser empregado em qualquer Programa de MIP (Guedes et al., 2000).

Nematóides são os mais numerosos organismos multicelulares presentes nos agroecossistemas, podendo ser encontrados em densidades acima de 30 milhões/m². Eles são encontrados explorando vários nichos, desde vegetação, solo e outras riquezas da biota (Nickle, 1991). Nematóides entomopatogênicos (NEPs) apresentam potencial para o controle biológico de pragas e têm sido usados na América do Norte, Europa, Ásia e Austrália para o controle de pragas de solo e de ambientes crípticos (Grewal et al., 2001).

Segundo Neves et al. (1998), muitas espécies de nematóides têm a capacidade de interferir na reprodução ou até mesmo na morte de insetos de diversas famílias e de várias ordens, dentre elas: Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera. Dentre as espécies de nematóides, as mais

estudadas em relação à produção são as pertencentes a duas famílias: Steinernematidae e Heterorhabditidae. Nematóides pertencentes a essas duas famílias, associados respectivamente às bactérias *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp., são comercialmente utilizados para o controle de insetos-praga de solo (Georgis & Manweiler, 1994), tornando viável sua produção massal para o uso em larga escala (Neves et al., 1998).

Existem dois métodos de produção de nematóides: *in vivo* e *in vitro*. A produção *in vitro* apresenta as vantagens de reduzir os custos, possibilitando um produto padrão, estável e viável. Ao contrário da produção *in vivo*, devido à possibilidade de produção em larga escala, torna os produtos mais competitivos (Neves et al., 1998).

De acordo com Gaugler et al. (2002), a produção *in vivo*, baseada na adaptação de Dutky et al. (1964) para armadilha de White, é apropriada para a produção em laboratório e realização de experimentos, sendo ineficiente na produção em larga escala. Apesar de não ter havido idéias de melhorias na produção *in vivo* durante o intervalo de 40 anos, avanços nesta tecnologia são necessários para que companhias possam produzir *in vivo* também comercialmente.

Segundo Poinar (1979), qualquer lagarta de dimensões grandes prestam-se à multiplicação desses grupos de nematóides, desde que exista para essa espécie de hospedeiro uma técnica de criação fácil e eficiente. Assim, faz-se necessária a obtenção de técnicas eficientes e de baixo custo de produção *in vivo* de NEPs em insetos hospedeiros, para serem utilizados comercialmente em pequena escala. Dessa forma, este trabalho teve como objetivos:

- avaliar duas técnicas de produção *in vivo* de juvenis infectivos (JIs) de *Heterorhabditis bacteriophora* em lagartas de *Galleria mellonella* e analisar os custos de produção desses sistemas;

- avaliar a produção *in vivo* de JIs de *H. bacteriophora* em lagartas de *Diatraea saccharalis*, *Anticarsia gemmatalis* e *Agrotis ipsilon* e analisar os custos de produção nesses hospedeiros.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de nematóides entomopatogênicos

Nos últimos anos, foram conseguidos avanços significativos no que diz respeito à produção em escala comercial de nematóides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*. Atualmente, produtos à base de NEPs são competitivos com inseticidas químicos no controle de insetos-praga em culturas de médio e alto valor comercial. A extensão de sua utilização em sistemas agrícolas de forma sustentável é dependente dos avanços tecnológicos capazes de produzir estes entomopatógenos em escala industrial e a custos de produção que não constituam um fator limitante.

O uso de NEPs como agentes no controle de inúmeras pragas depende da produção destes em grande escala, para serem incluídos em programas de manejo integrado de pragas (MIP). Para isso, são conhecidos dois métodos de produção massal: *in vitro* (meio sólido e líquido) e *in vivo*.

2.1.1 Produção *in vitro*: meio sólido

No início de 1931, Glaser reconheceu o valor do desenvolvimento de métodos em meio artificial para os NEPs e desenvolveu o primeiro método para *Steinernema* (*Neoplectana*) *glaseri* (Glaser, 1932), contra o besouro japonês de 1939 a 1942 (Fleming, 1968). No entanto, Glaser desconhecia a significância da bactéria simbiote na nutrição e patogenicidade dos nematóides, que foi reconhecida posteriormente (Poinar & Thomas, 1966).

A produção massal em dieta artificial foi feita 30 anos antes de Dutky et al. (1964) estabelecerem métodos efetivos *in vivo*. A produção massal de nematóides foi feita em bandejas com meio de cultura à base de polpa-de-vitelo, ácido salicílico e formaldeído para reprimir a contaminação por microrganismos

(McCoy & Girth, 1938), incluindo o simbionte natural, *Xenorhabdus poinare* (Gaugler et al., 1992). Hoje em dia, a necessidade da monoxenicidade é universalmente conhecida para a cultura *in vitro* de nematóides (Poinar & Thomas, 1966; Gaugler & Han, 2002).

Os nematóides foram criados inicialmente *in vitro* em um meio sólido axênico. Nematóides desinfestados em um meio monoxênico foram colocados sobre as bactérias simbiotes. A esterilização superficial dos JIs é insuficiente para estabelecer uma cultura monoxênica porque a bactéria contaminante pode sobreviver abaixo da cutícula. Assim, foi desenvolvido um método em que ovos de nematóides são obtidos da ruptura de fêmeas grávidas em solução alcalina, colocadas em culturas com o simbionte (Shapiro & Gaugler, 2002).

A cultura sólida foi usada inicialmente em arenas bidimensionais, placas de petri, contendo meio baseado em ração para cachorro, vísceras de porco, sangue de boi e outros produtos de origem animal. Wouts (1981) desenvolveu um meio (mais barato e mais consistente) incluindo levedura, extrato de levedura, caldo nutritivo, óleo vegetal e farinha de soja (Shapiro & Gaugler, 2002).

A cultura *in vitro* avançou consideravelmente com a invenção de sistemas tridimensionais envolvendo espuma de poliuretano. O meio líquido é misturado com a espuma e autoclavado. A bactéria é inoculada e, após três dias, os nematóides são colocados e coletados após 2 a 5 semanas, ficando a espuma dentro de peneiras imersas em água. Os JIs migram da espuma para a água e esta é bombeada para um tanque de coleta; o produto é limpo por meio de repetidas lavagens, sedimentação e decantação (Bedding, 1981). Assim como em placas de petri, o meio é baseado em um produto animal (rim de porco e vísceras de frango), mas foi posteriormente melhorado, incluindo ingredientes como peptona, extrato de levedura, ovos, farinha de trigo e banha (Shapiro & Gaugler, 2002).

O método desenvolvido por Bedding (1981) foi primeiramente realizado em frascos Erlenmeyer e então expandido para sacos autoclaváveis aerados através de uma abertura. A bactéria é inoculada inicialmente nos frascos contendo meio e o nematóide inoculado alguns dias depois. O potencial de produção em larga escala avançou após várias medidas, incluindo o uso de sacos com ventilação forçada, mistura e autoclavagem automatizada, e coleta por meio de centrifugação com peneiras (Shapiro & Gaugler, 2002).

Assim, o primeiro sucesso comercial em escala de cultura monoxênica foi desenvolvido por Bedding e ficou conhecido como cultura sólida (Bedding, 1981; 1984). Neste método, os nematóides são criados em esponjas de poliéster e poliuretano impregnadas com vísceras de porco e gordura bovina contendo a bactéria simbiote. Esse método produz em torno de 6 a 10×10^5 JIs/g de meio de cultura (Bedding, 1984) comercialmente utilizado na Austrália, China e Estados Unidos. Friedman (1990) relatou que o método de cultura sólida é viável economicamente com um nível de produção de aproximadamente 10×10^{12} nematóides/mês. O custo da mão-de-obra aumenta significativamente na produção de nematóides neste nível, tornando-se necessário um método mais barato para a produção em larga escala (Grewal et al., 2001).

2.1.1.1 Fatores que afetam a produção

A quantidade do inóculo do nematóide pode afetar a produção de algumas linhagens de NEPs e outras não. Por exemplo, *S. carpocapsae* (isolado Agriotos) apresentou produção ótima com inóculo de 2.000 JIs/g de meio, enquanto *S. carpocapsae* (isolado CB2B) e *H. bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae) não foram afetados pela quantidade do inóculo. A quantidade do inóculo da bactéria não parece ser importante na determinação da produção (Shapiro & Gaugler, 2002).

O tempo da cultura é inversamente proporcional à temperatura e deve ser otimizado para o máximo de produção das espécies ou isolados. O aumento da quantidade do inóculo pode aumentar a taxa de crescimento do nematóide e diminuir o tempo da cultura. Culturas com tempos longos podem prover altas produções, porém, a mortalidade dos nematóides pode elevar e o tempo da cultura deve ser determinado em relação ao custo do espaço (Shapiro & Gaugler, 2002).

A composição do meio tem efeito substancial na produção do nematóide. O aumento da quantidade e da qualidade de lipídios aumenta a produção e a qualidade dos nematóides. Componentes lipídicos dos hospedeiros naturais dos nematóides são melhores para a produção destes. Outros ingredientes do meio têm efeito direto na produção de nematóides, incluindo proteínas e sais (Shapiro & Gaugler, 2002).

2.1.2 Produção *in vitro*: meio líquido

O desenvolvimento de culturas monoxênicas líquidas em biorreatores apresenta como maiores barreiras o suprimento suficiente de oxigênio que previna o excesso para não ocorrer a morte dos nematóides e o problema ser aumentado devido à viscosidade do meio. Friedman et al. (1989) usaram um fermentador aerado juntamente com um agitador, que posteriormente sofreram várias inovações em relação à mistura e aeração após seus trabalhos e de Pace et al. (1986), incluindo biorreatores. A formação de espuma é outro problema observado durante a agitação, podendo ser reduzida de acordo com o formato do biorreator e agentes antiespumantes ou despumantes (Shapiro & Gaugler, 2002).

Na produção em meio líquido, a bactéria simbiote é cultivada antes do nematóide. Vários ingredientes da cultura líquida são relatados incluindo farinha de soja, extrato de levedura, óleo de milho e canola, gema de ovo, caseína, peptona, leite em pó, extrato de fígado e colesterol. O tempo de cultura pode

variar dependendo do meio e da espécie, variando de três semanas com alcance máximo de produção de duas semanas ou menos. Uma vez a cultura completa, os nematóides podem ser removidos do meio por centrifugação (Shapiro & Gaugler, 2002).

Friedman (1990) também relatou o desenvolvimento de técnicas de fermentação líquida para a produção em larga escala. Nesse método, o custo de produção diminui com o aumento da capacidade em aproximadamente 50×10^{12} JIs/mês. Esse método permite uma produção de steirnermátídeos em fermentadores de 80 mil litros. Recentes inovações na fermentação dos nematóides e nos processos de formulações do meio resultam na melhoria da qualidade e produtividade dos nematóides. A produção atual de *S. carpocapsae* em cultura líquida apresenta uma média de $2,5 \times 10^5$ JIs/g de meio. Além disso, *S. carpocapsae*, *S. riobravis*, *S. scapterisci*, *S. feltiae*, *S. glaseri*, *H. bacteriophora* e *H. megidis* têm sido produzidos em culturas líquidas em larga escala (Grewal et al., 2001).

O meio de cultura líquida para a produção de 1×10^{12} JIs de *S. carpocapsae* custa US\$ 0,8, representando 6,4% dos US\$ 12,38 total do custo de produção. Os componentes do meio no uso comercial hoje em dia são fortemente guardados como segredo industrial. É improvável que esses componentes sejam diferentes daqueles usados na indústria de fermentação (Shapiro & Gaugler, 2002). Tachibana et al. (1997) patentearam o meio para *S. kushidai* contendo amido solúvel, glucose, peptona, extrato de levedura e óleo de milho, demonstrando que a adição de colesterol aumentou a virulência desse nematóide. Os lipídios têm recebido muita atenção em relação aos outros componentes, pelo fato de 60% do total da energia dos JIs serem derivados do metabolismo dos lipídios. Hatab & Gaugler (2001) concluíram que fontes de lipídios em altas proporções de gordura saturada resultam numa produção subótima (abaixo do esperado). Yoo et al. (2000) descreveram um meio para *H.*

bacteriophora contendo 8% de óleo de oliva e canola (1:1) enfatizando a importância dos lipídios ricos em gorduras monossaturadas. Íons suplementam a nutrição e são indispensáveis para um crescimento ótimo; eles podem ser supridos na forma de NaCl (0,4%), MgCO₄ (0,05%), CaCl₂ (0,03%) e KCl (0,03%).

2.1.2.1 Fatores que afetam a produção

Embora os steinernematídeos e heterorhabditídeos sejam semelhantes nas exigências de aeração adequadas às estratégias de máxima produção, os dois gêneros diferem devido aos diferentes ciclos de vida e biologia reprodutiva. Os steinernematídeos são anfimíticos capazes de acasalarem-se na cultura líquida e a maximização da população deve ter profundo efeito na produção. O máximo encontro entre macho e fêmea de steinernematídeos deve ser alcançado pelo formato do biorreator e a regulação da aeração. A otimização do acasalamento não é o principal fator da produção de heterorhabditídeos em cultura líquida, já que a primeira geração é exclusivamente hermafrodita, embora as gerações subsequentes possam conter formas anfimíticas (macho e fêmea de heterorhabditídeos não se acasalam em cultura líquida). Assim, a otimização da produção de heterorhabditídeos na cultura líquida deve ter enfoque na primeira geração, na qual todos os nematóides são capazes de reproduzirem-se (Shapiro & Gaugler, 2002).

A máxima produção de heterorhabditídeos em cultura líquida depende do grau de conversão, termo usado para descrever o desenvolvimento dos JIs após a ecdise para iniciar o crescimento. Obviamente, JIs que não se convertem não contribuem para a produção (somente adultos de nematóides podem gerar descendentes). Níveis de heterorhabditídeos que se recuperam *in vivo* tendem a ser de 100% e os que se recuperam em cultura líquida variam de 0% a 85%. Além disso, a recuperação pode ser positivamente afetada pelo aumento dos

níveis de aeração, CO₂ e conteúdo lipídico no meio, e negativamente afetada pelo aumento da temperatura (Shapiro & Gaugler, 2002).

O componente principal da cultura líquida é o conteúdo e composição lipídica. Yoo et al. (2000) relataram que o aumento do lipídio contido no meio de 2,5% para 8% causou o aumento na produção significativamente. A produção e a qualidade dos nematóides em cultura líquida podem ser afetadas pela fonte de lipídios e, de forma similar à cultura sólida, os componentes lipídicos são recomendados para imitar os lipídios do hospedeiro. Outros nutrientes foram relatados afetando a produção positivamente, incluindo a concentração de glucose e extrato de levedura.

Outros fatores que afetam a produção dos NEPs em cultura líquida são a quantidade do inóculo e a espécie do nematóide. Han (1996) relatou ótima produção de *H. bacteriophora* com quantidade do inóculo intermediária, ao passo que existe uma relação positiva entre a quantidade do inóculo e a produção de *S. carpocapsae*. Ehlers et al. (2000) descobriram que não há efeito na quantidade do inóculo sobre a produção de *H. indica*. NEPs variam muito em relação a seu potencial de produção em cultura líquida; geralmente a produção é inversamente proporcional ao tamanho do nematóide. Uma alta produção em cultura líquida ocorre para *H. indica*, que produz, em média, mais de 450.000 JIs/mL. A média máxima de produção obtida para outros nematóides varia de 300.000 a 320.000 JIs/mL para *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae* respectivamente, 138.000 JIs/mL para *H. megidis* e 71.470 JIs/mL para *S. feltiae* (Shapiro & Gaugler, 2002).

2.1.3 Produção *in vivo*

A lagarta-dos-favos *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) é muito utilizada para a criação de nematóides por causa da sua disponibilidade comercial. Muitos pesquisadores (Dutky et al., 1964; Howell, 1979; Lindegren

et al., 1993; Flanders et al., 1996) descrevem métodos para infecção de nematóides e coleta. Esse processo atinge produções entre $0,5 \times 10^5$ e 4×10^5 JIs/lagarta, dependendo da espécie do nematóide. No entanto, falta economia de escala e os custos, como mão-de-obra, equipamento e material (insetos), aumentam como função linear da capacidade de produção. Com o aumento da escala, a produção *in vivo* de nematóides é muito sensível a variações biológicas e incidentes na manipulação do processo (Friedman, 1990).

A produção *in vivo* de nematóides é uma indústria artesanal com baixo volume de produção. Devido ao capital limitado ou à tecnificação da cultura *in vitro*, faz-se necessária estratégia para a criação de nematóides em insetos hospedeiros. A produção massal *in vivo* depende da avaliação de uma elevada segurança, excepcional suscetibilidade e baixo preço para a criação dos hospedeiros. Embora larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) sejam substancialmente baratas (Blinova & Ivanova, 1987), com raras exceções, *G. mellonella* é a melhor escolha de hospedeiro, sendo criado, por muitas companhias, mais do que outros insetos, apresentando-se como o mais suscetível a várias espécies de nematóides.

Gaugler & Han (2002) relatam que o custo de produção de NEPs *in vivo* foi de menos de 1 centavo de dólar por lagarta de *G. mellonella* produzindo mais que 1×10^5 JIs, com capacidade de até $3,5 \times 10^5$ JIs/lagarta. Assim, mais de 25 mil lagartas de *G. mellonella* são necessárias para tratar 1 hectare no padrão de $2,5 \times 10^9$ nematóide por hectare.

A produção *in vivo* é um sistema bidimensional realizado em bandejas e prateleiras (Friedman, 1990). Os métodos de produção de NEPs sobre insetos hospedeiros são descritos por vários autores (Dutky et al., 1964; Flanders et al., 1996; Kaya & Stock, 1997; Lindegren et al., 1993; Poinar, 1979; Woodring & Kaya, 1988). Todas essas referências descrevem, com alguma variação, um sistema baseado na armadilha de White (White, 1927), a característica da

migração natural dos JIs após a emergência do cadáver do hospedeiro. Os métodos descritos consistem em inoculação, coleta, concentração e, se necessário, descontaminação. Insetos são inoculados com nematóides numa placa ou bandeja contendo papel absorvente (papel de filtro) ou outro substrato que conduza o nematóide à infecção, tais como solo ou gesso de Paris. Depois de 2 a 5 dias, insetos infectados são transferidos para armadilha de White; caso o processo de infecção esteja avançado antes da transferência, os estágios evolutivos dos nematóides podem ocorrer e os cadáveres tornam-se mais facilmente repetíveis (Shapiro et al., 2001). A armadilha de White consiste de uma placa na qual os cadáveres são circundados por água, contida em uma placa mais larga ou bandeja. O disco central contendo cadáveres provê um substrato úmido para os nematóides se moverem, por exemplo, uma placa de Petri invertida com papel de filtro ou gesso de Paris. A progênie de JIs emerge e migra para a água onde é feita a coleta posteriormente (Shapiro & Gaugler, 2002).

Por razões comerciais, nematóides coletados são concentrados para formulação. Isso pode ser obtido por decantação (Dutky et al., 1964), porém, períodos muito longos podem ser prejudiciais aos nematóides devido à privação de oxigênio (Burman & Pye, 1980). O processo pode ser acelerado por filtração a vácuo (Lindgren et al., 1993). Centrifugação também pode ser usada (Kaya & Stock, 1997), mas, para produções comerciais *in vivo*, o capital usado para a centrifugação pode ser excessivo. Para a formulação, os NEPs (produzidos *in vivo* ou *in vitro*) podem ser estocados em tanques aerados por mais de 3 meses (Georgis et al., 1995).

No método da armadilha de White, a contaminação é minimizada porque os JIs que migram deixam a maioria dos contaminantes para trás. Assim, a contaminação microbiana ou por algum material do hospedeiro é possível e pode ser reduzida por uma repetida lavagem dos nematóides coletados usando

alguns métodos de concentração. Adicionalmente, a descontaminação pode ser usada utilizando compostos antimicrobianos (Dutky et al., 1964; Woodring & Kaya, 1988), como sulfato de estreptomicina, amina (cloreto de metilbenzetônio), mertiolate, NaOCl, ou HgCl₂ (Lunau et al., 1993), mas os efeitos desses compostos sobre os nematóides em aplicação comercial não foram verificados (Shapiro & Gaugler, 2002).

2.1.3.1 Metodologia para produção *in vivo*

A técnica modificada por Woodring & Kaya (1988) consiste da adição da suspensão de NEPs, cerca de 200 JIs/mL e 1 mL de água destilada, colocada em placas de petri de 9 cm de diâmetro, contendo ao fundo duas folhas de papel filtro. Posteriormente, são colocadas dez lagartas de *G. mellonella*, mantidas em câmara climatizada (B.O.D.) à temperatura de 25 ± 1°C e UR 70 ± 10%. Após 5 a 7 dias, os cadáveres das lagartas são transferidos para armadilha de White e os JIs do nematóide coletados diariamente a partir do início da emergência, com reposição de água, com auxílio de uma pisseta. A suspensão de JIs, posteriormente, deve ser armazenada em geladeira ou câmara climatizada, respectivamente para *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*.

2.1.3.2 Fatores que afetam a produção

A produção *in vivo* varia grandemente entre diferentes hospedeiros e espécies de nematóides. O inseto mais comumente utilizado em laboratório e comercialmente para produção de NEPs é o último instar da lagarta-dos-favos, *G. mellonella*, porque esta possui alta suscetibilidade à maioria dos nematóides, é de fácil criação e pode ser produzida em grande escala. Existem somente dois nematóides que não são produzidos em *G. mellonella* (devido à especificidade do hospedeiro): *S. kushidai* (Kaya & Stock, 1997; Mamiya, 1989), que é criado em larvas de besouros da família Scarabaeidae e *S. scapterisci*, criado em

paquinha (*Scapteriscus* spp.) (Grewal et al., 1999; Pace et al., 1986). Outros hospedeiros usados na produção *in vivo* incluem: *Heliothis virescens*, *Amyelois transitella*, *Trichoplusia ni*, *Pectinophora gossypiella*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa zea*, *Limantria dispar*, *Acheta domesticus* e vários coleópteros, incluindo *T. molitor* (Blinova & Ivanova, 1987; Cabanillas & Raulston, 1994; Elawad et al., 2001; Grewal et al., 1999; Lindegren et al., 1979; Shapiro et al., 1985).

A produção de nematóides em *T. molitor* varia entre raças de nematóides e espécie. Geralmente, a produção de nematóides é proporcional ao tamanho do hospedeiro (Blinova & Ivanova, 1987; Flanders et al., 1996) e também por peso do inseto (dentro das mesmas espécies de hospedeiro) e a suscetibilidade para infecção é inversamente proporcional ao tamanho e à idade do inseto hospedeiro (Blinova & Ivanova, 1987; Dutky et al., 1964; Shapiro et al., 1999). Fatores como criação e infecção são importantes na escolha do hospedeiro; por exemplo, cerambicídeos produzem nematóides duas vezes mais do que lagartas de *G. mellonella*, porém, sua criação é difícil, cara e de baixa infecção (Blinova & Ivanova, 1987).

A escolha de insetos hospedeiros e nematóides para a produção *in vivo* depende do custo de produção do nematóide por inseto e da suscetibilidade do inseto ao nematóide. Análises de custo de diferentes insetos hospedeiros têm sido feitas. Em trabalho realizado por Blinova & Ivanova (1987) foi demonstrado que *T. molitor* apresenta custo superior comparado com *G. mellonella* e *T. ni* para a produção de *S. carpocapsae*. Um ciclo de vida curto dentro do hospedeiro pode afetar o custo, permitindo ciclos de produção mais rápidos; recentemente, *S. abbasi* produziu aproximadamente um número equivalente à metade do tempo quando comparado com outros NEPs (3,5 dias) (Elawad et al., 2001).

A qualidade do nematóide parece ser melhor quando criado em hospedeiro natural (Abu Hatab & Gaugler, 2001; Abu Hatab et al., 1998). Além disso, nematóides podem adaptar-se ao hospedeiro onde são produzidos (Stuart & Gaugler, 1996), reduzindo sua eficácia em campo no controle da praga-alvo. Embora *G. mellonella* possa ser o hospedeiro mais eficiente, pode não ser a “dieta” mais apropriada para maximizar a eficácia contra uma determinada praga-alvo.

As produções *in vivo* são dependentes da concentração de nematóides (Boff et al., 2000; Zervos et al., 1991). Concentrações muito baixas resultam em baixa mortalidade do hospedeiro e concentrações muito altas resultam em falhas na infecção devido à competição com invasões secundárias (Woodring & Kaya, 1988). Isso resulta na redução da eficiência da produção devido à necessidade de remoção de insetos vivos ou mal infectados. O número de nematóides que invadem hospedeiros é proporcional à concentração de exposição (Selvan et al., 1993; Shapiro & Lewis, 1999). A otimização da densidade inicial de nematóide dentro do hospedeiro (por exemplo, 100 JIs de *H. bacteriophora* ou *S. carpocapsae* por lagarta de *G. mellonella*) maximiza a sobrevivência e a fecundidade (Selvan et al., 1993). Assim, concentrações intermediárias otimizam a produção (Boff et al., 2000). Similarmente, a densidade de hospedeiro por unidade de área afeta a evasão de nematóides (Epsky & Capinera, 1993) e pode afetar a produção. Esses autores demonstraram que a porcentagem de nematóides que invadiram o hospedeiro aumentou com os insetos por unidade de área por substrato. Flanders et al. (1996) não detectaram efeitos significativos na densidade do hospedeiro e do nematóide, mas isso pode ter sido devido às faixas de densidades testadas ou à peculiaridade do isolado do nematóide utilizado (*H. bacteriophora* isolado Oswego).

Fatores ambientais, tais como temperatura, aeração e umidade, podem afetar a produção. A temperatura da criação afeta tanto a produção quanto a

duração do ciclo de vida (tempo de emergência). Geralmente, a temperatura ótima é relacionada com o clima de origem do nematóide (Grewal et al., 1994; Molyneux, 1986). Foram determinadas as temperaturas ótimas para criação e tempo de emergência em *G. mellonella* para 12 espécies e isolados de nematóides; temperaturas ótimas variam de 18°C a 28°C (Grewal et al., 1994). Aeração adequada também é necessária para o desenvolvimento do nematóide (Burman & Pye, 1980; Friedman, 1990). O nível de umidade é outro componente essencial para a produção *in vivo*. Níveis altos de umidade podem ser mantidos por todo o ciclo de produção. No método de armadilha de White, o substrato deve conter umidade para prevenir a dessecação do cadáver e também permitir a emergência dos JIs, porém, o excesso de umidade deve ser evitado já que interfere na troca de oxigênio (Shapiro & Gaugler, 2002).

O método de inoculação pode afetar a eficiência de infecção e o potencial de produção. A inoculação da produção *in vivo* pode ser feita por pipetagem ou borrifação do nematóide no substrato, imersão dos hospedeiros na suspensão de nematóides ou (para alguns hospedeiros) aplicação do nematóide na dieta do inseto. A comparação entre métodos raramente tem sido feita. A imersão de hospedeiros é mais eficiente, mas requer maior quantidade de nematóide do que os outros métodos. Além disso, algumas combinações de nematóides e hospedeiros podem não ter sucesso no método de imersão. Por exemplo, *H. bacteriophora* não consegue infectar *T. molitor* em níveis requeridos para produção massal (90% ou mais), podendo ser aplicado somente por alimentação ou pipeta. A alimentação, no entanto, requer uma etapa adicional na remoção de cadáveres infectados do alimento restante (que pode causar contaminação); o procedimento de inoculação deve ser incluído na análise de custo antes da decisão pela utilização do método (Shapiro & Gaugler, 2002). Produtores muitas vezes são vulneráveis a variações no hospedeiro

devido à infecção por vírus, uso de antibióticos ou condições adversas no transporte (por exemplo, temperaturas extremas) (Gaugler & Han, 2002).

Uma preocupação na produção é a deteriorização da linhagem. Quando um agente de controle biológico é isolado da natureza e criado em laboratório ou produzido massalmente com propósitos comerciais, pode perder características benéficas devido a processos genéticos incluindo deriva, consangüinidade ou seleção inadvertida (Hopper et al., 1993). Assim, nematóides criados repetidamente podem resultar na redução da qualidade em caracteres, tais como, virulência, tolerância ambiental ou capacidade reprodutiva (Shapiro et al., 1996; Stuart & Gaugler, 1996). Assim, precauções contra a deteriorização da linhagem devem ser empregadas, por exemplo, criopreservação de culturas estoque (Curran & Bertler, 1992), minimização de criações em série e introdução de material genético selvagem (Gaugler & Han, 2002; Gaugler et al., 2000).

2.2 Formulação e armazenamento

Nickle (1991) afirma que JIs podem ser estocados durante alguns meses em camadas rasas de água em frascos aerados em temperatura ambiente. No entanto, eles são difíceis de ser manuseados devido à presença de água livre. Assim, muitos métodos têm sido desenvolvidos para a estocagem comercial dos nematóides, em que a água livre é absorvida pelo material inerte (esponja ou outros compostos porosos géis higroscópicos). A precária armazenagem e sobrevivência durante a pós-aplicação são os maiores obstáculos para a expansão no uso de NEPs como bioinseticidas. Nematóides formulados com dois anos de prateleira requerem normas como pesticidas químicos e para aplicação são usados equipamentos de pesticidas convencionais, fertilizantes e irrigação (Grewal, 2002).

Formulação refere-se à preparação de um produto desde um ingrediente ativo com adição de certas substâncias ativas (funcional) e não ativas (inertes) e

destina-se a melhorar ativamente a absorção, distribuição, estabilidade no uso do processo de estocagem sobre a atividade do ingrediente. Alguns exemplos de formulação de nematóides são constituídos por ingredientes à base de pesticida (aditivos) incluindo absorventes, adsorventes, agentes antimicrobianos, agentes antioxidantes, transporte, dispersantes, umectantes, preservativos, solventes, surfactantes, absorventes de UV. Elevada quantidade de oxigênio e misturas, sensibilidade a temperaturas extremas e comportamento de JIs limitam o método de formulação e ingredientes. A principal meta de desenvolvimento de formulações à base de nematóides inclui a manutenção e a qualidade, aumentando a estabilidade de estocagem, melhorando a facilidade de transporte e uso, a redução dos custos de transporte e a extensão na duração de sobrevivência do nematóide após aplicação. Espera-se que o tempo de vida de nematóides steinernematídeos e heterorhabditídeos seja aumentado com formulações melhores. Contudo, JIs podem ser estocados por vários meses em água sobre refrigeradores em tanques com bolhas, mas o custo elevado e dificuldades na manutenção da qualidade impedem o desenvolvimento desses métodos. Elevada demanda de oxigênio, sensibilidade de algumas espécies de nematóides a baixas temperaturas, suscetibilidade a contaminação por microrganismos e toxicidade de agentes antimicrobianos são fatores que influenciam a qualidade do nematóide durante a estocagem em água. Por isso, nematóides são usualmente formulados com inertes sólido ou pastoso, pouco depois de serem preparados (Grewal, 2002). Dessa forma, existem três tipos de formulações que são descritos a seguir.

A) Formulações à base de nematóides em atividade

Nematóides são completamente ativados e movem-se livremente no interior ou sobre o substrato. O transporte de formulações sólidas é realizado facilmente, com menos desperdício, mas todos os produtos requerem

refrigeradores durante a estocagem e transporte, tornando, assim, o processo mais caro.

Formulações à base de esponjas de poliéter-poliuretano são largamente usadas para estocar e transportar pequenas quantidades de nematóides produzidos por uma pequena indústria (mercados de gramado e jardim). Esta é feita pela aplicação em suspensão aquosa de nematóides em placa com esponja, usualmente com 500-1000 JIs/cm² de área superficial. Nematóides no interior de esponjas podem ser estocados de 1 a 3 meses de 5°C a 10°C. Normalmente de 5 a 25 x 10⁶ JIs são aplicados sobre placas com esponjas, colocadas em sacos plásticos. Essa formulação não é conveniente para grandes aplicações devido à pesada mudança do método e da necessidade de grande quantidade de esponjas. Formulação à base de vermiculita é uma melhora significativa em relação à esponja, pelo fato do produto ser mais concentrado, a longa estabilidade de estocagem e aplicação mais conveniente. Normalmente, sobre suspensão aquosa de nematóides a mistura é homogeneizada com vermiculita e colocada em sacos de polietileno, acrescentada em tanques de pulverização (Grewal, 2002).

B) Formulações que reduzem a mobilidade dos nematóides

Devido à elevada atividade de nematóides em formulações, as reservas energéticas estocadas de JIs são rapidamente reduzidas. Contudo, formulações têm sido desenvolvidas em relação à mobilidade dos nematóides, minimizando armadilhas físicas ou por meio do uso de inibidores metabólico. Dessa maneira, formulações que incluem alginato e géis em líquido concentrado contêm propriedade metabólica inibidora. Produtos com *S. carpocapsae* baseados em alginato foram os primeiros a atingirem tempo de prateleira, aumentando a aceitabilidade de nematóides com valor elevado, em um bom lugar no mercado (Grewal, 1998). Contudo, o nível de extração do tempo de consumo e a

eliminação da problemática de grandes quantidades de tela plástica e recipiente, são considerados impróprios para aplicação em larga escala.

A formulação com nematóides é preparada com um viscoso gel fluido ou pasta que reduzem a atividade do nematóide (Georgis, 1990), considerando que o gel fluido é de fácil aplicação, apresentando o nematóide tempo de prateleira mais curto do que em gel de alginato, suspendendo o uso desse produto (Grewal, 2002). Chang & Gehert (1995) descreveram uma formulação em pasta com nematóides misturados sobre óleo de hidrogenato e acrilamido. Acima de 80% de sobrevivência de *S. carpocapsae* após 35 dias em sala com temperatura foi relatada como formulação comercial inaceitável. Já Grewal (1998) relatou que a adição de inibidores de metabolismo reduz a demanda de oxigênio e permite a estocagem de concentrados de *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *S. riobrave* em bolhas de ar em longos períodos à temperatura ambiente. Acima de 7×10^9 JIs de *S. carpocapsae* podem ser estocados por 6 dias a temperatura ambiente em volume de 10 litros, com viabilidade menos significante. Essa formulação em concentrado líquido é usada para transportar *S. riobrave* para aplicação em citros contra *Diaprepes*. Yukawa & Pitt (1985) descreveram formulação em pó ativado com carvão servindo como um adsorvente. Carvão e mistura de nematóides são estocados em recipientes minimizando a disponibilidade de oxigênio. O elevado custo, a ausência de estabilidade em altas temperaturas e as dificuldades de aplicação também tornam essa formulação imprópria para uso comercial.

C) Formulações com nematóides em anidrobiose

Nematóides requerem um filme de água ao redor de seu corpo para otimizar o metabolismo, atividade e movimento. Entretanto, reservas energéticas de JIs são constantemente reduzidas durante a atividade. Contudo, uma meta na formulação tem reduzido a taxa de consumo de reservas energéticas estocadas

por JIs. NEPs são capazes de sofrer parcial anidrobiose (quiescência anidrobiótica) (Womersely, 1990). Embora a dissecação de nematóides com umidades relativamente controladas tenha sido demonstrada (Simons & Poinar, 1973; Popiel et al., 1993), esse método teve pouco sucesso comercialmente. Formulações contendo nematóides em anidrobiose parcial incluem géis, pó e grânulos.

Bedding & Butler (1994) desenvolveram formulações com nematóides indistintamente misturados sobre poliacrilamida anidra, resultando também em gel, mostrando que os nematóides sofreram pouco dessecação e apresentaram sobrevivência a temperaturas extremas. Em 1988, uma formulação foi descrita com nematóides misturados em argila, removendo-se o excesso da superfície da mistura e produzindo parcial dessecação (Bedding, 1988). Melhorias nas formulações em pó têm sido desenvolvidas para permitir a estocagem de heterorhabditídeos e steinernematídeos à temperatura extrema (Grewal, 1998). Nematóides são parcialmente dessecados por causa da adição de produto absorvente sobre a formulação. Essa formulação é também de fácil aplicação devido à elevada dispersibilidade sobre água. *Heterorhabditis megidis* pode ser estocado acima de 3 meses a 22°C, sem perda de viabilidade nessa formulação.

Capinera & Hibbard (1987) descreveram uma formulação granular na qual nematóides são parcialmente encapsulados sobre farinha de trigo. Connick et al. (1993) descreveram a formulação de nematóides em grânulos de trigo, incluindo enchimento e umectante para aumentar a sobrevivência do nematóide. O processo envolve grânulos secos misturados para prevenir a migração e a redução do risco de contaminação. Contudo, grânulos secos durante a estocagem resultam numa baixa sobrevivência.

Formulações à base de grânulos dispersivos em água (WG) têm sido desenvolvidas com JIs revestidos com grânulos de 10 a 20 mm de diâmetro, consistindo de misturas de vários tipos de sílica, argilas, celulose, lignina e

amido (Georgis et al., 1995; Silver et al., 1995). A mistura de grânulos permite o acesso de oxigênio para os nematóides durante a estocagem e transporte. Em temperaturas ótimas, nematóides entram em estágio parcial de anidrobiose, devido à remoção lenta da água do corpo para a formulação. A indução parcial de anidrobiose é usualmente evidente de 4 a 7 dias, reduzindo de 3 a 4 vezes o consumo de oxigênio de nematóides (Grewal, 2000a;b). Estas formulações apresentam várias vantagens sobre outras formulações. Isso inclui: (1) ampliação da estabilidade de estocagem do nematóide a baixas temperaturas, (2) aumento da tolerância do nematóide a temperaturas extremas, permitindo facilidade de transporte a um custo menor, (3) melhora na facilidade do uso de nematóide, diminuindo tempo e mão-de-obra, (4) diminuição do tamanho do recipiente e a taxa de cobertura, (5) diminuição dos materiais e uma aparência mais aceitável. Essa é a primeira formulação comercial que permitiu a estocagem de *S. carpocapsae* por mais de 6 meses a 25°C (Grewal, 2000a).

2.3 Hospedeiros alternativos: patogenicidade e virulência

A infectividade (definida como a habilidade de JIs do nematóide de penetrar no hospedeiro) é freqüentemente usada para determinar a virulência (grau de intensidade da doença) de entomopatógenos (Tanada & Fuxa, 1987; Tanada & Kaya, 1993) com utilização da maior taxa no controle biológico de insetos-praga. Ela varia entre as diferentes espécies ou isolados de nematóides e entre várias culturas (Caroli et al., 1996), contribuindo com resultados em campo e bioensaios em laboratório (Lewis & Gaugler, 1994). A infectividade de nematóides em testes laboratoriais tem sido considerada como um potencial indicador no controle biológico de pragas (Fan & Hominick, 1991; Glazer, 1991; Caroli et al., 1996; Ricci et al., 1996).

Segundo Stock (1998), recomenda-se coleta de nematóides emergidos dos primeiros dias, pois os de última emergência são menos virulentos, já que

são produtos de hospedeiros esgotados, com oferta de nutrientes reduzida. Shapiro & Lewis (1999) afirmam que a infectividade de NEPs é afetada por fatores biológicos intrínsecos e extrínsecos, além das condições ambientais. Nematóides infectivos são positivamente afetados pela densidade do hospedeiro e pela duração do tempo de exposição (Epsky & Capinera, 1993). O nematóide *H. bacteriophora* é capaz de resistir melhor a elevadas densidades de hospedeiro do que *S. carpocapsae* (Selvan et al., 1993).

A estratégia de infecção é frequentemente governada pela combinação de fatores que podem incluir condições exógenas como a densidade do hospedeiro, densidade do parasita e temperatura ambiente, ou estágios endógenos, como o estado fisiológico ou idade do parasita. A infectividade de JIs de *H. bacteriophora* é maior em areia mais do que em suspensão aquosa (Shapiro & Lewis, 1999).

Em certos estudos, tem sido verificado que a concentração de NEPs não é afetada pela proporção de nematóides que invadem o hospedeiro (Fan & Hominick, 1991; Epsky & Capinera, 1993). Contrariamente, Selvan et al. (1993) e Flanders et al. (1996) reportaram que, quanto maior a concentração, menos JIs do nematóide entram no hospedeiro. Em trabalhos de Shapiro & Lewis (1999), houve uma relação inversa entre a concentração do nematóide e a proporção de JIs que invadem o hospedeiro. Selvan et al. (1993) observaram que a proporção constante de invasão de JIs relativamente a concentrações baixas (acima de 300 JIs) tem relação inversa entre a dose e a invasão de JIs sobre concentrações elevadas. Flanders et al. (1996) observaram a relação inversa a concentrações baixas, apresentando similaridade com as taxas usadas por Fan & Hominick (1991) e Epsky & Capinera (1993), com 500 JIs ou menos.

Epsky & Capinera (1993) afirmaram que a porcentagem de mortalidade foi afetada pela concentração do nematóide, aumentando de 37,7% na concentração de 10 nematóides para 90% na concentração de 250 nematóides,

após 48 horas em lagartas de último instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), e de 10% para 90% nas mesmas concentrações em lagartas de *Agrotis ipsilon*. Ainda de acordo com os mesmos autores, a concentração de *S. carpocapsae* não foi significativamente afetada pela eficiência da invasão nas duas lagartas, havendo uma relação direta entre o número de nematóides aplicados e o número de nematóides que invadem o hospedeiro (Epsky & Capinera, 1993).

A atividade de espécies e isolados de heterorhabditídeos e steinernematídeos difere de espécie para espécie, sendo influenciada por fatores ambientais como temperatura, umidade, tipo de solo, etc. Por isso, na seleção de espécies ou isolados de NEPs para aplicações de campo contra pragas é importante que se verifique a persistência de todas as espécies ou isolados de nematóides disponíveis em condições de campo (Bedding et al., 1983).

Nematóides atacam insetos (Gaugler et al., 1980) e penetram no seu interior pelas vias oral, anal ou espiráculos (Marcek et al., 1988). Entretanto, JIs de *Heterorhabditis* são também capazes de entrar no interior de insetos através da cutícula (Bedding & Molyneux, 1982). Eles penetram na hemocele e liberam a bactéria simbiótica, que se multiplica e mata o inseto hospedeiro após 24 horas de exposição ao nematóide (Glazer et al., 1991).

Poucos esforços têm sido feitos para quantificar a virulência de espécies de nematóides em inúmeros insetos hospedeiros. Contudo, estudos têm demonstrado que a eficiência de várias espécies de nematóides diferem significativamente entre alguns insetos alvo (Bedding et al., 1983; Akhurst, 1986; Forschler & Nordin, 1988; Kondo & Ishibashi, 1988). Poucas informações sobre os fatores que afetam essas diferenças tem sido atribuídas à variação entre isolados de nematóides sobre a atividade de JIs no solo (Simons & van der Schaaf, 1986; Dunphy & Webster, 1985), o número de bactéria por JIs (Dunphy et al., 1985) e a proporção de JIs carregando a bactéria simbiótica (Akhurst,

1983) ou o tamanho do hospedeiro infectado (Kondo, 1987). No entanto, isolados do complexo nematóide-bactéria podem diferir, ainda, quanto a influência da infectividade e virulência. Essas diferenças incluem a taxa de invasão de JIs no interior da hemocele do inseto, o tempo de liberação da bactéria e, finalmente, a virulência da bactéria simbiótica influenciada pela taxa de crescimento da bactéria e da atividade de enzimas proteolíticas (Glazer et al., 1991). *Spodoptera littoralis* mostrou ser suscetível à infecção do nematóide *S. carpocapsae* (Sikora et al., 1979) e *Ochrobactrum* spp. não foi patogênico a lagartas de *G. mellonella* e *S. littoralis* (Babic et al., 2000).

Shamseldean & Atwa (2001) indicaram que diferenças de suscetibilidade entre lagartas de *G. mellonella*, *S. littoralis*, *A. ipsilon* e *Schistocerca gregaria* devem-se, principalmente, ao nível de resistência contra a taxa de invasão dos nematóides *S. glaseri*, *S. riobravus*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *H. bacteriophora*, *Steinernema* sp. e *Heterorhabditis* spp., mais do que os mecanismos de defesa contra a invasão do nematóide. Em adição, diferenças de produção de JIs foram devido a diferenças entre o tamanho do hospedeiro, comprimento e reservas alimentares.

Em trabalhos de Negrisoni et al. (2004a), a concentração de 800 JIs/placa de *Heterorhabditis* sp. (isolado PI) foi a que proporcionou maior suscetibilidade de lagartas de *A. ipsilon* com 94% de mortalidade, mostrando elevada virulência, mesmo em baixas concentrações do inóculo. Já para *A. gemmatilis*, a concentração de 1.000 JIs do mesmo nematóide/placa foi a que proporcionou maior mortalidade, 76% nas lagartas (Negrisoni et al., 2004b).

Schroeder et al. (1994) afirmam que pelo fato de *H. bacteriophora* (isolado Oswego) sobreviver em vasos durante um período de 51 dias, o primeiro estágio larval de *Otiorhynchus ligustici* (L.) com tamanho reduzido foi não suscetível à infecção provocada pelo nematóide. Já Georgis & Poinar

(1984), relataram que o primeiro e o segundo instar larval de *O. ligustici* foi suscetível à infecção por *H. heliothis* nas mesmas condições.

Gazit et al. (2000) relatam que *S. riobravis* (isolado TX) e *Heterorhabditis* sp. IS-5 (H IS-5) mostraram elevada atividade, provocando mortalidade acima de 80% em *Ceratitis capitata*, considerando o primeiro nematóide mais efetivo do que o segundo e que a atividade dos dois isolados a uma taxa de inoculação constante foi dependente da densidade da larva do inseto.

Os nematóides *S. glaseri*, *S. feltiae* e *Heterorhabditis* são ativos contra larvas de último instar de *Otiorrhynchus sulcatus* (Fabr.) em morangueiros próximos da superfície do solo ou contra a larva no interior do solo (Bedding & Miller, 1981; Georgis & Poinar, 1984; Scherer, 1987). *S. glaseri* pode promover 100% de controle quando aplicado sobre a superfície do solo, contra a larva no interior do mesmo (Evenhuis, 1982; Klingler, 1986; Simons, 1981).

Muitos lepidópteros são bastante suscetíveis a Steinernematidae e Heterorhabditidae, sob condições laboratoriais em folhas de papel filtro e em solo não compactado de vasos de flores (Nickle, 1991).

Nem todos os estádios do ciclo de vida do inseto apresentam a mesma suscetibilidade. A pré-pupa de *S. exigua* é altamente suscetível a *S. feltiae*, com mais de 94% de mortalidade, mas a pupa não é muito suscetível, pelo fato de conter seda em seu casulo, apresentando-se como uma barreira mecânica ao nematóide (Kaya & Hara, 1980; 1981; Samsok & Sikora, 1981). Em contraste, as pupas de *H. virescens*, *G. mellonella*, *Bombyx mori*, e *Operophtora brumata* não possuem barreira para nematóides apresentando 100% de mortalidade, alcançando-as facilmente quando sem casulo (Hara & Kaya, 1983; Jaques et al., 1968; Kaya & Grieve, 1982; Moyle & Kaya, 1981). Os adultos são suscetíveis e durante a pupação podem ser controlados pela aplicação de nematóides em água no interior do solo (Veremchuk, 1974).

Teoricamente, nematóides não são afetados por inimigos naturais de insetos alvo, no entanto, podem ser afetados no parasitismo direto do hospedeiro suscetível ou indiretamente pela morte deste. Larvas de 10 a 11 dias de *Hyposoter exiguae* (Viereck) e *Glyptapanteles militaris* (Walsh) (= *Apanteles*), dois himenópteros parasitas de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (lagarta militar) e larvas de 2 a 3 dias de taquinídeos *Myxexoristops* sp. (parasita de *Cephalcia abietis*) e *Compsilura concinnata* Meigen (um parasita da lagarta militar) escapam da infecção pelo seu completo desenvolvimento ou matam seus hospedeiros antes da emergência do nematóide (Georgis & Hague, 1982; Kaya, 1978; 1984; Mracek & Spitzer, 1983).

De acordo com Nickle (1991), embora inúmeros insetos pertencentes a várias ordens sejam utilizados como hospedeiros alternativos para a produção de nematóides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, alguns parasitas de insetos, muitos artrópodes pequenos e larvas de caracóis são exemplificados por apresentarem elevada suscetibilidade, sendo mortos por um período de 24 a 36 horas de exposição ao nematóide. Dessa forma, seguem-se como exemplos, larvas do mosquito *Aedes aegypti* L. e *Culex pipiens* (Roth.); larva, pupa e pré-pupa de *Ctenocephalidis felis* (Bouche); larva de *Xenopsylla cheopsis* (Rothchild); larva de colembola *Sminthurus viridis* (L.); isópteros terrestres, *Porcellio* spp. e milípede de jardim, *Oxydus gracilis* Koch. Nematóides, como *S. glaseri*, *S. feltiae*, *S. bibionis* e *H. heliothidis*, podem matar *Oncomelania hupensis* (caracol) com aplicações de 100, 200, e 300 JIs/cm² em jarros na superfície do solo, apresentando mortalidade de aproximadamente 45%, 90%, e 95%, respectivamente (Li et al., 1986).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU HATAB, M.; GAUGLER, R. Diet composition and lipids of *in vitro* - produced *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biology Control**, v.20, p.1-7, 2001.

ABU HATAB, M.; GAUGLER, R.; EHLERS, R. Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids. **Journal Parasitology**, v.84, p.215-221, 1998.

AKHURST, R.J. *Neoplectana* species: Specificity of association with bacteria of the genus *Xenorhabdus*. **Exp. Parasitology**, v.55, p.258-263, 1983.

AKHURST, R.J. Controlling insects in soil with entomopathogenic nematodes. In: SAMSON, R.A.; VLAK, J.M.; PETERS, D. (Ed.). **“Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology”**. Wageningen: The Netherlands Foundation of the fourth Int. Colloq. of Invertebrate Pathology, 1986. p.265-267.

BABIC, I. et al. Occurrence of natural dixenic associations between the symbiont *Photorhabdus luminiscens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. In tropical entomopathogenic *Heterorhabditis* spp. (Nematoda, Rhabditida). **Microbiology-Rearing**, v.146, n.3, p.709-718, 2000.

BEDDING, R.A. Low cost *in vitro* mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. **Nematologica**, v.27, p.190-114, 1981.

BEDDING, R.A. Large scale production, storage, and transport of the insect-parasitic nematode *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Annual Applied Biology**, v.104, p.117-120, 1984.

BEDDING, R.A. Storage of insecticidal nematodes. **World Patent No. WO 88/08668**. 1988.

BEDDING, R.A.; BUTLER, K.L. Method for storage of insecticidal nematodes. **World Patent No. WO 94/05150**. 1994.

BEDDING, R. A.; MILLER, L. A. Use of a nematode, *Heterorhabditis heliothidis*, to control black vine weevil, *Otiorrhynchus sulcatus*, in potted plants. **Annual Applied Biology**, v.99, p.211-216, 1981.

- BEDDING, R.A.; MOLYNEUX, A.S. Penetration of insect cuticle by infective of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). **Nematologica**, v.28, p.354-359, 1982.
- BEDDING, R.A.; MOLYNEUX, A.S.; AKHURST, R.J. *Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp., and *Steinernema kraussei*: Inter-specific and intraspecific differences in infectivity of insects. **Experimental Parasitology**, v.55, p. 249-257, 1983.
- BLINOVA, S.L.; IVANOVA, E.S. Culturing the nematode-bacterial complex of *Neoaplectana carpocapsae* in insects. In: SONIN MD (Ed.). **Helminths of insects**. New Delhi: American, 1987. p. 22-26.
- BOFF, M. et al. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. **Nematologica**, v 2, p.303-308, 2000.
- BURMAN, M.; PYE, A.E. *Neoaplectana carpocapsae*: respiration of infective juveniles. **Nematologica**, v.26, p.214-219, 1980.
- CABANILLAS, H.E.; RAULSTON, J.R. Pathogenicity of *Steinernema riobravis* against corn earworm, *Helicoverpa zea* (Boddie). **Fundam Appl Nematol**, v.17, p.219-223, 1994.
- CAPINERA, J. I.; HIBBARD, B. E. Bait formulations of chemical and microbial insecticides for suppression of crop feeding grasshoppers. **Journal of Agricultural Entomology**, v.4, p.337-344, 1987.
- CAROLI, L.; GLAZER, I.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes infectivity assay: comparison of penetration rate into different hosts. **Biocontrol Science Technology**, v.6, p.227-233, 1996.
- CHANG, F.N.; GEHRET, M. J. Stabilized insect nematode compositions. **US Patent** No. 5, 401, 506. 1995.
- CONNICK, W. J. Jr.; NICKLE, W. R. ; VINYARD, B. J. "Pesta": new granular formulations for *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Nematology**, v.25, p.198-203, 1993.
- CURRAN, J. C.G.; BUTLER, K. Routine cryopreservation of isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis* species. **Journal of Nematology**, v.24, p.269-270, 1992.

DUNPHY, G.B.; RUTHERFORD, T.A.; WEBSTER, J.M. Growth and virulence of *Steinernema glaseri* influenced by different subspecies of *Xenorhabdus nematophilus*. **Journal of Nematology**, v.17, p.476-482, 1985.

DUNPHY, G.B.; WEBSTER, J.M. Interaction of *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus* with the hemolymph of *Galleria mellonella*. **Journal Insect Physiology**, v.17, p.476-482, 1985.

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

EHLERS, R.U. et al. Mass production potential of bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica* - *Photorhabdus luminescens*. **Biocontrol Science Technology**, v.10, p.607-616, 2000.

ELAWAD, S.A.; GOWEN, S.R.; HAGUE, N.G.M. Progeny production of *Steinernema abbasi* in lepidopterous larvae. **Int Pest Manage**, v.47, p.17-21, 2001.

EPSKY, N.D.; CAPINERA, J.L. Quantification of invasion of two strains of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) into three lepidopteran larvae. **Journal of Nematology**, v.25, p.173-180, 1993.

EVENHUIS, H.H. Control of black vine weevil *Otiorynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Mededeling van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, v.47, n.2, p.675-678, 1982.

FAN, X.; HOMINICK, W.M. Efficiency of the *Galleria* (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (*Steinernema* and *Heterorhabditidae*) from sand and soil. **Rev. Nematol.**, v.14, p.381-387, 1991.

FLANDERS, K.L.; MILLER, J.M.; SHIELDS, E.J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* "Oswego" (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil inhabiting insects in temperate regions. **Journal Economic Entomology**, v.89, p.373-380, 1996.

FLEMING, W.E. Biological control of the Japanese beetle. **United States Department of Agriculture Technical Bulletin**. N. 1383, 1968.

FORSCHLER, B.T.; NORDIN, G.L. Comparative pathogenicity of selected entomogenous nematodes to the hardwood borers, *Prionoxystus robiniae* (Lepidoptera: Cossidae) and *Megacyllene robiniae* (Coleoptera: Cerambycidae). **Journal Invertebr. Pathology**, v.52, p.343-347, 1988.

FRIEDMAN, M.J. Commercial production and development. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, 1990. p.153-172, 1990.

FRIEDMAN, M.J.; LANGSTON, S.L.; POLLIT, S. **Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes**. International Patent WO89/04602. 1989.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. São Paulo: FEALQ, 2002. 920 p.

GAUGLER, R.; HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. et al. **Entomopathogenic nematology**. CAB International, 2002. 289 p.

GAUGLER, R. et al. Orientation of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* to carbon dioxide. **Environmental Entomology**; v.9, p.649-652, 1980.

GAUGLER, R. et al. Large-scale inoculative releases of the entomopathogen *Steinernema glaseri*: assessment 50 years later. **Biological Control**, v.2, p.181-187, 1992.

GAUGLER, R. et al. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.17, p.100-109, 2000.

GAUGLER, R. et al. Automated technology for in vivo mass production of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.24, p.199-206, 2002.

GAZIT, Y.; ROSSLER, Y.; GLASER, I. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of Mediterranean fly (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science Technology**, v.10, p.157-164, 2000.

GEORGIS, H.; HAGUE, N.G. M. Interactions between *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda) and *Olesicampa monticola*, a parasitoid of the larch sawfly *Cephalcia lariciphila*. IRCS Medical Science: **Environmental Biology and Medicine Experimental Animals; Microbiology, Parasitology and Infectious Diseases**, v.10, n.80, p. 617, 1982.

GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, 1990. p.173-191.

GEORGIS, R.; DUNLOP, D.B.; GREWAL, P.S. Formulation of entomopathogenic nematodes. In: HALL, F.R.; BARRY, J.W. (Ed.). **Biorational pest control agents: formulation and delivery**. Bethesda, Maryland: American Chemical Society, 1995. p.197-205.

GEORGIS, R.; POINAR, G.O. Field control of the strawberry root weevil *Nemoctetes incomptus* by neoplectana nematodes (Steinernematidae: Nematoda). **Journal Invert. Pathology**, v.43, n.1, p.130-131, 1984a.

GEORGIS, R.; POINAR Jr. G.O. Greenhouse control of the black vine weevil *Otiiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) by heterorhabditid and steinernematid nematodes. **Environmental Entomology**, v.13, p.1138-1140, 1984b.

GEORGIS, R.; MANWEILER, S.A. Entomopathogenic nematodes: a developing biological control technology. **Agricultural Zoology Rev.**, v.6, p.63-94, 1994.

GLASER, I. Invasion rate as a measure of infectivity of steinernematid and heterorhabditid nematodes to insects. **Journal Invertebr. Pathology**, v.59, p.90-94, 1991.

GLASER, R.W. **Studies on *Neoplectana glaseri*, a nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica*)**. New Jersey: Department of Agriculture, 1932. (Circular, 211).

GLAZER, I.; GALPER, S.; SHARON, E. Virulence of the nematode (steinernematids and *Heterorhabditis*) - bacteria *Xenorhabdus* spp.) complex to the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 94-100, 1991.

GREWAL, P.S. Formulations of entomopathogenic nematodes for storage and application. **Japanese Journal of Nematology**, v.28, p.68-74, 1998.

GREWAL, P.S. Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. **Pest Management Science**, v.56, p.401-406, 2000a.

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

GREWAL, P.S. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University, 2002. p. 1-28.

GREWAL, P.S.; CONVERSE, V.; GEORGIS, R. Influence of production and bioassay methods on infectivity of two ambush foragers (Nematoda: Steinernematidae). **Journal Invertebr. Pathology**, v.73, p.40-44, 1999.

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

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

GUEDES, J.C.; COSTA, I.D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. 248 p.

HAN, R. C. The effects of inoculum size on yield of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in liquid culture. **Nematologica**, v.42, p.546-553, 1996.

HARA, A. H.; KAYA, H. K. Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Environmental Entomology**, v.12, p. 496-501, 1983.

HATAB, M.A.; GAUGLER, R.; Diet composition and lipids of *in vitro*-produced. **Heterorhabditis bacteriophora**, **Biological Control**, v.20, p.1-7, 2001.

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

HOWELL, J. F. New storage methods and improved trapping techniques for the parasitic nematode *Neoaplectana carpocapsae*. **Journal Invertebr. Pathology**, v.33, p.155-158, 1979.

JAQUES, R.P.; STULTZ, H.T.; HUSTON, F. The mortality of the pale apple leafroller and winter moth by fungi and nematodes applied to soil. **Canadian Entomologist**, v.100, n.8, p.813-918, 1968.

KAYA, H. K. Interaction between *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) and *Apanteles militaris* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. **Journal Invertebr. Pathology**, v.31, p.358-364, 1978.

KAYA, H.K. Effect the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* on the tachinid parasite *Compsilura cincinnata* (Diptera: Tachinidae). **Journal Nematology**, v.16, n.1, p.9-13, 1984.

KAYA, H.K.; GRIEVE, B.J. The nematode *Neoaplectana carpocapsae* and the beet armyworm *Spodoptera exigua* infectivity of prepupae and pupae in soil and of adults during emergence from soil. **Journal Invertebr. Pathology**, v.39, n.2, p.192-197, 1982.

KAYA, H.K.; HARA, A.H. Differential susceptibility of lepidopterous pupae to infection by the nematode *Neoaplectana carpocapsae*. **Journal Invertebr. Pathology**, v.36, p.389-393, 1980.

KAYA, H. K.; HARA, A. H. Susceptibility of various species of lepidopterous pupae to the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae*. **Journal Nematology**, v.13, p.291-294, 1981.

KAYA, H.K.; STOCK, S.P. Techniques in insect nematology. In: LACEY L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic, 1997. p.281-324.

KLINGER, J. Einsatz und Wirksamkeit inseltenparasitischer Nematoden gegen den Gefurchten Dickmaulruessler. **Gaertnermeister**, v.89, n.13, p.277-279, 1986.

KONDO, E. Size-related susceptibility of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (Str. CC-136). **Applied Entomology Zoology**, v.22, p.560-569, 1987.

- KONDO, E.; ISHIBASHI, N. Histological and SEM on the invasion and succeeding growth of entomogenous nematode, *Steinernema feltiae* (str. DD-136), in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Applied Entomology and Zoology**, v.23, p.88-96, 1988.
- LEWIS, E.E.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematode sex ratio relates to foraging strategy. **Journal Invertebr. Pathology**, v.64, p.238-242, 1994.
- LI, P.S. et al. Laboratory studies on the infectivity of the nematode *Steinernema glaseri* to *Oncomelania hupensis*, a snail intermediate host of blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Hin. Journal Biology Control*, v.2, n.2, p.50-53, 1986.
- LINDEGREN, J.E. et al. Propagation and storage of *Neoplectana carpocapsae* Weiser using *Amyeloides transitella* (Walker) adults. **USDA Adv Agricultural**, v. 3, p. 1-5, 1979.
- LINDEGREN, J.E.; VALERO, K.A.; MACKEY, B.E. Simple *in vivo* production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. **Journal Nematology**, v.25, p.193-197, 1993.
- LUNAU, S. et al. Establishment of monoxenic inocula for scaling up *in vitro* cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Nematologica**, v.39, p.385-399, 1993.
- MAMIYA, Y. Comparison of infectivity of *Steinernema kushidai* (Nematoda: Steinernematidae) and other steinernematid and heterorhabditid nematodes for three different insects. **Applied Entomology Zoology**, v.24, p.302-308, 1989.
- MARCEK, Z.; HANZAL, R.; KODRIK, D. Sites of penetration of juvenile steinernematids and heterorhabditids (Nematoda) into the larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). **Journal Invertebr. Pathology**, v.52, p.477-478, 1988.
- MCCOY, E.E.; GIRTH, H.B. **The culture of *Neoplectana glaseri* on veal pulp**. New Jersey :Agriculture, 1938. p. 285.
- MOLYNEUX, A. S. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* (= *Neoplectana*) spp.: temperature, and aspects of behavior and infectivity. **Exp Parasitology**, v.62, p.169-180, 1986.

MOYLE, P. L.; KAYA, H. K. Dispersal and infectivity of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) in sand. **Journal Nematology**, v.13, n.3, p.295-300, 1981.

MRACEK, Z.; SPITZER, K. Interaction of the predators and parasitoids of the sawfly *Cephalcia abietis* (Pamphilidae: Hymenoptera) with its nematode *Steinernema krassei*. **Journal Invertebr. Pathology**, v.42, n.3, p.397-399, 1983.

NEGRISOLI Jr., A.S.; BARBOSA, C.R.C.; MOINO Jr., A.M. Determinação da patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. (isolado PI) (Nematoda: Rhabditida) em lagartas de *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Crambidae) (Hufnagel, 1797). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 13., 2004, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA, 2004a. CD ROM.

NEGRISOLI Jr., A.S.; BARBOSA, C.R.C.; MOINO Jr., A.M. Patogenicidade de *Heterorhabditis* sp. (isolado PI) (Nematoda: Rhabditida) em lagartas de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) Hueb., 1818. In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 13., 2004b, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA, 2004b. CD ROM.

NEVES, P.J.; ALVES, S.B.; AGUILLERA, M.M. Produção de nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.29, p.889-905.

NICKLE, W.R. **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991.

PACE, W.G. Liquid culture of nematodes. **International Patent** WO86/01074. 1986.

POINAR, G. O. Jr. **Nematodes for biological control of insects**. Boca Raton: CRC, 1979. 277p.

POINAR, G.O. Jr.; THOMAS, G.M. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode DD-136 (*Neoaplectana* sp. Steinernematidae). **Parasitology**, v.56, p.385-390, 1966.

POPIEL, I. et al. Commercial storage and shipment of entomopathogenic nematodes. **US Patent** No. 5, 183, 950. 1993.

RICCI, M. et al. Comparison of bioassays to measure virulence of different entomopathogenic nematodes. **Biocontrol Science Technology**, p. 135-142, 1996.

SAMSOOK, V.; SIKORA, R.A. Influence of parasite density, host developmental stage and leaf wetness duration on *Neoaplectana carpocapsae* parasitism of *Heliothis virescens*. **Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, v.46, n.2, p.685-694, 1981.

SCHROEDER, P. et al. Pathogenicity of rhabditid nematodes (Nematoda: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to alfalfa snout beetle (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Journal Economic Entomology**, v.87, n.4, p.917-922, 1994.

SHAMSELDEAN, M.M.; ATWA, A.A. Comparative infectivity and reproduction of entomopathogenic nematodes isolated from the Arabian gulf, Egypt, France and USA. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.11, n.1, 2, p.143-151, 2001.

SELVAN, S.; CAMPBELL, J.F.; GAUGLER, R. Density dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. **Journal Invertebr. Pathology**, v.62, p.278-284, 1993.

SHAPIRO, D.I. et al. Effects of temperature and host range on suppression of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) by entomopathogenic nematodes. **Journal Economic Entomology**, v.92, 1086-1092, 1999.

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

SHAPIRO, D.I.; GLAZER, I.; SEGAL, D. Trait stability and fitness of the heat tolerant entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* IS5 strain. **Biology Control**, v. 6, p. 238-244, 1996.

SHAPIRO, D.I.; LEWIS, E.E. Comparison of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. **Environmental Entomology**, v.28, p.907-911, 1999.

SHAPIRO, D.I.; LEWIS, E.E. BEHLE; R.W.; MCGUIRE, M.R. Formulation of entomopathogenic nematode-infected-cadavers **Journal of Invertebrate Pathology**, v.78, p.17-23, 2001.

SHAPIRO, M.; POINAR Jr, G.O.; LINDEGREN, J.E. Suitability of *Lymantria dispar* (Lepidoptea: Lymantriidae) as a host for the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal Economic Entomology**, v.78, p.342-345, 1985.

SCHERER, W. Bekaempfung des Gefurchten Dickmaulruesslers in Freiland-Erdbeeren. **Obstbau**, v.12, n.5, p.225-227, 1987.

SIKORA, R.A.; SALEM, I.E.M.; KLINGAUF, F. Susceptibility of *Spodoptera littoralis* to the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* and the importance of environmental factors in an insect control program. **Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.**, v.44, p.309-322, 1979.

SILVER, S.C.; DUNLOP, D.B.; GROVE, D.I. Granular formulations of biological entities with improved storage stability. **World Patent No. WO 95/0577**. 1995.

SIMONS, W.R. Biological control of *Otiorynchus sulcatus* with heterorhabditid nematodes in the glasshouse. *Netherlands*. **Journal Plant Pathology**, v.87, n.4, p.149-158, 1981.

SIMONS, W.R.; POINAR, G.O. Jr. The ability of *Steinernema carpocapsae* (Steinernematidae: Nematoda) to survive extended period of desiccation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.22, p.228-230, 1973.

SIMONS, W.R.; VANDERSCHAAF, D.A. Infectivity of three *Heterorhabditis* sp. isolates for *Otiorynchus sulcatus* at different temperatures. In: SAMPSON, R.A.; VLAK, J.M.; PETERS, D. (Ed.). “**Fundamental applied aspects of invertebrate pathology**” Netherlands: 1986. p.285-289. (The Foundation of the Fourth int. Colloq. of Invertebrate Pathology Wageningen).

STOCK, S.P. **Sistemática y biología de nematodos parasitos y asociados a insectos de importância econômica**. Santa Fé, Argentina: Universidad Nacional Del Litoral Esperanza, 1998. 88 p.

STUART, R. J.; GAUGLER, R. Genetic adaptation and founder effect in laboratory populations of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*. **Canadian Journal Zoology**, v.74, p.164-170, 1996.

TACHIBANA, M. et al. Nematoda cultivating method. **US Patent**, n. 5,694,833. 1997.

- TANADA, Y., FUXA, J.R. The pathogen population, p. 113-157. In: FUXA, J.R.; TANADA, Y. (Ed.). **Epizootiology of insect diseases**. New York: J. Wiley, 1987.
- TANADA, Y.; KAYA, H.K. Nematodes, nematomorphs and plathyelminthes. In: TANADA, Y., KAYA, H.K. (Ed.). **Insect Pathology**. New York: Academic, 1993. p.459-491.
- VEREMCHUK, G.V. Some factors affecting the infection of insects with *Neoaplectana carpocapsae agriotos* (Nematoda: Steinernematidae). **Parazitologiya**, v.8, n.5, p.402-407, 1974.
- WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v.66; p.302-303, 1927.
- WOMERSELY, C.Z. Dehydration survival and anhydrobiotic potential. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton: CRC, 1990. p.117-137.
- WOODRING, J.L.; KAYA, H.K. **Sternematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques southern cooperative**. Arkansas: Arkansas Agricultural Experiment Station Fayetteville, 1988. (Series Bulletin, 331).
- WOUTS, W.M. Mass production of entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. **Journal Nematology**, v.13, p.467-469, 1981.
- YOO, S.J. et al. Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.54, p.759-763, 2000.
- YUKAWA, T.; PITT, J.M. Nematode storage and transport. **World Patent No. WO 85/03412**. 1985.
- ZERVOS, S.; JOHNSON, S.C.; WEBSTER, J.M. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditidae) in *Galleria mellonella*. **Canadian Journal Zoology**, v.69, p.1261-1264, 1991.

CAPÍTULO 2

1 RESUMO

BARBOSA, Carla Ruth de Carvalho. Comparação entre sistemas de produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos em *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). In: _____. **Técnicas de produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) em *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) e hospedeiros alternativos.** 2005. p. 40-68 Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras *

O sucesso da utilização de nematóides entomopatogênicos (NEPs) em programas de MIP é devido à possibilidade da sua produção em larga escala para comercialização em diferentes formulações. No Brasil ainda não existem produtos comerciais, tampouco produção massal desses entomopatogênicos. A produção *in vivo* de NEPs pode ser feita em diferentes sistemas mais ou menos tecnificados. Os objetivos deste trabalho foram para avaliar diferentes sistemas de produção de *Heterorhabditis bacteriophora* em *Galleria mellonella*, bem como analisar o custo de produção dos sistemas. Foi utilizado um delineamento fatorial inteiramente casualizado para a estimativa da concentração letal máxima (CL₉₉) para determinar o inóculo para a produção. A produção foi realizada em armadilha de White e em funil de Baermann. Os dados de mortalidade de lagartas e produção de JIs por peso de lagarta foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial. A CL₉₉ estimada foi de 2.404 JIs/placa de petri de 9 cm de diâmetro em 10 lagartas de *G. mellonella*, após 72 horas de exposição ao nematóide. Nos sistemas de armadilha de White e funil de Baermann (na densidade de 200 lagartas) a produção foi de 486.610 e 3.984.758 JIs/g de lagarta, respectivamente. Os custos de produção de JIs do nematóide no sistema de armadilha de White e funil de Baermann foram de R\$ 190,01 (US\$ 63,33) e R\$ 1,84 (US\$ 0,61)/milhão de JIs, respectivamente. Dessa forma, o melhor sistema de produção *in vivo* de JIs de *H. bacteriophora* foi de funil de Baermann.

* Orientador: Alcides Moino Junior

2 ABSTRACT

BARBOSA, Carla Ruth de Carvalho. Comparison among production systems *in vivo* of entomopathogenic nematode in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). In: _____. **Entomopathogenic nematodes production techniques *in vivo* (Rhabditida: Heterorhabditidae) in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) and alternative hosts.** 2005. p.40-68 Dissertation (Master in Entomology)- Federal University of Lavras, Lavras*

The success of utilization of entomopathogenic nematodes (EPNs) in IPM programs is due to the possibility of its production in large scale for trading in different formulations. In Brazil, neither mass production nor EPNs-based commercial products exist yet. The EPNs *in vivo* production can be done in different systems more or less technically. The objectives of this work were to evaluate different systems of production of *Heterorhabditis bacteriophora* in *Galleria mellonella*, as well to analyze the systems production cost. It was used a factorial delineation totally randomized to estimate the maximum lethal concentration (LC₉₉) to determine the inoculum of the production. The production was performed with White's trap and Baermann's funnels. The mortality data of caterpillars and JIs production per caterpillar weight were submitted to variance analysis and polynomial regression. The estimated LC₉₉ was 2.404 IJs/petri's dish in *G. mellonella* caterpillar after 72 hours of exposition to nematode. In white's trap systems and Baermann's funnel (in density of 200 caterpillars) the production was 486.610 and 3.984.758 IJs/g of caterpillar, respectively. The production cost of JIs nematode in White's trap systems and Baermann's funnel was of R\$ 190,01 (US\$ 63,33) and R\$ 1,84 (US\$ 0,61)/million of IJs, respectively. So, the best production system for *in vivo* production of *H. bacteriophora* of IJs was Baermann's funnel.

* Adviser: Alcides Moino Junior

3 INTRODUÇÃO

Diversas pesquisas têm evidenciado a utilização comercial de espécies dos gêneros de nematóides entomopatogênicos (NEPs) *Heterorhabditis* e *Steinernema*, como potenciais agentes de controle biológico de insetos-praga em testes laboratoriais e a campo.

NEPs podem ser produzidos massalmente por métodos *in vivo* e *in vitro* (Shapiro et al., 2002), consistindo o primeiro de um sistema bidimensional realizado em bandejas e prateleiras, baseado em armadilhas de White (Shapiro & Gaugler, 2002). Da mesma forma, Carne & Reed (1964) descreveram um aparelho de coleta de JIs, no qual cadáveres de insetos hospedeiros são colocados em um disco localizado na boca de um funil largo.

Vários métodos *in vivo* são necessários para o isolamento inicial e a produção de novos nematóides, espécies ou isolados, necessitando de uma padronização que minimize a variabilidade entre os métodos (Lindgren et al., 1993). Dessa maneira, fazem-se necessários estudos para otimizar a produção *in vivo* desses entomopatógenos, reduzindo a limitação da produção a baixo custo e promovendo eficiência no mercado. Segundo Friedman (1990), o custo de produção de NEPs por inseto infectado é elevado, excedendo a um dólar americano por milhão de JIs.

Os equipamentos utilizados para a produção *in vivo* são simples e dependentes da capacidade de superfície de área, por isso o dobro da capacidade de produção dobra a área e o capital de custo. Sem automação, a mão-de-obra também aumenta numa função linear, já que o processo é altamente manufaturado. Além disso, um dos insumos, as lagartas hospedeiras, apresentam alto custo de produção, são altamente sensíveis a variações biológicas, tais como

doenças e sujeitas a insucessos quando a produção é aumentada (Friedman, 1990).

Assim, este trabalho teve como objetivos:

- avaliar diferentes sistemas de produção *in vivo* de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* em lagartas de último instar de *Galleria mellonella*;
- analisar o custo de produção desses sistemas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.1 Nematóides entomopatogênicos

Foram utilizados JIs da espécie *Heterorhabditidis bacteriophora*, armazenados em suspensão aquosa em (B.O.D.) a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de U.R.

4.2 Criação e manutenção de *Galleria mellonella*

A criação e manutenção de *G. mellonella* foi conduzida no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras em sala climatizada a 30°C , UR de 60% e fotofase de 12 horas, em metodologia adaptada por Parra (1998), modificada de Guerra (1973). Os insetos adultos emergidos foram transferidos para recipientes de alumínio contendo, no centro da tampa, uma tela de aço e no seu interior um pedaço de papel sanfonado para a oviposição dos mesmos. A coleta dos ovos foi feita a cada dois dias e estes transferidos para recipientes plásticos cobertos com filó preso por elástico, contendo no seu interior cera alveolada (favo seco) e dieta artificial. Após a emergência das lagartas, ao atingirem tamanho suficiente para evitar o escape através da tela de aço, as mesmas foram transferidas para os recipientes de alumínio contendo no seu interior cera alveolada e dieta artificial. A dieta artificial foi preparada com os ingredientes descritos na Tabela 6, nas quantidades citadas, misturando-as em bacia plástica e mantidas em refrigerador para conservação.

4.3 Produção do inóculo de nematóides

Os nematóides foram produzidos segundo a técnica mencionada por Woodring & Kaya (1988) e armazenados em recipientes plásticos mantidos em câmara climatizada (B.O.D.), à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, para, posteriormente, serem utilizados em bioensaios para a determinação da concentração letal máxima (CL₉₉).

4.4 Confirmação da sintomatologia, emergência de JIs e contagens de nematóides

Lagartas de *G. mellonella* infectadas por JIs do NEP por 72 horas de exposição foram colocadas em placas de petri de 9 e 15 cm de diâmetro, respectivamente, para a produção em armadilhas de White e funil de Baermann, ambas contendo ao fundo uma folha de papel filtro (câmara seca) mantidas nas mesmas condições anteriores por um período de cinco dias para a verificação da sintomatologia. Aquelas que não apresentaram sintomas característicos da infecção pelo nematóide são descartadas.

Após esse período, as mesmas foram pesadas e individualizadas para o seu respectivo sistema de produção para que ocorresse a emergência dos JIs para a água. As coletas de JIs foram realizadas diariamente, por um período de 12 dias a partir do início da produção, armazenados em recipientes plástico de 25 mL e Becker plásticos de 1000 mL, provenientes de armadilhas de White e funis de Baermann, respectivamente. O volume total de JIs foi quantificado em placas plásticas de poliestireno para testes serológicos, retirando-se cinco alíquotas de 0,1 mL e calculando-se a produção por peso (g) de lagarta.

4.5 Determinação da concentração letal máxima (CL₉₉)

A determinação da CL₉₉ foi realizada em lagartas de *G. mellonella*. Placas de petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel filtro ao fundo e 10 lagartas cada, foram expostas às concentrações de 0 (testemunha);

500; 1.000; 1.500; 2.000; 2.500 JIs/placa, acondicionadas em (B.O.D.) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas. Após 72 horas de exposição aos nematóides, lagartas mortas foram transferidas para placas de petri de 9 cm com uma folha de papel filtro, mantidas por cinco dias para a confirmação da sintomatologia do nematóide. Cada placa foi considerada como uma repetição, totalizando cinco repetições por tratamento.

4.6 Armadilhas de White

Foi utilizada a metodologia de White (1927), modificada por Dutky et al. (1964), na qual 10 lagartas de último instar de *G. mellonella* foram infectadas com o inóculo estimado pela CL_{99} , capaz de matar o maior número de lagartas por um período de 72 horas de exposição ao nematóide (Figura 1A).

4.7 Funil de Baermann

Esse método foi modificado de Carne & Reed (1964), que consiste de funis de vidro com capacidade de 250 e 500 mL. A inoculação de JIs de *H. bacteriophora* em lagartas de último instar de *G. mellonella*, foi realizada em recipientes plásticos (21 x 15 x 2 cm) contendo duas folhas de papel filtro ao fundo, com 5 mL da suspensão de nematóides e 2 mL de água destilada.

A concentração de JIs do nematóide para a inoculação foi a mesma estimada pela CL_{99} . Após 72 horas mantidos a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, os cadáveres foram transferidos para funis de vidro nas densidades de 50, 100, 150, 200 e 250 lagartas/funil. Cada funil continha uma mangueira de látex em sua extremidade inferior e uma presilha de Mohr para escoamento da água, bem como, na sua extremidade superior, uma tela de náilon, onde foram colocadas as lagartas mortas. A quantidade de água destilada colocada no interior dos funis foi a necessária para preencher o espaço entre a mangueira e a abertura superior do funil. Os funis foram acondicionados

em suporte de madeira cobertos com tampas plásticas e mantidos em temperatura ambiente. A coleta de JIs foi realizada diariamente, esgotando-se a reserva de água das mangueiras dos funis em provetas de 1.000 mL. A água foi repostada e as provetas completadas com água destilada para promover a decantação dos JIs do nematóide, armazenadas e quantificadas como descrito anteriormente (Figura 1B).

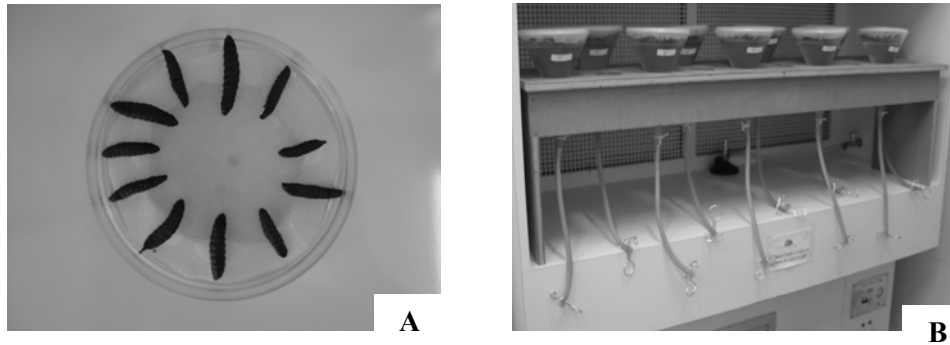


FIGURA 1. Sistemas de produção *in vivo* de juvenis infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* em Armadilha de White (A) e Funil de Baermann (B).

4.8 Delineamento experimental e variáveis analisadas

Os experimentos foram inteiramente casualizados, com 6 tratamentos e 5 repetições, para a estimativa da CL_{99} ; produção no sistema de armadilha de White com 1 tratamento e 10 repetições; 5 tratamentos e 5 repetições para o sistema de produção em funis de Baermann.

Os dados de mortalidade e de produção de JIs do nematóide por peso de lagarta foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$) e regressão polinomial.

4.9 Custo de produção de JIs nos diferentes sistemas

De acordo com Reis (2004), o custo de produção é a soma dos valores de todos os recursos (insumos) e operações (serviço) utilizados no processo produtivo de certa atividade (produto ou serviço).

4.9.1 Custo fixo (CF)

Refere-se aos recursos que possuem duração superior ao curto prazo de produção, considerando o ciclo de produção de JIs de *H. bacteriophora*. É o custo de cada recurso fixo que foi calculado, somando-se a depreciação e o custo alternativo do fator produtivo (Mendes, 2004).

A) Depreciação: corresponde ao custo necessário para substituir os bens de capital quando tornados inúteis, por meio do desgaste físico ou econômico. É computada pela depreciação de tais recursos, baseada na vida útil de cada um, de acordo com a equação citada por Reis (2004):

$$\text{Depreciação} = \frac{\text{Valor atual do recurso novo} - \text{Valor residual do recurso}}{\text{Vida útil do recurso}}$$

Para a estimativa do custo, foi adotada, convencionalmente, a vida útil de benfeitorias de vinte anos e para máquinas e, equipamentos, dez anos (Reis, 2004). Já para o valor residual dos equipamentos, foi considerado o valor final do bem após a sua utilização durante sua vida útil, para fins de comercialização “valor de sucata”, além de serem considerados novos todos os equipamentos.

B) Custo alternativo ou de oportunidade (CA): é o retorno do capital empregado na atividade, que seria proporcionado se fosse aplicado em outra alternativa econômica. Foi considerado o retorno da caderneta de poupança

(9,6% a.a.), calculado para custo fixo, de acordo com a seguinte expressão, conforme Reis (2004):

Custo Fixo Alternativo (CFAlt)

$$CFAlt = Valor\ Atual \times Taxa\ de\ Juros.$$

4.9.2 Componentes do custo fixo

A) Instalações

Considerou-se como instalação para a produção de JIs do nematóide, uma benfeitoria composta de uma sala de preparação (10 m²), onde são manuseados e estocados os materiais referentes à produção de JIs do nematóide, como os procedimentos de produção do inóculo do nematóide e de lagartas de *G. mellonella*, bem como a limpeza dos recipientes utilizados para a produção. A sala contém uma mesa para suporte para facilitar o manuseio dos materiais, refrigerador, câmara climatizada (B.O.D.) e uma balança de precisão.

B) Equipamentos e instrumentos

Os equipamentos e instrumentos utilizados, bem como sua respectiva finalidade no processo produtivo, estão descritos na Tabela 1.

C) Materiais componentes do custo fixo

Os materiais correspondentes ao custo fixo de produção de JIs do nematóide encontram-se descritos nas Tabelas 2 e 3.

D) Remuneração das instalações

Foi considerado para o custo alternativo da sala de criação, o valor de aluguel da mesma, considerado o retorno mais comum para esse recurso.

Dessa forma, temos:

$$\text{Custo Fixo} = \text{Depreciação} + \text{Custo Alternativo}$$

TABELA 1. Equipamentos e instrumentos componentes do custo fixo de produção de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora*, em armadilha de White e funil de Baermann.

Equipamentos e Instrumentos	Unidade	Quantidade	Finalidade
Balança analítica eletrônica digital precisão de 4 casas decimais	unidade	1	Pesagem de lagartas mortas de último instar de <i>Galleria mellonella</i> .
(B.O.D.)	unidade	1	Manutenção da temperatura e umidade constantes das suspensões de JIs e realização dos bioensaios.
Destilador	unidade	1	Fornecimento de água destilada aos bioensaios.
Estufa	unidade	1	Esterilização do material e vidraria.
Microscópio estereoscópico	unidade	1	Contagem total de JIs para a quantificação do inóculo.

TABELA 2. Materiais utilizados como componentes do custo fixo de produção de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* em armadilha de White.

Equipamentos e materiais	Unidade	Quantidade	Finalidade
Arm. de White	unidade	2	Multiplificação de NEPs e bioensaio.
Contador manual	unidade	1	Contagem do n° total de JIs do nematóide.
Erlenmeyer (500mL)	unidade	1	Armazenamento das suspensões de JIs do nematóide.
Mesa com fórmica	unidade	1	Manipulação do experimento.
Micropipetas	unidade	1	Inoculação e quantificação de JIs do nematóide.
Placa de petri (9 cm de diâmetro)	unidade	2	Inoculação de JIs do nematóide em lagartas de último instar de <i>Galleria mellonella</i> .
Pipeta, picetas, pinça, caneta, caderneta, estiletes	-	-	Procedimentos diversos.

TABELA 3. Materiais utilizados como componentes do custo fixo de produção de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* em funil de Baermann.

Equipamentos e Materiais		Unidade	Quantidade	Finalidade
Bandeja plástica (21 x 15 x 2 cm)	unidade	2		Depende do melhor tratamento escolhido (densidade de lagarta).
Becker (1000 mL)	unidade	1		Armazenamento das suspensões de JIs do nematóide.
Contador manual	unidade	1		Contar nº total de JIs do nematóide.
Funil de 250 mL	unidade	1		Coleta de JIs do nematóide.
Mesa com fórmica	unidade	1		Manipulação do experimento.
Micropipeta	unidade	1		Inoculação e quantificação de JIs do nematóide.
Pipetas, piceta, pinça, caneta, caderneta, estiletes, barbante	-	-		Procedimentos diversos.
Presilha de Mhor	unidade	1		Manter o nível de água no funil.
Tampa plástica	unidade	5		Fechamento do funil.
Tela de náilon	m ²	0,02		Acomodação das lagartas.
Tubo látex	m	0,5		Coleta de JIs do nematóide.
Tubo de silicone	unidade	1		Adesão da tela ao funil.

4.9.3 Custo variável (CV)

Refere-se aos custos cujos recursos têm duração inferior ou igual ao curto prazo, sendo, portanto, sua recomposição feita a cada ciclo do processo produtivo; incorporam-se totalmente ao produto no curto prazo, não sendo reaproveitados para outro ciclo. São alteráveis em curto prazo e estas alterações provocam variações na quantidade e qualidade do produto ou serviço dentro do ciclo. São recursos que exigem gastos monetários diretos e em curto prazo (Reis, 2004).

Para o Custo Alternativo Variável, temos:

A) *Custo Variável Alternativo*

$$CV_{Alt} = (\text{valor do subtotal do custo variável} \div 2) \times \text{taxa de juros.}$$

4.9.4 Componentes do custo variável

A) Insumos

Os insumos gastos no processo de produção de JIs do nematóide estão descritos nas Tabelas 4 e 5.

TABELA 4. Insumos e tarifas componentes do custo variável de produção de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* em armadilha de White.

Insumos	Unidade	Quantidade	Finalidade
Lagartas de <i>Galleria mellonella</i>	unidade	20	Multiplicação de NEPs e bioensaio.
Material de limpeza	-	-	Álcool, detergente, papel absorvente, esponja e afins.
Papel filtro	unidade	7	Multiplicação de NEPs e bioensaio.

TABELA 5. Insumos, tarifas componentes do custo variável de produção de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* em funil de Baermann.

Insumos	Unidade	Quantidade	Finalidade
Lagartas de <i>Galleria mellonella</i>	unidade	200	Densidade de 200 lagartas/funil.
Material de limpeza	-	-	Álcool, detergente, papel absorvente, esponja e afins.
Papel filtro (60 x 60 cm)	unidade	4	Inoculação de JIs do nematóide em bandejas plásticas.

B) Mão-de-obra

Consideram-se a mão-de-obra de um técnico de laboratório (laboratorista) fazendo-se o cálculo proporcional do tempo gasto para produção de JIs (h.homem) e o salário médio de um profissional dessa categoria. Não foram considerados os encargos sociais.

Dessa maneira, temos:

$$\text{Custo variável} = \text{insumos} + \text{mão-de-obra} + \text{custo de oportunidade.}$$

C) Lagartas de *Galleria mellonella*

TABELA 6. Cálculo do custo de criação de lagartas de *Galleria mellonella*, em sala climatizada, baseado no custo da dieta artificial.

Produto	Quantidade	Preço (R\$)
Farelo de soja	80 g	0,64
Favo de mel	150 g	9,00
Fubá	172 g	0,22
Levedo de cerveja	94 g	1,12
Glicerina	208 mL	2,56
Leite em pó desnatado	48 g	0,67
Mel	236 mL	4,51
Total		18,72

Para o cálculo do custo da produção de JIs do nematóide em lagartas de *G. mellonella*, considerou-se o cálculo da criação da mesma em sala climatizada, baseado no custo da dieta artificial modificada por Parra (1998). Em média, uma marmita possui 600 lagartas de *G. mellonella*, recebendo, em todo o seu ciclo, duas dietas nas proporções acima citadas. Assim:

$$C = D \div n^{\circ} \text{ de lagartas por marmita}$$

C = custo da criação/lagarta de *G. mellonella*

D = valor total da dieta artificial

4.9.5 Dados para a análise econômica simplificada

A) Custo operacional (Cop.)

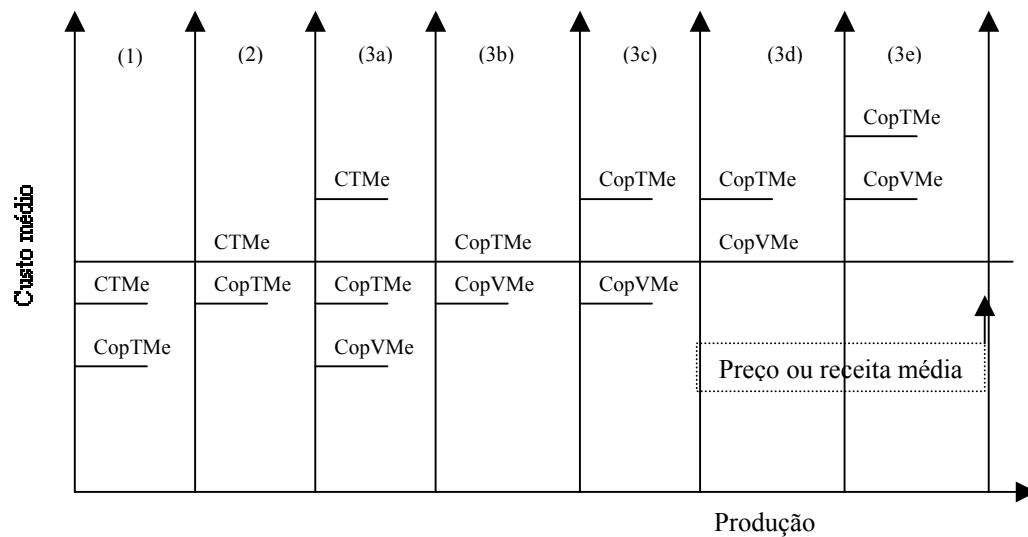
Refere-se ao custo de todos os recursos de produção que exigem desembolso por parte da empresa (unidade de produção) para sua recomposição, incluindo, praticamente todos os custos variáveis e todos os fixos que exigem reposição por meio de aquisições, sem considerar os custos alternativos. Sua

finalidade é mostrar, caso a firma não tenha remuneração igual ou maior que o custo alternativo, se e quanto ela tem de residuo que remunera em parte o capital, tempo, administração e recursos auto-renováveis (Reis, 2004).

B) Custo total médio (CTMe)

É a soma dos custos, fixo total (CFT) e variável total (CVT), dividindo-se pela quantidade produzida de JIs do nematóide por peso de lagarta.

Há diversas condições para a análise econômica simplificada dessa atividade, dependendo do preço (ou receita média) em relação aos custos. Dessa forma, foi sugerida uma interpretação (Reis, 2004) (Figura 2). Esta análise poderá subsidiar o produtor a atribuir preço ao entomopatôgeno produzido e auxiliar na tomada de decisão quanto à atividade de criação desse nematóide.



*CTMe = custo total médio; CopTMe = custo operacional total médio; CopVMe = custo operacional variável médio.

FIGURA 2. Situação de análises econômica e operacional de uma atividade produtiva (Reis, 1997).

De acordo com a Figura 2, a situação (1) corresponde a lucros supernormais ou econômicos, o que sugere que a atividade está atraindo recursos e em condições de se expandir. Já a situação (2) refere-se aos custos normais, que proporcionam rentabilidade igual a outra alternativa, o que sugere estabilidade. Na situação (3), a rentabilidade da atividade é pior do que as remunerações do mercado; esta situação se subdivide em cinco tipos: (3a) paga todos os recursos aplicados na atividade ($RMe > CopTMe$), com remuneração menor que a alternativa de mercado; (3b) ($RMe = CopTMe$), que paga todos os recursos, porém, não paga o recurso alternativo; (3c) paga todos os recursos variáveis e parte dos fixos; (3d) ($RMe = CopTMe$), paga somente os recursos variáveis e (3e) ($RMe < CopTMe$), que não cobre o custo variável.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estimativa da concentração letal máxima (CL₉₉)

Foi feita análise de variância e regressão polinomial para os dados de mortalidade das lagartas de *G. mellonella*, mostrando significância ($F = 14,20$; $P = 0,015$) para o nematóide utilizado (Figura 3).

A concentração letal máxima (CL₉₉) estimada foi de 2.404 JIs/placa de petri de 9 cm de diâmetro em 10 lagartas de *G. mellonella* no sistema de armadilha de White e funil de Baermann, por 72 horas de exposição a *H. bacteriophora*.

Convém salientar que o modelo quadrático ajustado foi feito desconsiderando o intercepto, em virtude do alto valor do coeficiente de determinação (R^2) adquirido, pois a inclusão do intercepto, especificamente a esses dados, proporcionou uma redução acentuada no valor de (R^2), o que torna o modelo inadequado em relação os dados observacionais.

De acordo com a CL₉₉ estimada, *H. bacteriophora* foi pouco virulento contra lagartas de *G. mellonella* quando comparado com *Heterorhabditis* sp. (isolado PI), apresentando valores menores de 142 e 118 JIs/lagarta de *G. mellonella*, respectivamente, em placas de petri de 9 cm e 5 cm de diâmetro (Barbosa et al., 2004).

Shapiro et al. (1985) obtiveram valor um pouco superior para a CL₉₉ ao encontrado neste bioensaio, com 3.000 JIs de *S. feltiae* por placa contra todos os estádios de *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae).

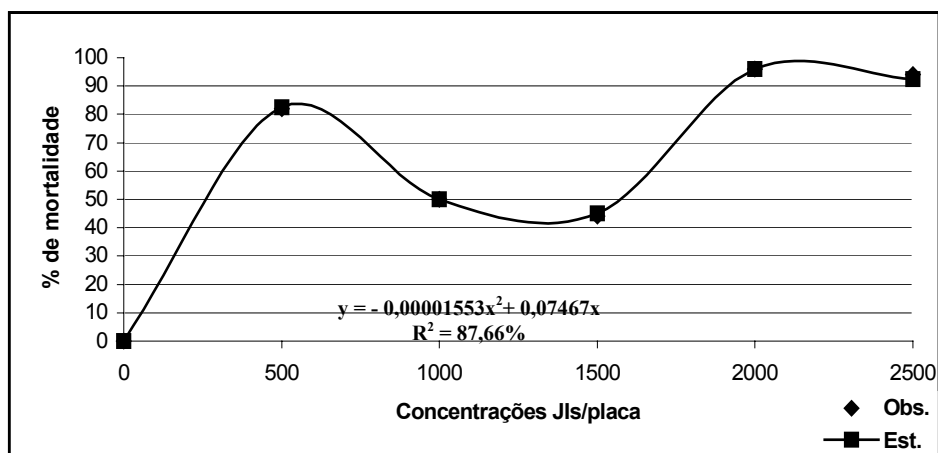


FIGURA 3. Mortalidade estimada de 10 lagartas de *Galleria mellonella* por placa de petri de 9 cm de diâmetro, após 72 horas de exposição a nematóides entomopatogênicos, em diferentes concentrações do inóculo.

5.2 Produção total de nematóides entomopatogênicos

No sistema de armadilha de White, obteve-se produção de 486.610 JIs de *H.bacteriophora*/g de lagarta de *G. mellonella*. Já no sistema de funil de Baermann (Figura 4), houve diferença nos resultados de produção, com uma elevada eficiência na produção *in vivo* de 3.984.758 JIs de *H. bacteriophora*/g de lagarta na densidade de 200 lagartas ou 32,6 g de lagartas ($F = 4,165$; $P = 0,0554$).

Schroeder et al. (1994) relataram pouca diferença entre os métodos de infecção nos bioensaios da patogenicidade de *H. bacteriophora* (isolado Oswego), apresentando menos de 50% e 90% de mortalidade nas larvas de *Otiorhynchus ligustici* (L.), em estudos laboratoriais e em casa de vegetação, respectivamente.

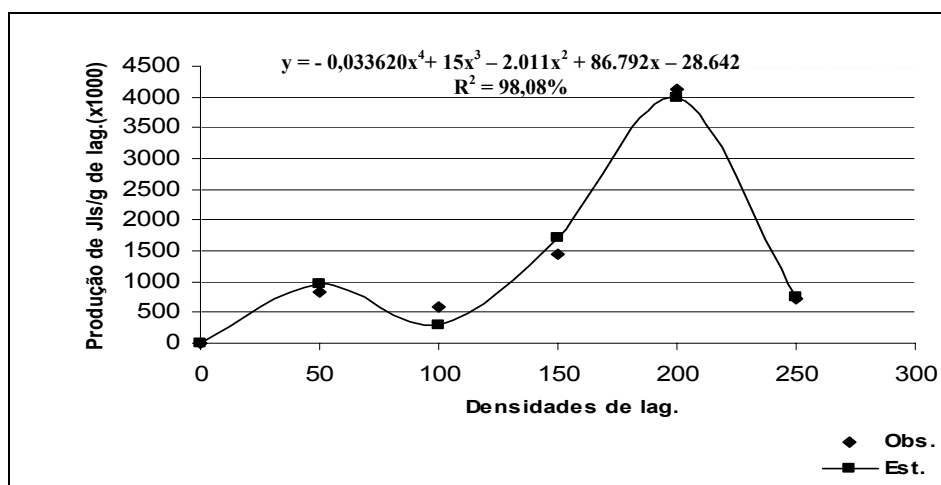


FIGURA 4. Produção de *Heterorhabditis bacteriophora*, em diferentes densidades de lagartas de *Galleria mellonella*, em funis de Baermann.

Deseo et al. (1990) obtiveram produção de 550 milhões de JIs de *Heterorhabditis* spp. coletados de 0,001 grama de lagarta de *G. mellonella*, mostrando valor de produção superior ao encontrado no presente trabalho nos dois sistemas de produção. Choo et al. (2002) verificaram a produção de $18,8 \times 10^4$ de JIs de *S. carpocapsae* (isolado Pocheon) a 24°C e Ozer & Unlu (2003) obtiveram produção de 141.562 até 271.593 JIs de *H. bacteriophora*, chegando a atingir 350.000 JIs por lagartas de *G. mellonella*, mostrando produção inferior ao encontrado neste trabalho, em temperatura próxima.

De acordo com Lindegren et al. (1993), a produção *in vivo* de *S. carpocapsae* avaliada em lagartas de *G. mellonella*, durante um período médio de 16 dias, girou em torno de $1,9 \times 10^5$ JIs/lagarta ($8,2 \times 10^5$ JIs/g de hospedeiro ou $9,9 \times 10^6$ JIs/placa de produção). Para isso, os mesmos autores determinaram que a concentração de 50 nematóides por lagarta de *G. mellonella* ou 2.500 JIs/placa foi considerada a mais apropriada para a produção de JIs, após 48 horas

de exposição. Os mesmos autores verificaram que a produção de JIs de *S. carpocapsae* em lagartas de *G. mellonella* apresentou produções variáveis afetadas pelo tamanho do hospedeiro, espécie do nematóide e método de criação.

Em trabalho de Flanders et al. (1996), a produção *in vivo* de *H. bacteriophora* em lagartas de *G. mellonella* alcançou 567.000 JIs/lagarta. O tempo médio de emergência foi de 17 dias na dose de 20 JIs/lagarta, tendo a emergência sido de um a dois dias mais rápida na dose de 200 JIs/lagarta.

Segundo Shapiro et al. (1985), o número de JIs de *S. feltiae* foi aumentando progressivamente, de acordo com o desenvolvimento de *Lymantria dispar*, com 35 JIs/larva neonatas; 1.475 JIs/larva de segundo instar ; 3.910 JIs/larva de terceiro instar e 11.106 JIs/larva de quarto instar.

5.3 Custo de produção de JIs nos diferentes sistemas

5.3.1 Custo fixo (CF)

Os resultados que se referem aos custos de produção de *H. bacteriophora*, nos dois sistemas de produção, estão demonstrados nas planilhas de estimativa de custo fixo total (Tabelas 7 e 8).

TABELA 7. Custo fixo discriminado para a produção de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora*, em lagartas de *Galleria mellonella*, em armadilha de White.

Recursos	Valor (R\$)	Vida útil (ciclos)	*Valor residual	Depreciação	**Custo alternativo	Custo fixo parcial
Armadilhas de White	5	33	0	1,551041667	27,824	29,37504167
(B.O.D.)	3.478	160	500	0,481770833	9	9,481770833
Balança analítica	2.923	160	200	0,330729167	6,68	7,010729167
Construção	5.000	320	-	1,302083333	58,66	59,96208333
Contador manual	131	160	0	0,926041667	15,824	16,75004167
Destilador Erlenmeyer (500mL)	835	160	200	1,418229167	23,384	24,80222917
Estufa	17,8	33	0	0,018686869	0,0592	0,077886869
Estufa	1.978	160	200	0,012626263	0,04	0,052626263
Mesa com fórmica	100	160	20	0,000151515	0,00048	0,000631515
Micropipetas (200-1000 µ L)	288	83	0	0,289156627	2,304	2,593156627
Microscópio estereoscópico	1.125	160	200	0,012626263	0,04	0,052626263
Pinça	2	33	0	0,01010101	0,032	0,04210101
Pipeta (1 mL)	4	33	0	0,005050505	0,016	0,021050505
Pipeta (10 mL)	5	33	0	0,008838384	0,028	0,036838384
Pisseta	3,5	33	0	0,044949495	0,1424	0,187349495
Placa de petri (9 cm)	7,4	33	0	0,068229167	1,048	1,116229167
Ponteira (azul)	0,06	33	0	0,041666667	0,8	0,841666667
Tubo de ensaio (10 mL)	2	33	0	0,005050505	0,016	0,021050505
Total				6,527029101	145,89808	152,4251091

* Valor residual: valor de mercado de tais equipamentos

** Custo alternativo: forma de estimação

1) Instalações: considerou-se o valor do aluguel da sala (R\$ 80,00/mês)

2) Equipamentos: valor do novo x taxa mensal (0,8%)

TABELA 8. Custo fixo discriminado para a produção de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora*, em lagartas de *Galleria mellonella*, em funis de Baermann.

Recursos	Valor (R\$)	Vida útil (ciclos)	*Valor residual	Depreciação	**Custo alternativo	Custo fixo parcial
(B.O.D.)	3.478	160	500	1,551041667	27,824	29,37504167
Balança analítica	2.923	160	200	0,481770833	9	9,481770833
Bandeja plástica (21 x 15 x 2 cm)	4	33	0	0,330729167	6,68	7,010729167
Becker (1000 mL)	13,9	33	0	1,418229167	23,384	24,80222917
Construção	5.000	320	-	1,302083333	58,66	59,96208333
Contador manual	10	33	0	0,926041667	15,824	16,75004167
Destilador	835	160	200	0,01010101	0,032	0,04210101
Estufa	1.978	160	200	0,289156627	2,304	2,593156627
Funil (250 mL)	16,6	33	0	0,012626263	0,04	0,052626263
Mesa com fórmica	100	160	20	0,03510101	0,1112	0,14630101
Micropipetas (200-1000 µ L)	288	83	0	0,025252525	0,08	0,105252525
Microscópio estereoscópico	1.125	160	200	0,041666667	0,8	0,841666667
Pinça de Mhor	6,5	160	0	0,026041667	0,4	0,426041667
Pipetas (10 mL)	5	33	0	0,041919192	0,1328	0,174719192
Suporte para funil (250 mL)	50	160	0	0,013020833	0,02	0,033020833
Tela de náilon	0,048	16	0	0,003385417	0,052	0,055385417
Tubo de ensaio (10 mL)	2	33	0	0,00025	0,000384	0,000634
Tubo de silicone	1,6	16	0	0,008333333	0,0128	0,021133333
Tubo látex	2,5	16	0	0,005050505	0,016	0,021050505
Total				6,521800882	145,37318	151,8949849

* Valor residual: valor de mercado de tais equipamentos

** Custo alternativo: forma de estimação

1) Instalações: considerou-se o valor do aluguel da sala (R\$ 80,00/mês)

2) Equipamentos: valor do novo x taxa mensal (0,8%)

5.3.2 Custo variável (CV)

Refere-se aos insumos, mão-de-obra e lagartas de *G. mellonella*.

A) Custo de *Galleria mellonella* nos diferentes sistemas

$$C = 18,72 \div 600 = 0,0312/\text{lagarta}$$

De acordo com o cálculo acima, o custo da lagarta de *G. mellonella* em dieta artificial é de R\$ 0,0312/lagarta.

TABELA 9. Custo variável de produção de JIs em lagartas de *Galleria mellonella* em armadilha de White.

Recurso	Quantidade	Valor (30/11/2004)
Mão-de-obra	13,5 h.homem	39,28
Lagartas de <i>Galleria mellonella</i>	10	0,3
Material de limpeza		5
Papel filtro	7	0,11
Total		44,69

TABELA 10. Custo variável de produção de JIs em lagartas de *Galleria mellonella* em funis de Baermann.

Recurso	Quantidade	Valor (30/11/2004)
Mão-de-obra	14 h.homem	40,74
Lagartas de <i>Galleria mellonella</i>	200	6,00
Material de limpeza		5,00
Papel filtro	4	2,24
Tampa plástica	1	0,05
Ponteira (azul)	2	0,06
Total		54,09

5.3.3 Custo total (CT)

TABELA 11. Dados para a análise econômica simplificada dos dois sistemas de produção de JIs em lagartas de *Galleria mellonella*.

Parâmetros*	Sistema de Armadilha de White	Sistema de Funil de Baermann
CopFT (custo operacional fixo total)	355,0795492	353,7045706
CaltFT (custo alternativo fixo total)	276,7552	275,44296
CFT (custo fixo total)	152,4251091	151,8949849
CFTMe (custo fixo total médio)	0,000313239	0,000308696
CopVT (custo operacional variável total)	44,69	54,09
CaltVT (custo alternativo variável total)	0,4469	0,5409
CVT (custo variável total)	45,1369	54,6309
CopT (custo operacional total)	399,7695492	407,7945706
CopMe (custo operacional médio)	0,00082154	0,000838032
CVTMe (custo variável total médio)	9,2758E-05	0,000112268
CT (custo total)	197,5620091	187,8658849
Peso total de lagartas	2,1367	28,0536
Produção de JI/grama de lagarta	486610	3.984758,80
CT/grama	92,46127631	6,696676536
CTMe (custo total médio)	0,000190011	0,0000018475
CTMe /milhão de JIs	190,0110485	1,8474974723

** referente a 10 lagartas

*** referente a 200 lagartas

* CopFT (custo operacional fixo total) = \sum depreciações

CaltFT (custo alternativo fixo total) = \sum custos alternativos

CFT (custo fixo total) = CopFT + CaltFT

CFTMe (custo fixo total médio) = CFT ÷ (Produção/grama)

CopVT (custo operacional variável total) = \sum recursos

CaltVT(custo alternativo variável total) = \sum custo variável x taxa de juros

CVT (custo variável total) = CopVT + CaltVT

CopMe (custo operacional médio) = CopT ÷ (Produção/grama)

CVTMe (custo variável total médio) = CVT ÷ (Produção/grama)

CopT (custo operacional total) = CopFT + CopVT

CT(custo total) = CFT + CVT

Peso total de lagartas = peso observado

Produção de JIs/grama = (produção total) ÷ (grama total de lagartas)

CT/grama = CT/peso total de lagartas (referente a 10 ou 200 lagartas)

CTMe = (CT/grama) ÷ (Produção/grama)

CT/milhão de JIs = (CTMe) x (10⁶)

O custo de produção de JIs de *H. bacteriophora*, em sistema de armadilha de White e funil de Baermann, foi de R\$ 92,46 (US\$¹ 30,82) e R\$ 7,36 (US\$ 2,45)/g de lagarta de *G. mellonella*, respectivamente. Esses valores são correspondentes ao custo de produção de um milhão de JIs, apresentando R\$ 190,01 (US\$63,33) para sistema de armadilha de White e R\$ 1,84 (US\$ 0,61) para funil de Baermann.

Segundo Gaugler et al. (2000), a BioLogic's apresenta o custo de US\$ 1,27 para produzir *in vitro* em meio sólido (Bedding, 1984) 1×10^6 JIs de *S. carpocapsae*. Várias companhias apresentam diferenças nos custos utilizando tecnologia de produção *in vivo*, com US\$ 10,8, US\$ 8,0, US\$ 0,73/milhão de JIs de *S. carpocapsae* e US\$ 1,22 para produzir 1×10^6 JIs de *H. bacteriophora* pela Green Spot, Hydro-Gardens e IBCS. M&R Durango e Nematec apresentam custo de US\$ 1,60 e US\$ 2,96, para a produção de 1×10^6 de JIs de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*, respectivamente.

Atualmente, não existe a comercialização de NEPs no Brasil (Grewal et al., 2001) e, dessa forma, elimina-se a possível concorrência de mercado, podendo o preço ser estabelecido diretamente pelo “produtor”, comercializando a um preço fixado acima do custo de produção (preço > CTMe). Dessa maneira, a produção do entomopatógeno estaria na faixa de lucros supernormais, supostamente em expansão, atraindo a concorrência do produto final (Figura 2, situação 1).

A produção *in vivo* de *H. bacteriophora* em funil de Baermann foi cerca de 8 vezes maior em relação ao sistema de armadilha de White. Além disso, o custo por JI em funil de Baermann foi aproximadamente 100 vezes menor do que o sistema de armadilha de White. Dessa forma, o melhor sistema de produção *in vivo* de JIs de *H. bacteriophora* foi funil de Baermann na densidade de 200 lagartas de *G. mellonella*.

¹ Referente ao valor comercial do dólar igual a R\$ 3,00

6 CONCLUSÕES

A produção *in vivo* de *H. bacteriophora* em funil de Baermann foi maior em relação ao sistema de armadilha de White.

A densidade de 200 lagartas de *G. mellonella* em funil de Baermann proporciona maior produção de JIs de *H. bacteriophora*/g de lagarta.

O sistema que proporciona o menor custo de produção de JIs de *H. bacteriophora* é funil de Baermann.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, C.R.C.; NEGRISOLI Jr, A.S.; MOINO Jr, A. Produção *in vivo* de *Heterorhabditis* sp. (isolado PI) (Nematoda: Rhabditida) em lagartas de *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., 2004, Gramado, RS. **Anais...** Gramado, RS: SBE, 2004. p.282.

BEDDING, R.A. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Ann. Applied Biology**, v.104, p.117-120, 1984.

CARNE, P.B.; REED, E.M. A simple apparatus for harvesting infective stage nematodes emerging from their insect hosts. **Parasitology**, v.54, p.551-553, 1964.

CHOO-HOYUL. et al. Effects of temperature and nematode concentration on pathogenicity and reproduction of entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Pocheon starin (Nematoda: Steinernematidae). **Korean-Journal-of-Applied-Entomology**, v.41, n.4, p.269-277, 2002.

DESEO-KV.; RUGGERI-L.; LAZZARI-G. Mass-production and quality control of entomopathogenic nematodes in *Galleria mellonella* L. larvae. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5., 1990, Adelaide, Australia. **Proceedings and Abstracts...** Adelaide, Australia, 1990. p.20-24.

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

FLANDERS, K.L., MILLER, J.M., SHIELDS, E.J. *In vivo* Production of *Heterorhabditis bacteriophora* "Oswego" (Rhabditida: Heterorhabditidae), a Potential Biological Control Agent for Soil-Inhabiting Insects in Temperate Regions. **Journal of Economic Entomology**, v.89, n.2, p.373-380, 1996.

FRIEDMAN, M.J. Commercial production and development. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: 1990. 365p.

GAUGLER, R. et al. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.17, p.100-109, July 2000.

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

GUERRA, M.S. **Bionomia das traças-de-cera *Galleria mellonella* L. e *Acroia grisella* F. (Lepidóptera, Galleridae) no Município de Piracicaba.** 1973. 133p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

LINDEGREN, J.E., VALERO, K.A., MACKEY, B.E. Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. **Journal of Nematology**, v.25, n.2, p.193-197, 1993.

MENDES, S.M. **Desenvolvimento em diferentes temperaturas e otimização da criação do predador *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae).** 2004. 136p. Tese (Doutorado em Entomologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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). **Turkey Journal Biology**, Ankara, v.27, p.149-155, 2003.

PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos, p. 1015-1038. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** São Paulo: FEALQ,1998. 1163p.

REIS, A. J. Economia aplicada à administração. In: _____. **Comportamento de preços.** p. 39-64. 2004. Apostila.

REIS, R. P. **Introdução à teoria econômica.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1997.

SCHROEDER, P. et al. Pathogenicity of rhabditid nematodes (Nematoda: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to alfalfa snout beetle (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Journal Economic Entomology**, v.87, n.4, p.917-922, 1994.

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

SHAPIRO, M.; POINAR, G.O.; LINDEGREN, J.Jr. Suitability of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) as a host for the entomogeneous nematode, *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal Economic Entomology**, v.78, p.342-345, 1985.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; GOUGE, D.H.; KOPPENHOFER, A.M. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf, and citrus. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. CABI, 2002, 333-355p.

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. **Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques**. Netherlands: Southern Cooperative. Arkansas Agricultural Experiment Station Fayetteville, 1988. (Series Bulletin, 331).

CAPÍTULO 3

1 RESUMO

BARBOSA, Carla Ruth de Carvalho. Comparação da produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos em diferentes hospedeiros. In: _____. **Técnicas de produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) em *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) e hospedeiros alternativos.** 2005. p. 69-91 Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras *

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) são produzidos *in vitro* e *in vivo* para o controle de insetos-praga de importância econômica na agricultura. Um dos fatores que influenciam a produção *in vivo* é o inseto hospedeiro, que deve proporcionar elevadas produções a baixo custo. Assim, este trabalho teve por objetivo comparar e analisar economicamente a multiplicação *in vivo* de *Heterorhabditis bacteriophora* em lagartas de *Anticarsia gemmatalis*, *Agrotis ipsilon* e *Diatraea saccharalis*. Foi utilizado um delineamento fatorial inteiramente casualizado para a estimativa da concentração letal máxima (CL₉₉) para determinar o inóculo para a produção. A produção foi realizada em armadilha de White. As maiores produções foram 351.868, 227.848 e 24.928 JIs/g de lagarta em *D. saccharalis*, *A. gemmatalis* e *A. ipsilon*, respectivamente. O hospedeiro que apresentou menor custo foi *A. ipsilon*, com R\$ 49,86/g de lagarta (US\$ 16,62). e R\$ 200,04/milhão de JIs (US\$ 66,68), seguido de *A. gemmatalis* e *D. saccharalis*. O melhor hospedeiro alternativo é *A. gemmatalis*, apresentando maior produção de *H. bacteriophora* em sistema de armadilha de White, com baixo custo.

* Orientador: Alcides Moino Junior

2 ABSTRACT

BARBOSA, Carla Ruth de Carvalho. Production comparison *in vivo* of entomopathogenic nematodes in different hosts. In: _____. **Entomopathogenic nematodes production techniques *in vivo* (Rhabditida: Heterorhabditidae) in *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) and alternative hosts.** 2005. p.69-91 Dissertation (Master in Entomology)- Federal University of Lavras, Lavras*

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are produced *in vitro* and *in vivo* to control insect pests of economical importance in agriculture. One of the factors that influences the production *in vivo* is the host insect which must supply high production at a low cost. Thus, this study aimed to compare and analyze economically the multiplication *in vivo* of *Heterorhabditis bacteriophora* in *Anticarsia gemmatalis*, *Agrotis ipsilon* and *Diatraea saccharalis* caterpillars. It was used a factorial complete randomized design to estimate the maximum lethal concentration (LC₉₉) in order to determine the inoculum production. The production was performed with the White's trap. The higher productions were 351.868, 227.848 and 24.928 IJs/g of *D. saccharalis*, *A. gemmatalis* and *A. ipsilon* caterpillar, respectively. The host which showed the cost was *A. ipsilon*, with R\$ 49,86/g of caterpillar (US\$ 16,62) and R\$ 200,04/million of IJs (US\$ 66,68) followed by *A. gemmatalis* and *D. saccharalis*. The best alternative host is *A. gemmatalis*, showing the highest production of *H. bacteriophora* in the White's trap system, at a low cost.

* Adviser: Alcides Moino Junior

3 INTRODUÇÃO

De acordo com Poinar & Thomas (1978), há mais de 3.100 associações naturais entre insetos e nematóides, envolvendo 11 ordens de nematóides e 19 ordens de insetos. Nickle (1991) relata que a atividade biológica de nematóides heterorhabditídeos e steinernematídeos contra insetos-praga tem sido avaliada extensivamente em testes laboratoriais e em campo, com resultados promissores em insetos das ordens Coleoptera (19 espécies), Lepidoptera (17 espécies) e Diptera (13 espécies), além do gênero *Musca*. Segundo Qizhi-Liu et al. (2002), mais de 40 pragas foram testadas com NEPs na China.

Assim, essas espécies parasitas de insetos transmitem a bactéria que é letal para seus hospedeiros, característica que faz com que eles sejam mais eficientes para o controle de insetos do que alguns outros grupos de nematóides. Durante as últimas décadas, steinernematídeos e heterorhabditídeos têm-se tornado cada vez mais populares no controle de insetos. Dentre as vantagens, podem-se citar: (a) atacam uma variedade de hospedeiros, (b) juvenis infectivos (JIs) podem ser facilmente produzidos a valores baixos, seja no interior de hospedeiros ou em meios artificiais, (c) podem ser estocados por períodos extensos e (d) podem ser facilmente aplicados em campo. Esses nematóides são resistentes a condições ambientais variadas, podendo ser ativos no solo, penetrar em hospedeiros suscetíveis e causar 100% de mortalidade em poucos dias, sendo, além disso, inofensivos a organismos não-alvo. O número de espécies de insetos suscetíveis a esses nematóides parece ilimitado, podendo ser efetivos agentes de controle contra hospedeiros em cultivos protegidos, especialmente em vasos e ambientes crípticos.

Há mais de 70 anos vêm sendo desenvolvidas tecnologias para a produção de nematóides entomopatogênicos (NEPs) (Shapiro & Gaugler, 2002)

e muitas dessas espécies, principalmente as das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, são comercialmente produzidas, apresentando sucesso quando introduzidos em diversos mercados (Ehlers, 1996). A produção *in vivo* varia grandemente entre diferentes hospedeiros e espécies de nematóides (Shapiro & Gaugler, 2002). Dessa forma, há muitas razões para se acreditar que o uso de NEPs para o controle de insetos-praga aumentará substancialmente em futuro próximo.

Assim, são necessários testes com insetos hospedeiros e espécies de nematóides com características desejáveis (patogênicos, virulentos, específicos e de fácil criação a baixo custo), a fim de reduzir os custos durante a produção. Este trabalho teve como objetivo comparar e analisar economicamente a produção *in vivo* do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis bacteriophora*, em diferentes insetos hospedeiros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.1 Nematóides entomopatogênicos

Foram utilizados JIs da espécie *Heterorhabditidis bacteriophora*, armazenados em suspensão aquosa em (B.O.D.) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de U.R.

4.2 Criação dos hospedeiros alternativos

Os insetos hospedeiros utilizados para a produção de JIs de *H. bacteriophora* foram lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hueb., 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), oriundas do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”(ESALQ/USP). Os insetos foram mantidos a 20°C para a criação dos adultos e 30°C para o desenvolvimento dos ovos, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas, em dieta artificial (adaptada por Parra, 1989) (Tabela 1), preparada da seguinte maneira: todos os ingredientes, exceto o ágar, foram misturados em água e batidos em liquidificador, dissolvendo o ágar em água em ebulição e misturando-os aos demais componentes. A dieta foi homogeneizada por meio de um agitador elétrico e transferida ainda quente para tubos de ensaio de vidro. Anticontaminantes e vitaminas foram adicionadas à dieta, em temperaturas de 60°C a 65°C .

Para a obtenção dos ovos, foram separados adultos na proporção de 20 machos e 30 fêmeas das lagartas mencionadas anteriormente em gaiolas de PVC

de 10 cm de diâmetro e 22 cm de altura, revestidas internamente com papel sulfite umedecido para receber os ovos. Estes foram tratados com formaldeído, a 5% por cinco minutos, lavados em água destilada e transferidos para tubos de ensaio de vidro com a dieta na quantidade de 10 a 15 ovos por tubo, no interior de câmaras assépticas.

TABELA 1. Componentes da dieta artificial (adaptada por Parra, 1989) para os diferentes insetos.

Componentes	Quantidades	
	<i>Diatraea saccharalis</i>	<i>Anticarsia gemmatilis</i> e <i>Agrotis ipsilon</i>
Açúcar	52,5 g	-
Ácido ascórbico	1,90 g	3,60 g
Ácido sórbico	-	1,80 g
Ágar	11,3 g	23,0 g
Água destilada	900 mL	1.200 mL
Caseína	54,0 g	30,0 g
Cloreto de colina	0,40 g	-
Farelo de soja	54,0 g	-
Formol (37%)	0,75 mL	3,60 mL
Feijão	-	75,0 g
Germe de trigo	54,0 g	60,0 g
Levedura	-	37,50 g
Nipagin	3,00 g	3,00 g
Proteína de soja	-	30,0 g
Sais de Wesson	7,50 g	-
Solução vitamínica	11,3 mL	9,00 mL
Tetrex	0,13 g	0,11 g
Vita Gold	0,40 mL	-

4.3 Produção dos nematóides

Os nematóides foram produzidos segundo a técnica mencionada por Woodring & Kaya (1988) e armazenados em recipientes plásticos de 25 mL e mantidos em câmara climatizada (B.O.D.), à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, para posteriormente serem utilizados em bioensaios para a determinação da concentração letal máxima (CL_{99}).

4.4 Determinação da concentração letal máxima (CL₉₉)

A concentração letal (CL) vem ser a expressão às respostas biológicas dos artrópodos às implicações dos patógenos. As respostas dos hospedeiros nos seus diferentes níveis podem ser calculadas matematicamente a partir dos dados de mortalidade (ou de outro parâmetro biológico considerado) (Alves et al., 1998), por meio da análise de regressão polinomial, resultando nas estimativas de CL₉₉ (concentração necessária para matar 99% das lagartas tratadas).

A determinação da CL₉₉ foi realizada para todos os insetos hospedeiros utilizados, em que placas de petri de 9,0 cm de diâmetro contendo duas folhas de papel filtro ao fundo e 10 lagartas cada foram expostas às concentrações de 0 (testemunha); 500; 1.000; 1.500; 2.000; 2.500 JIs/placa, acondicionadas em (B.O.D.) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas. Após 72 horas de exposição aos nematóides, lagartas mortas foram transferidas para placas de petri de 9 cm com uma folha de papel filtro, mantidas por cinco dias para a confirmação da sintomatologia do nematóide. Cada placa foi considerada como uma repetição, totalizando cinco repetições por tratamento.

4.5 Produção de juvenis infectivos em hospedeiros alternativos

Foi empregada a metodologia de White (1927), modificada por Dutky et al. (1964), pela qual lagartas de todos os insetos utilizados foram infectadas com suas respectivas concentrações letais máximas (CL₉₉), por um período de 72 horas expostas aos JIs do nematóide e mantidas nas mesmas condições anteriormente descritas. Em seguida, 10 cadáveres de lagartas foram transferidas para placas de petri de 9 cm de diâmetro contendo uma folha de papel filtro por um período de 5 dias, para completar o desenvolvimento de JIs. Para a produção de JIs do nematóide utilizado, cadáveres de lagartas de cada inseto foram transferidas para armadilhas de White contendo uma folha de papel filtro umedecido, por um período de 12 dias a partir da emergência de JIs do papel

para a água até o final da produção. As suspensões de JIs produzidas nas armadilhas de White foram coletadas diariamente e armazenadas em frascos de plásticos de 25 mL, sendo a produção total quantificada em placas plásticas de poliestireno para testes serológicos.

4.6 Delineamento experimental e variáveis analisadas

Os experimentos foram inteiramente casualizados, com 6 tratamentos e 5 repetições, para a estimativa da CL_{99} . Os dados de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de Abbott (1925) para *A. gemmatalis* e os de produção de JIs do nematóide por peso de lagarta (g) foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$) e regressão polinomial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estimativa da concentração letal máxima (CL₉₉)

Os resultados obtidos nesse ensaio indicam que a concentração letal máxima (CL₉₉) foi de 2.322 JIs/placa ($F = 8,48$; $P = 0,0549$) para *A. ipsilon*, 1.793 JIs/placa ($F = 77,632$; $P = 0,0$) para *D. saccharalis* e 1.685 JIs/placa ($F = 21,42$; $P = 0,0$) para *A. gemmatalis*, após 72 horas de exposição ao nematóide (Figuras 1, 2 e 3). Esses dados indicam que *H. bacteriophora* foi mais virulento para lagartas de *A. gemmatalis*, sendo necessária baixa quantidade de inóculo para provocar 99% de mortalidade, quando comparada com valores de CL₉₉ citados anteriormente para os outros insetos utilizados. Também verificado por Glaser et al. (1991) que *Heterorhabditis* sp. (isolado México) foi mais virulento para lagartas de *S. littoralis*, enquanto *S. glaseri* mostrou-se menos virulento ao mesmo inseto e à concentração de 65 JIs/inseto resultou em 100% de mortalidade após 48 horas de exposição ao nematóide (Kondo & Ishibashi, 1984).

Taylor et al. (1998) obtiveram valores inferiores ao encontrado na presente pesquisa com CL₉₉ e CL₉₈ para *Steinernema feltiae* de 82 e 58 nematóides por larvas de *Musca domestica* L. em papel filtro ou 104 e 74 nematóides por cm² de área superficial de estrume, respectivamente.

Barbosa et al. (2004) verificaram valor superior da CL₉₉ estimada para *Heterorhabditis* sp. (isolado PI) em lagartas de *D. saccharalis* com 1.970 JIs/placa, atingindo produção de $1,01 \times 10^3$ JIs/g de lagarta nesta concentração em relação ao presente trabalho.

Ozer & Unlu (2003) afirmaram que diferenças entre a virulência e produção entre as espécies de nematóides podem ser maior ou menor para um

hospedeiro suscetível, como *G. mellonella*, que permite a multiplicação de todas as espécies de nematóides.

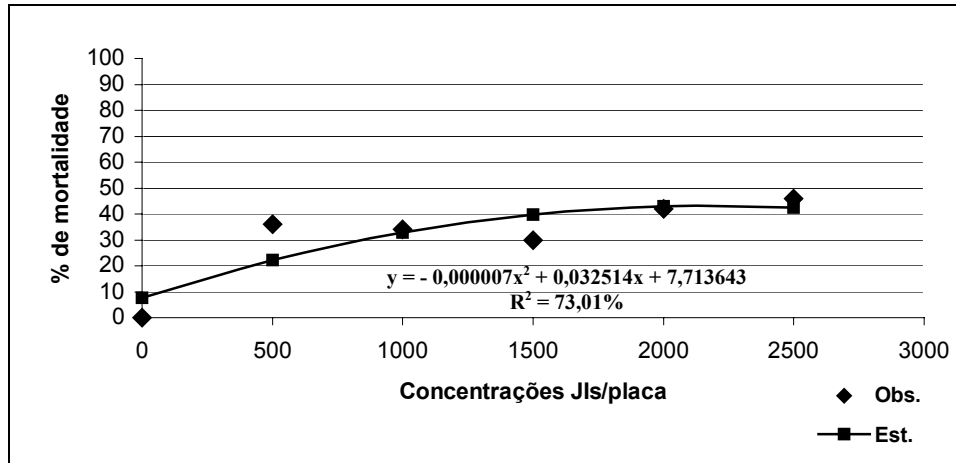


FIGURA 1. Mortalidade estimada de 10 lagartas de *Agrotis ipsilon* por placa de petri de 9 cm de diâmetro, após 72 horas de exposição a nematóides entomopatogênicos, em diferentes concentrações do inóculo.

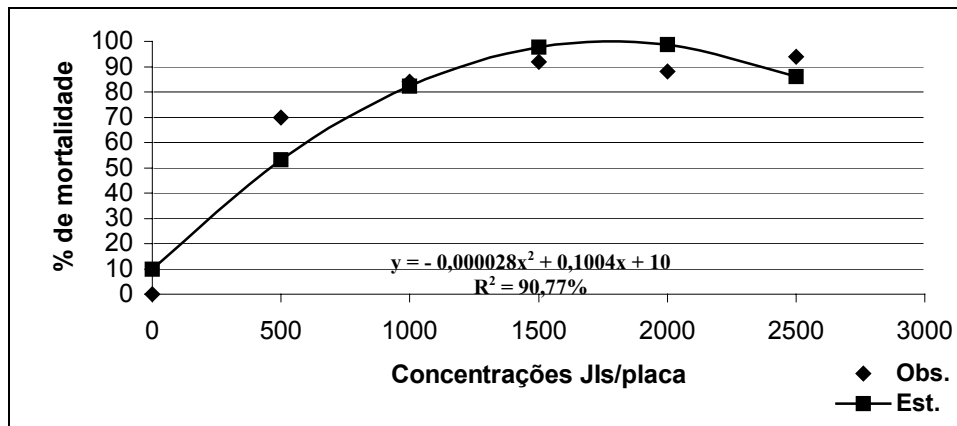


FIGURA 2. Mortalidade estimada de 10 lagartas de *Diatraea saccharalis* por placa de petri de 9 cm de diâmetro, após 72 horas de exposição a nematóides entomopatogênicos, em diferentes concentrações do inóculo.

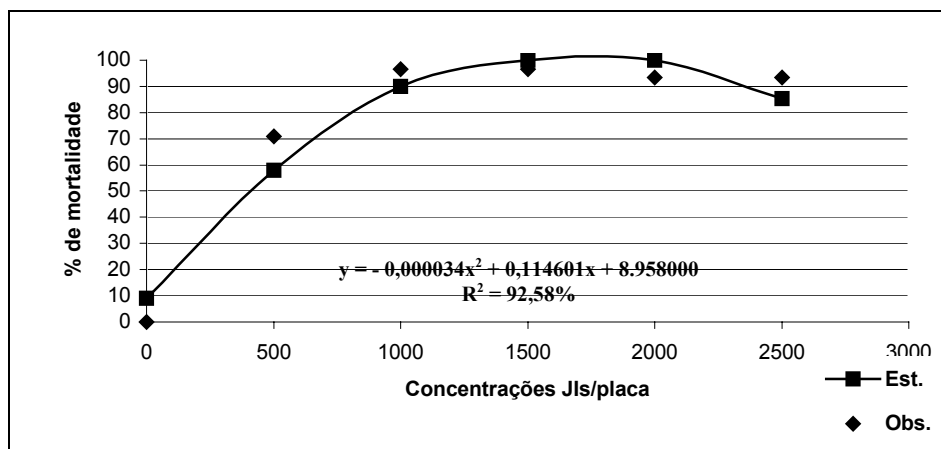


FIGURA 3. Mortalidade estimada de 10 lagartas de *Anticarsia gemmatalis* por placa de petri de 9 cm de diâmetro, após 72 horas de exposição a nematóides entomopatogênicos, em diferentes concentrações do inóculo.

5.2 Produção de JIs do nematóide nos insetos hospedeiros

Diatraea saccharalis foi o hospedeiro que promoveu a melhor produção de *H. bacteriophora*, embora não diferindo de *A. gemmatalis*, enquanto que *A. ipsilon* apresentou menor produção de JIs devido à baixa suscetibilidade desse inseto hospedeiro ao nematóide utilizado (Tabela 2).

TABELA 2. Produção média de juvenis infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* em insetos hospedeiros.

Hospedeiro	Média de produção*	
<i>Diatraea saccharalis</i>	351.868 ± 65.499	a**
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	227.848 ± 55.988	a
<i>Agrotis ipsilon</i>	24.928 ± 7.902	b

* Números de juvenis infectivos/g de lagarta.

** Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (P < 0,05).

Por outro lado, trabalhos demonstram a produção de 200.000 JIs de *S. feltiae* (Dutky et al., 1964) e 350.000 JIs de *H. bacteriophora*, (Milstead & Poinar, 1978) em lagartas de *G. mellonella*. Molina & Lopes (1999) obtiveram produção de 395.880 JIs de *S. carpocapsae* por larva de quarto instar de *Bombyx mori*.

Adams & Nguyen (2002) e Ozer & Unlu (2003) afirmaram que a produção é dependente do tamanho do corpo do hospedeiro. Ao contrário desses autores anteriores, o presente trabalho encontrou a menor produção de JIs de *H. bacteriophora* no maior hospedeiro (*A. ipsilon*). Da mesma forma, Molina (2004) encontrou maiores produções no menor hospedeiro (*G. mellonella*), com relação a *B. mori*.

Entretanto, Prabhuraj et al. (2003) revelaram que *B. mori*, *G. mellonella* e *Holotrichia serrata* apresentaram produções de 8.807.110, 5.080.930 e 8.960.398 de JIs de *S. glaseri*, respectivamente e 1.191.032, 983.611 e 128.399 de JIs de *Heterorhabditis* sp./inseto, respectivamente. Considerou-se *B. mori* o melhor hospedeiro, seguido de *G. mellonella* e *H. serrata* para a produção de JIs de *S. glaseri* e *Heterorhabditis* sp.

De acordo com Zaki et al. (2000), lagartas de terceiro instar de *B. mori* produziram 2.750 JIs/lagarta de *H. bacteriophora* e 48.703 JIs/lagarta de *S. carpocapsae*, enquanto no último instar não se obteve nenhuma produção para os nematóides utilizados. Contudo, após 15 e 20 dias de emergência, a produção

diminuiu para 2.530 JIs/lagarta de *H. bacteriophora* e 30.750 JIs/lagarta para *S. carpocapsae*.

Jansson (1996) obteve produções máximas de três espécies de *Heterorhabditis* sp. (isolado Bacardis), *Heterorhabditis* sp. (isolado FL2122) e *H. bacteriophora* HP88, com 238.692, 22.903 e 137.228 JIs/lagarta de *G. mellonella*, respectivamente. Já em larvas de *Cylas formicarius*, a produção de *Heterorhabditis* sp. (isolado Bacardis), *Heterorhabditis* sp. (isolado FL2122) e *H. bacteriophora* HP88, foi de 8.625, 6.896 e 3.387 JIs/larva, respectivamente.

Shapiro & Gaugler (2002) obtiveram produções médias *in vivo* de vários isolados de *H. bacteriophora* (isolado TF) (115.538 JIs/larva de *T. molitor*), (isolado HB) (61.786 JIs/larva de *T. molitor*), (isolado Lewiston) (79.292 JIs/larva de *T. molitor*), (isolado Oswego) (95.667 JIs/larva de *T. molitor*), *H. indica* (isolado Hom 1) (58.250 JIs/larva de *T. molitor*) e *H. marelatus* (isolado Point Reyes) (51.875 JIs/larva de *T. molitor*).

De acordo com Dutky et al. (1964) e Adams & Nguyen (2002), insetos de tamanhos maiores apresentam ciclos mais longos, conseqüentemente um maior número de gerações de nematóides por existir com maior quantidade de nutrientes.

5.3 Custo de produção de JIs nos hospedeiros alternativos

Os resultados referentes aos custos da produção de JIs de *H. bacteriophora* estão apresentados nas tabelas de estimação de custo fixo total (Tabela 3) e de custo variável total (Tabela 4).

5.3.1 Custo fixo (CF)

TABELA 3. Custo fixo discriminado para a produção de juvenis infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora*, em hospedeiros alternativos.

Recursos	Valor (R\$)	Vida útil (ciclos)	*Valor residual	Depreciação	**Custo alternativo	Custo fixo parcial
(B.O.D.)	3478	160	500	1,55104167	27,824	29,37504167
Construção	5.000	320	-	1,30208333	58,66	59,96208333
Destilador	835	160	200	0,48177083	9	9,481770833
Estufa	1978	160	200	0,33072917	6,68	7,010729167
Microscópio estereoscópico	1125	160	200	0,92604167	15,824	16,75004167
Equipamentos e materiais						
Armadilhas de White	5	33	0	0,01868687	0,0592	0,077886869
Contador manual	10	83	0	0,01262626	0,04	0,052626263
Erlenmeyer (500mL)	17,8	33	0	0,00015152	0,00048	0,000631515
Mesa fórmica com Micropipetas (200-1000 µ L)	100	160	20	0,28915663	2,304	2,593156627
Pipeta (10 mL)	5	33	0	0,01010101	0,032	0,04210101
Pipeta (1 mL)	4	33	0	0,00505051	0,016	0,021050505
Pinça	2	33	0	0,00883838	0,028	0,036838384
Pisseta	3,5	33	0	0,04494949	0,1424	0,187349495
Ponteira (azul)	0,06	33	0	0,01004016	0,08	0,090040161
Placa de Petri (9 cm)	7,4	33	0	0,04166667	0,8	0,841666667
Tubo de ensaio (10 mL)	2	33	0	0,00505051	0,016	0,021050505
Total				5,05061093	62,88608	126,5966909

* Valor residual: valor de mercado de tais equipamentos

** Custo alternativo: forma de estimação

1) Instalações: considerou-se o valor do aluguel da sala (R\$ 80,00/mês)

2) Equipamentos: valor do novo x taxa mensal (0,8%)

5.3.2 Custo variável (CV)

O custo variável foi calculado considerando-se que o custo de produção de *D. saccharalis*, *A. ipsilon* e *A. gemmatalis* é de R\$ 0,008/lagarta,

R\$ 0,08/lagarta e R\$ 0,0266/lagarta, respectivamente (Parra, 2004, comunicação pessoal).

TABELA 4. Custo variável discriminado para a produção de juvenis infectivos de *Heterorhabditis bacteriophora* em hospedeiros alternativos.

Recurso	Quantidade	Valor R\$		
		<i>Diatraea saccharalis</i> ¹	<i>Anticarsia gemmatalis</i> ²	<i>Agrotis ipsilon</i> ³
Mão-de-obra	h.homem	39,28	39,28	39,28
Lagartas ^{1,2,3}	10	0,08	0,266	0,8
Lagartas de <i>G mellonella</i>	10	0,3	0,3	0,3
Material de limpeza		5	5	5
Papel filtro	4	0,06	0,06	0,06
Total		44,77	44,956	45,49

5.3.3 Custo total (CT)

TABELA 5. Dados para a análise econômica simplificada para a produção de juvenis infectivos em lagartas de diferentes hospedeiros.

Parâmetros*	<i>Diatraea saccharalis</i>	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	<i>Agrotis ipsilon</i>
CopFT (custo operacional fixo total)	5,05061093	5,05061093	5,05061093
CaltFT (custo alternativo fixo total)	121,54608	121,54608	121,54608
CFT (custo fixo total)	126,5966909	126,5966909	126,5966909
CFTMe (custo fixo total médio)	0,26016048	0,26016048	0,26016048
CopVT (custo operacional variável total)	44,72	44,906	45,44
CaltVT (custo alternativo variável total)	0,4472	0,44906	0,4544
CVT (custo variável total)	45,1672	45,35506	45,8944
CopMe (custo operacional médio)	0,000137746	0,000197088	0,001822923
CVTMe (custo variável total médio)	0,000128364	0,000199058	0,001841152
CopT (custo operacional total)	48,4685276	44,906	45,44
CT (custo total)	171,7638909	171,9517509	172,4910909
Peso de lagartas	0,718	1,6113	3,459
Produção de JIs/grama de lagarta	351.868	227.848	24.927
CT/grama	239,2254748	106,7161614	49,86732898
CTMe (custo total médio)	0,000679873	0,000468366	0,000200046
CTMe/milhão de JIs	679,8727785	468,3655834	200,0462493

* CopFT (custo operacional fixo total) = \sum depreciações
 CaltFT (custo alternativo fixo total) = \sum custos alternativos

CFT (custo fixo total) = CopFT + CaltFT
 CFTMe (custo fixo total) = CFT ÷ (Produção/grama)
 CopVT (custo operacional variável total) = \sum recursos
 CaltVT (custo alternativo variável total) = \sum custo variável x taxa de juros
 CVT (custo variável total) = CopVT + CaltVT
 CopMe (custo operacional médio) = CopT ÷ (Produção/grama)
 CVTMe (custo variável total médio) = CVT ÷ (Produção/grama)
 CopT (custo operacional total) = CopFT + CopVT
 CT (custo total) = CFT + CVT
 Peso total de lagartas = peso observado
 Produção de JIs/grama = (produção total) ÷ (grama total de lagartas)
 CT/grama = CT/peso total de lagartas (referente a 10 ou 200 lagartas)
 CTMe = (CT/grama) ÷ (Produção/grama)
 CT/milhão de JIs = (CTMe) x (10⁶)

O hospedeiro que apresentou menor custo de produção de *H. bacteriophora* em armadilha de White foi *A. epsilon*, com R\$ 49,86/g de lagarta (US\$16,62) e por milhão de JI R\$ 200,04 (US\$ 66,68) seguido de *A. gemmatalis* e *D. saccharalis* (Tabela 5).

Há grandes diferenças de preços de agentes de controle biológico entre companhias nos Estados Unidos e Europa. *S. feltiae* (Filipjev) e *H. megidis*, produzidos massalmente por duas companhias, custam US\$ 0,910 e 0,518/milhão de JIs, respectivamente (van Lenteren et al., 1997).

Georgis (2002) relatou que o custo para produzir 2,5 x 10⁹ JIs de *S. carpocapsae* na formulação de grânulos dispersivos em água foi de US\$ 30,97. Em fermentadores de 80.000 litros, a produção de *S. riobravis* e *S. carpocapsae* excedeu 150 x 10³ nematóides/mL, enquanto para *H. bacteriophora*, *S. feltiae* e *S. glaseri*, a produção atingiu 142 x 10³, 93 x 10³ e 62 x 10³ nematóides/mL, respectivamente.

A produção *in vitro* apresenta um custo de aproximadamente US\$ 1,00/milhão de JIs (Poinar, 1979), US\$ 12/bilhão de JIs e US\$ 17/bilhão de JIs de *H. bacteriophora* (Gaugler & Han, 2002) e, em meio com lipídio e agar, a produção atingiu 31 milhões de *Steinernema* sp. a um custo de R\$ 0,26 e US\$ 0,9/placa de petri (20g de meio), apresentando menos gastos do que o produzido

in vivo em lagartas de *G. mellonella* com custo de oito vezes ou mais (Tangchitsomkid et al., 1999).

O elevado custo apresentado pelos nematóides é reflexo da baixa economia de escala, intrínseca à indústria artesanal, sobretudo apontando volume de produção baixo (Gaugler et al., 2000). De acordo com Georgis (2002), o custo de produção tem sido uma das razões para a limitação do uso de nematóides para o controle de certos insetos e mercados. De acordo com Tauber et al. (2000), a comercialização de inimigos naturais ainda é considerada um desafio quanto à redução do custo de produção dos mesmos. Considerando que a produção *in vitro* de NEPs ocorre em larga escala e tem como característica a utilização de alta tecnologia quando comparado com o método *in vivo*, este último satisfaz as necessidades de pequenos produtores, principalmente em cultivo protegidos e instituições governamentais, devido a baixa tecnificação e possibilidade de produção em pequena escala.

6 CONCLUSÕES

Heterorhabditis bacteriophora é patogênico a *D. saccharalis*, *A. ipsilon* e *A. gemmatalis* e, com maior virulência, a *A. gemmatalis*.

Diatraea saccharalis e *A. gemmatalis* são os hospedeiros com maior produção de *H. bacteriophora*, em armadilha de White.

Agrotis ipsilon é o hospedeiro que proporciona menor custo de produção de JIs de *H. bacteriophora*, seguido de *A. gemmatalis* e *D. saccharalis*, respectivamente.

Anticarsia gemmatalis é considerado o melhor hospedeiro alternativo de *H. bacteriophora*, com baixo custo e alta produção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.
- ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University, 2002. p.1-28.
- ALVES, S.B. et al. Técnicas de laboratório, In: _____. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ, 1998. p.637-710.
- BARBOSA, C.R.C.; NEGRISOLI Jr, A.S.; MOINO Jr, A. Suscetibilidade e produção *in vivo* de *Heterorhabditis* sp. (isolado PI) (Nematoda: Rhabditida) em lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 13., 2004, Lavras. **Resumos...** Lavras, UFLA, 2004. CD ROM.
- 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. Current and future use of nematodes in biocontrol: practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. **Biocontrol Science and Technology**, v.6, p.303-316, 1996.
- GAUGLER, R. et al.. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.17, p.100-109, July 2000.
- GAUGLER, R.; HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. CAB International, 2002. p.289-310.
- GEORGIS, R. The biosys experiment: an insider's perspective. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University, 2002. p.357-371.

GLASER, I.; GALPER, S.; SHARON, E. Virulence of the nematode (Steinernematid and *Heterorhabditis*) - bacteria (*Xenorhabdus* spp.) complex to the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.57, p.94-100, 1991.

JANSSON, R.K. Infectivity and reproduction of three heterorhabditid nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) in two insect hosts. **Florida Entomologist**, v.79, n.3, p.363-373, 1996.

KONDO, E.; ISHIBASHI, N. Infectivity and multiplication of *Steinernema feltiae* (strain Mexican) on the common cutworm *Spodoptera litura*. **Japan Journal Applied Entomology Zoology**, v.28, p.229-236, 1984.

MILSTEAD, J.E.; POINAR, G.O. Jr. A new entomogenous for pest management systems. **California Agriculture**, v.32, p.324-327, 1978.

MOLINA A.J.P. **Isolamento, identificação, biologia e produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) provenientes de Lavras, MG.** 2004. 96p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MOLINA, A.J.P.; LOPEZ, N.J.C. Producción de tres especies de entomonematodos com dos sistemas de infección em dos hospederos. In: CONGRESO DE LA SOCIEDAD COLOMBIANA DE ENTOMOLOGIA, 26., 1999, Santa Fé de Bogotá. **Resúmenes...** Santa Fé de Bogotá: Sociedad Colombiana de Entomologia, 1999. p.138.

NICKLE, W.R. **Manual of agricultural nematology.** New York: Marcel Dekker, 1991. p.1035.

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). **Turkey Journal Biology**, Ankara, v.27, p.149-155, 2003.

PARRA, J.R.P.; MISHFELDT, L.H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: ANDERSON, T.E.; LEPPLA, N.C. (Ed.). **Advances in insect rearing for research and pest management.** Colorado: Westview, 1992. p.403-409, 1989.

POINAR, G. O. Jr. **Nematodes for biological control of insects**. Boca Raton, Florida: CRC, 1979. 277p.

POINAR, JR.G.O.; THOMAS, G.M. **Laboratory guide to insect pathogens and parasites**. New York: Plenum,1978. p.392.

PRABHURAJ; VIRAKTAMATH-ACA.; KAMAR-ARV. Evaluation of silkworm larva and root grub for the in vivo mass production of entomopathogenic nematodes. **Indian-Journal-of-Entomology**,v.65, n.1, p.34-37, 2003.

QIZHI-LIU. et al. Progress of applied research on entomopathogenic nematodes in biological control in China. **Journal of China Agricultural University**, v.7, n.5, p.65-69, 2002.

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

TANGCHITSOMKID, N. et al. Mass rearing of thai strain entomopathogenic nematodes (*Steinernema* sp.) on lipid agar medium. In: KASETSART UNIVERSITY ANNUAL CONFERENCE, 37., 1999, Kasetsart. **Proceedings...** Kasetsart: Kasetsart University, 1999. p.320-325.

TAUBER, M.J.; TAUBER, C.; DAANE, K. M.; HAGGEN, K. S. **Comercialization of predators: Recent lessons from green lacewing (Neuroptera: Chrysopidae)**. *American Entomologist*, Lanham, v. 26, n. 1, p. 26-38, 2000.

TAYLOR, D.B. Susceptibility of house fly (Diptera: Muscidae) larvae to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae). **Environmental Entomology**, v.27, n.6, p.1514-1519, 1998.

VAN LENTEREN, J.C.; ROSKAM, M.M.; TIMMER, R. Commercial mass production and pricing of organisms for biological control of pests in Europe. **Biological Control**, v.10, p.143-149, 1997.

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 southern cooperative**. Arkansas: Arkansas Agricultural Experiment Station Fayetteville, 1988. (Series Bulletin, 331).

ZAKI, F.A. et al. *In vivo* culturing of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* on silkworm (*Bombyx mori*) and their effect on some lepidopterous insects. **Indian Journal of Nematology**, v.30, n.1, p.1-4, 2000.

ZAKI, F. A.; MANTOO, M. A.; SHAHEENA, G.; GUL, S. *In vivo* culturing of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* on silkworm (*Bombyx mori*) and their effect on some lepidopterous insects. **Indian Journal of Nematology**, v. 30, n. 1, p. 1-4. 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora *Diatraea saccharalis* tenha sido considerado o melhor hospedeiro alternativo, por apresentar a maior produção de *H. bacteriophora* em sistema de armadilha de White, *Galleria mellonella* continua sendo a melhor opção, em função da criação mais barata, menor custo e maior produção do nematóide nesse sistema. Todavia, sugere-se que sejam avaliados outros insetos hospedeiros com potencial para a produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos.

Dessa forma, o sistema de funil de Baermann, como uma nova alternativa para a produção desses entomopatógenos, apresentou menor custo e maior produtividade de JIs em relação ao sistema de armadilha de White, havendo a possibilidade de avaliação de outros hospedeiros, além de *G. mellonella*, nesse sistema.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)