



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ

Campus de Luiz Meneghel- Bandeirantes

GABRIELA SOUZA DONEZE

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VIVO*, ALTERNATIVAS DE
MEIO DE CULTURA E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
INÓCULO PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE *Heterorhabditis
amazonensis* (Isolado UEL 08)**

GABRIELA SOUZA DONEZE

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VIVO*, ALTERNATIVAS DE
MEIO DE CULTURA E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
INÓCULO PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE *Heterorhabditis*
amazonensis (Isolado UEL 08)**

Dissertação de Mestrado apresentada a
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
Campus Luiz Meneghel, ao Programa de Mestrado
em Agronomia.

Bandeirantes

2022

GABRIELA SOUZA DONEZE

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VIVO*, ALTERNATIVAS DE
MEIO DE CULTURA E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
INÓCULO PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE *Heterorhabditis*
amazonensis (Isolado UEL 08)**

Dissertação de Mestrado apresentada a
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
Campus Luiz Meneghel, ao Programa de Mestrado
em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Viviane Sandra Alves

Prof^o Dr^o Leopoldo Sussumu Matsumoto

Prof^o Dr^o Luis Francisco Angeli Alves

Bandeirantes

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP

SG118a SOUZA DONEZE, GABRIELA
 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO IN VIVO, ALTERNATIVAS DE
 MEIO DE CULTURA E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO
 PARA PRODUÇÃO IN VITRO DE *Heterorhabditis*
 amazonensis (Isolado UEL 08) / GABRIELA SOUZA
 DONEZE; orientadora VIVIANE SANDRA ALVES -
 Bandeirantes, 2022.
 48 p. :il.

 Dissertação (Mestrado Acadêmico Agronomia) -
 Universidade Estadual do Norte do Paraná, Centro de
 Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
 Agronomia, 2022.

 1. PRODUÇÃO DE NEPs. 2. PRODUÇÃO in vivo. 3.
 PRODUÇÃO in vitro . 4. PRODUÇÃO in vitro em meio
 solido. 5. PRODUÇÃO in vitro em meio semi-solido.
 I. SANDRA ALVES, VIVIANE, orient. II. Título.

Agradecimentos

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

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

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

Agradeço ao meu namorado Leonardo, que está ao meu lado me apoiando e me incentivando dia após dia.

Agradeço ao meu cachorro Francisco, por sempre estar me esperando após um dia cansativo de laboratório com muito carinho e amor.

Agradeço as minhas parceiras de laboratório Gabi e Anelise por sempre me auxiliarem nos trabalhos realizados, e por cada momento de alegria e de sofrimento que vivemos juntas no laboratório.

Agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, aos estagiários do LECOM, pois sem eles esta pesquisa não se sustentaria.

Em especial agradeço a minha orientadora Professora Dra. Viviane Sandra Alves por ter depositado total confiança nesses oito anos de jornada, por ter me dado a oportunidade de estagiar no LECOM como PIBIC e poder dar continuidade como mestranda, compartilhando um pouco de seu vasto conhecimento.

Agradeço a CAPES pela concessão da Bolsa.

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

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

RESUMO

Nematoides Entomopatogênicos (NEP) são parasitas obrigatórios que possuem associação com bactérias simbióticas e causam mortalidade em insetos, por isso, são considerado ótimos agentes no controle biológico. Produtos à base de NEP são uma realidade fora do Brasil, mas aqui, ainda são escassos devida a dificuldade de produção em larga escala. Por outro lado, o isolado nativo *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) foi avaliado como um agente potencial para uso no controle do cascudinho de aviário, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). Embora os testes de patogenicidade e virulência sobre o inseto indicarem que este é um isolado promissor, não há evidências de que ele possa ser produzido em larga escala e assim, utilizado no controle dessa praga. Diante disso, este trabalho teve como objetivo, realizar testes de produção *in vivo* e *in vitro* do isolado UEL 08. Para o teste *in vivo* foram utilizadas larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) como hospedeiro e avaliou-se a produção por larva, por grama de larva e produção total. A produção *in vitro* foi avaliada utilizando meios sólido e semi-sólido, contendo diferentes fontes de gordura (óleo de milho, canola, algodão, soja, coco, gordura de porco e manteiga de leite bovino). Posteriormente, foram avaliados diferentes concentrações de inóculo (1.000, 2.500, 5.000, 7.500 e 10.000 Juvenis Infectantes (JIs)/frasco). Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento. No ensaio de produção *in vivo* observou-se produção de $6,5 \times 10^4$ JIs/larva e produção total de $6,5 \times 10^5$ JIs/repetição. Na produção *in vitro* em meio sólido, houve diferença entre as fontes de gordura utilizadas, sendo o óleo de milho a que proporcionou maior produção com 926,5 JIs/mL de meio. Em meio semi-sólido, o óleo de milho também apresentou a melhor produção, com $3,2 \times 10^4$ JIs/mL diferindo de todas as outras fontes de gordura avaliadas. Os JIs produzidos tanto em meio sólido, quanto em semi-sólido foram virulentos quando aplicados sobre larvas de *G. mellonella*, com valores de mortalidade que aproximaram-se de 100%. A melhor concentração de inóculo em meio semi-sólido foi de 1.000JIs/frasco.

Palavras-Chave: Meios de cultura, fonte de gordura, inóculo.

DONEZE, Gabriela, **Evaluation of *in vivo* production, culture medium alternatives and different inoculum concentrations for *in vitro* production of *Heterorhabditis amazonensis* (Isolate UEL 08)**. 2022. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2022.

ABSTRAC

Entomopathogenic Nematodes (EPN) are obligate parasites that have an association with symbiotic bacteria and cause mortality in insects, so they are excellent agents in biological control. EPN-based products are a reality outside Brazil, but here, they are still scarce due to the difficulty of large-scale production. On the other hand, the native isolate *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) was evaluated as a potential agent for use in the control of the avian rattlesnake, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). Although pathogenicity and virulence tests on the insect indicate that this is a promising isolate, there is no evidence that it can be produced on a large scale and used to control this pest. Therefore, this work aimed to perform *in vivo* and *in vitro* production tests of isolate UEL 08. For the *in vivo* test, *Galleria mellonella* larvae (Lepidoptera: Pyralidae) were used as host and the production per larva, per gram of larva and total production was evaluated. *In vitro* production was evaluated using solid and semi-solid medium containing different fat sources (corn, canola, cotton, soybean, coconut, pork fat and bovine milk butter). Subsequently, different inoculum sizes (1,000, 2,500, 5,000, 7,500 and 10,000 Infecting Juveniles (IJs)/fry) were evaluated. The trials were conducted in an entirely randomized design, with four replicates for each treatment. In the *in vivo* production assay we observed a production of 6.5×10^4 IJs/larva and a total production of 6.5×10^5 IJs/repetition. In *in vitro* production in solid medium, there was a difference between the fat sources used, with corn oil providing the highest production with 926.5 IJs/mL of medium. In semi-solid medium, corn oil also showed the best production, with 3.2×10^4 IJs/mL, differing from all other fat sources evaluated. The IJs produced both in solid and semi-solid medium were virulent when applied on *G. mellonella* larvae, with mortality values approaching 100%. The best inoculum concentration in semi-solid medium was 1,000 IJs/well.

Keywords: Culture media, fat source, inoculum.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	11
2.1. Nematoides Entomopatogênicos	11
2.1.1 Ciclo de vida.....	12
2.1.2. Bactérias.....	14
2.1.3 Gênero <i>Heterorhabditis</i>	15
2.2 Produção de Nematoides.....	17
2.2.1 Produção <i>in vivo</i>	17
2.2.2 Produção <i>in vitro</i> e suas limitações	18
2.3 <i>Alphitobius diaperinus</i>	20
3 MATERIAL E MÉTODO	23
3.1 Manutenção do Isolado de Nematóide Entomopatogênico	23
3.2 Produção de Nematoides.....	24
3.2.1 Produção <i>in vivo</i>	24
3.2.2 Produção <i>in vitro</i>	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Produção <i>in vivo</i>	29
4.2 Produção <i>in vitro</i>	30
4.2.1 Meio sólido.....	30
4.2.2 Meio semi-sólido.....	32
4.2.3 Infectividade.....	35
4.2.4 Avaliação de diferentes concentrações de inóculo para produção <i>in vitro</i> em meio semi-sólido	36
5. CONCLUSÃO	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cadáveres de larvas de <i>Galleria mellonella</i> mortas por nematoides entomopatogênicos: A) Gênero <i>Steinernema</i> . B) Gênero <i>Heterorhabditis</i>	12
Figura 2 - Ciclo de vida de nematoides entomopatogênicos do gênero <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	13
Figura 3 - Produção em meio sólido: A) Meio com a bactéria crescida; B) Multiplicação de NEP; C) armadilha de White modificada.	26
Figura 4 - Produção em meio semi-sólido: A) Meio de cultura sem crescimento bacteriano. B) Meio de cultura com espuma+bactéria crescida. C) Multiplicação dos NEP.	27
Figura 5 - Produção diária de JIs do isolado UEL 08 (<i>Heterorhabditis amazonensis</i>) pelo método in vivo usando larvas de <i>Galleria mellonella</i> como hospedeiro.	29
Figura 6 - Curva de regressão da produção de JIs total e viáveis do isolado UEL 08 (<i>Heterorhabditis amazonensis</i>) em meio semi-sólido após 21 dias de incubação.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Ingredientes para dieta de <i>Galleria mellonella</i>	23
Tabela 2 - Meio de cultura sólido base adaptado de Neira-Monsalve et al. (2019).	25
Tabela 3 – Produção total de Juvenis Infectantes/placa (15mL de meio) do isolado UEL 08 (<i>Heterorhabditis amazonensis</i>) por método in vitro em meio sólido usando diferentes fontes de gordura.	31
Tabela 4 – Produção total de Juvenis Infectantes/frasco (30mL de meio) do isolado UEL 08 (<i>Heterorhabditis amazonensis</i>) por método in vitro em meio semi-sólido usando diferentes fontes de gordura.	33
Tabela 5 – Número médio de Juvenis Infectantes do isolado UEL 08 (<i>Heterorhabditis amazonensis</i>) produzidos por mL de meio sólido, semi-sólido ou por grama de larva de <i>Galleria mellonella</i>	34
Tabela 6 - Porcentagem de mortalidade de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas por JIs do isolado UEL 08 (<i>Heterorhabditis amazonensis</i>) produzidos em meio sólido e semi-sólido	35

Tabela 7- Produção de Juvenis Infectantes/frasco (50mL de meio) do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) por método in vitro em meio semi-sólido usando diferentes concentrações de juvenis por frasco. 36

Tabela 8- Porcentagem de mortalidade em larvas de *Galleria mellonella* infectadas por JIs do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) produzidos in vitro em diferentes concentrações de inóculo. 38

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) pertencentes às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae constituem agentes de controle biológico de insetos bastante efetivos (KOPPENHÖFER *et al.*, 2000). Esse sucesso se dá devido à sua associação com bactérias simbiotes, que os auxiliam a causar a morte rápida do hospedeiro. As espécies de NEP *Heterorhabditis* estão associadas às bactérias *Photorhabdus*, e espécies do gênero *Steinernema* encontram-se associados às bactérias do gênero *Xenorhabdus* (GREWAL; KOPPENHÖFER; CHOO, 2005).

A utilização de NEP é uma alternativa viável principalmente para o controle de insetos que se abrigam no solo, ou em ambientes crípticos, como o cascudinho-de-aviário, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), cujo controle é dificultado devido ao hábito de viver em meio à cama de aviário.

A presença do cascudinho nos aviários de corte pode causar inúmeros prejuízos, pois as aves são atraídas pelo movimento dos insetos, e passam a ingeri-los no lugar da ração balanceada. Como resultado, há alterações no desenvolvimento das. Além disso, a ingestão dos insetos adultos causa ferimentos no trato digestório das aves, devido à dureza dos élitros. São ainda fonte de inóculo e transmissores de doenças às aves, como a Doença de Newcastle e Gumboro (MCALLISTER *et al.*, 1995), e patógenos como a *Salmonella* sp. e *Clostridium perfringens* (CHERNAKI-LEFFER *et al.*, 2002; VITTORI *et al.*, 2007; HAZELEGER *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* comprovam que os NEP podem ser uma alternativa para o controle do cascudinho de aviário (Geden *et al.* 1985; Szałanski *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2012). Recentemente Fernandes *et al.* (2021) realizaram testes utilizando isolados nativos brasileiros, e observaram destaque para os isolados da espécie *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08, UEL 07 e NEPET 11) que causaram mortalidade de 85%, 93% e 100% respectivamente, em larvas de cascudinho. Além disso, ensaios em campo foram conduzidos comprovaram o potencial dos NEP visando ao controle do cascudinho-dos-aviários (Geden *et al.*, 1987; Rodrigueiro *et al.*, 2008).

No entanto, no Brasil não há produtos registrados à base de NEP para o controle do cascudinho, sendo que o único produto à base de NEP (*Heterorhabditis bacteriophora*) registrado no Brasil, junto ao MAPA, além de não ter indicação para esta finalidade, ainda não é disponível comercialmente.

A principal limitação na utilização dos NEP no controle biológico é o desenvolvimento de tecnologias de produção em larga escala (REF), e não há na literatura nenhuma referência quanto a produção *in vitro* da espécie *Heterorhabditis amazonensis* (DOLINSKI, 2020).

Assim, este trabalho teve como objetivo, avaliar a produção *in vivo* do isolado *Heterorhabditis amazonensis* (UEL-08), e apresentar alternativas de meio de cultura e diferentes concentrações de inóculo para a produção *in vitro*.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1. Nematoides Entomopatogênicos

Os nematoides estão entre os organismos mais abundantes da terra, presentes tanto em ambientes aquáticos quanto em terrestres, e podem possuir vida livre ou serem parasitas de animais ou vegetais (STOCK, 2015). Os nematoides parasitas são há muito tempo alvo de pesquisas devido às injúrias que causam na agricultura, em animais e em humanos (DOLINSKI, 2020).

Dentre os nematoides parasitas, estão presentes organismos benéficos, que podem agir como agentes de controle de pragas (STOCK; HUNT, 2005) e conhecidos como nematoides entomopatogênicos (NEP).

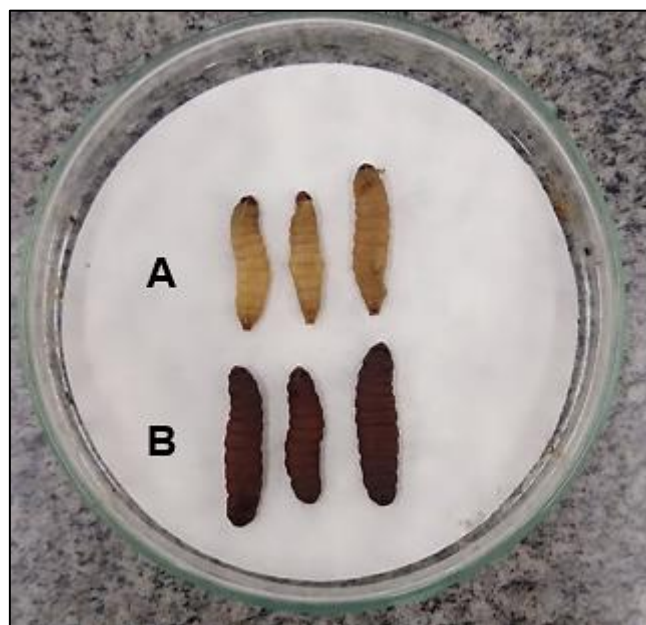
O termo nematoide entomopatogênico refere-se às famílias Steinernematidae, que contém os gêneros *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinerema* Nguyen e Smart, 1994 e Heterorhabditidae, que abriga o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (BURNELL; STOCK, 2000).

A espécie do gênero *Oscheius* também podem apresentar associações temporárias ou oportunistas com bactérias entomopatogênicas do gênero *Serratia* (Ye *et al.*, 2010). Essa associação, tal como nos outros grupos, aumenta a virulência dos nematoides e acelera a morte do inseto hospedeiro, mas não é obrigatória, não caracterizando-se, portanto, como uma simbiose (DILLMAN *et al.*, 2012).

As espécies dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* por sua vez, são parasitas obrigatórios de insetos, e possuem associação simbiótica com bactérias, atuando juntos para causar mortalidade dos seus hospedeiros (ADAMS; NGUYEN, 2002). Os NEP do gênero *Steinernema* associam-se às bactérias *Xenorhabdus*, as quais ficam presentes na vesícula intestinal (BIRD; AKHURST, 1983), e os do gênero *Heterorhabditis* associam-se a bactérias *Photorhabdus* que estão localizadas ao longo do intestino (CICHE; ENSIGN, 2003).

Uma característica da infecção pelo complexo nematoide + bactéria é a mudança de coloração dos cadáveres dos insetos infectados, deixando marrom-escuro, para *Heterorhabditis* + *Photorhabdus*, e marrom claro para *Steinernema* + *Xenorhabdus* (Figura 1) (ALVES; LOPES, 2008).

Figura 1 - Cadáveres de larvas de *Galleria mellonella* mortas por nematoides entomopatogênicos: A) Gênero *Steinernema*. B) Gênero *Heterorhabditis*.



Fonte: Doneze (2021).

Os NEP penetram no corpo do inseto-alvo pelos orifícios naturais como boca, ânus e espiráculos, liberando bactérias na hemolinfa do hospedeiro. Ali, elas se multiplicam, excretam toxinas e causam a morte do inseto por septicemia e toxicidade em um período de 24 a 72 horas (POINAR, 1990). Ou seja, o Juvenil infectante (JI) e a bactéria juntos atuam como um complexo que mata o inseto em um curto período (KOPPENHOFER, 2007).

Após a morte do hospedeiro, o nematoide se alimenta do interior do cadáver, um meio nutritivo rico em bactérias e resíduos dos tecidos internos do inseto.

2.1.1 Ciclo de vida

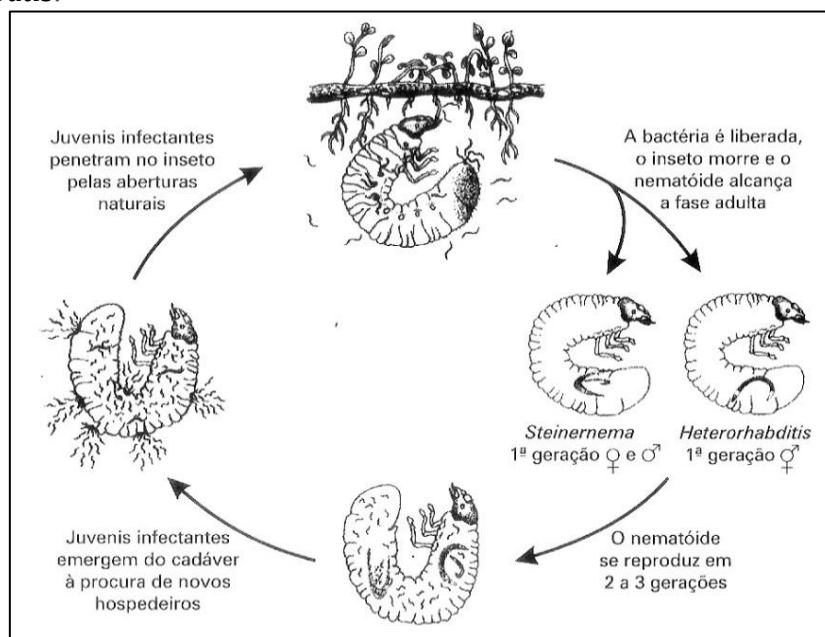
O ciclo de vida dos nematoides e a patogenicidade pode variar em função do gênero, espécie e população do hospedeiro (ANDALÓ; MOINO JR; SANTA-CECÍLIA, 2004). As fases de desenvolvimento dos NEP (*Steinernema* e *Heterorhabditis*) passam pelos estágios de ovo, quatro estádios juvenis (juvenis – J1, J2, J3, J4) e fase adulta (ALMENARA *et al.*, 2012).

O ciclo de vida de *Heterorhabditis* e *Steinernema* se inicia quando a fase de vida livre, que se passa no solo, os juvenis infectantes (JI) ou juvenis de terceiro estágio, penetram no hospedeiro (Figura 2) (FERRAZ, 2008).

Os JI do gênero *Steinernema* possuem uma amostra da bactéria simbiótica do gênero *Xenorhabdus* sp. no intestino, e assim que entram na hemocele do hospedeiro, elas são liberadas, multiplicando-se no interior do inseto, matando-o por septicemia entre 24 e 48 horas. Os JIs de terceiro estágio se alimentam então das bactérias e dos tecidos do hospedeiro digeridos, passando para o último estágio juvenil (J4), e em seguida dão origem a machos e fêmeas (adultos) de primeira geração. Após o acasalamento, as fêmeas de primeira geração produzem ovos, que ao eclodirem, dão origem aos juvenis de primeiro estágio (segunda geração) (ADAMS; NGUYEN, 2002).

No gênero *Heterorhabditis*, o ciclo de vida é parecido com o *Steinernema* (Figura 2), exceto que na primeira geração são produzidas apenas fêmeas hermafroditas que se reproduzem por endotoquia matricida. Se mais de uma geração é produzida no inseto morto, são formados machos e fêmeas na segunda geração (ADAMS; NGUYEN, 2002), enquanto no gênero *Steinernema*, os JI são anfimíticos, e ocorre cruzamento de machos e fêmeas desde a primeira geração (VOSS *et al.*, 2009).

Figura 2 - Ciclo de vida de nematoides entomopatogênicos do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis*.



Fonte: Ferraz *et al.*, 2008.

Os ciclos de *Steinernema* e *Heterorhabditis* continuam até que se esgotem as fontes de alimento, ou seja, quando o cadáver do hospedeiro já se encontra em estado de decomposição e há escassez de alimento. Isso faz com que o nematoide pare seu desenvolvimento na fase de J3 (JI), e saia do cadáver para o solo, em busca de outro hospedeiro (ADAMS; NGUYEN, 2002; FERRAZ *et al.*, 2008).

2.1.2. Bactérias

O gênero de bactéria *Photorhabdus* contém três espécies (*Photorhabdus luminescens*, *P. temperata* e *P. asymbiotica*) com 18 subespécies e, embora possuam associação simbiótica com os NEP do gênero *Heterorhabditis*, podem ser cultivadas em vida livre em condições de laboratório (WATERFIELD; CICHE; CLARKE, 2009; LEE; STOCK, 2010; ALMENARA *et al.*, 2012).

As bactérias *Photorhabdus* são bacilos Gram negativos da família Enterobacteriaceae, e possuem duas fases sendo: F1 (forma ativa) e F2 (forma inativa). Ambas as fases são diferentes quando se patogenicidade em insetos e na associação aos NEP (GIVAUDAN; LANOIS, 2000). Quando a bactéria é isolada do nematoide ela apresenta o fenótipo F1 (ou forma ativa), de modo que, após algumas gerações, ela irá apresentar o fenótipo de F2 (ou forma inativa) (KOPPENHÖFER, 2007).

A F1 é caracterizada pela expressão e secreção em larga escala dos produtos metabólicos ligados à patogenia causada ao inseto, além do controle de outras populações bacterianas presentes no cadáver. A F2 é marcada pelos produtos primários de metabolismo, além dos fatores estruturais ligados à reprodução (BOEMARE; AKHURST, 1988), essa fase é menos exigente nutricionalmente e normalmente ocorre no final do processo infectivo, quando já está ocorrendo o esgotamento nutricional do hospedeiro (EHLERS *et al.*, 1998).

O complexo *Heterorhabditis* + *Photorhabdus* é mais específico quando comparado a *Steinernema* + *Xenorhabdus*, e geralmente uma espécie de NEP apresenta como bactéria simbiote sempre uma única linhagem daquela espécie de bactéria. Já em *Steinernema* o gênero *Xenorhabdus* são menos restritos, e diferentes espécies de NEP apresentam a mesma espécie de bactérias simbiotes (FORST; CLARKE, 2002).

As bactérias *Photorhabdus* apresentam catalase positiva e possuem bioluminescência, o que torna fácil a identificação quando ocorrem em insetos, pois a bioluminescência pode ser facilmente observada sob luz ultravioleta (AKHURST; BOEMARE, 2005).

As bactérias entomopatogênicas apresentam papel fundamental no ciclo de vida dos NEP, pois permitem o crescimento e reprodução dos NEP e produzem vários compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de outros microrganismos oportunistas (CLARKE; 2008). Elas também são responsáveis pela bioconversão do hospedeiro, tornando a biomassa do cadáver disponível para a alimentação dos NEP (BODE, 2009).

2.1.3 Gênero *Heterorhabditis*

O gênero *Heterorhabditis* é o único gênero da família Heterorhabditidae e inclui mais de 20 espécies reconhecidas (STOCK; GOODRICH-BLAIR, 2012).

Os NEP *Heterorhabditis* possuem biologia similar aos *Steinernema*, porém apresentam diferenças em sua morfologia, uma vez que os Juvenis Infectantes (JIs) de *Heterorhabditis* possuem, em sua maioria, um dente quitinoso, que os auxiliam a penetrar no hospedeiro. Outra característica que diferencia as espécies são a presença de fêmeas hermafroditas no primeiro ciclo de *Heterorhabditis* no interior do hospedeiro (BURNELL; STOCK, 2000).

Segundo Poinar (1993), os *Heterorhabditis* surgiram provavelmente de uma espécie marinha de vida livre, e de acordo com a estrutura filogenética desenvolvida por Blaxter *et al.* (1998), os Heterorhabditidae estão relacionados com os *Strongylida*, grupo de parasitas vertebrados cujo ancestral comum são *Pellioditis*, um bacterívoro de vida livre.

Devido ao grande sucesso em parasitar insetos, os *Heterorhabditis* vem sendo utilizados em produtos comerciais. Na Flórida, produtos comerciais à base de *H. bacteriophora* Poinar (Rhabditida: Heterorhabditidae) e *H. indica* foram desenvolvidos visando o controle de pragas de citros (SCHROEDER, 1987; FIGUEROA; ROMAN, 1990). Em New Jersey, também vêm sendo comercializados populações naturais de *H. bacteriophora* para controlar pragas em campo de golfe (MCGRAW; KOPPENHÖFER, 2009).

No Brasil, existem aproximadamente 54 isolados descritos, pertencentes a variadas espécies de ambos os gêneros citados, sendo *Heterorhabditis amazonensis* considerada uma nova espécie, encontrado no estado do Amazonas (ANDALÓ *et al.*, 2006), mas amplamente distribuída pelo país, com registros em pelo menos cinco estados.

Trabalhos de amostragens de solo e isolamentos de NEP já foram realizados em diversos estados do Brasil. Acevedo *et al.* (2005), por meio de amostras de solo coletadas em Minas Gerais, isolaram três NEP da espécie gênero *Heterorhabditis amazonensis*. No estado do Paraná, foram identificados seis isolados da espécie *H. amazonensis*, sendo UEL 01, 07 e 08, descritos por Guide (2019), e UENP 02, 05 e 06, descritos por Doneze (2019).

Morales *et al.* (2016) realizaram pesquisas no oeste da Venezuela, e identificaram três novas populações de *H. amazonensis* (LPV081, LPV156 e LPV498). Até então, essa espécie só havia sido identificada no Brasil. No entanto, algumas diferenças em sua morfometria foram encontradas em comparação com a espécie brasileira, mas as espécies permanecem idênticas molecularmente (REF).

Estudos realizados com isolados de *H. amazonensis* nativos do Brasil, sobre diversas pragas mostram que este NEP tem potencial de controle para insetos de diversas ordens.

Nesse sentido, Alves *et al.* (2009) realizaram testes utilizando isolados de *H. amazonensis* sobre *Dysmicoccus texensis* (Hemiptera: Pseudococcidae), e observaram mortalidade de 84 a 94%, conforme a concentração testada (50 e 100JI/placa).

Já Cecconello (2020) realizou testes de seleção de isolados de NEP para o controle de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), e o isolado NEPET 11 (*H. amazonensis*) apresentou melhor desempenho, com mortalidade de 71% em percevejos adultos.

Visando o controle de *A. diaperinus*, Fernandes *et al.* (2019) observaram destaque nos isolados NEPET 11, UEL 07 e UEL 08, com mortalidade em larvas de 100, 93,75 e 85,50% respectivamente. Os autores também realizaram testes contra adultos de *A. diaperinus*, e os isolados UEL 07 e RSC 05 (*H. amazonensis*) foram os que mais se destacaram com mortalidade de 76,5 e 73,5% respectivamente.

No estudo desenvolvido por Fernandes *et al.* (2021), fica evidente a eficiência dos isolados de *H. amazonensis* sobre *A. diaperinus*. No entanto, outros fatores

além da virulência precisam ser levados em consideração antes da escolha de um agente com potencial para uso em larga escala, e a capacidade de produção e multiplicação em meios alternativos é uma delas.

2.2 Produção de Nematoides

2.2.1 Produção *in vivo*

A produção *in vivo* de NEP é um método muito utilizado para a multiplicação, e é caracterizada como um sistema bidimensional que utiliza insetos hospedeiros para reproduzir os NEP (BLINOVA; IVONOVA, 1987).

A escolha do hospedeiro é um fator importante, pois esses devem apresentar recursos nutricionais que serão oferecidos para os NEP e consequentemente, maiores serão a produtividade e qualidade da produção se o hospedeiro for mais adequado (FLANDERS; MILLER; SHIELDS, 1996).

O inseto conhecido como traça-dos-favos (*Galleria mellonella* L.) (Lepidoptera: Pyralidae) é muito utilizado, devido à sua disponibilidade comercial, suscetibilidade a maioria das espécies de NEP e à alta produtividade de JI que pode ser obtida com esse hospedeiro (MONTEIRO *et al.*, 2014). Outro hospedeiro também utilizado no método *in vivo* é a larva-da-farinha *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). Trata-se de um hospedeiro alternativo, pois quando comparado com a larva de *G. mellonella* apresenta baixo custo de produção, porém, a produtividade de JIs é inferior (MONTEIRO *et al.*, 2014).

Além do hospedeiro, existem outros fatores que podem interferir na produção *in vivo*, como a temperatura, concentração de JI no inóculo, método de inoculação e densidade de hospedeiro por recipiente durante a inoculação dos nematoides, dentre outros (SHAPIRO; GAUGLER, 2002).

Em trabalhos desenvolvidos avaliando-se a produção de JIs em larvas de *G. mellonella*, alcançou-se a produção de 4×10^5 JIs/larva, mas este valor pode variar em função da espécie de nematoide (GREWAL; NARDO; AGUILLERA, 2001).

Barbosa (2005) avaliou a produção do isolado *H. bacteriophora* em *G. mellonella* em dois sistemas de produção: 1) armadilha de White e 2) funis de Baermann na densidade de 200 lagartas. O total de produção em armadilha de White foi de $4,8 \times 10^5$

JIs/g de lagarta, já em funis de Baermann foi superior, totalizando $3,9 \times 10^7$ JIs/g de lagarta, sendo este o melhor sistema de produção *in vivo* de JIs de *H. bacteriophora*.

Guide *et al.* (2016) realizaram a produção *in vivo* dos isolados NEPET11 e RSC05 (*H. amazonensis*), utilizando larvas de *G. mellonella*, e observaram que a produção final foi de aproximadamente 7×10^4 e $7,2 \times 10^4$ JIs/g de lagarta, respectivamente.

Guide (2019) também avaliou a produção *in vivo* do isolado nativo UEL 08 (*H. amazonensis*), utilizando a concentração de 50 JIs/cm² sobre larvas de *G. mellonella*, e observou produção de $2,9 \times 10^6$ JIs/repetição, e de $3,4 \times 10^3$ JIs por grama de larva.

Ressalta-se que a produção de NEP pelo método *in vivo* pode apresentar alta variabilidade, pois o processo é em grande parte dependente de manuseio humano, e pode sofrer influência de inúmeros fatores, o que torna o sistema de produção bastante trabalhoso e não muito produtivo.

2.2.2 Produção *in vitro* e suas limitações

Glaser em 1931, desenvolveu o primeiro método de meio de cultura artificial para a multiplicação de isolados de *Steinernema glaseri*. No entanto, até então se desconhecia a presença da bactéria simbiote no interior dos NEP (POINAR; THOMAS, 1966).

A produção *in vitro* de NEP caracteriza-se na introdução de juvenis infectantes em uma cultura pura da bactéria simbiote em um meio nutritivo estéril. Esse meio deve conter ingredientes que evitam contaminação com bactérias indesejáveis, que retêm a bactéria simbiote e fornece todos os nutrientes necessários para a multiplicação dos nematoides (LEITE *et al.*, 2016).

A produção *in vitro* pode ser realizada em meio sólido ou líquido, e em ambos os meios devem ser previamente esterilizados e, em seguida, inoculados com as bactérias simbiotes, e só posteriormente com os NEP, pois a produtividade dos isolados é influenciada diretamente pela concentração de nutrientes presentes no meio (LEITE *et al.*, 2016).

Um meio de cultura para a produção de NEP necessita ingredientes específicos para ser eficiente, como: fontes de carbono, açúcares, álcoois de açúcar e lipídios e uma fonte de nitrogênio (PACE *et al.*, 1986; EHLERS *et al.*, 1998).

Os primeiros meios testados eram sólidos, feitos utilizando ração para cães, vísceras de porco, sangue de boi e outros produtos de origem animal. Em 1981, Wouts desenvolveu um meio contendo leveduras, caldo nutriente, farinha de soja e óleo vegetal, apresentando baixo custo e uma produção mais consistente (SHAPIRO; GAUGLER, 2002).

Na produção em meio líquido são utilizados vários ingredientes, como farinha de soja, extrato de levedura, fonte de gordura, gema de ovo, caseína, leite em pó, extrato de fígado de boi e colesterol. Esse método pode ser realizado em três semanas ou menos, dependendo da espécie presente no meio de cultura (GAUGLER; HAN, 2002).

O componente principal, tanto em produção líquida como em produção em meio sólido, são as fontes de gordura, isso porque a produção e a qualidade dos NEP podem ser afetadas por esse ingrediente, pois, os componentes lipídicos são utilizados para simular os lipídios do hospedeiro (YOO *et al.*, 2000). Uma vez que a fonte de lipídio for insuficiente no meio de cultura para os NEP, não ocorrerá uma boa produção de NEP, podendo afetar a persistência e desempenho dos JIs em infectar novos hospedeiros (HATAB; GAUGLER, 2001).

Outro fator que pode afetar a produção *in vitro* é a concentração do inóculo de NEP, pois quantidades maiores de JIs podem reduzir o tempo de cultivo (SHAPIRO-ILAN *et al.*, 2012). Devido isso, meios com maiores quantidades de inóculos de JIs, podem apresentar maior produção em menos tempo (NEIRA-MONSALVE *et al.*, 2019).

Neira-Monsalve *et al.* (2019) realizaram testes em meio de cultura sólido utilizando o isolado *H. indica* SL0708, buscando investigar o melhor meio de cultura, o tamanho do inóculo e diferentes fontes de gordura vegetais. Quanto ao tamanho do inóculo os autores observaram que as diferentes concentrações de NEP adicionadas ao meio de cultura não é um fator decisivo para o isolado *H. indica* SL0708. Observaram também que as três fontes de gordura (óleo de soja, milho e azeite) testadas não foram fator determinantes na produção de JIs, mas sim o fator os componentes presentes no meio de cultura (gema de ovo, peptona, farinha de soja e ferro).

Leite *et al.* (2016), por sua vez, realizaram testes em meio líquido utilizando o isolado *S. feltiae*, e usaram sete fontes de lipídios (óleo de milho, palma, salmão, amendoim, girassol, canola e banha de porco). Observaram que o meio que com banha de porco proporcionou o menor rendimento de JIs, enquanto os demais óleos utilizados não diferenciaram entre si.

Tanto os NEP do gênero *Steinernema* quanto *Heterorhabdis* possuem requisitos particulares para a produção *in vitro* em meio líquido, isso por que ambos os gêneros diferem em seus ciclos de vida e biologia reprodutiva (SHAPIRO-ILAN; HAN; DOLINKSI, 2017). Em testes realizados observou-se que os NEP do gênero *Steinernema* possuem em seu ciclo de vida apenas machos e fêmeas e são capazes de acasalar em cultura líquida, diferente dos NEP do gênero *Heterorhabdis*, cuja primeira geração é exclusivamente hermafrodita, e essas conseguem se reproduzir, porém os machos heterorhabditídeos não são capazes de aderir à região vaginal das fêmeas em cultura líquida (Strauch *et al.*, 1994).

Apesar da vasta literatura sobre a eficiência dos NEP como agentes de controle biológico, trabalhos sobre produção *in vitro* são escassos, pois grande parte desses trabalhos são desenvolvidos sobre sigilo industrial, e não estão disponíveis para consulta.

No entanto, tendo em vista a possibilidade de uso do isolado UEL 08 como agente de controle para *A. diaperinus*, o desenvolvimento de estudos analisando a possibilidade da produção deste isolado em larga escala se fazem imprescindíveis para viabilizar seu uso em larga escala.

2.3 *Alphitobius diaperinus*

O cascudinho-de-aviário, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), originalmente era praga de grãos armazenados, mas se adaptou aos aviários de corte e postura (WALLACE; WINKS; VOESTERMANS, 1985), onde passou a se alimentar de fezes, cadáveres de animais e da ração das aves (LESCHEN; STEELMAN, 1988).

Assim como os demais coleópteros, o cascudinho é holometábolo, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adultos, cuja duração pode ser diretamente afetada pelas condições ambientais, como temperatura por exemplo (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001).

Uma vez adaptados aos aviários os *A. diaperinus*, tornam-se um problema, devido ao fato de serem veiculadores de diversos patógenos como *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter diversus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium perfringens* (AXTELL; ARENDS, 1990; CHERNAKI-

LEFFER *et al.*, 2002; VITTORI *et al.*, 2007), e de doenças aviárias como Doença de Newcastle e Gumboro (MCALLISTER *et al.*, 1995).

A presença do cascudinho nos aviários de corte faz com que as aves sejam atraídas pelo movimento dos insetos, e passam a ingeri-las no lugar da ração balanceada, o que afeta o desenvolvimento delas. Além disso, a ingestão dos insetos adultos causa ferimentos no trato digestório das aves, devido a dureza dos élitros (DESPINS; AXTELL, 1995).

O fato de serem insetos crípticos, que vivem no solo, ou associados a ambientes protegidos, seu controle é dificultado, o que muitas vezes, inviabiliza o sistema de produção. A utilização de inseticidas químicos sintéticos, além de serem pouco eficiente, pode causar seleção de populações de insetos resistentes, além de gerar contaminação do ambiente e nas aves, já que estes podem provocar resíduo na carcaça (JAPP, 2010).

Estudos utilizando NEP como alternativa de controle para o cascudinho de aviários não são uma novidade. Na década de 1980 Geden *et al.* (1985) avaliaram a possibilidade do uso desses agentes no controle de *A. diperinus*, e observaram a suscetibilidade do cascudinho a isolados norte-americanos de NEP das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae sendo observada a patogenicidade dos isolados *S. glaseri*, *S. feltiae* e *H. heliothidis*, tanto para larvas como em adultos.

Szałanski *et al.* (2004) por sua vez, realizaram testes utilizando NEP da família Steinernematidae, avaliando 12 isolados, sendo cinco das espécies *S. carpocapse*, seis das espécies *S. feltiae* e um da espécie *S. scapterisei*. Os isolados *S. carpocapse* e *S. feltiae* se destacaram, variando a porcentagem de mortalidade em ambas espécies.

No Brasil, Alves *et al.* (2005) iniciaram estudos com NEP em condições de laboratório, visando ao controle do cascudinho, e observaram que os isolados *S. carpocapse* mostraram-se patogênicos, com mortalidade de até 48% em larvas do inseto, apresentando potencial de uso no controle de cascudinho.

Posteriormente, Alves *et al.* (2012) avaliaram 14 isolados, selecionando o melhor NEP em adultos e larvas de cascudinho, também foi avaliado a eficiência dos isolados em diferentes temperaturas. Dos isolados selecionados, o que apresentou maior virulência foi o *S. arenarium* apresentando 99% de mortalidade, também foi possível observar que temperaturas acima de 30°C reduziram a eficiência a 57% sobre as larvas.

Recentemente, Fernandes *et al.* (2021) avaliaram o potencial de isolados nativos de NEP brasileiros sobre o cascudinho, sendo mais virulentos para

adultos de cascudinho os isolados *H. amazonensis* (UEL 07), *H. amazonensis* (RSC 05) e *S. carpocapsae* (All) com 76,5; 73,5; 70% mortalidade, respectivamente. Já para larvas, os isolados *Heterorhabditis* sp. (NEPET 11), *S. feltiae* (IBCB-n 47), *H. amazonensis* (UEL 07) e *H. amazonensis* (UEL 08) com 100,0; 93,7; 96,0; 85,5% de mortalidade respectivamente.

Os isolados UEL 07 e 08, e NEPET 11 foram avaliados quanto a produção *in vivo*, e foi observado em sua produção por grama de larva 8×10^4 , $3,4 \times 10^3$ e 7×10^4 respectivamente (Guide, 2019; Araújo, 2021).

Segundo Moino e Dolinski (2006), a utilização de isolados nativos deve ser prioridade sobre isolados exóticos, pois os isolados nativos já estão adaptados a fauna e ao clima do local, podendo ser mais eficientes que os exóticos. Por outro lado, não existem na literatura, trabalhos que tratem da produção *in vitro* de *H. amazonsensis*, por isso se faz necessário realizar metodologias e alternativas de produção para isolado.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Manutenção do Isolado de Nematóide Entomopatogênico

Para manutenção e replicação dos nematoides, foram utilizadas larvas de *G. mellonella* criadas em laboratório, em temperatura ambiente e alimentadas com dieta artificial adaptada de Parra (1998) (Tabela1).

Tabela 1: Ingredientes para dieta de *Galleria mellonella*.

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

Fonte: Parra (1998), p. 1022.

Os adultos do inseto foram mantidos em recipientes de vidro de 3L de capacidade, com tampa plástica perfurada, contendo papel cartão dobrado em forma de sanfona para as fêmeas realizarem a oviposição. As posturas foram coletadas em dias alternados e colocadas em outros recipientes de vidro contendo dieta artificial e favo de abelha para servir de alimento para as larvas recém-eclodidas, onde permaneceram até serem utilizadas nos bioensaios.

Os isolado *Heterorhabditis amazonensis* (UEL 08) foi multiplicado *in vivo*, conforme descrito por Molina e Lopes (2001), usando larvas de último instar de *G. mellonella*, que após a confirmação da infecção, foram transferidas para câmara seca e mantidas em câmara de germinação a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco dias. Após este período, as larvas foram colocadas em armadilhas de White (WHITE, 1927) para coleta dos Juvenis Infectantes (JI) e mantidas sob as mesmas condições já mencionadas.

3.2 Produção de Nematoides

3.2.1 Produção *in vivo*

Para avaliação da produção *in vivo*, 10 larvas de último instar de *G. mellonella* foram adicionadas a placas de Petri de nove cm de diâmetro contendo duas folhas de papel filtro, onde foram pesadas em conjunto. O nematoide foi inoculado na concentração de 50 JIs/cm² e as placas foram mantidas em câmara de germinação a 25°C±1, no escuro, por um período de três dias, acompanhando-se a sintomatologia e mortalidade. As lagartas mortas e com coloração avermelhada (característica da infecção pelos NEP), ausência de odor putrefato e exoesqueleto consistente, foram colocadas em placas limpas com um papel filtro seco por mais cinco dias (câmara seca). Após esse período, as larvas foram transferidas para armadilha de White para que a emergência dos JIs na água. As coletas dos JIs foram realizadas diariamente, e a produção foi quantificada a partir do primeiro dia de emergência até o esgotamento.

Os dados de produção de JIs foram submetidos a Análise de Regressão para determinação da curva de produção e da equação referente a produção pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

3.2.2 Produção *in vitro*

3.2.2.1. Isolamento das Bactérias Simbiontes

O isolamento das bactérias foi realizado a partir da hemolinfa do hospedeiro infectado (AKHURST, 1980). Assim, larvas de *G. mellonella* mortas por nematoides (48 horas após a infecção) foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% e com auxílio de uma agulha, foi feito um orifício na parte frontal da lagarta e a hemolinfa extravasada foi transferida para meio de cultura NBTA (Agar Nutritivo; 25 mg Azul de Bromotimol; 40 mg Cloreto de Trifenil-Tetrazolio; 1000 ml-1 água destilada). As placas foram incubadas no escuro durante 48-72 h a 28°C.

3.2.2.2. Produção em meio sólido

Para a produção *in vitro* em meio sólido, foi utilizado um meio de cultura base para o desenvolvimento dos JIs, adaptado de Neira-Monsalve *et al.* (2019) (Tabela 2).

Tabela 2 - Meio de cultura sólido base adaptado de Neira-Monsalve *et al.* (2019).

Ingrediente	Quantidade
Água destilada	1000 mL
Glicose	3g
Extrato de levedura	10g
Peptona	10g
Farinha de soja	3g
Fonte de gordura	30g
Gema de ovo	6g
NaCl	4g
KCl	0,35g
CaCl ₂	0,3g
MgSO ₄	0,2g
FeSO ₄	0,05g
Agar (meio sólido)	15g

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

A partir do meio base, diferentes fontes de gordura foram testadas, sendo seis gorduras de origem vegetal (óleo de soja, canola, milho, girassol, algodão e coco) e duas fontes de gordura animal (banha de porco e manteiga de leite bovino).

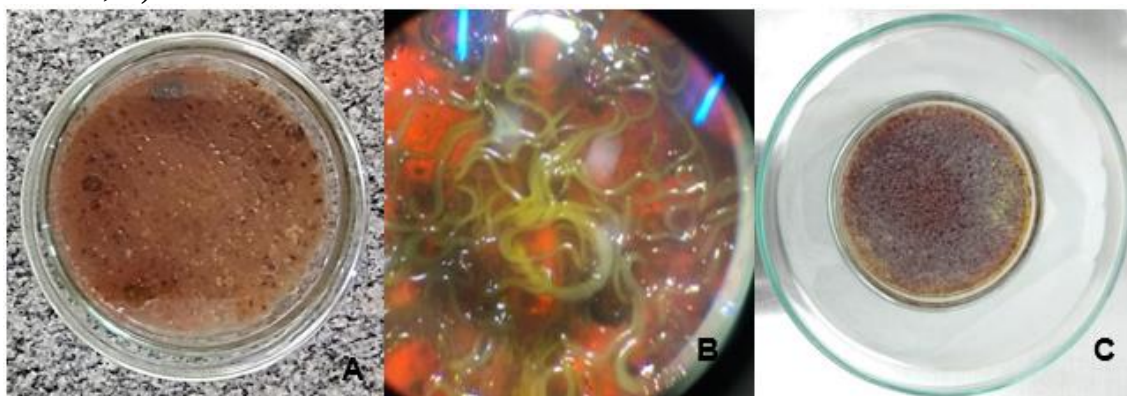
O meio de cultura autoclavado foi vertido em placas de Petri de sete cm de diâmetro. A bactéria simbiote do isolado UEL 08, crescida em TBS+YE (30g de peptona, 3,75g de extrato de levedura, 1000mL de água destilada) por 48 horas, foi padronizada na concentração 10 da escala de McFarland e estriada nas placas pelo método de placa cheia.

As placas foram mantidas em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1$, no escuro por um período de 48 horas para o crescimento das bactérias. Após esse período, foram adicionados 400 JIs/placa. Os JIs foram previamente desinfestados por meio de lavagem com hipoclorito a 0,05% durante 9 minutos e enxaguados três vezes com água destilada esterilizada.

As placas foram observadas diariamente, e após a emergência dos JIs de segunda geração, as placas foram transferidas para armadilha de White modificadas (Figura 3), para coletas e contagens da produção dos JIs.

O total de JIs foi quantificado e os dados foram submetidos a Análise de Regressão pelo programa Excel para determinação da curva de produção e da equação referente a produção. O ensaio foi conduzido contendo 4 repetições e 8 tratamentos (fontes de gordura). As avaliações se realizaram a cada cinco dias após a observação da emergência de JIs, durante 20 dias (quatro avaliações) e os dados foram submetidos a teste de médias Scott-Knott pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

Figura 3 - Produção em meio sólido: A) Meio com a bactéria crescida; B) Multiplicação de NEP; C) armadilha de White modificada.



Fonte: Dados da Pesquisa (2021).

3.2.2.3. Produção em meio semi-sólido

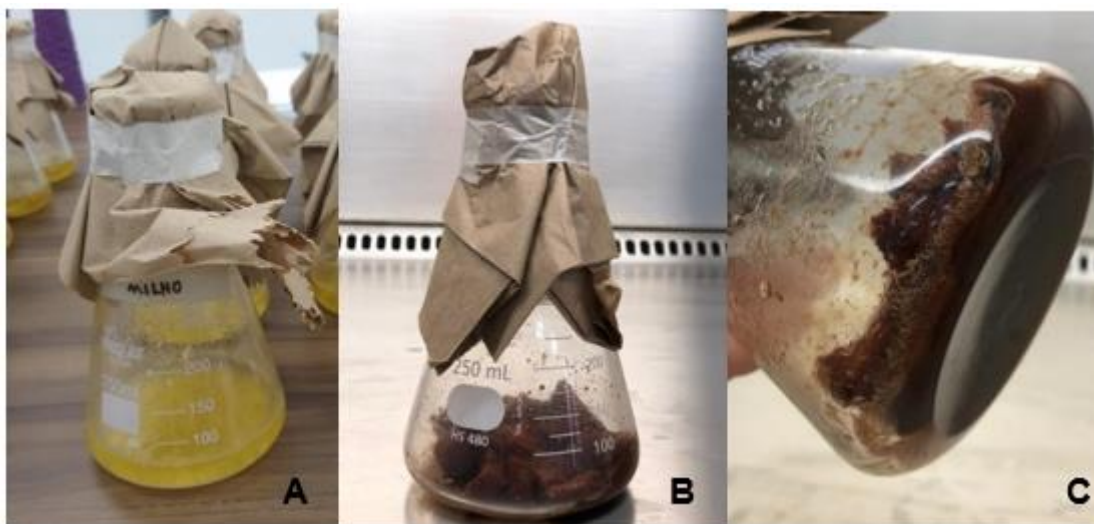
Para a produção em meio semi-sólido foi utilizado o meio de cultura base (Tabela 3), alterando-se a quantidade de ágar para 5g/L. Nesse teste, foram avaliadas as mesmas fontes de gordura que avaliadas no teste anterior (óleo de soja, canola, milho, girassol, algodão, coco, banha de porco e manteiga de leite).

O ensaio foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 30 mL de meio previamente esterilizado. Em seguida, foi adicionado 1 mL da suspensão de

bactéria simbiote crescida em TBS+YE por 48 horas na concentração de 10 na escala de McFarlande. Os frascos foram então acondicionados em Incubadora Refrigerada com agitação (Shaker) a 150rpm e a $25^{\circ}\text{C}\pm 1$, pelo período de 48 horas para o crescimento das bactérias. Após esse período, foram adicionados 600 JIs/frasco desinfestados e cerca de 2g de pedaços de espuma para dar mobilidade aos NEP (Figura 4).

A partir do inóculo dos JIs, os frascos foram mantidos em câmara de germinação a $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ no escuro por 21 dias, quando se realizou a avaliação da produção. Para a contagem dos JIs, foram acrescentados aproximadamente 120 mL de água destilada em cada Erlenmeyer, e os frascos foram vigorosamente agitados para diluição do meio e suspensão dos JIs. Em seguida, uma alíquota de 1 mL foi retirada, e procedeu-se a contagem. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado contendo quatro repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos a Análise de variância e a teste de média Scott-Knott pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2019).

Figura 4 - Produção em meio semi-sólido: A) Meio de cultura sem crescimento bacteriano. B) Meio de cultura com espuma+bactéria crescida. C) Multiplicação dos NEP.



Fonte: Dados da Pesquisa (2021).

3.2.2.4. Avaliação de concentrações de JIs

Nesse teste foi utilizada a mesma metodologia do experimento de produção em meio semi-sólido, porém com 50 mL de meio por frasco. O teste foi

conduzido utilizando a fonte de gordura que apresentou a melhor produção nos testes anteriores. Foram avaliadas diferentes concentrações de inóculo (1.000, 2.500, 5.000, 7.500 e 10.000 JIs/frasco). O experimento foi conduzido em esquema fatorial 1 x 5 (1 fonte de gordura x 5 tamanhos de inóculo). Os dados foram submetidos a Análise de variância, teste de média Scott-Knott e análise de regressão para determinação da concentração de JIs. Todas as análises foram feitas programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

3.2.2.5. Avaliação da Infectividade

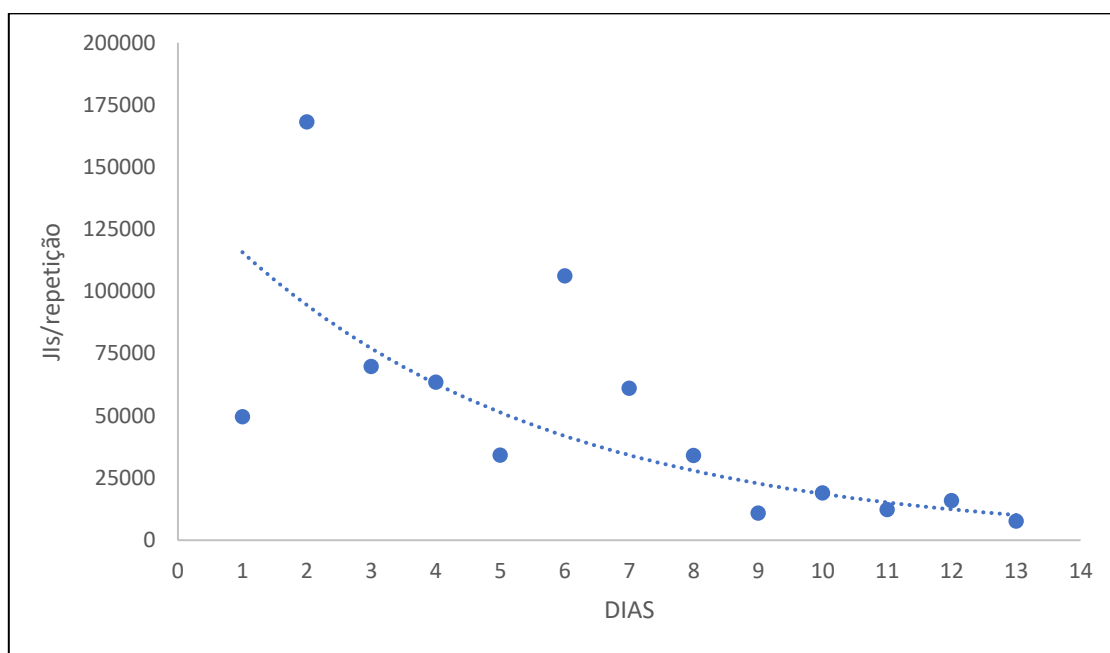
Para avaliar a infectividade dos JIs produzidos pelo método *in vitro* foi realizado o teste de infectividade. Assim, cinco larvas de *G. mellonella* foram dispostas em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, com o fundo recoberto por dois discos de papel-filtro. O nematoide foi inoculado na concentração de 100 JIs/cm². As placas foram mantidas em câmara de germinação a 25°C±1, no escuro por um período de três dias para a confirmação da mortalidade e sintomatologia.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção *in vivo*

A produção de JI pelo isolado UEL 08 ocorreu durante 13 dias, com picos de produção no 2º e 6º dias, com $1,7 \times 10^5$ JIs/repetição e $1,1 \times 10^5$ JIs/repetição, respectivamente (Figura 5). Molina *et al.* (2004) realizaram testes de produção e observaram que os JIs alcançaram maior produção nos três primeiros dias, corroborando o observado neste estudo com o isolado UEL 08.

Figura 5- Produção diária de JIs do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) pelo método *in vivo* usando larvas de *Galleria mellonella* como hospedeiro.



$$y = 141867e^{-0,203x}, R^2 = 0,7022.$$

Fonte: Dados da pesquisa (2021).

A produção total durante os 13 dias de coleta foi de $6,5 \times 10^5$ JIs/repetição, enquanto a produção por g/larva foi de $5,1 \times 10^4$ JIs/g. Guide (2019) também realizou testes de produção com esse mesmo isolado, utilizou uma concentração de 50 JIs/cm² e obteve uma produção total de $2,9 \times 10^6$ JIs/repetição, e de $3,4 \times 10^3$ JIs por grama de larva.

Guide *et al.* (2016) também realizaram testes de produção de NEPET 11 (*H. amazonensis*) e RSC 05 (*H. amazonensis*), e obtiveram produção de 7×10^4 e $7,2 \times 10^4$ JIs/g de larvas respectivamente, apresentando produção superior quando comparado com o isolado UEL 08. Essa diferença na produção *in vivo* entre os isolados, se dá por diversos fatores que interagem de formas inesperadas (ZERVOS *et al.*, 1991; SHAPIRO-ILAN *et al.*, 2004). Um fator que pode ser determinante é a disponibilidade de alimento para os isolados, podendo influenciar a permanência dos NEP no interior do inseto e na formação de novas gerações (EHLERS, 2001).

Outro fator que pode influenciar a produção/infectividade é a constante multiplicação do isolado, pois isolados multiplicados repetidamente em laboratório podem ocasionar mudanças em sua virulência, tolerância ambiental ou capacidade reprodutiva pelo inseto hospedeiro (SHAPIRO *et al.* 1996). Guide (2019) avaliaram a produção do isolado UEL 08, logo após o seu isolamento. Desde então, o isolado vem sendo mantido em suspensão aquosa, e passando por constantes multiplicações em larvar de *G. mellonella*, o que pode ter interferido na sua capacidade de multiplicação, o que justifica a queda da produção observada neste trabalho quando comparado ao trabalho com o mesmo isolado.

Poinar (1979) afirma que a média de produção em larvas de *G. mellonella* pode variar de 30.000 a 50.000 JIs/larva. No presente trabalho podemos observar que o isolado UEL 08 produziu cerca de 65.262 JIs/larva, e se mostrou um isolado com uma boa capacidade de produção pelo método *in vivo*.

4.2 Produção *in vitro*

4.2.1 Meio sólido

Observou-se produção de JIs em todas as fontes de gorduras avaliadas em meio sólido e a emergência dos NEP se deu entre 12º e 13º dia após a inoculação dos JIs no meio.

O óleo de milho foi a fonte de gordura com o melhor desempenho de produção de JIs, diferenciando significativamente dos demais tratamentos, com produção total de 13.897,5 JIs/placa e de 926,5 JIs/mL de meio (Figura 3).

O óleo de algodão não apresentou diferença estatística dos demais tratamentos, porém apresentou a menor produção de JIs, sendo de $4,3 \times 10^3$ JIs/placa e de $3,7 \times 10^2$ JIs/mL de meio.

O óleo de soja foi a segunda fonte de gordura com maior produção, com produção total de $4,7 \times 10^2$ JIs/mL. Em testes realizados por Neira-Monsalve *et al.* (2019), utilizando o isolado *H. indica* SL0708, os autores compararam três fontes de gordura (óleo de soja, canola e azeite de oliva) na produção em meio sólido, e observaram que o óleo de soja proporcionou a maior produção (mesmo não se diferenciando significativamente dos outros tratamentos). Segundo os autores, devido ao seu baixo custo e sua disponibilidade, o óleo de soja é uma fonte de gordura promissora na produção *in vitro* de NEPs..

Tabela 3 – Produção total de Juvenis Infectantes/placa (15mL de meio) do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) por método *in vitro* em meio sólido usando diferentes fontes de gordura.

Fonte de gordura	Produção de JIs
Óleo de milho	13.897,5±1.791,0 A*
Óleo de soja	7.004,7±903,7 B
Manteiga de leite	6.405,0±1.131,8 B
Óleo de girassol	5.937,5±1.049,5 B
Óleo de coco	5.534,2±362,2 B
Banha de porco	5.397,5±615,8 B
Óleo de canola	5.171,0±583,3 B
Óleo de algodão	4.305,2±863,9 B

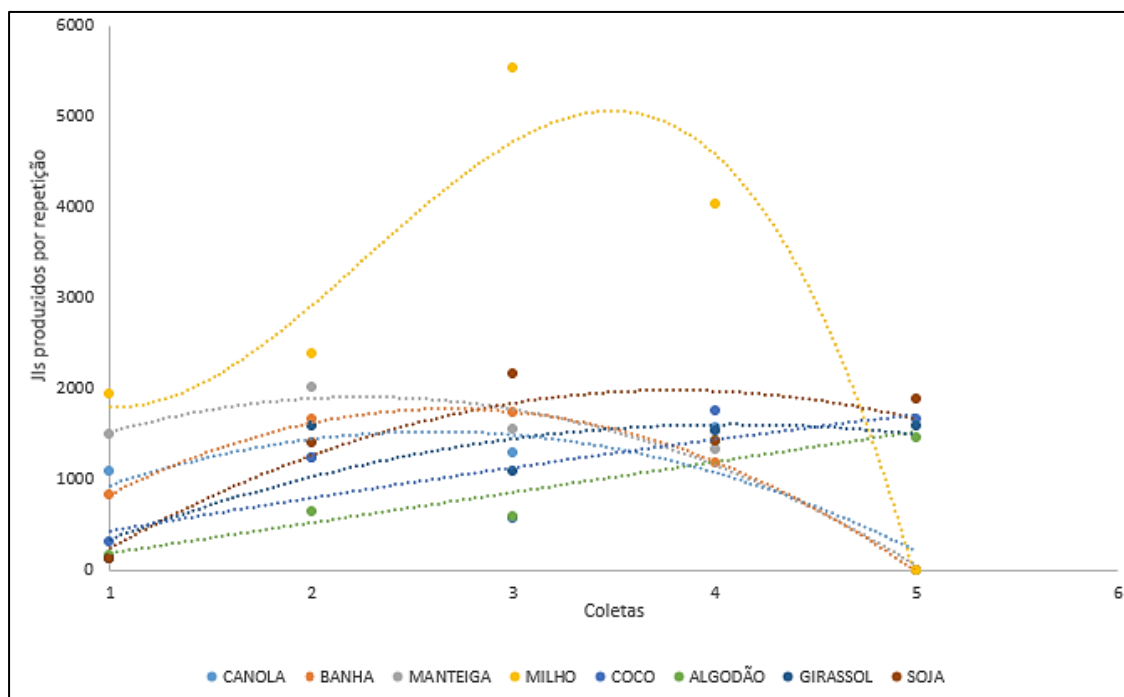
*Médias(± EPM) seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferiram entre si pelo teste de Skott-Knott com $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa (2021).

Durante o período de avaliação foi possível observar que o óleo de milho teve o pico de produção na terceira coleta com 5.540JIs/placa, enquanto o óleo de canola apresentou pico de produção apenas na última coleta, com 1.567,5 JIs/placa (Figura 7).

Já o óleo de algodão, apresentou seu pico de produção apenas na última coleta, demonstrando não ser uma fonte de gordura adequada, pois a maior produção se deu no último dia de coleta.

Figura 6 – Produção semanal do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) por método *in vitro* em meio sólido usando diferentes fontes de gordura.



Equações e R²: Óleo de milho $y = -437,71x^3 + 2966,2x^2 - 4712,4x + 3985,8$ $R^2 = 0,9276$, óleo de canola $y = -229,68x^2 + 1195,4x - 25,45$ $R^2 = 0,7341$, óleo de coco $y = -14,125x^2 + 405,72x + 45,05$ $R^2 = 0,6225$, óleo de algodão $y = -0,0179x^2 + 335,23x - 143,35$ $R^2 = 0,8881$, óleo de soja $y = -221,73x^2 + 1685,2x - 1215,7$ $R^2 = 0,7966$, óleo de girassol $y = -132,14x^2 + 1080,9x - 601,5$ $R^2 = 0,6839$, gordura de porco $y = -333,57x^2 + 1788,4x - 616,5$ $R^2 = 0,999$, manteiga de leite $y = -246,96x^2 + 1113,5x + 657$ $R^2 = 0,96$.

Fonte: Dados da Pesquisa (2021).

4.2.2 Meio semi-sólido

Houve produção de JIs em todas as fontes de gorduras utilizadas (óleo de algodão, canola, coco, milho, soja, girassol, manteiga de leite e banha de porco), e a produção de NEP entre elas apresentou diferenças significativas.

O óleo de algodão e coco apresentaram a menor produção de JIs, com uma média de $2,9 \times 10^4$ JIs/frasco e $3,2 \times 10^5$ JIs/frasco, respectivamente (Tabela 3). Já o óleo de milho, apresentou o melhor desempenho com médias de $9,6 \times 10^5$ JIs/frasco.

Leite *et al.* (2016) realizaram testes de produção do isolado *Steinernema feltiae* em meio líquido e os óleos de milho e de amendoim foram os que apresentaram maior eficiência na produção de JIs. Segundo os autores, o óleo de amendoim e o óleo de milho apresentam baixos valores de gorduras saturadas, enquanto o óleo de algodão e o óleo de coco apresentam valores elevados em gorduras saturadas, podendo ser um fator determinante para a multiplicação dos JIs.

Tabela 4 – Produção total de Juvenis Infectantes/frasco (30mL de meio) do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) por método *in vitro* em meio semi-sólido usando diferentes fontes de gordura.

Fonte de gordura	JIs/frasco
Óleo de milho	963.000±39.950 A*
Óleo de soja	826.500±92.352 B
Manteiga de leite	786.000±62.161 B
Banha de porco	675.000±93.829 C
Óleo de girassol	547.500±29.546 D
Óleo de canola	426.000±93.338 E
Óleo de coco	321.000±14.282 F
Óleo de algodão	28.500±9.591 G
C.V.	11.67

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

Fonte: Dados da Pesquisa (2021).

As fontes de gordura animal (banha de porco e manteiga de leite), diferiram entre si em suas produções com $6,8 \times 10^5$ e $7,9 \times 10^5$ JIs/frasco, respectivamente. Leite *et al.* (2016) realizaram testes em meio líquido testando diferentes fontes de gordura para produzir *S. feltiae*, e tal como aqui observado, a banha de porco foi a fonte de gordura que apresentou menor produção para esse isolado. Os autores justificaram o mau desempenho dessa gordura devido a consistência semi-sólida que pode ter atrapalhado na produção líquida.

Ao comparar a produção *in vitro* por mL de meio, nos meios sólidos não houve diferença entre as diferentes fontes de gordura avaliadas. Por sua vez, os meios semi-sólidos, apresentaram diferença, com destaque para os meios contendo óleo de milho, soja, banha e manteiga que não diferiram entre si, e diferiram dos demais (Tabela 05).

Quando comparamos a produção por mL de meio entre as duas formas de produção *in vitro* (meios sólido e semi-sólido) desdobrados dentro de cada fonte de gordura, os meios semi-sólidos contendo óleo de milho, soja, manteiga e banha de porco apresentam produção superior que os meios sólidos contendo estas mesmas gorduras (Tabela 5).

As fontes de gordura a base de óleo de girassol, canola, coco e algodão não apresentaram diferença quando comparadas quanto a produção em meio sólido e semi-sólido (Tabela 05).

Cabe salientar que a quantidade de inóculo adicionados ao meio em ambos os experimentos foram diferentes. Nos testes em meio sólido foram inoculados 26,6 JIs/mL, já em meio semi-sólido foi aplicado 20JIs/mL, portanto, esperava-se que o meio de cultura sólido produziria maiores concentrações de JIs, uma vez que recebeu uma quantidade superior de NEP por mL de meio, entretanto isso não foi um fator decisivo. Yang *et al.* (1997) relatam que o isolado *S. carpocapse* em cultivo de meio sólido, apresentou uma redução de sua aptidão, consequentemente, isso causou uma redução em sua produção final.

Tabela 5 – Número médio de Juvenis Infectantes do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) produzidos por mL de meio sólido, semi-sólido ou por grama de larva de *Galleria mellonella*.

Fonte de gordura	Produção <i>in vitro</i>		Produção <i>in vivo</i>
	Sólido JIs/mL de meio	Semi-sólido JIs/mL de meio	Inseto JIs/g
Óleo de milho	926,5±119,4Aa*	32.100±1.331,6 Ab	
Óleo de soja	467,0±60,2 Aa	27.550±3.078,4 Ab	
Manteiga	427,0±75,4 Aa	26.200±2.072,0 Ab	
Banha de porco	359,8±41,0 Aa	23.033±3.127,6 Ab	
Óleo de girassol	395,8±59,9 Aa	18.250 ± 984,8 Ba	
Óleo de canola	344,7±38,8 Aa	14.200±3.111,2 Ba	
Óleo de coco	369,0±24,1 Aa	10.700±476,0 Ba	
Óleo de algodão	287,4±57,5 Aa	966,7±319,7 Ba	
<i>Galleria mellonella</i>	-	-	50.684
C.V.	113,28		

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula nas linhas não diferiram entre si pelo teste de Skott-Knott com $p \leq 0,05$.

Fonte: Dados da Pesquisa (2021)

Outro fator que pode ter determinado o melhor desempenho do cultivo em meio semi-sólido é a oxigenação que ocorre no interior do frasco. Bedding *et al.* (1991) relatam que para obter uma boa produção os recipientes devem permitir trocas gasosas, fator esse que pode não ter ocorrido nas placas de Petri.

Quando se compara a produção *in vivo* com a *in vitro*, outros fatores precisam ser levados em consideração, além do inóculo, como a mão de obra necessária

para a condução de ambas as metodologias. Isso porque, a produção *in vivo* requer a manutenção da criação de insetos, o que demanda muito tempo, mão de obra e custo com dieta. Além disso, esse método, assim como a produção em meio sólido, requer coletas diárias dos JIs e manutenção destes em suspensão aquosa com aeração, para evitar a morte deles.

Na produção *in vitro* em meio semi-sólido, a mão de obra é consideravelmente menor. Além disso, a possibilidade de expansão da produção e implementação de larga escala é mais viável.

Outro fator a ser considerado nesta comparação, é a concentração de JIs, pois no ensaio *in vivo* foi utilizado um inóculo de 50JIs/cm² (aproximadamente 318 JIs/lagarta ou 1.900 JIs/grama de lagarta), enquanto no ensaio *in vitro* em meio semi-sólido foi usado um inóculo de 20JIs/mL de meio.

4.2.3 Infectividade

Independente da forma de produção, os JIs obtidos em culturas sólidas e semi-sólidas foram patogênicos às larvas de *G. mellonella* (Tabela 5).

Tabela 6 - Porcentagem de mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* infectadas por JIs do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) produzidos em meio sólido e semi-sólido .

Fonte de gordura	Sólido	Semi-sólido
Óleo de milho	100±0 Aa*	100±0 Aa
Manteiga	95±10 Aa	90±11,5 Aa
Banha de porco	90±11,5 Aa	95±10 Aa
Óleo de canola	90±11,5 Aa	90±11,5 Aa
Óleo de algodão	100±0 Aa	95±10 Aa
Óleo de soja	100±0 Aa	90±11,5 Aa
Óleo de coco	80±0 Aa	90±11,5 Aa
Óleo de girassol	95±10 Aa	100±0 Aa
C.V.	10.31	

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

Fonte: Dados da Pesquisa (2021)

Observa-se que em meio sólido e em meio semi-sólido ocorreu mortalidade de 100% em *G. mellonella*, quando utilizado JIs foram produzidos com o óleo de milho.

Cottrell *et al.* (2011) alertam para o risco de redução da infectividade de nematoides produzidos em meio líquido, quando comparados aos obtidos em meio sólido. Entretanto, não houve diferença entre os tratamentos. Corroborando os dados aqui obtidos, Shapiro e McCoy (2000), também não observaram diferenças na mortalidade dos insetos quando inoculados com JIs produzidos em meio sólido e líquido.

4.2.4 Avaliação de concentrações de JIs

Observou-se que ocorreu produção de JIs em todas as concentrações de inóculo avaliadas, e que houve diferença significativa entre as concentrações avaliadas (Tabela 07).

O tratamento com o inóculo de 5.000 JIs/frasco foi o que apresentou a maior produção total de NEP com $2,5 \times 10^6$ JIs/frasco diferenciando-se estatisticamente dos demais tratamentos, porém apresentou alta mortalidade de JIs ($1,2 \times 10^6$ JIs mortos/frasco), e quando avaliados apenas os JIs viáveis, este tratamento não diferiu do menor inóculo avaliado ($1,3 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^6$ JIs vivos/frasco, respectivamente).

Os tratamentos com as concentrações de inóculo de 1.000, 7.500 e 10.000 JIs/frasco foram os que obtiveram a menor produção total (não diferenciando estatisticamente), porém quando consideramos o número de JIs viáveis, os inóculos de 7.500 e de 10.000 JIs/frasco foram os piores tratamentos, pois apresentaram alta mortalidade (56% e 63% de JIs mortos, respectivamente) e não diferiram entre si.

Assim, com base nos resultados observados, o inóculo de 1.000 JIs/frasco foi o que apresentou o melhor rendimento, pois usou menor concentração de JIs e resultou em produção de JIs viáveis semelhante ao observado na concentração de 5.000 JIs/frasco.

Tabela 7- Produção de Juvenis Infectantes/frasco (50mL de meio) do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) por método *in vitro* em meio semi-sólido usando diferentes concentrações de juvenis por frasco.

JIs/frasco	Produção total (10^6)	Vivos (10^6)	Mortos (10^6)
------------	---------------------------	------------------	-------------------

1.000	1,2±86.602,5 C*	1,2±86.602,5 A	0 A
2.500	1,5±106.066,0 B	0,95 ⁵ ±141.972,7 B	0,6±15.4616,4 B
5.000	2,5±43.301,2 A	1,±96.824,5 A	1,2 ±86.602,5 B
7.500	1,1±94.372,9 C	5,1±71.807,0 C	0,6±43.301,2 B
10.000	1,2±128.086,9 C	4,6±71.807,0 C	0,7±156.124,9 C
C.V.	6,17	10,95	16,18

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

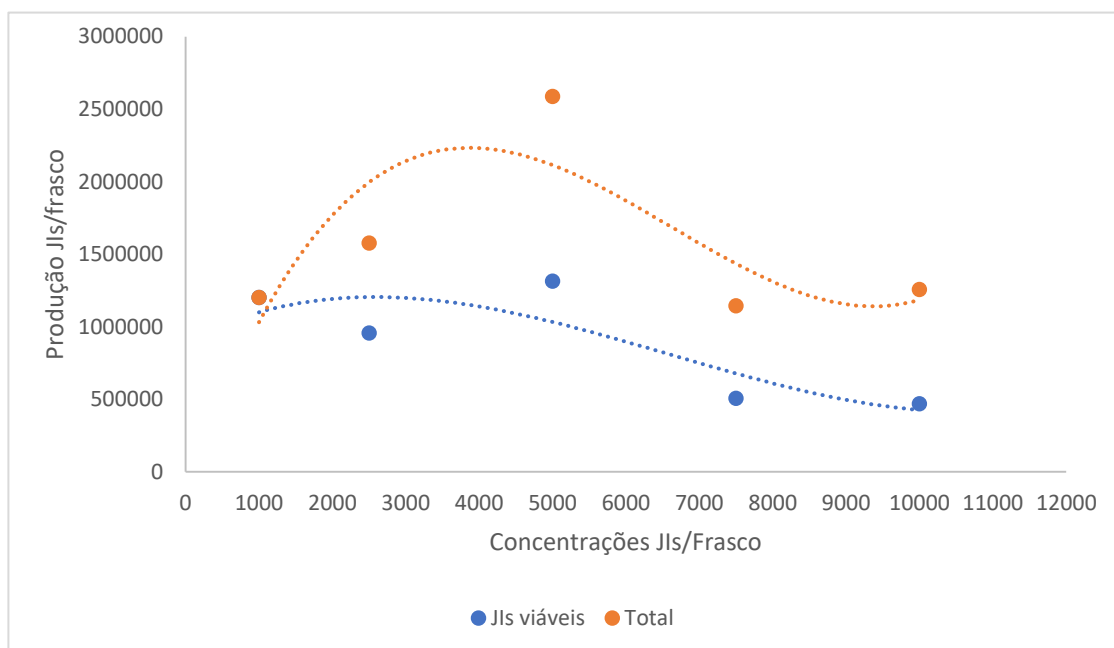
Fonte: Dados da Pesquisa (2021).

Foi possível observar nesse teste, que as concentrações do inóculo afetam a produção de JIs. O número de JIs/mL de meio irá interferir diretamente na demanda de recursos disponíveis, como alimento, oxigênio, espaço, entre outros e a falta de qualquer um destes recursos pode resultar na morte dos JIs produzidos.

Na figura 06 fica claro que a produção total de JIs é dependente da concentração do inóculo utilizado, e de acordo com a curva de regressão, a produção sofre incremento até a concentração de 5000JIs/frasco, quando começa a decrescer. O mesmo pode ser observado na curva que representa o número de JIs viáveis, o que nos leva a sugerir que intervalos de concentrações entre 1.000 e 5.000 JIs/frasco devem ser avaliados.

Os inóculos de 2500 e 5000 resultaram em produções totais maiores, mas houve grande mortalidade de JIs. Segundo Han *et al.*(1992) o tempo de incubação mais longos podem fornecer maiores produções de JIs, mas a mortalidade de NEP também é afetada com o tempo. Fator esse que pode ter ocorrido, devido a isso é sugerido a realização de novos ensaios com coletas de JIs em um tempo inferior a 21 dias, podendo resultar em uma maior produção com uma menor mortalidade.

Figura 6- Curva de regressão da produção de JIs total e viáveis do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) em meio semi-sólido após 21 dias de incubação.



Total $y = 1E-05x^3 - 0,2602x^2 + 1425,9x - 147403$ $R^2 = 0,642$ Vivos $y = 3E-06x^3 - 0,0606x^2 + 251,58x + 906376$ $R^2 = 0,7001$

Fonte: Dados da Pesquisa (2021).

O teste de infectividade dos JIs produzidos *in vitro* em diferentes concentrações de inóculo possibilitou observar que a infectividade dos JIs não sofreu alteração, e em todas as concentrações os JIs foram patogênicos as larvas de *G. mellonella* (Tabela 8).

Tabela 8- Porcentagem de mortalidade em larvas de *Galleria mellonella* infectadas por JIs do isolado UEL 08 (*Heterorhabditis amazonensis*) produzidos *in vitro* em diferentes concentrações de inóculo.

Tratamento	Mortalidade
1.000	90±0,57% A*
2.500	95±0,5% A
5.000	85±0,5% A
7.500	95±0,5% A
10.000	85±0,5% A
C.V.	11.48

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

Fonte: Dados da Pesquisa (2021).

5. CONCLUSÃO

O óleo de milho foi a fonte de gordura que proporcionou melhor produção de JIs em ambas as formas de produção, e não alterou os valores de infectividade dos JIs produzidos. Por sua vez, o meio semi-sólido foi aproximadamente 30 vezes mais eficiente que o meio sólido. A concentração de inóculo para produção *in vitro* em meio semi-sólido, apresentou diferenças na produção final, e o inóculo de 1.000 JIs/frasco foi o que apresentou o melhor rendimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADAMS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and Systematics. **Entomopathogenic Nematology**. v.1, 2002.

Akhurst, R. J.; Boemare, N. E. Genus XL. *Xenorhabdus* Thomas and Poinar 1979, 354AL emend. Thomas and Poinar 1983, 878. In: BERGEY, S. **Manual of Systematic Bacteriology**, v.2, p. 831–838, 2005.

AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes Neoplectana and Heterorhabditis. **Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 303-309, 1980.

AKHURST, R.; SMITH, K. Regulation and safety. In: Gaugler, R. (ed.), **entomopathogenic Nematology**, p.311- 322, 2002.

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

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

ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle Microbiano de pragas na América Latina**. FEALQ, Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, v. 14, cap. 6, p. 171-202, 2008.

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

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

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

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

AXTELL, R. C.; ARENDS, J. J. Ecology and management of arthropod pests of poultry. **Annual Review of Entomology**, v.35, n.1, p.101-126, 1990.

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

Bedding RA. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. **Nematologica**.v.27, p.109–114, 1981.

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

BLAXTER M.L., DE LEY, P.; GAREY, JR; LIU, L.X; SCHEIDEMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; THOMAS, W.K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, v.392, p.71-75, 1998.

BLINOVA, S.L.; IVANOVA, E.S. Culturing the nematode-bacterial complex of BODE, H. B. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current opinion in chemical biology**, v. 13, n. 2, p. 224-230, 2009.

BOEMARE, N. E.; AKHURST, R. J. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). **Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 751-761, 1988.

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

CECCONELLO, D. M. **Nematoides entomopatogênicos no controle do percevejo *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae).** 2020. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2019.

CHERNAKI, A. M.; ALMEIDA, L. M. Exigências térmicas, período de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.365-368, 2001.

CHERNAKI-LEFFER, A. M.; BIESDORF, S. M.; ALMEIDA, L. M.; LEFFER, E. V. B.; VIGNE, F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola** v.4, p. 243-247, 2002.

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

CLARKE, D. J. *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. **Cell Microbiology**, v.10, p.59-67, 2008.

Cottrell T.E.; Shapiro-Ilan D.I.; Horton D.L.; Mizell R.F., III Laboratory virulence and orchard efficacy of entomopathogenic nematodes toward the lesser peachtree borer (Lepidoptera: Sesiidae) **Environmental Entomology**. V.104, p.47–53, 2011.

DE LEY, P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. In: **WormBook**, eds. The C. elegans Research Community, 2006.

DESPINS J.L.; AXTELL R.C. Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Poult. Sci.**, v.74, p.331-336, 1995.

DESPINS, J. L.; AXTELL, R. C. Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Poultry Science**, v.74, p.331-336, 1995.

DILLMAN, A. R.; CHASTON, J. M.; ADAMS, B. J.; CICHE, T. A.; GOODRICH-BLAIR, H.; STOCK, S. P.; STERNBERG, P. W. An entomopathogenic nematode by any other name. **PLoS Pathogens**, v.8, n.3, p.100-527, 2012.

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

DOLINSKI, C.; MOINO JR, A. Utilização de nematoides entomopatogênicos nativos e exóticos: O perigo das introduções. **Nematologia Brasileira**, v.30, p.139-149, 2006.

DOLINSKI, C. Controle de artrópodes-praga com nematoides entomopatogênicos. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Org) **Controle biológico de pragas da agricultura**, Brasília, EMBRAPA, p.275-286, 2020.

DONEZE, G. S. **Caracterização molecular de nematoides entomopatogênicos (isolados UENP 02, 05 e 06) nativos na região norte do Paraná**. 2019, 25 f, TCC (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte do Paraná-Campus Cornélio Procopio, 2019.

EHLERS, R. U.; LUNAU, S.; KRASOMIL-OSTERFELD, K.; OSTERFELD, K. H. Liquid culture of the entomopathogenic nematode–bacterium-complex *Heterorhabditis megidis*/*Photorhabdus luminescens*. **Biological Control**, v. 43, n. 1, p.77–86, 1998.

FERNANDES, T. A. P.; MARCOMINI, M. C.; FERREIRA, F. P.; GUIDE, B. A.; ALVES, V. S.; NEVES, P. M. O. J. Native isolates and the effect of aviary litter on the pathogenicity and virulence of entomopathogenic nematodes for the control of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 1, p. 1-18, 2021.

FERRAZ, L. C. C. B.; LEITE, L. G.; LOPES, R. B.; MOINO JR, A.; DOLINSKI, C. Utilização de nematoides para o controle de pragas agrícolas e urbanas. In: ALVES, S.

B.; LOPES, R. B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e desafios**. Piracicaba: Fealq, Cap. 6, p. 171-196, 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p.1039-1042, 2011.

FIGUEROA, W.; ROMAN, J. Biocontrol of the sugarcane rootstalk borer, *Diaprepes abbreviatus* (L.), with entomophilic nematodes. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v.74, p.395-404, 1990.

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.

FORST, S., CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. **Entomopathogenic Nematology**, v. 57, 2002.

GAUGLER, R.; HAN, R. Production technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. CAB International, 2002. p.289-310.

GEDEN, C. J.; ARENDS, J. J.; AXTELL, R. C. Field trials of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) for control of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in commercial broiler and turkey houses. **Journal of Economic Entomology**, v.80, p.136-141, 1987.

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

GIVAUDAN, A.; LANOIS, A. flhDC, o operon mestre flagelar de *Xenorhabdus nematophilus*: necessidade de motilidade, lipólise, hemólise extracelular e virulência total em insetos. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n.1, p.107-115, 2000.

GREWAL, P. S.; KOPPENHÖFER, A. M.; CHOO, H. Y. Lawn, turfgrass, and pasture applications. In: Grewal, P. S.; Ehlers, R. U.; Shapiro–Ilan D. I. (Eds.), **Nematodes as biocontrol agentes**, Wallingford, p.115–146, 2005.

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

GUIDE, B. A. **Identificação e aspectos biológicos do nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* Isolado**. (2019). Tese de doutorado, Programa Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil, 2019.

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

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

HAZELEGER, W. C.; BOLDER, N. M.; BEUMER, R. R.; JACOBSREITSMA, W. F. Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enteric* serovar paratyphi B variant java between successive broiler flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.22, p.6887-6891, 2008.

JAPP, A. K.; BICHO, C. L.; SILVA, A. V. F. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1668-1673, 2010.

KOPPENHÖFER, A. M.; GREWAL, P.S.; KAYA, H.K.; KLEIN, M. G. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white larvae: greenhouse and field evaluation. **Biological control**, v. 19. n. 3, p.245-251, 2000.

KOPPENHÖFER, H. S. Bacterial symbionts of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. **Nematology Monographs and Perspectives**, v.5, p.735-808, 2007.

LEE, MING-MIN.; STOCK, S. P. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp.(γ -Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n. 2, p. 67-74, 2010.

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

LESCHEN, R. A. B.; STEELMAN, C. D. *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae) larva and adult mouthparts. **Entomological News**, v.99, n.4, p.221-224, 1988.

MCALLISTER, J. C.; STEELMAN, C. D.; NEWBERRY, L. A.; SKEELES, J. K. Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). **Poultry Science**, v.74, p.45-49, 1995

MCGRAW, B. A.; KOPPENHÖFER, A. M. Population dynamics and interactions between endemic entomopathogenic nematodes and annual bluegrass weevil populations in golf course turfgrass. **Applied Soil Ecology**, v.41, n.1, p.77-89, 2009.

MOLINA, J.P.; LÓPEZ, N.J.C. Producción in vivo de trêsentomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, v.27, n.1-2, p.73-78, 2001.

MONTEIRO, C. M. O.; MATOS, R. S.; ARAÚJO, L. X.; CAMPOS, R.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DOLINSKI, C. Entomopathogenic nematodes in insect cadaver formulations for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.203, p.310-317, 2014.

MONTEIRO, C. M. O.; MATOS, R. S.; ARAÚJO, L. X.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DOLINSKI, C. First report of pathogenicity of entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* on partially engorged females of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Biologica Control**, v.69, p.78-81, 2014.

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

NEIRA-MONSALVE E.; SÁENZ-APONTE A.; BOCANEGRA R. M. X.; GUTIÉRREZ-ROJAS I.; TERÁN W., QUEVEDO-HIDALGO B. *In vitro* production of the biological control agent *Heterorhabditis indica* SL0708 in different agar media. **Biocontrol Science and Technology**, v.29, n.11, p.1090-1105, 2019.

NEGRISOLI JUNIOR, A. S., NEGRISOLI, C. D. C., SILVA, A. D. O. Produção e armazenamento de nematoides entomopatogênicos. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documentos (INFOTECA-E)**, 2015.

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

PACE, G. W.; GROTE, W.; PITT, D. E.; PITT, J. M. Liquid culture of nematodes. **Patent, International Publication Number WO 86/1074**, 1986.

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, p.1163.

POINAR, G. O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**, v.365, p. 23-62, 1990.

POINAR, G. O. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 16, n. 4, p. 333-338, 1993.

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.

POINAR, G.O. Nematodes for biological control of insects. **Boca Raton: CRC Press**, p.143-148, 1979.

RODRIGUEIRO, T. S. C.; GINARETE, C. M. A.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; GOULART, R. M.; GIACOMETTI, F. H. C. Eficiência de *Heterorhabditis indica* IBCB-N05 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) sob comedouros de granja avícola. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, p.279-284, 2008.

SCHROEDER, W. J. Laboratory bioassays and field trials of entomogenous nematodes for control of *Diaprepes abbreviatus*. **Environmental Entomology**, v.16, p.987-989, 1987.

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

SHAPIRO-ILAN, D.; HAN, R.; DOLINKSI, C. Entomopathogenic nematode production and application technology. **Journal of Nematology**, v.44, n.2, p.206–217, 2012.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R.; LEWIS, E. E. In vivo production of entomopathogenic nematodes. **International Journal of Nematology**, v.14, p. 13-18, 2004

STOCK, S. P. Diversity, biology and evolutionary relationships. In: Campos-Herrera (ed.). **Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests**. New York: Springer, 2015.

STOCK, S. P.; GOODRICH-BLAIR, H. Nematode parasites, pathogens and associated of insects and invertebrates of economic importance. In L. A. Lacey (Ed.), **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**, v. 2, n. 12, p. 373-426, 2012.

STOCK, S. P.; HUNT, D. J. Morfologia e sistemática de nematóides usados em biocontrole. **Nematodes as biocontrol agents**, p.3-43, 2005.

STRAUCH, O.; STOESSEL, S.; EHLERS, R. U. As condições de cultura definem a reprodução automítica ou anfigênica em nematóides rhabditídeos entomopatogênicos do Gênero *Heterorhabditis*. **Fundamentos e Nematologia Aplicada**, v.17, p.575–582, 1994.

SELVAN, S.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Density-dependant effects on entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis* and *Steinernematidis*) within an insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 278-284, 1993.

SZALANSKI, A. L.; PALMER, T. W.; MCKAY, T.; STEELMAN, C. D. Infectivity of *Steinernema* spp. (Nematoda: Steinernematidae) to adult litter beetles, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in the laboratory. **Biocontrol Science and Technology**, v.14, n.1, p.81-85, 2004.

VITTORI, J.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; TROVÓ, K. P.; RIBEIRO, C. A. M.; BARBOSA, G. G.; SOUZA, L. M.; PIGATTO, C. P. *Alphitobius diaperinus* spp as a vector of *Clostridium perfringens* in broiler houses in the state of São Paulo - Brazil. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.894-896, 2007.

VOSS, M.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI, A. S. J.; BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos. Passo Fundo: **Embrapa Trigo-documentos(INFOTECA-E)**, p. 1- 38, 2009.

WALLACE, M. H.; WINKS, R. G.; VOESTERMANS, J. The use a beetle, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) for the biological control of poultry dung in high-rise layer houses. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, v.51, n.3, p.214-219, 1985.

WATERFIELD, N. R.; CICHE, T.; CLARKE, D. *Photorhabdus* and a host of hosts. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 557–574, 2009.

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

Yang H, Jian H, Zhang S, Zhang G. Qualidade do nematóide entomopatogênico *Steinernema carpocapsae* produzido em diferentes meios de comunicação. **Controle biológico**.v.10, p.193–198, 1997.

YE, W.; TORRES-BARRAGAN, A.; CARDOZA, Y. J. *Oscheius carolinensis* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), um nematóide entomopatogênico potencial do vermicomposto. **Nematology**, v.12, n.1, p.121-135, 2010.

YOO, S.J.; BROWN, I.; GAUGLER, R. Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.54, p.759-763, 2000.

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