

AVALIAÇÃO DE ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Heterorhabditis*
baujardi LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae) VISANDO A
APLICAÇÃO NUM SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR
MICROASPERSÃO

JUAN CARLOS LARA GONZÁLEZ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2006

AVALIAÇÃO DE ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Heterorhabditis*
baujardi LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae) VISANDO A
APLICAÇÃO NUM SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR
MICROASPERSÃO

JUAN CARLOS LARA GONZÁLEZ

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientador: Profa. Cláudia Dolinski

Campos dos Goytacazes, RJ
Outubro- 2006

AVALIAÇÃO DE ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Heterorhabditis
baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae) VISANDO A
APLICAÇÃO NUM SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR
MICROASPERSÃO

JUAN CARLOS LARA GONZÁLEZ

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Produção Vegetal”.

Aprovado em 9 de outubro de 2006

Comissão Examinadora:

Prof. Elias Fernandes de Souza (D.Sc. em Produção Vegetal) – UENF

Prof. Ricardo Moreira de Souza (Ph.D. em Fitopatologia) – UENF

Prof. Alcides Moino Jr. (D.Sc. em Entomologia) - UFLA

Prof^a. Cláudia Dolinski (Ph.D. em Fitopatologia) - UENF
Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais, Alberto Lara (*in memoriam*) e Lucila González, que lutaram com tantas dificuldades para que seu filho pudesse chegar até aqui, e tendo como sua herança eterna, **o estudo**.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

A UENF, pela oportunidade de realização do curso e concessão da bolsa;

A minha família, especialmente minha filha Valeria, pelo apoio, motivação e confiança nos momentos de ausência;

Aos meus professores, Cláudia e Ricardo, pela oportunidade, amizade, confiança e motivação;

Aos professores das disciplinas de Estatística, Semioquímicos, Biologia e Sistemática de Insetos, Fisiologia do Desenvolvimento e Relações Hídricas e Fitobacteriologia, pelos conhecimentos transmitidos;

Aos professores Rogério Figueiredo Daher e Elias Fernandes, pela sua orientação, dedicação e incentivo;

A minha namorada Kelly Santos por sua companhia, amor e compreensão nos momentos difíceis;

Aos amigos do curso de Pós-Graduação aqui conquistados, especialmente do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia;

Aos colegas do Laboratório de Nematologia, pela amizade e os ótimos momentos convividos;

A todos os funcionários, técnicos e estagiários do LEF, pela amizade e ajuda nos experimentos, especialmente o Sr. Gilberto Miranda dos Santos;

Aos amigos Eleodoro, Vicente, Max, Eduardo, Thiago, pela grande amizade;

Aos ‘morantes’, amigos que me receberam em sua casa: Leandro, Francisco, Farle e Romano;

A Juan Pablo e Celso Barbosa, pela grande amizade e ajuda durante o tempo que estive no Brasil;

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Goiaba.....	4
2.2. Principais pragas da goiabeira.....	5
2.2.1. Gorgulho da goiaba (<i>Conotrachelus psidii</i> Marshall, 1992) (Coleoptera: Curculionidae).....	5
2.2.2. Mosca das frutas (<i>Anastrepha</i> spp. e <i>Ceratitis capitata</i> Wied, 1824) (Diptera: Tephritidae).....	6
2.3. Nematóides entomopatogênicos	6
2.4. Irrigação.....	8
2.4.1. Irrigação na cultura da goiaba	10
2.5. Tecnologia de aplicação de pesticidas.....	10
2.5.1. Sistemas de aplicação de nematóides entomopatogênicos	10
3. TRABALHOS	13
Capítulo 1 - EFEITO DA PRESSÃO SOBRE OS JUVENIS INFECTANTES DE <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae).....	13
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	14
Material e métodos.....	16
Resultados.....	19

Discussão.....	22
Conclusões.....	23
Referências bibliográficas.....	24
Capítulo 2 - EFEITO DA TEMPERATURA DE ÁGUA DE IRRIGAÇÃO SOBRE OS JUVENIS INFECTANTES DE <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae).....	26
Resumo.....	26
Abstract.....	27
Introdução.....	27
Material e métodos.....	29
Resultados e discussão.....	31
Conclusões.....	34
Referências bibliográficas.....	35
Capítulo 3 - EFEITO DO ÓLEO MINERAL SOBRE OS JUVENIS INFECTANTES DE <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae).....	37
Resumo.....	37
Abstract.....	38
Introdução.....	38
Material e métodos.....	40
Resultados e discussão.....	42
Conclusões.....	45
Referências bibliográficas.....	45
Capítulo 4 - AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR MICROASPERSÃO PARA A APLICAÇÃO DOS JUVENIS INFECTANTES DE <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae).....	48
Resumo.....	48
Abstract.....	49
Introdução.....	50
Material e métodos.....	51
Resultados e discussão.....	55
Conclusões.....	57
Referências bibliográficas.....	57
4. CONCLUSÕES E RESUMO.....	60

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
APÊNDICES.....	66
APÊNDICE A. RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DO EFEITO DA PRESSÃO SOBRE OS JUVENIS INFECTANTES DE <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae).....	67
APÊNDICE B. RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DO EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE OS JUVENIS INFECTANTES DE <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae).....	69
APÊNDICE C. RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO ÓLEO MINERAL SOBRE OS JUVENIS INFECTANTES DE <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae).....	71
APÊNDICE D. RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DA AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR MICROASPERSÃO PARA A APLICAÇÃO DOS JUVENIS INFECTANTES DE <i>Heterorhabditis baujardi</i> LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae).....	73

RESUMO

LARA, JUAN CARLOS; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Outubro de 2006; Avaliação de aspectos biológicos de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae) visando a aplicação num sistema de irrigação por microaspersão; Orientador: Prof^a: Cláudia Dolinski. Co-orientador: Prof. Elias Fernandes.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito das condições geradas pelos sistemas de irrigação sobre os juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae). Ensaios de laboratório foram conduzidos para avaliar o efeito de pressões entre 20 e 340 psi, de temperaturas entre 25 e 45°C e do óleo mineral ASSIST® (BASF SA) em concentrações de 0,5 a 2% v/v sobre os JIs. As variáveis avaliadas foram viabilidade, patogenicidade à *Galleria mellonella* e capacidade de deslocamento dos JIs. Além disso, foi avaliado o efeito de um sistema de microaspersão sobre os JIs à campo. Quanto à pressão, o nematóide suportou todas as pressões avaliadas sem diminuir sua viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento. Na avaliação da temperatura foi observado o efeito das maiores temperaturas (40 e 45°C), que diminuíram a viabilidade dos nematóides, além de prejudicar sua patogenicidade e deslocamento. O óleo mineral avaliado não foi adequado para os JIs, pela diminuição da viabilidade. O sistema de microaspersão avaliado foi considerado adequado para a aplicação dos JIs, já que não afetou sua viabilidade, patogenicidade ou capacidade de deslocamento. Adicionalmente foram avaliadas três concentrações do nematóide em questão aplicado pelo sistema de microaspersão sobre larvas de *Galleria mellonella* em um pomar de goiaba.

Houve diferença estatística entre os tratamentos quando comparados à testemunha ($p < 0,05$), o que demonstra que a aplicação deste nematóide via irrigação é viável para o controle de pragas de solo na cultura da goiaba.

ABSTRACT

LARA, JUAN CARLOS; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; October of 2006; Evaluation of biological aspects of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae) aiming at the application in a system of irrigation for microaspersion; Advisor: Prof^a: Cláudia Dolinski. Co-advisor: Prof. Elias Fernandes.

The objective of this study was to evaluate the effect of irrigation system generated conditions on infective juveniles (IJs) of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae). Laboratory assays were carried out to evaluate the effect of different pressures (20 to 340 psi), temperatures (25 to 45°C), and a mineral oil (ASSIST® Basf SA) in different concentrations (0,5 up to 2% v/v) on the viability, pathogenicity and capacity of displacement of *H. baujardi* LPP7 IJs. Moreover, it was evaluated the effect generated by a micro aspersion system on the IJs of *H. baujardi* LPP7 under field conditions. As for the pressure, the nematodes supported all the pressures evaluated without reducing their viability, pathogenicity or capacity of displacement. When evaluating the temperature, it was observed a negative effect of the highest temperatures (40 and 45°C). Under those temperatures, the IJs diminished their viability, harming their pathogenicity and displacement. The mineral oil tested was not functional for *H. baujardi* LPP7 IJs, since it diminished their viability. The micro aspersion system evaluated was considered adjusted for the application of IJs, since it did not affect their viability, pathogenicity or capacity of displacement. Additionally three nematode dosages were evaluated on *Galleria mellonella* larvae applied by a micro aspersion system under field conditions. There were statistic differences among treatments (different

dosage) ($p < 0,05$), showing that this nematode can be applied through irrigation system for the control of ground guava pests.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, com uma área produtora de goiaba (*Psidium guajava* L.) em torno de 15.800 ha (Gonzaga et al., 2001), é o primeiro produtor mundial de goiabas vermelhas (Associação Brasileira dos Produtores de Goiaba, 2004). Entre os Estados brasileiros, Minas Gerais, São Paulo e Pernambuco distinguem-se como os mais importantes e respondem, em conjunto, por mais de 80% da produção nacional. Os Estados do Rio Grande do Sul, do Rio de Janeiro e do Ceará são também produtores de goiaba. A produção nacional em 2002 foi de 389.162 toneladas de frutos, mas esse número tende a crescer devido aos novos produtos à base de goiaba que estão sendo lançados no mercado, como molho para macarrão, molho acri-doce, preparados em pó e ainda os tradicionais sucos e doces (Gonzaga et al., 2001).

A goiaba vermelha é admirada por seu sabor e valor nutricional. As principais variedades plantadas no Norte/Noroeste Fluminense são a Paluma e a Ogawa (Dolinski, 2006).

Identificar as principais pragas das propriedades ou região e monitorá-las ajuda na convivência e manutenção das pragas sob controle. Para se conviver com elas, pode-se utilizar métodos alternativos ao controle químico. Manejando-se as pragas com métodos alternativos, diminuem-se os níveis de resíduos químicos, podendo tornar a goiaba certificada e com selo de qualidade (Dolinski, 2006).

Políticas de controle devem-se basear não somente na redução dos danos econômicos, mas também na defesa e conservação do sistema agro-

ecológico, e é por isso que a aplicação de um método alternativo aos pesticidas utilizados é recomendável.

As principais pragas da cultura da goiaba são: o psílídeo, o besouro da goiabeira, as lagartas desfolhadoras, o gorgulho da goiaba, a mosca das frutas, o tripes e os percevejos, dentre outros. O gorgulho da goiaba causa grandes prejuízos em pomares do Brasil e do mundo, sendo encontrado em praticamente 100% das plantações de goiaba. Pode causar vários tipos de dano, como queda dos frutos pequenos, perda de peso e da qualidade dos frutos. É uma praga de difícil controle, pois passa a maior parte do seu ciclo dentro do fruto ou no solo na forma de larva e pupa. Isso faz com que nenhum dos métodos de controle utilizados atualmente controlem a praga efetivamente, principalmente o químico. Portanto, uma possível maneira de reduzir a população deste inseto seria com um agente de controle biológico que compartilhasse o mesmo hábitat durante uma parte de seu ciclo de vida. Como as larvas no quarto ínstar do gorgulho da goiaba se encontram no solo, o uso dos nematóides entomopatogênicos (NEPs) (Nematoda: Heterorhabditidae, Steinernematidae) como agentes de controle biológico parece ser o mais indicado. A mosca das frutas também causa grandes danos e possui uma fase da vida no solo, sendo outra praga com potencial para ser controlada por NEPs.

No Brasil já foi comprovado o efeito positivo dos NEPs no controle do gorgulho da goiaba em condições de laboratório e de campo (Dolinski et al., 2006). A adaptação desta alternativa de controle às práticas tradicionais do cultivo é de vital importância, por isso é fundamental buscar formas fáceis e práticas de aplicação dos NEPs, nas quais os agricultores não precisem investir capital para aplicá-los, mas apenas adaptar os equipamentos que possuem. Portanto, a avaliação dos possíveis danos que esses equipamentos possam causar aos NEPs é muito importante para avançar nos programas de controle biológico de pragas da goiaba no Brasil.

Este trabalho teve por objetivos avaliar se a pressão e a temperatura ocasionam dano físico ou comportamental ao NEP *Heterorhabditis baujardi* LPP7, e avaliar a eficiência da aplicação desses nematóides pelo sistema de irrigação por microaspersão.

Adicionalmente foi avaliado o efeito do óleo mineral sobre os juvenis infectantes (JIs) do nematóide *H. baujardi* LPP7, visando melhorar sua resistência à condições adversas do ambiente, como temperaturas elevadas, raios ultra violeta e dessecação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Goiaba

A goiaba, *Psidium guajava* L., pertence à família Mirtaceae, cuja região de origem provavelmente seria entre o sul do México e a América do Sul. Esta planta pode ter sido disseminada pelo homem, pássaros e outros animais para outras áreas tropicais das Américas e Índia, onde se adaptou com sucesso (Gonzaga et al., 2001).

O cultivo da goiaba vem adquirindo crescente importância econômica no Brasil, que já é o principal produtor comercial de goiaba vermelha do mundo. A área plantada com este cultivo no ano 2002 superou 15.000 ha e sua produção foi de quase 400.000 ton (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2003).

Os frutos da goiabeira têm importância econômica devido as suas amplas formas de aproveitamento. Em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, a goiaba não só é empregada na indústria, sob múltiplas formas (purê, polpa, néctar, suco, compota, sorvete, dentre outros), como também é amplamente consumida como fruta fresca (Souza et al., 2001). Seus frutos vêm sendo melhorados tanto para o aumento da qualidade *in natura* como para a industrialização (Associação Brasileira dos Produtores de Goiaba, 2004).

O mercado interno absorve quase a totalidade da produção nacional, que vem aumentando em volumes crescentes nos últimos anos. Ainda que alta, a produtividade da goiaba poderia ser maior, se não fossem insetos e doenças afetando a cultura. O gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii* Marshal, 1922) (Coleoptera: Curculionidae), a mosca das frutas (*Anastrepha* spp. e *Ceratitidis capitata* Wied, 1824) (Díptera: Tephritidae), a ferrugem da goiabeira (*Puccinia*

psidii) (Barelli e Galli, 1998) e o nematóide *Meloidogyne mayaguensis* são os de maior importância (Torres et al., 2004).

2.2. Principais pragas da goiabeira

2.2.1. Gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii* Marshall, 1922) (Coleoptera: Curculionidae)

Esta praga é responsável por grandes perdas econômicas, pois pode chegar a atacar de 60 a 100% dos frutos. É uma praga de difícil controle através de métodos químicos convencionais devido a sua localização dentro dos frutos e no solo (Orlando et al., 1974).

O inseto é um pequeno besouro de aproximadamente 6,0 mm de comprimento por 4,0 mm de largura, de coloração pardo-escuro, com peças bucais cilíndricas e alongadas. A larva é amarelada com cápsula cefálica escura. O corpo da larva é enrugado transversalmente e mede, quando totalmente desenvolvido, 12,0 mm de comprimento por 4,0 mm de largura (Souza et al., 2001).

No Estado do Rio de Janeiro, São Paulo e Goiás, é uma praga temporária e pode ser encontrada nos pomares durante a estação chuvosa e quente (setembro a abril). No Noroeste e na Baixada Litorânea do Estado do Rio de Janeiro, esta é a principal praga nos plantios de goiaba e 80 a 100% dos frutos podem ser atacados nos pomares abandonados e não tratados (Dolinski, 2006).

As fêmeas, ao iniciarem a postura, procuram os frutos ainda verdes, cavando com o rostro orifícios onde depositam os ovos, normalmente apenas um por cavidade. Após a eclosão, a larva penetra no fruto e se alimenta das sementes, ficando parte da polpa e das sementes destruídas, com coloração escura, indicando deterioração. Após o seu completo desenvolvimento, o fruto cai e a larva deixa o fruto, aprofundando-se no solo, onde se transforma em pupa, permanecendo nesse estágio por cerca de três a quatro meses. Logo após as primeiras chuvas surgem os adultos, que abandonam o solo, iniciando um novo ciclo (Bailez et al., 2003).

Atualmente, a medida de controle do gorgulho das goiabas é o controle químico com aplicação de soluções inseticidas com fention a 0,10%, paration metílico a 0,10% ou triclorfon a 0,30%, iniciadas no estágio de frutos ainda verdes, com média de 3 cm de diâmetro (Souza et al., 2003). Vale ressaltar que

não existem inseticidas registrados para esta praga (Sistema Integrado de Agrotóxicos, 2006). Utiliza-se, também, o controle cultural com o ensacamento dos frutos verdes, utilizando-se papel apropriado, resistente à umidade; e a coleta e destruição dos frutos caídos, que concorre para a diminuição do inóculo para os anos seguintes (Souza et al., 2003).

2.2.2. Mosca das frutas (*Anastrepha* spp. e *Ceratitis capitata* Wied, 1824) (Diptera: Tephritidae)

Esta praga é encontrada no Estado do Rio de Janeiro, contudo não é considerada de importância econômica, mas é possível que venha a ser com o aumento de produção e a presença de frutos de goiaba o ano inteiro. Em São Paulo é a principal praga.

As fêmeas de *C. capitata*, colocam os ovos abaixo da pele dos frutos maduros. As larvas saem dos ovos em 3 a 6 dias e se alimentam por mais 15 a 25 dias. Quando os frutos caem as larvas vão para o solo, viram pupa e se tornam adultos depois de 15 a 19 dias. Os adultos podem ocorrer durante o ano todo, dependendo da disponibilidade de frutas maduras.

Os adultos da mosca das frutas podem voar até 135 km, sendo o movimento natural um importante meio de disseminação. No mercado internacional, a principal maneira de disseminar esta praga para áreas não infestadas é pelo transporte de frutos contendo larvas (Souza et al., 2003).

2.3. Nematóides entomopatogênicos

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) são organismos de forma cilíndrica-alongada, sem segmentação nem apêndices, patógenos obrigatórios capazes de colonizar alguns invertebrados, como insetos, aranhas e carrapatos. Possuem três adaptações características: primeiro, são letais a insetos; segundo, possuem associação simbiótica com bactérias entomopatogênicas; e por último seu terceiro estágio (J3), também chamado de juvenil infectante (JI), tem a capacidade de penetrar os insetos e de sobreviver no solo (Akhurst e Boemare, 1990; Sudhaus, 1993).

Os NEPs vêm sendo isolados dos solos em diferentes ecossistemas do mundo, desde o ártico até os trópicos, apresentando um vasto leque de hospedeiros (Poinar, 1990; Hominick et al., 1996). A variedade de espécies e

linhagens geográficas os posiciona como organismos com potencial uso no controle de pragas, especialmente no solo. Podendo, assim, substituir os inseticidas por sua segurança e facilidade de aplicação (Capinera e Epsky, 1992).

Os NEPs pertencem à Ordem Rhabditida a às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae (Adams e Nguyen, 2002). Na família Steinernematidae estão os gêneros *Steinernema* e *Neosteinernema*, com 43 e 1 espécies descritas, respectivamente. Na família Heterorhabditidae, 9 espécies estão validadas (Adams et al., 2006).

O ciclo de vida das espécies do gênero *Steinernema* começa com os J1s, que carregam células das bactérias entomopatogênicas do gênero *Xenorhabdus* numa vesícula localizada na região anterior do intestino. Estes juvenis penetram no corpo do hospedeiro através de suas aberturas naturais: boca, ânus e espiráculos (Forst e Clarke, 2002). Subseqüentemente, passam à hemocele, onde liberam suas bactérias simbiotes. Estas se multiplicam rapidamente e, após 24 – 48 horas, causam septicemia e morte do hospedeiro. O cadáver fica então preenchido por uma “sopa bacteriana”, que é um meio rico em nutrientes constituído pelas bactérias e por tecidos do inseto já degradado. Os nematóides se alimentam desta “sopa bacteriana” e se desenvolvem, passando para o último estágio de juvenil (J4) e depois se tornam adultos anfimíticos de primeira geração. Em geral, os juvenis originários desses adultos ainda têm ao seu dispor apreciável quantidade de alimento, conseguindo completar o ciclo e formar os adultos anfimíticos de segunda geração dentro do corpo do hospedeiro. Geralmente, após o surgimento e acasalamento dos adultos de segunda geração, têm-se a formação de uma população de juvenis que se alimenta do resto do cadáver e depois o abandona, indo para o solo em busca de novos hospedeiros. Antes dos nematóides deixarem o cadáver, as bactérias simbiotes são apreendidas novamente na vesícula do intestino do J1s (Adams e Nguyen, 2002).

O ciclo de vida das espécies do gênero *Heterorhabditis* se assemelha ao descrito para o gênero *Steinernema*, com a diferença de que a primeira geração de adultos no inseto-cadáver é composta unicamente de hermafroditas, aparecendo machos e fêmeas anfimíticos na segunda geração e, eventualmente, nas seguintes. Além disso, as bactérias simbiotes são apreendidas e armazenadas na região anterior do intestino dos J1s, e não em vesículas como nos J1s do gênero *Steinernema*. Para ambos os gêneros, o ciclo de vida é

completado em 6 a 18 dias, em temperaturas na faixa de 18-28°C, mas isto depende ainda do inseto hospedeiro e da espécie de nematóide (Poinar, 1990).

Nas últimas décadas, os NEPs têm evidenciado seu potencial como agentes biológicos para o controle de diferentes insetos-praga. NEPs são considerados uma ferramenta efetiva para ser incorporada em programas de manejo integrado de pragas (MIP), representando uma parte importante dos chamados biocontroladores (Ehlers, 1996).

Os NEPs, por serem organismos cujo hábitat natural é o solo, sofrem influência de características deste hábitat, como tamanho dos poros, umidade, presença de oxigênio, temperatura e pH (Barbercheck, 1992). As interações de todos esses fatores podem alterar desde a sobrevivência até a capacidade de infecção do nematóide (Kaya, 1990). Algumas espécies de NEPs podem tolerar temperaturas extremas, mas é possível que a baixa umidade do solo altere sua capacidade de dispersão e persistência (Kung et al., 1991). O óleo mineral aparentemente proporciona proteção e umidade à cutícula dos JIs (Schroer e Ehlers, 2005).

Uma característica adicional que destaca os NEPs dentre os agentes do controle biológico é a sua capacidade de dispersão e busca do hospedeiro. Os NEPs são atraídos pelas atividades fisiológicas do hospedeiro, como a respiração, que ocasiona diferenças de CO₂ (Zuckerman e Jansson, 1984; Gaugler et al., 1989).

De acordo com sua movimentação e comportamento, os NEPs podem ser classificados em dois tipos: “ambusher” ou “cruiser”. *S. carpocapsae* é um típico “ambusher”, que fica parado sobre a cauda na superfície do solo até a aproximação do hospedeiro. Este movimento é conhecido como nictação, o qual permite ao nematóide alcançar outros substratos ou hospedeiros mediante movimentos sincronizados e ondulatórios de seu corpo (Ishibashi e Kondo, 1990). *H. bacteriophora* e *S. glaseri* são típicos “cruiser”, pois são móveis e respondem notoriamente aos químico-atraentes do hospedeiro (Kaya e Gaugler 1993).

2.4. Irrigação

É importante ter em mente o significado real da agricultura irrigada, que possibilita maior produção (mais de um plantio por ano) e produtividade

(otimização no uso de áreas), com os menores níveis de investimento, em comparação com outros setores da economia (Mantovani et al., 2006).

No Brasil, estima-se que o potencial para desenvolvimento sustentável é de 14,6 milhões de hectares em “terras altas” e de 14,9 milhões de hectares em “várzeas”, totalizando 29,5 milhões. Dessas, encontram-se sob irrigação 3,149 milhões de hectares, o que representa 10,7% do potencial de solos aptos para agricultura irrigada sustentável (Christofidis, 2002).

Irrigação localizada é o sistema de irrigação em que a água é aplicada diretamente na região radicular em pequenas intensidades, ou seja, baixa vazão e alta frequência com turnos de regas pequenos, mantendo esse solo próximo à capacidade de campo. Os dois principais sistemas de irrigação localizada são gotejamento e microaspersão (Mantovani et al., 2006).

Gotejamento e microaspersão são sistemas muito difundidos, sendo o primeiro mais antigo no Brasil. Diferem entre si quanto à aplicação de água: no gotejamento aplicam-se vazões menores, de 1 a 20 L/h, gota a gota, e na microaspersão as vazões são aplicadas de forma pulverizada, de 20 a 150 L/h (Salassier et al., 2005).

A irrigação por aspersão caracteriza-se pela pulverização do jato de água no ar, visando ao umedecimento de 100% da área ocupada pela planta. Existe uma série de modelos de aspersores, de acordo com o ângulo que os bocais formam com o plano horizontal (aspersores de sobrecopa) e com o diâmetro dos bocais. Esse tipo de irrigação é bastante afetado pela ação da velocidade do vento. Também há necessidade de se ajustar os calendários de irrigação e de pulverização, para se evitar o umedecimento excessivo (Salassier et al., 2005).

A irrigação por gotejamento caracteriza-se pela aplicação da água e de produtos químicos numa fração do volume de solo explorado pelas raízes das plantas, de forma pontual ou em faixa contínua (Salassier et al., 2005).

Na microaspersão, as dimensões do bulbo molhado dependem quase que exclusivamente, do alcance e da intensidade de aplicação ao longo do emissor e do volume de água aplicado por irrigação. Entre os parâmetros a serem utilizados para a escolha do sistema de irrigação por microaspersão, destacam-se: vazão do emissor, raio de alcance, intensidade de aplicação ao longo do raio, consumo de energia e manutenção do emissor (Gonzaga et al., 2001).

2.4.1. Irrigação na cultura da goiaba

Esta fruteira responde muito bem à irrigação até o nível de 120 a 180 litros de água por planta/dia, tanto no aumento da produtividade quanto na melhoria da qualidade dos frutos. A irrigação por sulcos e a localizada são as melhores para a goiabeira, dependendo do potencial hídrico, dos aspectos topográficos e da disponibilidade de recursos financeiros. No Rio de Janeiro, nos últimos anos, tem-se dado preferência à irrigação localizada, sendo que a microaspersão é mais recomendada para terrenos arenosos e o gotejamento para solos médios e argilosos. O tempo e a frequência de irrigação dependerão do clima da região, do solo e das características do equipamento de irrigação utilizado (Ide, 2001)

2.5. Tecnologia de aplicação de pesticidas

A eficácia da aplicação de um inseticida demanda o desenvolvimento de sistemas que integrem o tipo de formulação, o equipamento e o método de aspersão. Igualmente para se realizar uma aplicação correta, é necessário aplicar no momento oportuno, com uma cobertura máxima, uma dosagem correta e um tamanho de gota adequado. O êxito de qualquer controle fitossanitário depende também da qualidade do produto e da precisão de sua aplicação, tendo sempre em conta a menor contaminação ambiental possível (Villalba, 2003).

O objetivo principal de todos os métodos e sistemas de aplicação é a distribuição uniforme do ingrediente ativo, no caso dos nematóides, que estejam próximos às pragas que atacam a cultura. Na prática é quase impossível obter uma distribuição uniforme em quantidades pequenas de inóculo, o que obriga a recorrer a agentes ou meios de diluição. Para os nematóides, o diluente mais usado é a água. A gota, constitui-se, portanto, no veículo ou meio de transporte para fazer-se chegar a substância ativa até o seu destino (Villalba, 2003).

2.5.1. Sistemas de aplicação de nematóides entomopatogênicos

De uma maneira geral, NEPs podem ser aplicados por pulverização, através da irrigação e em cadáveres de insetos (Grewal, 2002). Alguns trabalhos em laboratório têm mostrado que a aplicação de cadáveres de lagartas contendo nematóides, quando comparada com a aplicação de nematóides em suspensões aquosas, dão um resultado melhor quanto à dispersão (Shapiro e Glazer, 1996) e

sobrevivência dos JIs no solo (Perez et al, 2003). Segundo Shapiro e Lewis (1999) e Shapiro et al. (2000), isto se deve ao estresse fisiológico ao qual é submetido o nematóide durante o período de armazenamento na suspensão aquosa.

As telas e os filtros dos equipamentos de aspersão devem permitir que os nematóides passem através deles. *S. carpocapsae* Weiser, 1955 pode passar através de telas tão finas como 100 micrômetros de diâmetro, mas telas com aberturas maiores são necessárias para espécies maiores como *S. glaseri* Steiner, 1929 e *H. megidis* Poinar, Jackson e Klein, 1987. Portanto retirar os filtros e as telas às vezes é recomendado, mas isto requer re-calibração do equipamento (Grewal, 1998).

A maioria dos sistemas de aspersão não promove pressão suficiente para causar dano aos nematóides. Em geral, os nematóides não devem ser submetidos a pressões superiores a 300 psi nos tanques dos equipamentos e a temperaturas superiores a 30°C (Grewal, 1998).

Na Colômbia, Lara e López (2005) mostraram que o nematóide *Steinernema* sp. pode ser aplicado com equipamentos manuais e de pressão previamente definida até 40 psi sem causar nenhum dano físico e sem diminuir sua infectividade.

NEPs requerem que os primeiros 25 a 65 cm do solo sejam bem irrigados para permitir seu movimento no solo (Shetlar, 1999). É importante também levar em conta que temperaturas do solo entre 12 e 28 °C são consideradas favoráveis para a aplicação de NEPs (Kaya, 1990).

Microaspersão do nematóide *Heterorhabditis* sp. linhagem T390 a nível da superfície do solo foi mais efetivo do que quando adicionando na irrigação por gotejamento. Estudos à campo têm mostrado a necessidade de se aplicar os NEPs com uma maior quantidade de água, para que os NEPs não sofram dessecação (Curran, 1992).

Alguns adjuvantes usados na aplicação de NEPs são Triton X100 (BDH, Merck Ltd., Dorset, UK), Glicerol, Croduvant, Crovol L27 e Crovol L40 (Croda Chemicals Ltd.), todos eles numa concentração de 2 até 4% (v/v) (Mason et al., 1999).

As formulações líquidas de nematóides devem ser aplicadas entre 48 e 72 horas após a diluição para se evitar problemas com a dessecação e não se ter

efeitos negativos na virulência dos NEPs (Georgis et al., 1995). Trabalhos para o controle da broca do café com nematóides entomopatogênicos demonstraram que a aplicação destes com água e um óleo agrícola (Carrier) melhorou a capacidade dos NEPs de resistir às condições ambientais e não afetou em nada a viabilidade e capacidade de infecção dos mesmos (Lara et al., 2004).

3. TRABALHOS

Capítulo 1. EFEITO DA PRESSÃO SOBRE OS JUVENIS INFECTANTES DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae)

RESUMO

O maior limitante para o controle de insetos-praga com nematóides entomopatogênicos (NEPs) é sua alta sensibilidade a condições ambientais extremas, que podem ser atingidas nos sistemas de irrigação. Conhecer esses limites é muito importante no momento de se fazer a aplicação do NEP e precisam ser levados em consideração na hora de se desenvolver um programa de controle biológico. Foram testadas sobre *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Heterorhabditidae: Nematoda) pressões de 20, 100, 180, 260 e 340 psi durante 15, 20, 25 e 30 minutos, avaliando-se pelo delineamento de parcelas subdivididas no tempo. Para as variáveis viabilidade dos juvenis infectantes (JIs), patogenicidade dos JIs a lagartas de *Galleria mellonella* e deslocamento dos JIs não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$). A menor percentagem absoluta de viabilidade dos JIs foi encontrada no tratamento com a maior pressão (340 psi) e durante 30 minutos (90,95%). Os maiores valores absolutos de mortalidade das lagartas de *G. mellonella* foram encontrados na testemunha aos 20 minutos de avaliação (98%), seguido pelo tratamento de 20 psi no mesmo tempo de avaliação (96%). Para a variável deslocamento dos JIs o tratamento que apresentou maior percentagem de mortalidade foi de 20 psi em 30 minutos (90%).

Este trabalho demonstrou que o nematóide *H. baujardi* LPP7 consegue suportar pressões de até 340 psi sem ser afetado em sua viabilidade, patogenicidade e deslocamento.

ABSTRACT

The greatest disadvantage for using entomopathogenic nematodes (ENPs) for pest control is their high sensitivity the extreme environment conditions that can be easily reached in irrigation systems. It is important to know these limits before applying nematodes, and those factors must be taken in consideration prior establishing a biological control program. *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Heterorhabditidae: Nematoda) was tested with pressures of 20, 100, 180, 260 and 340 psi during 15, 20, 25 and 30 minutes and evaluated by the delineation of parcels subdivided in time. There were no significant differences according to Tukey test ($p < 0,05$) for the variables viability of the infective juveniles (IJs), pathogenicity of *Galleria mellonella* larvae and IJs displacement. The lowest absolute percentage of IJ viability was found in the treatment with the highest pressure (340 psi) during 30 minutes (90,95%). The highest absolute mortality values of *G. mellonella* larvae were found in the control after 20 minutes (98%), followed by the treatment of 20 psi also after 20 minutes (96%). For the displacement of the IJs, the treatment that presented the highest mortality percentage was 20 psi with 30 minutes (90%). This study demonstrated that the nematode *H. baujardi* LPP7 tolerates pressures of up to 340 psi, without affecting its viability, pathogenicity and displacement.

INTRODUÇÃO

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) pertencem aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* (Nematoda: Heterorhabditidae, Steinernematidae) e são parasitas obrigatórios de insetos. Esses nematóides possuem associação simbiote com bactérias patogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* spp. e

Photorhabdus spp. as quais associam-se aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, respectivamente (Poinar, 1990). Os juvenis infectantes (JIs), considerados como o único estágio de vida-livre dos NEPs, penetram no hospedeiro através de suas aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos) e, no caso dos heterorhabditídeos, também perfurando a cutícula. Após a entrada na hemocele do hospedeiro, JIs liberam as bactérias simbiotas que vão causar a morte do hospedeiro, servir de base para a nutrição dos nematóides e para defesa contra invasores secundários (Poinar, 1990). Estes nematóides completam seu desenvolvimento e permanecem por duas ou três gerações dentro do hospedeiro. Quando o alimento é esgotado, os JIs saem do inseto-cadáver à procura de novos hospedeiros (Grewal e Georgis, 1998).

Nas últimas décadas, os NEPs têm evidenciado seu potencial como agentes do controle biológico para o controle de insetos-praga, sendo hoje considerados uma ferramenta efetiva a ser incorporada em programas de manejo integrado de pragas, representando uma parte importante dos chamados biocontroladores (Ehlers, 1996).

Os NEPs podem ser aplicados no solo com a irrigação por aspersão (Georgis, 1990). O uso dos diferentes equipamentos depende da cultura e em cada caso se deve ter em consideração o volume, a agitação contínua, a pressão e o tempo de reciclagem, além das condições próprias do sistema e dos padrões de distribuição (Grewal, 2002)

A microaspersão do nematóide *Heterorhabditis* sp. linhagem T390 a nível da superfície do solo foi mais efetiva do que quando adicionado na irrigação por gotejamento. Estudos à campo têm mostrado a necessidade de se aplicar os NEPs com uma maior quantidade de água, para que estes não sofram dessecação (Curran, 1992) e para que possam se movimentar livremente (Shetlar, 1999).

Na Colômbia, Lara e López (2005) demonstraram que o nematóide *Steinernema* sp. pode ser aplicado com equipamentos manuais e de pressão previamente definida até 40 psi sem causar nenhum dano físico e sem diminuir a sua capacidade de infecção. Fife et al. (2003) avaliaram o efeito da pressão de 186 e 1550 psi com as espécies *H. bacteriophora* Poinar, 1976 e *H. megidis* Poinar, Jackson e Klein, 1987, concluindo que quando se incrementou a pressão, a viabilidade relativa dos NEPs diminuiu. Além disso, recomendaram a pressão

máxima de 200 psi para *H. megidis* e 290 psi para *S. carpocapsae* Weiser, 1955 e *H. bacteriophora*. Em geral os nematóides não devem ser submetidos à pressão superior a 300 psi nos tanques dos equipamentos e também a temperaturas superiores a 30°C (Grewal, 1998).

Heterorhabditis baujardi Phan, Subbotin, Nguyen e Moens, 2003 é uma espécie nativa brasileira que vêm sendo utilizada para o controle do gorgulho da goiaba, com potencial para o controle de outras pragas da goiabeira (Dolinski et al., 2006a). Além de causar elevada mortalidade, produz satisfatórias quantidades de JIs (Dolinski et al., 2006b).

Aparentemente a tolerância a diferentes pressões varia de acordo com a espécie do nematóide. Além disso, não se sabe ao certo se a pressão afeta a capacidade de busca dos JIs. Sendo assim, JIs de *H. baujardi* LPP7 foram mantidos à temperatura ambiente (25,6°C) e submetidos a pressões entre 20 e 340 psi com o objetivo de se avaliar seu efeito na viabilidade, infectividade e capacidade de busca.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização

O experimento foi conduzido no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia, pertencente ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ, de maio a junho de 2006.

Material biológico

Traça pequena dos favos (*Galleria mellonella* L. Lepidoptera: Pyralidae). Folhas de papéis com ovos das mariposas de *G. mellonella* foram colocadas em potes de vidro de 30 cm de altura com dieta própria para suas larvas. Os potes foram mantidos a 28°C e 60% de umidade relativa em câmara de germinação, sendo a dieta adicionada quando necessária. Após 4-5 semanas, larvas no último ínstar foram colocadas em vidros menores (10 cm de altura) sem

dieta para puparem, passarem a fase adulta e posteriormente ovopositar em pedaços de papel colocados na tampa dos vidros (Machado, 2006).

***Heterorhabditis baujardi* LPP7.** A produção dos JIs foi feita *in vivo* mediante colocação dos JIs em contato com as larvas de *G. mellonella* no último ínstar, utilizando 200 JIs em 1 mL de água destilada em placas de Petri de 5 cm de diâmetro com papel de filtro (Whatman #1) no fundo. Após a adição dos nematóides, foram colocadas 10 lagartas por placa de Petri e mantidas a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas em câmara de germinação. As larvas que apresentaram sintomatologia típica de infecção por *Heterorhabditis*, ou seja, a cor marrom avermelhada, foram colocadas em outras placas de Petri com papel filtro estéril (câmara seca) a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 a 8 dias. Após este tempo, as larvas foram colocadas em “armadilhas de White modificadas” (White, 1927) para que os JIs fossem recuperados (Figura 1). Estes foram coletados e armazenados em água a uma temperatura de 16°C até o momento de utilização.



Figura 1. Armadilha de White modificada para recuperar os juvenis infectantes das larvas de *Galleria mellonella* mortas por *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

Testes

Foram avaliadas as pressões de 20 psi (137 KPa), 100 psi (689 KPa), 180 psi (1241 KPa), 260 psi (1792 KPa) e 340 psi (2344 KPa), com a finalidade de se determinar sob quais pressões o referido nematóide diminui sua viabilidade, infectividade e capacidade de buscar o hospedeiro.

Juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 foram submetidos a essas pressões por 15, 20, 25 e 30 minutos, o qual seria o tempo máximo estimado de uma aplicação de nematóides à campo. O volume total foi de 70 mL de água por tratamento, sendo a temperatura da água utilizada de 25 °C, aproximadamente, e à concentração de 100 JIsxmL⁻¹. Cada tratamento foi composto por um nível de pressão e um tempo de avaliação. A testemunha foi composta por igual concentração de nematóides, mas sem pressão forçada. Para se obter as diferentes pressões, os nematóides foram colocados em um aparelho chamado bomba de Sholander Dickson^a (Figura 2) e receberam a pressão equivalente a cada tratamento através de um cilindro de nitrogênio acoplado a um manômetro.



Figura 2. A. Bomba de Sholander Dickson^a com o cilindro de nitrogênio. B. Bomba de Sholander fechada, tendo-se na parte superior direita o indicador da pressão.

Variáveis avaliadas

Viabilidade dos juvenis infectantes. Em cada tempo pré-determinado foram coletadas de cada tratamento 5 amostras de 50 µL. Em cada amostra foi observada a viabilidade dos nematóides, a qual foi dada pela relação entre o total de JIs vivos e o total dos JIs por amostra obtida.

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{total de NEPs vivos} / \text{total de NEPs}) \times 100$$

Patogenicidade dos juvenis infectantes. Foi avaliada a patogenicidade dos JIs após cada tratamento em larvas da traça pequena dos favos, para o qual foram utilizadas 10 larvas por tratamento com 5 repetições. As infecções foram feitas com 100 JIs/mL de cada tratamento e a mortalidade foi avaliada 72 horas após a infecção.

Deslocamento dos juvenis infectantes. Em vasos plásticos (42 x 25 x 12 cm) com solo estéril (2 Kg) foram colocados 5 envelopes feitos com tela metálica medindo (6 x 5 cm) com 10 larvas de *G. mellonella* em cada. A concentração de 10.000 JIs/30 mL de água foi adicionada na extremidade oposta àquela onde os envelopes com insetos foram colocados. Após 10 dias da aplicação, a mortalidade dos insetos foi avaliada (Figura 3). A umidade do solo foi mantida em 12%.

Foi utilizado um arranjo fatorial e o teste Tukey foi usado para se comparar a mortalidade e a viabilidade médias a 5% de significância.



Figura 3. Vasos com solo e envelopes com *Galleria mellonella* para se avaliar o deslocamento dos juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7.

RESULTADOS

Viabilidade dos juvenis infectantes

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para esta variável (GL=5; F=2,10; p=0,07) a 5% de significância. As diferentes

pressões aplicadas ao longo de diferentes tempos não diminuíram a viabilidade dos JIs. As mortalidades médias dos JIs obtidas em percentagem após cada tratamento para cada tempo de aplicação se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Viabilidade média em percentagem dos juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 submetidos a diferentes pressões por quatro períodos de tempo.

Pressão	Períodos de avaliação em minutos			
	15	20	25	30
Testemunha	100,00 A	100,00 A	100,00 A	97,14 A
20 psi (137 KPa)	100,00 A	100,00 A	96,66 A	100,00 A
100 psi (689 KPa)	100,00 A	100,00 A	97,14 A	100,00 A
180 psi (1241 KPa)	97,14 A	100,00 A	100,00 A	100,00 A
260 psi (1792 KPa)	95,00 A	100,00 A	100,00 A	95,00 A
340 psi (2344 KPa)	97,50 A	96,00 A	95,00 A	90,95 A
CV	5,83	3,676	6,19	6,43

Para cada tempo de avaliação, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CV: coeficiente de variação.

Nas análises de variância feitas em cada momento de avaliação, não foram encontradas diferenças estatísticas para os tratamentos a 5% de significância (Apêndice 2A).

Patogenicidade dos juvenis infectantes

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos para a variável patogenicidade dos JIs de *H. baujardi* LPP7 quando comparados à testemunha (GL=5; F=1,50; p=0,19) a 5% de significância. Não foi encontrada uma relação entre pressão e percentagem de mortalidade de *G. mellonella*.

Tabela 2. Mortalidade média em percentagem de *Galleria mellonella* pelos juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 submetidos a diferentes pressões por quatro períodos de tempo.

Pressão	Períodos de avaliação em minutos			
	15	20	25	30
Testemunha	64 A	98 A	84 A	80 A
20 psi (137 KPa)	64 A	96 A	82 A	74 A
100 psi (689 KPa)	70 A	72 A	72 A	76 A
180 psi (1241 KPa)	52 A	84 A	74 A	84 A
260 psi (1792 KPa)	60 A	80 A	78 A	90 A
340 psi (2344 KPa)	78 A	84 A	88 A	86 A
CV	38,14	15,66	21,06	20,12

Para cada tempo de avaliação, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CV: coeficiente de variação.

Nas análises de variância feitas em cada período de tempo não foram encontradas diferenças estatísticas para os tratamentos (Apêndice 4A).

Deslocamento dos juvenis infectantes

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tempos durante os quais foram submetidos os tratamentos (GL=5; F=0,94; $p>0,05$). Não foi encontrada uma relação entre uma maior pressão e uma diminuição na percentagem de larvas infectadas. Os menores valores de mortalidade de *G. mellonella* foram encontrados no tempo de 15 minutos para os tratamentos de 260 e 100 psi com valores de 68 e 70 %, respectivamente (Tabela 3). O tratamento que apresentou a maior percentagem de mortalidade foi de 20 psi com 30 minutos com valor de 90%.

Tabela 3. Mortalidade média em percentagem de *Galleria mellonella* pelos juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 submetidos a diferentes pressões por quatro períodos de tempo após o deslocamento.

Pressão	Períodos de avaliação em minutos			
	15	20	25	30
Testemunha	74 A	74 A	86 A	88 A
20 psi (137 KPa)	74 A	74 A	86 A	90 A
100 psi (689 KPa)	70 A	74 A	82 A	84 A
180 psi (1241 KPa)	78 A	82 A	86 A	76 A
260 psi (1792 KPa)	68 A	74 A	80 A	80 A
340 psi (2344 KPa)	76 A	78 A	84 A	80 A
CV	15,04	12,71	11,80	9,58

Para cada tempo de avaliação, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CV: coeficiente de variação.

Nas análises de variância feitas em cada período de avaliação não foram encontradas diferenças estatísticas para os tratamentos em nenhum dos quatro períodos de avaliação (Apêndice 6A).

DISCUSSÃO

De uma forma geral, as pressões utilizadas não afetaram os JIs do nematóide quanto a sua viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento até lagartas de *G. mellonella*.

Este trabalho concorda com Fife et al. (2003), que não encontraram diferenças estatísticas na viabilidade relativa do nematóide *H. bacteriophora* durante 0, 5, 10 e 30 minutos. Também demonstraram que para se manter a viabilidade perto dos 85% era necessário não submeter o nematóide *H. megidis* a pressões superiores a 200 psi e 289 psi para os nematóides *H. bacteriophora* e *Steinernema carpocapsae*, respectivamente.

Dutky (1974) reportou que *Steinernema* spp. pode resistir a pressões acima de 1000 psi. Da mesma forma, Lara e López (2005) avaliaram o efeito de

pressões de 20 e 40 psi sobre o nematóide *Steinernema* spp. e encontraram que estas pressões não afetavam a viabilidade e a patogenicidade do nematóide.

Quanto à patogenicidade sobre larvas de *G. mellonella*, esse trabalho também concorda com Fife et al. (2003), que demonstraram que os NEPs podem manter sua infectividade por uma semana quando são submetidos a altas pressões.

Quanto à capacidade de busca, os nematóides que sofreram pressão por mais tempo apresentaram uma mortalidade absoluta maior. Isto pode sugerir um efeito positivo da pressão que faz com que os nematóides procurem com maior rapidez os insetos alvo.

Os resultados encontrados neste trabalho, de modo geral, levam a afirmar que o nematóide *H. baujardi* LPP7 pode suportar pressões de até 340 psi sem afetar suas capacidades de infecção e busca do hospedeiro. Grewal (1998) afirma que os NEPs de um modo geral não devem ser submetidos a pressões superiores aos 300 psi. Este trabalho reafirma que cada nematóide possui suas características próprias.

Este trabalho fornece informações básicas do efeito de um sistema de aplicação, operado por pressão sobre a viabilidade, patogenicidade e deslocamento dos NEPs. É muito importante conhecer todas as condições para a eficiência e a eficácia de um agente de controle biológico para incrementar sua aceitação e seu uso pelos agricultores.

CONCLUSÕES

Não há diferenças para as variáveis viabilidade, patogenicidade e capacidade de busca dos JIs com respeito à testemunha quando se utilizam pressões entre 20 e 340 psi durante 15, 20, 25 e 30 minutos.

O nematóide entomopatogênico *H. baujardi* LPP7 pode suportar pressões até 340 psi sem ser afetado em sua viabilidade, capacidade de infecção e busca sobre *Galleria mellonella*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Curran, J. (1992) Influence of application method and pest population size on the field efficacy of entomopathogenic nematodes. Supplement to Journal of Nematology 24 (4S): 631-636.
- Dolinski, C., Del Valle, E.E., Stuart, R. (2006a) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. Biological Control 38: 422-427.
- Dolinski, C., Del Valle, E.E., Burla, R.S, Machado, I.R (2006b) Biological traits of two native Brazilian entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae: Rhabditida). Iheringia Zoologia, in press.
- Dutky, S.R. (1974) Nematode parasites. *In*: Maxwell, F.G., Harris, F.A. (Eds.), Proceedings of the Summer Institute on Biological Control of Plant Insects and Diseases. University Press, Jackson, MS, p. 576-590.
- Ehlers, R.U. (1996) Current and future use of nematodes in biocontrol: Practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. Biocontrol Science and Technology. 6: 303 - 316.
- Fife, J.P., Derksen, R.C., Ozkan, H.E., Grewal, P.S. (2003) Effects of pressure differentials on the viability and infectivity of entomopathogenic nematodes. Biological Control 27: 65-72.
- Georgis, R. (1990) Formulation and application technology. *In*: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 173-194.
- Grewal, P.S. (1998) Formulation of entomopathogenic nematodes for storage and application. Japanese Journal of Nematology 28: 68-74.
- Grewal, P.S. (2002) Formulation and application technology. *In*: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 265-288.
- Grewal, P.S., Georgis, R. (1998) Entomopathogenic nematodes. *In*: Hall, F.R., Menn J.J. (Eds.) Biopesticides: Uses and Delivery. Methods Biotechnology. Totowa, Humana Press Inc. p: 15-271.

- Lara, J.C., López, J.C. (2005) Evaluación de diferentes equipos de aspersión para la aplicación de nematodos entomopatógenos. *Revista Colombiana de Entomología* 31(1): 1-4.
- Machado, I. (2006) Isolamento e identificação de nematóides entomopatogênicos provenientes da floresta Amazônica em Monte Negro-Ro. Universidade Estadual Norte Fluminense. Monografia.
- Poinar Jr., G.O., (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In*: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, FL. Press, p. 23-61.
- Shetlar, D.J. (1999) Application methods in different cropping systems. *In*: Polavarapu, S. (Ed.). *Proceedings of workshop: Optimal Use of Insecticidal Nematodes in Pest Management*. New Brunswick, NJ, pp. 31-36.
- White, G.F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.

Capítulo 2. EFEITO DA TEMPERATURA DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO SOBRE OS JUVENIS INFECTANTES DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae)

RESUMO

Fatores ambientais como a temperatura são muito importantes no uso de nematóides entomopatogênicos (NEPs) para o controle biológico, pois podem afetar a sua sobrevivência e infectividade. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a influência da temperatura que pode ser encontrada nos sistemas de irrigação sobre a viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae). Foram avaliadas as variáveis percentagem de viabilidade, percentagem de patogenicidade (sobre larvas de *Galleria mellonella*) e mortalidade de larvas de *G. mellonella* após o deslocamento dos JIs. Foi utilizada a concentração de 10.000 JIs/100 mL de água nas temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45°C. As avaliações foram feitas no início do experimento e aos 60 e 120 minutos. Foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos, já que nas temperaturas acima de 35°C as percentagens de viabilidade, patogenicidade e mortalidade de larvas de *G. mellonella*, após o deslocamento do nematóide foram menores. A menor percentagem absoluta de viabilidade foi encontrada a 45°C (17,33%). Observou-se também uma relação direta entre a temperatura e o tempo de avaliação, pois os maiores efeitos foram encontrados com 120 minutos. Temperaturas entre os 25 e 35°C não afetaram o nematóide nas variáveis avaliadas.

ABSTRACT

Environmental factors such as temperature are very important since they can interfere on entomopathogenic nematodes survival and infectivity. In this work, the objective was to evaluate the influence of the temperature that can be found in an irrigation systems in the viability, pathogenicity and capacity of displacement of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Heterorhabditidae: Nematoda). The variable evaluated were percentage of viability, percentage of pathogenicity (on *Galleria mellonella* larvae) and mortality of *G. mellonella* larvae after the nematode displacement. The dosage of 10.000 JIs/100 mL of water was used at the temperatures of 25, 30, 35, 40, 45°C. The evaluations were done at time zero, 60 and 120 minutes. For all the evaluated variable, there were statistics differences among the treatments. At the highest temperatures the percentage of the all the variables evaluated were the lowest. The lowest absolute viability percentage was found at 45°C (17.33%). A direct relation between the temperature and the evaluation time was also observed, since the highest effect was found at 120 minutes. Temperatures between 25 and 35°C had no effect on the nematode in all the variables evaluated.

INTRODUÇÃO

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) pertencem aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* e são parasitas obrigatórios de insetos. Estes nematóides possuem uma associação simbiote com bactérias patogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. associadas aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, respectivamente (Poinar, 1990). Os juvenis infectantes (JIs), considerados como o único estágio de vida-livre dos NEPs, penetram no hospedeiro através de suas aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos), ou em alguns casos perfurando a cutícula. Após a entrada na hemocele do hospedeiro, JIs liberam as bactérias simbiotes que vão causar a morte do hospedeiro, servir de base para a nutrição dos nematóides e para

defesa contra invasores secundários (Poinar, 1990). Estes nematóides completam seu desenvolvimento e permanecem por duas ou três gerações dentro do hospedeiro. Quando o alimento é esgotado, os JIs saem do hospedeiro à procura de novos hospedeiros (Grewal e Georgis, 1998).

Os NEPs, por serem organismos cujo hábitat natural é o solo, sofrem influência de características neste hábitat como tamanho dos poros, umidade, ausência de oxigênio, temperatura e pH (Barbercheck, 1992). As interações de todos esses fatores podem alterar desde a sobrevivência até a capacidade de infecção do nematóide (Kaya, 1990). Algumas espécies de NEPs podem tolerar temperaturas extremas, mas é possível que a baixa umidade do solo altere sua capacidade de dispersão e persistência (Kung et al., 1991).

As estratégias usadas pelos NEPs para sobreviver em condições ambientais adversas como dessecação, temperaturas extremas, congelamento, radiação ultravioleta, doenças e predação, são pouco conhecidas, podendo estar relacionadas à permanência do nematóide no solo em estado quiescente, a migração para outros locais e a permanência no cadáver dos insetos por períodos mais longos (Glazer, 2002).

O principal limitante para o controle biológico com NEPs é a sensibilidade a condições ambientais extremas (Kaya e Gaugler, 1993). A temperatura influencia vários processos metabólicos dos JIs, principalmente a taxa de utilização de reservas (lipídeos, proteínas e carboidratos), a mobilidade, a sobrevivência, a infectividade, o desenvolvimento e a reprodução (Dunphy e Webster, 1986). A amplitude de temperatura que permite o aproveitamento máximo das potencialidades dos NEPs como agentes de controle biológico é relativamente estreita e a sua infectividade e persistência é comprometida por temperaturas superiores a 30°C e inferiores a 15°C (Kaya, 1990).

Andaló et al. (2005) consideraram as temperaturas de 16 e 20°C como as mais adequadas para armazenamento de *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4 em suspensão aquosa. Para *S. riobrave* e *S. carpocapsae*, observaram manutenção da viabilidade até 60 dias de armazenamento, sendo que após esse período houve um decréscimo principalmente para temperaturas de 24 e 28°C.

Para a aplicação dos NEPs deve-se levar em conta que em geral, estes não devem ser submetidos a temperaturas superiores a 30°C (Grewal, 1998).

Lara e López (2005) aplicaram o nematóide *Steinernema* sp. à temperatura de 25°C, sem encontrar efeito sobre a viabilidade e virulência dos JIs.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de altas temperaturas na viabilidade, patogenicidade e deslocamento dos JIs de *Heterorhabditis baujardi* LPP7, visando sua possível aplicação por um sistema de irrigação para o controle de insetos praga na cultura da goiaba.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização

O experimento foi conduzido no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia, pertencente ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ, de abril a maio de 2006.

Material biológico

Traça pequena dos favos (*Galleria mellonella* L.) (Lepidoptera: Pyralidae). Folhas de papéis com ovos das mariposas de *G. mellonella* foram colocadas em potes de vidro de 30 cm de altura com dieta própria para suas larvas. Os potes foram mantidos a 28°C e 60% de umidade relativa em câmara de germinação, sendo a dieta adicionada quando necessária. Após 4-5 semanas, larvas no último ínstar foram colocadas em vidros menores (10 cm de altura) sem dieta para puparem, virarem mariposas e posteriormente ovopositar em pedaços de papel colocados na tampa dos vidros (Machado, 2006).

***Heterorhabditis baujardi* LPP7.** A produção dos JIs foi feita *in vivo* mediante colocação dos JIs em contato com as larvas de *G. mellonella* no último ínstar, utilizando 200 JIs em 1 mL de água destilada em placas de Petri de 5 cm de diâmetro com papel de filtro (Whatman #1) no fundo. Após a adição dos nematóides, foram colocadas 10 lagartas por placa de Petri e mantidas a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas em câmara de germinação. As larvas que apresentaram sintomatologia típica de infecção por *Heterorhabditis*, ou seja, a cor marrom avermelhada, foram colocadas em outras placas de Petri com papel

filtro estéril (câmara seca) a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 a 8 dias. Após este tempo, as larvas foram colocadas em “armadilhas de White modificadas” (White, 1927), para que os JIs fossem recuperados. Estes foram coletados e armazenados em água a uma temperatura de 16°C até o momento de utilização.

Testes

Foram avaliadas as temperaturas de 25, 30, 35, 40 e 45°C , com a finalidade de determinar em qual destas temperaturas o nematóide começa perder sua viabilidade, patogenicidade e diminuir sua capacidade de busca. Em caixas de isopor simulando um banho-maria, foram colocados 10.000 JIs/100 mL de água e esses foram submetidos às temperaturas acima por um tempo de 1 e 2 horas, que é o tempo máximo estimado que o nematóide ficaria num sistema de irrigação (Figura 1). Cada tratamento foi composto pela temperatura e o tempo empregados, com 10 repetições cada.

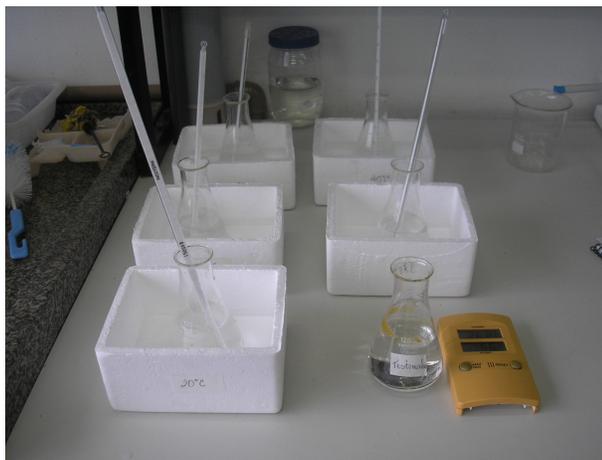


Figura 1. Caixas de isopor usadas para manter os juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 a diferentes temperaturas.

Variáveis avaliadas

Viabilidade dos juvenis infectantes. Em cada tempo foram coletadas de cada tratamento 5 amostras de $50 \mu\text{L}$. Em cada amostra foi observada a viabilidade dos nematóides, a qual foi dada pela relação entre o total de JIs vivos e o total dos JIs por amostra obtida.

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{total de NEPs vivos} / \text{total de NEPs}) \times 100$$

Patogenicidade dos juvenis infectantes. Foi avaliada a patogenicidade dos JIs após cada tratamento sobre larvas da traça pequena dos favos (*G. mellonella*), para o qual foram utilizadas 10 larvas de cada inseto por tratamento com 5 repetições. Infecções foram feitas com $100 \text{ JIs} \times \text{mL}^{-1}$ de cada tratamento e a mortalidade foi avaliada 72 horas após a infecção.

Deslocamento dos juvenis infectantes. Em vasos plásticos (42 x 25 x 12 cm) com solo estéril (2 Kg) foram colocados 5 envelopes feitos com tela metálica medindo (6 x 5 cm) com 10 larvas de *G. mellonella* em cada. A concentração de 10.000 JIs/30 mL de água foi adicionada na extremidade oposta àquela onde os envelopes com insetos foram colocados. Após 10 dias da aplicação, a mortalidade dos insetos foi avaliada. A umidade foi mantida em 12%.

Foi utilizado arranjo fatorial e o teste Tukey foi usado para comparar a mortalidade e a viabilidade médias a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Viabilidade dos juvenis infectantes

Foram encontradas diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos com relação à variável viabilidade dos juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 (GL=5; F=0,94; $p>0,05$).

Nos períodos de exposição de zero e uma hora, o tratamento de 45°C apresentou menor percentagem de viabilidade (10 e 3,33%) (GL=5; F=3,62; $p=0,01$). Já no momento duas horas, os tratamentos 40 e 45°C foram estatisticamente diferentes dos outros (GL=5; F=16,83; $p<0,05$) com 20 e 3,33%, respectivamente (Tabela 1).

Nos períodos zero, uma e duas horas, as maiores viabilidade absolutas encontradas foram nas temperaturas de 35, 30 e 26°C (100%, 90% e 96%, respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1. Percentagem média de viabilidade dos juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 após diferentes períodos de exposição a diferentes temperaturas em água.

Temperatura (°C)	Períodos de avaliação em horas		
	0	1	2
25	80,00 A	76,00 A	88,33 A
30	100,00 A	90,00 A	90,00 A
35	100,00 A	85,00 A	93,33 A
40	80,00 A	80,00 A	20,00 B
45	38,66 B	10,00 B	3,33 B
CV	45,22	49,98	35,00

Para cada tempo de avaliação, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
CV: coeficiente de variação.

Comparando as médias dos tratamentos por Tukey encontraram-se 2 grupos diferentes, tendo-se 25°C a 35°C como o melhor intervalo de temperatura para o nematóide *H. baujardi* LPP7. As temperaturas que mais afetaram a viabilidade dos JIs foram de 40 e 45°C após duas horas.

Todos os tratamentos apresentaram uma tendência em diminuir a viabilidade dos JIs através do tempo, com exceção da testemunha, a qual apresentou um incremento na percentagem de viabilidade.

Patogenicidade dos juvenis infectantes

Foram encontradas diferenças estatísticas somente nos tratamentos 40 e 45°C, por um período de duas horas (GL=5; F=2,87; p=0,03). Foi encontrada uma relação negativa entre alta temperatura e percentagem de mortalidade das larvas de *G. mellonella*.

Pelo teste de comparação de médias, foram encontrados dois grupos diferentes entre os tratamentos avaliados após duas horas (Tabela 2). As temperaturas de 40 e 45°C para duas horas afetaram o nematóide *H. baujardi* LPP7 na capacidade de matar larvas de *G. mellonella*. Esses dados não concordam com Grewal (1998), que preconizou que os nematóides entomopatogênicos em geral não suportam temperaturas superiores a 30°C nos tanques dos equipamentos de aspersão.

Lara e López (2005) encontraram que o nematóide *Steinernema* sp. à temperatura de 25°C não perdia sua viabilidade e capacidade de infecção em larvas de *G. mellonella*. Este trabalho concorda com Dolinski et al. (2006), que mostrou que o nematóide *H. baujardi* LPP7, apesar de matar larvas de *G. mellonella* a temperaturas de 25 a 34°C, tinha sua produção de JIs afetada, a partir de 31°C.

Tabela 2. Percentagem média da mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* pelos juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 submetidos a diferentes temperaturas por três períodos de tempo.

Temperatura (°C)	Períodos de avaliação em horas		
	0	1	2
25	74 A	76 A	74 A
30	68 A	64 A	62 A
35	66 A	84 A	74 A
40	52 A	64 A	44 B
45	62 A	32 A	30 B
CV	41,14	47,23	43,52

Para cada tempo de avaliação, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CV: coeficiente de variação.

Deslocamento dos juvenis infectantes

Foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos para a variável deslocamento de juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7 (GL=5; F=15,33; p<0,05). Encontrou-se uma relação inversa entre alta temperatura e menor percentagem de larvas mortas após o deslocamento dos JIs.

Pelo teste de comparação de médias foram estabelecidos três grupos diferentes entre os tratamentos para o momento de avaliação duas horas (GL=5; F=8,87; p<0,05). Não se encontrou efeito sobre o nematóide *H. baujardi* LPP7 em sua capacidade de deslocamento até larvas de *G. mellonella* nas temperaturas entre os 25 e 35°C para os três momentos de avaliação. A temperatura que mais afetou a capacidade de infecção dos JIs foi a temperatura de 45°C (Tabela 3).

Tabela 3. Percentagem média de mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* pelos juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 após o deslocamento submetidos a diferentes temperaturas por três períodos de tempo.

Temperatura (°C)	Períodos de avaliação em horas		
	0	1	2
25	50 A	52 A	56 A
30	56 A	54 A	56 A
35	50 A	52 A	48 A
40	34 A	34 A	24 B
45	28 A	20 A	8 C
CV	40,67	53,13	36,88

Para cada tempo de avaliação, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CV: coeficiente de variação.

No caso da temperatura de 25°C, observou-se um efeito positivo da mesma sobre o deslocamento dos JIs, e portanto, um aumento na percentagem de mortalidade de larvas de *G. mellonella*. Lara et al. (2004) não encontraram efeito negativo na viabilidade e capacidade de busca dos nematóides *Heterorhabditis* sp. e *Steinernema* sp. sobre populações de broca no solo com temperaturas de 26°C. Em geral, quanto, mais tempo sob altas temperaturas, menor é a capacidade de busca dos JIs.

CONCLUSÕES

Há diferenças estatísticas entre os tratamentos para as variáveis viabilidade, patogenicidade e deslocamento dos juvenis infectantes.

O nematóide entomopatogênico *H. baujardi* LPP7 pode suportar temperaturas até 35°C sem ser afetado em sua viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento até larvas de *G. mellonella*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andaló, V., Moino Jr., A, Molina, J.P., Cavalvanti, R.S., Carvalho, F.A. (2005) Efeito da temperatura e concentração na sobrevivência de nematóides entomopatogênicos em condições de armazenamento visando seu uso no controle microbiano de pragas. *Boletim de Sanidad Vegetal de Plagas* 31: 253 – 265.
- Barbercheck, M.E. (1992) Effects of soil physical factors on biological control agents of soils insect pests. *Florida Entomologist* 75 (4): 539 – 548.
- Dolinski, C., Del Valle, E.E., Stuart, R. (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control* 38: 422-427.
- Dunphy, G.B., Webster, J.M. (1986) Temperature effects on the growth and virulence of *Steinernema feltiae* strains and *Heterorhabditis heliothidis*. *Journal of Nematology* 18: 270-272.
- Glazer, I. (2002). Survival biology. *In: Gaugler, R. (Ed.) Entomopathogenic Nematology*. CABI, 169-188.
- Grewal, P.S. (1998) Formulation of entomopathogenic nematodes for storage and application. *Japanese Journal of Nematology* 28: 68-74.
- Grewal, P.S., Georgis, R. (1998) Entomopathogenic nematodes. *In: Hall, F.R., Menn J.J. (Eds.) Biopesticides: Uses and Delivery. Methods Biotechnol.* Totowa, Humana Press Inc. 5: 15-271.
- Kaya, H.K. (1990) Soil Ecology: *In: Entomopathogenic nematodes in biological control of insect pests*. H.Kaya (Edit.) Boca Ratón, CRC Press, p. 93-115.
- Kaya, H.K., Gaugler, R. (1993) Entomopathogenic nematodes. *In: Annual Review of Entomology*. Palo Alto, Califórnia 38: 181 – 206.
- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K. (1991) Effects of soil temperature, moisture and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 242 - 249.
- Lara, J.C. López, J.C., Bustillo, A.E. (2004) Efecto de entomonemátodos sobre poblaciones de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera:

- Scolytidae), en frutos en el suelo. *Revista Colombiana de Entomologia* 30(2): 179-185
- Lara, J.C., López, J.C. (2005) Evaluación de diferentes equipos de aspersión para la aplicación de nematodos entomopatógenos. *Revista Colombiana de Entomología* 31(1): 1-4
- Machado, I. (2006) Isolamento e identificação de nematóides entomopatogênicos provenientes da floresta Amazônica em Monte Negro-Ro. Universidade Estadual Norte Fluminense. Monografía.
- Poinar, Jr. G.O., (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In*: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, FL. Press, p. 23-61.
- White, G.F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.

**Capítulo 3. EFEITO DO ÓLEO MINERAL ASSIST® SOBRE OS JUVENIS
INFECTANTES DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda:
Heterorhabditidae)**

RESUMO

Entre os principais problemas que os nematóides entomopatogênicos (NEPs) possuem no momento de sua aplicação no solo, está a sensibilidade a condições ambientais extremas. Por isso, tentando dar ao nematóide proteção contra tais condições, testou-se o efeito do óleo mineral ASSIST® (BASF SA) sobre os juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Heterorhabditidae: Nematoda), em concentrações de 0 % (testemunha), 0,5%, 1% e 2%, durante 0, 3, 6, 9 e 12 horas. Depois de cada tempo foram avaliadas as variáveis viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento dos JIs. Foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos para as três variáveis avaliadas. Para a variável viabilidade dos JIs observou-se uma relação negativa entre a concentração do óleo e o tempo de avaliação. Os menores valores de viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento após deslocamento foram encontrados quando se usou 2% de óleo por 12 horas. Este trabalho mostrou que a mistura de JIs de *H. baujardi* LPP7 com o óleo mineral ASSIST® não é recomendável, pois este, em geral, diminui a viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento dos nematóides através do tempo.

ABSTRACT

Among many problems that entomopathogenic nematodes (EPNs) have during the application time in the ground, sensitivity to extreme environment conditions is the main one. Because of that, it is important to give the nematode some protection against such conditions. The effect of mineral oil ASSIST® (BASF SA) was tested on the infective juveniles (IJs) of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Heterorhabditidae: Nematoda) in concentrations of 0% (control), 0,5%, 1% and 2%, during 0, 3, 6, 9 and 12 hours. After each time the variables viability, pathogenicity and capacity of displacement of the IJs were evaluated. There were statistical differences among the treatments for the three evaluated variables. For the variable IJs viability, a negative correlation was observed between the oil concentration and the evaluation time. The lowest values of viability, pathogenicity and capacity of displacement of the IJs were found in the highest concentration after 12 hours of nematode contact with the oil. These results demonstrated that the mixture of *H. baujardi* LPP7 IJs with mineral oil ASSIST® is not recommendable since it diminishes the viability, pathogenicity and capacity of displacement of nematodes.

INTRODUÇÃO

Os nematóides entomopatogênicos (Steinernematidae e Heterorhabditidae) são parasitos de insetos e matam seu hospedeiro devido a bactérias que eles carregam no sistema digestivo. No caso dos steinernematídeos carregam *Xenorhabdus* spp. e os heterorhabditídeos carregam *Photorhabdus* spp. (Adams e Nguyen, 2002; Poinar, 1990). Os juvenis infectantes (JIs), considerados como o único estágio de vida-livre dos NEPs, penetram no hospedeiro através de suas aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos), ou em alguns casos perfurando a cutícula com um “dente” localizado na extremidade anterior do JI. Estes nematóides completam seu desenvolvimento e permanecem 2 ou 3

gerações dentro do hospedeiro. Quando o alimento acaba, os JIs saem do hospedeiro-cadáver à procura de novos hospedeiros (Grewal e Georgis, 1998).

Os nematóides por serem habitantes naturais do solo, se constituem em agentes com grande potencial para ter sucesso como organismos biocontroladores (Shapiro-Ilan et al., 2005). Existe um amplo número de tecnologias viáveis para a aplicação de NEPs no solo, desde em água com mangueira até sistemas de irrigação (Georgis, 1990; Grewal, 2002).

Várias formulações para a aplicação de NEPs ao solo são usadas, incluindo carvão ativado, géis de poliacrilamida, argilas, esponjas de poliuretano e vermiculita. As formulações podem aumentar a persistência dos nematóides devido a uma redução no metabolismo e imobilização, o qual pode estar acompanhado por refrigeração do produto ou dessecação parcial dos JIs (Georgis, 1990; Georgis et al., 1995). Algumas formulações, como as argilas, têm a capacidade de aumentar o tempo de atividade do nematóide no solo depois da aplicação, protegendo os NEPs contra as condições ambientais adversas (Kaya e Nelsen, 1985; Capinera et al., 1988; Georgis et al., 1989; Renn, 1998; Navon et al., 2002). Formulações que são baseadas na não dessecação dos NEPs, como pasta ou esponja conseguem ter altas viabilidades, mas não podem ser guardadas em altas densidades, o que se constitui numa limitação para aplicações em larga escala (Shapiro-Ilan et al., 2002).

Alguns adjuvantes usados na aplicação de NEPs são Triton X100 (BDH, Merck Ltd., Dorset, UK), Glicerol, Croduvant, Crovol L27 e Crovol L40 (Croda Chemicals Ltd.), todos eles numa concentração de 2 até 4% (v/v) (Mason et al., 1999).

As formulações líquidas de nematóides devem ser aplicadas entre 48 e 72 horas após a diluição para se evitar problemas com a dessecação e não se ter efeitos negativos na virulência dos NEPs (Georgis et al., 1995). Trabalhos para o controle da broca do café com nematóides entomopatogênicos demonstraram que a aplicação destes com água e um óleo agrícola (Carrier) melhorou a capacidade dos NEPs de resistir às condições ambientais e não afetou em nada a viabilidade e capacidade de infecção dos mesmos (Lara et al., 2004).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do óleo mineral na viabilidade, patogenicidade e deslocamento dos JIs de *Heterorhabditis baujardi*

LPP7, visando sua possível aplicação por meio de um sistema de irrigação para o controle de insetos praga na cultura da goiaba.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização

O experimento foi conduzido no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia, pertencente ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ, de fevereiro a março de 2006.

Material biológico

Traça pequena dos favos (*Galleria mellonella* L.) (Lepidoptera: Pyralidae). Folhas de papéis com ovos das mariposas de *G. mellonella* foram colocadas em potes de vidro de 30 cm de altura com dieta própria para suas lagartas. Os potes foram mantidos a 28°C e 60% de umidade relativa em câmara de germinação, sendo a dieta adicionada quando necessária. Após 4-5 semanas, lagartas no último ínstar foram colocadas em vidros menores (10 cm de altura) sem dieta para puparem, virarem mariposas e posteriormente ovopositar em pedaços de papel colocados na tampa dos vidros (Machado, 2006).

***Heterorhabditis baujardi* LPP7.** A produção dos JIs foi feita *in vivo* mediante colocação dos JIs em contato com as larvas de *G. mellonella* no último ínstar, utilizando 200 JIs em 1 mL de água destilada em placas de Petri de 5 cm de diâmetro com papel de filtro (Whatman #1) no fundo. Após a adição dos nematóides, foram colocadas 10 lagartas por placa de Petri e mantidas a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas em câmara de germinação. As lagartas que apresentaram sintomatologia típica de infecção por *Heterorhabditis*, ou seja, a cor marrom avermelhada, foram colocadas em outras placas de Petri com papel filtro estéril (câmara seca) a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 a 8 dias. Após este tempo, as larvas foram colocadas em “armadilhas de White modificadas” (White, 1927), para que os JIs fossem recuperados. Estes foram

coletados e armazenados em água a uma temperatura de 16°C até o momento de utilização.

Testes

Foi utilizado o óleo mineral ASSIST® (BASF SA) misturado com os JIs de *H. baujardi* LPP7 foram misturados ao óleo mineral nas seguintes concentrações: concentração 1: 0,5 mL de óleo x L⁻¹ de água; concentração 2: 1 mL de óleo x L⁻¹ de água e concentração 3: 2 mL de óleo x L⁻¹ de água. Quinhentos mil JIs de *H. baujardi* LPP7 foram armazenados em água com cada uma das concentrações de óleo mineral, sendo a testemunha os JIs sem óleo mineral (Figura 1). Os JIs foram avaliados após 0, 3, 6, 9 e 12 horas de contato com as diferentes concentrações de óleo mineral.



Figura 1. Erlenmeyers com as diferentes concentrações do óleo mineral ASSIST® (BASF SA) e os juvenis infectantes de *H. baujardi* LPP7.

Variáveis avaliadas

Viabilidade dos juvenis infectantes. Em cada tempo de avaliação foram coletadas de cada tratamento 5 amostras de 50 µL. Em cada amostra foi observada a viabilidade dos nematóides, a qual foi dada pela relação entre o total de JIs vivos e o total dos JIs por amostra obtida.

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{total de NEPs vivos} / \text{total de NEPs}) \times 100$$

Patogenicidade dos juvenis infectantes. Foi avaliada a patogenicidade dos JIs após cada tratamento sobre as larvas da traça pequena dos favos para o

qual foram utilizadas 10 larvas de cada inseto por tratamento com 5 repetições. Infecções foram feitas com $100 \text{ JIs} \times \text{mL}^{-1}$ de cada tratamento e a mortalidade foi avaliada 72 horas após da infecção.

Deslocamento dos juvenis infectantes. Em vasos plásticos (42 x 25 x 12 cm) com solo estéril (2 Kg) foram colocados 5 envelopes de tela metálica medindo (6 x 5 cm) com 10 larvas de *G. mellonella* em cada. A concentração de 10.000 JIs/30 mL de água foi adicionada na extremidade oposta àquela onde os envelopes com insetos foram colocados. Após 10 dias da aplicação a mortalidade dos insetos foi avaliada.

Foi utilizado o delineamento em arranjo fatorial e o teste Tukey foi usado para comparar as mortalidades e a viabilidades médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Viabilidade dos juvenis infectantes

Foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos para a variável viabilidade dos juvenis infectantes (GL=3; F=5,30; p=0,0022). Foi observada também uma relação negativa entre o aumento na concentração do óleo e o momento de avaliação (Tabela 1).

Todos os tratamentos apresentaram uma tendência a diminuir a viabilidade dos JIs através do tempo, com exceção da testemunha, a qual apresentou um incremento entre 0 e 6 horas, depois deste tempo a viabilidade também diminuiu. De um modo geral, quando se utilizou óleo mineral, a viabilidade dos JIs de *H. baujardi* LPP7 diminuiu através do tempo.

Tabela 1. Percentagem média de viabilidade dos juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 após imersão em óleo mineral por cinco períodos de avaliação.

Óleo (%)	Períodos de avaliação em horas				
	0	3	6	9	12
0	19,14 A	26,60 A	30,66 A	25,56 A	13,27 A
0,5	22,21 A	22,44 A	2,89 B	0,60 B	2,53 B
1,0	25,15 A	15,30 B	4,17 B	0,48 B	0,78 B
2,0	19,43 A	5,84 C	2,79 B	0,40 B	0,00 B
CV	30,91	30,54	41,48	90,84	44,23

Para cada momento de avaliação, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
CV: coeficiente de variação.

Pelo teste de comparação de médias surgiram 2 grupos diferentes entre os tratamentos para os momentos de avaliação a três horas (GL=3; F=14,38; $p<0,05$), a seis horas (GL=3; F=53,11; $p<0,05$), a nove horas (GL=3; F=20,80; $p<0,05$) e a doze horas (GL=3; F=56,60; $p<0,05$), encontrando-se que as diferentes concentrações do óleo afetam negativamente a viabilidade do nematóide *H. baujardi* LPP7 (Tabela 1).

Patogenicidade dos juvenis infectantes

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos para a variável patogenicidade dos JIs de *H. baujardi* LPP7 nos diferentes momentos de avaliação. Foi encontrada uma relação negativa entre a concentração de óleo a 2% e a percentagem de mortalidade de juvenis infectantes.

Os dados anteriores descartam este óleo mineral como parte de uma formulação líquida para nematóides. Segundo Georgis et al. (1995) as formulações líquidas de nematóides não devem ter efeitos negativos na virulência dos JIs.

Foi feita análise de variância para cada momento de avaliação e não se encontrou diferenças estatísticas entre os tratamentos, que pode ser devido à alta variabilidade dos dados (Tabela 2). Esses dados concordam com os resultados encontrados por Lara et al. (2004) em trabalhos para o controle da broca do café com *Steinernema* sp., esses autores demonstraram que a aplicação de JIs em água e um óleo agrícola (Carrier) melhorou a capacidade dos NEPs a resistir às

condições ambientais e não afetou nem a viabilidade, nem a capacidade de infecção dos mesmos.

Tabela 2. Percentagem média de mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* por juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 após imersão em óleo mineral por cinco períodos de avaliação.

Óleo (%)	Períodos de avaliação em horas				
	0	3	6	9	12
0	36	36	40	60	36
0,5	36	36	20	40	28
1,0	28	28	12	20	20
2,0	44	32	28	24	8
CV	70,27	56,69	90,33	90,86	113,37

CV: coeficiente de variação.

Deslocamento dos juvenis infectantes

Foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos para a variável mortalidade de larvas de *G. mellonella* após o deslocamento dos JIs de *H. baujardi* LPP7 (GL=3; F=54,84; $p < 0,05$). Encontrou-se uma relação negativa entre a concentração do óleo e a diminuição na percentagem de larvas infectadas após o deslocamento dos JIs após 12 horas de exposição.

Os menores valores de mortalidade de larvas de *G. mellonella* foram encontrados nos tratamentos de 0,5, 1 e 2% após 12 horas de contato dos nematóides com o óleo (GL=3; F=10,00; $p < 0,05$). O tratamento que causou maior percentagem de mortalidade absoluta foi com 0,5% de óleo mineral após 3 horas de contato (GL=3; F=0,68; $p > 0,05$) (Tabela 3).

Pelo teste de comparação de médias formaram-se dois grupos diferentes entre os tratamentos (Tabela 3), sendo encontrado um efeito negativo sobre a capacidade de busca do nematóide após 9 horas de contato com o óleo mineral, independentemente da concentração utilizada.

Tabela 3. Percentagem média de mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* por juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 após imersão em óleo mineral por cinco períodos de avaliação após deslocamento.

Óleo (%)	Períodos de avaliação em horas				
	0	3	6	9	12
0	12 A	24 A	16 A	24 A	20 A
0,5	8 A	28 A	24 A	4 A	0 B
1,0	8 A	24 A	24 A	4 A	0 B
2,0	4 A	12 A	8 A	8 A	0 B
CV	131,10	85,03	76,57	118,32	141,42

Para cada momento de avaliação, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
CV: coeficiente de variação.

CONCLUSÕES

O nematóide entomopatogênico *H. baujardi* LPP7, não deve ser misturado ao óleo mineral Assist® nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%, por mais de três horas.

Devem-se avaliar outros óleos minerais e outras concentrações, pois é muito importante tentar proteger os nematóides contra as condições ambientais, que em alguns casos podem ser muito adversas. Disso pode depender o êxito ou fracasso de um programa de controle biológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, B.J., Nguyen, K.B. (2002) Taxonomy and Systematics *In*: Gaugler, R. (Ed.) Entomopathogenic Nematology. CABI, New York. Press, p. 1-33
- Capinera, J.L., Pelissier, D., Menout, G.S., Epsky, N.D. (1988) Control of black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae), with entomogenous

- nematodes (Nematoda: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 427-435.
- Georgis, R. (1990) Formulation and application technology. *In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 173-194.
- Georgis, R., Dunlop, D.B, Grewal, P.S. (1995) Formulation of entomopathogenic nematodes. *In: Hall, F. R., Barry, J. W. (Eds.) Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 197-205.
- Georgis, R., Wojetech, W.F., Shetlar, D.J. (1989) Use of *Steinernema feltiae* in a bait for the control of black cutworms (*Agrotis ipsilon*) and tawny mole crickets (*Scapteriscus vicinus*). *Fla. Entomology* 72: 203-204.
- Grewal, P.S., Georgis, R. (1998) Entomopathogenic nematodes. *In: Hall, F.R., Menn J.J. (Eds.) Biopesticides: Uses and Delivery*. Methods Biotechnology. Totowa, Humana Press Inc. p: 15-271.
- Grewal, P.S. (2002) Formulation and application technology. *In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 265-288.
- Kaya, H.K., Nelsen, C.E. (1985) Encapsulation of steinernematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environment Entomology* 14: 572-574.
- Lara, J.C. López, J.C., Bustillo, A.E. (2004) Efecto de entomonemátodos sobre poblaciones de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), en frutos en el suelo. *Revista Colombiana de Entomología* 30(2): 179-185
- Machado, I. (2006) Isolamento e identificação de nematóides entomopatogênicos provenientes da floresta Amazônica em Monte Negro-Ro. Universidade Estadual Norte Fluminense. Monografia.
- Mason, J., Matthews, G., Wright, D. (1999) Evaluation of spinning disc technology for the application of entomopathogenic nematodes against a foliar pest. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 282-288.
- Navon, A., Nagalakshmi, V.K., Levski, S., Salame, L., Glazer, I. (2002) Effectiveness of entomopathogenic nematodes in an alginate gel

- formulation against lepidopteran pests. *Biocontrol Science Technology* 12: 737-746.
- Poinar, Jr. G.O., (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, FL. Press, p. 23-61.
- Renn, N. (1998) The efficacy of entomopathogenic nematodes for controlling housefly infestations of intensive pig units. *Medicine Veterinary Entomology* 12: 46-51.
- Shapiro-Ilan, D.I., Gouge, D.H., Piggott, S.J., Fife, J.P. (2005) Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological control*. Article in press.
- Shapiro-Ilan, D.I., Gouge, D.H., Koppenhofer, A.M. (2002) Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. *In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 333-356.
- White, G.F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.

Capítulo 4. AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR MICROASPERSÃO PARA A APLICAÇÃO DOS JUVENIS INFECTANTES DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae)

RESUMO

Fatores como temperatura, pressão e filtros num sistema de irrigação são muito importantes, pois podem afetar a viabilidade e a infectividade dos nematóides entomopatogênicos. Nesse trabalho foi avaliada a influência das condições geradas por um sistema de irrigação por microaspersão na viabilidade, patogenicidade e capacidade de deslocamento dos juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Heterorhabditidae: Nematoda). A percentagem de viabilidade dos JIs foi avaliada imediatamente após a passagem dos JIs pelo sistema de irrigação. A percentagem de mortalidade e a percentagem de deslocamento até larvas de *Galleria mellonella* foram avaliadas em vasos. Em outro experimento à campo, foi avaliada a percentagem de mortalidade de *G. mellonella* com três dosagens do nematóide *H. baujardi* LPP7 (100.000, 300.000 e 500.000 JIs/ árvore). Nesse último ensaio, a avaliação foi feita 5 dias após a aplicação dos nematóides e a testemunha foi aplicação de água sem nematóides. A viabilidade dos nematóides após a passagem pelo sistema não apresentou diferenças estatísticas comparado com a testemunha. A mortalidade de *G. mellonella* no laboratório foi de 77,50 e 83,75% para o tratamento e a testemunha, respectivamente. Da mesma forma, a mortalidade após o deslocamento dos JIs foi de 82 e 85% para os JIs do tratamento e os da testemunha, respectivamente. As avaliações à campo com as diferentes dosagens apresentaram diferenças

estatísticas entre os tratamentos ($p < 0,05$) e se observou uma maior mortalidade nas maiores dosagens de nematóides, com valores máximos de 28,35% e 37% em cada uma das duas repetições do experimento. De modo geral, pode-se afirmar que este sistema de microaspersão é adequado para a aplicação dos IJs desse nematóide sem afetar sua viabilidade, patogenicidade e capacidade de busca até o inseto alvo.

ABSTRACT

Factors as temperature, pressure and filters in an irrigation system are very important, since they may affect entomopathogenic nematodes viability and infectivity. In this work, it was evaluated the influence of the conditions generated in a micro aspersion irrigation system on the viability, pathogenicity and capacity of displacement of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Heterorhabditidae: Nematoda) infective juveniles (IJs). The IJs viability was evaluated after the nematodes passed through the irrigation system. Infectivity in *Galleria mellonella* larvae, and larvae mortality after the IJs displacement were evaluated in vases. In another field experiment, the mortality of *G. mellonella* larvae in three nematode dosages (100,000, 300,000 and 500,000 IJs/tree) was evaluated. The evaluation of this last assay was done 5 days after the nematodes application, and control was water applied without nematodes. The nematodes viability after passing through the system did not show statistical differences (89.47% and 91.84% for the treatment and the control, respectively). *G. mellonella* larvae mortality under laboratory conditions was 77,50 and 83,75% for the treatment and the control, respectively. Same way, mortality after the displacement of the IJs was of 82 and 85% for the treatment and the control, respectively. There were statistic differences among the different dosages ($p < 0,05$) and it was observed a higher mortality in the highest nematode dosages 28,35% and 37% in each one of the two experiment repetitions). In general, it can be concluded that this micro aspersion system is adjusted for applying this nematode without affecting its viability, pathogenicity and capacity of search to the insect.

INTRODUÇÃO

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) pertencem aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* (Heterorhabditidae e Steinernematidae: Nematoda) e são parasitas obrigatórios de insetos. Os juvenis infectantes (JIs), considerados como o único estágio de vida-livre dos NEPs, penetram no hospedeiro através de suas aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos), ou em alguns casos perfurando a cutícula. Após a entrada na hemocele do hospedeiro, JIs liberam as bactérias simbiotes que vão causar a morte do hospedeiro, servir de base para a nutrição dos nematóides e para defesa contra invasores secundários (Poinar, 1990).

Os NEPs vêm sendo isolados de solos em diferentes ecossistemas do mundo, desde o ártico até os trópicos, apresentando um vasto leque de hospedeiros (Poinar, 1990; Hominick et al., 1996). A variedade de espécies e linhagens geográficas os posiciona como organismos com potencial uso no controle de pragas, especialmente no solo. Podendo assim, substituir os inseticidas por sua segurança e facilidade de aplicação (Capinera e Epsky, 1992).

Nas últimas décadas, os NEPs têm evidenciado seu potencial como agentes biológicos para o controle de insetos-praga. NEPs são considerados uma ferramenta efetiva para ser incorporada em programas de manejo integrado de pragas (MIP), representando uma parte importante dos chamados biocontroladores (Ehlers, 1996).

A maioria dos sistemas de aspersão não promove pressão suficiente para causar dano físico aos nematóides, mas não se sabe se a passagem pelo sistema afetaria. Em geral, os nematóides não devem ser submetidos a pressões superiores a 300 psi nos tanques dos equipamentos e a temperaturas superiores de 30°C (Grewal, 1998).

Nematóides requerem que os primeiros 25 a 65 cm do solo sejam bem irrigados para permitir seu movimento no solo (Shetlar, 1999). É importante também levar em conta que temperaturas do solo entre 12 e 28 °C são consideradas favoráveis para a aplicação de nematóides entomopatogênicos (Kaya, 1990).

Microaspersão do nematóide *Heterorhabditis* sp. linhagem T390 ao nível da superfície do solo foi mais efetiva do que quando adicionando na irrigação por

gotejamento. Estudos à campo têm mostrado a necessidade de se aplicar os NEPs com um maior quantidade de água, para que os NEPs não sofram dessecação (Curran, 1992). Duncan et al. (1999) sugeriram que a distribuição desigual no sistema de irrigação, por exemplo, microaspersão pode ser solucionado com uma adição extra de aspersores nas linhas.

Nilsson e Gripwall (1999) pesquisaram a influência do sistema de aplicação sobre a viabilidade de *Steinernema feltiae* (Filipjev) com altas pressões e não reportaram influência significativa sobre a viabilidade, mas observaram uma diminuição na viabilidade a qual provavelmente foi devida a um estresse gerado pela passagem dos nematóides pelo rotor e o aumento de temperatura na água.

Lara e López (2005) mostraram que o nematóide *Steinernema* sp. pode ser aplicado com equipamentos manuais e de pressão previamente definida até 40 psi sem causar nenhum dano físico e sem diminuir sua capacidade de infecção.

Tendo em conta as considerações anteriores, JIs de *H. baujardi* LPP7 foram aplicados por um sistema de microaspersão em uma plantação de goiaba com o objetivo de avaliar o efeito deste sistema na viabilidade, infectividade e deslocamento dos JIs.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização

O experimento foi conduzido no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia, e no pomar de goiaba pertencente ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes, RJ, de junho a agosto de 2006.

Material biológico

Traça pequena dos favos (*Galleria mellonella* L.) (Lepidoptera: Pyralidae). Folhas de papéis com ovos das mariposas de *G. mellonella* foram colocadas em potes de vidro de 30 cm de altura com dieta própria para suas lagartas. Os potes foram mantidos a 28°C e 60% de umidade relativa em câmara

de germinação, sendo a dieta adicionada quando necessária. Após 4-5 semanas, lagartas no último ínstar foram colocadas em vidros menores (10 cm de altura) sem dieta para puparem, virarem mariposas e posteriormente ovopositar em pedaços de papel colocados na tampa dos vidros (Machado, 2006).

***Heterorhabditis baujardi* LPP7.** A produção dos JIs foi feita *in vivo* mediante colocação dos JIs em contato com as larvas de *G. mellonella* no último ínstar, utilizando 200 JIs em 1 mL de água destilada em placas de Petri de 5 cm de diâmetro com papel de filtro (Whatman #1) no fundo. Após a adição dos nematóides, foram colocadas 10 lagartas por placa de Petri e mantidas a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas em câmara de germinação. As lagartas que apresentaram sintomatologia típica de infecção por *Heterorhabditis*, ou seja, a cor marrom avermelhada, foram colocadas em outras placas de Petri com papel filtro estéril (câmara seca) a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 a 8 dias. Após este tempo, as larvas foram colocadas em “armadilhas de White modificadas” (White, 1927), para que os JIs fossem recuperados. Estes foram coletados e armazenados em água a uma temperatura de 16°C até o momento de utilização.

Sistema de irrigação

O sistema utilizado foi de microaspersão com as seguintes características: bomba de $\frac{1}{4}$ cv (cavalos vapor), monofásica, 3500 rpm, pressão entre 15 e 25 psi e diâmetro do rotor de 96 mm; microaspersores: tamanho do bocal 1 mm, pressão entre 20 e 35 psi, vazão entre 44 e 56 L/h e raio efetivo de molhamento 2,8 m. Para as aplicações com os nematóides foi retirado o filtro na saída da bomba, para não danificar os JIs.

Além disso, foi determinado o Coeficiente de Uniformidade de Christiansen (CUC), que é o parâmetro que descreve a uniformidade de irrigação, sendo usado para medir a variabilidade espacial da lâmina de água aplicada pelo sistema de irrigação (Mantovani et al., 2006).

Testes

Experimento 1. Os JIs de *H. baujardi* LPP7 foram submetidos às condições geradas pelo sistema de irrigação por microaspersão e foram avaliados possíveis danos mecânicos e comportamentais nos JIs. Para isto foi utilizado um

sistema de irrigação com 4 linhas, cada uma com 7 aspersores (total de 28 plantas). Uma concentração de 100.000 JIs x L⁻¹ de água foi aplicada no sistema e em 12 microaspersores foram coletadas amostras de 500 mL da mistura de água mais JIs (Figura 1). Como testemunha utilizou-se a mesma concentração de nematóides por volume de água sem passar pelo sistema. As amostras foram levadas ao laboratório para a contagem dos JIs e avaliação das variáveis.

Viabilidade dos juvenis infectantes. De cada repetição foram tiradas 5 amostras de 100 µL. Em cada amostra foi avaliada a viabilidade dos nematóides, a qual foi dada pela relação entre o total de JIs vivos e o total dos JIs por amostra obtida.

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{total de NEPs vivos} / \text{total de NEPs}) \times 100$$



Figura 1. Garrafas plásticas utilizadas para a coleta de água com nematóides na saída dos microaspersores do sistema de irrigação.

Patogenicidade dos juvenis infectantes. Foi avaliada a patogenicidade dos JIs após a passagem pelo sistema de irrigação sobre larvas da traça pequena dos favos (*G. mellonella*) para o qual foram utilizadas 10 larvas com 8 repetições para o tratamento e 8 para a testemunha. Infecções foram feitas com uma concentração 100 JIs/mL e a mortalidade foi avaliada 72 horas após da infecção.

Deslocamento dos juvenis infectantes. Em vasos de plástico (42 x 25 x 12 cm) com solo estéril (2 Kg) foram colocadas as larvas da traça pequena dos favos a uma distância de 40 cm dos nematóides. Em cada vaso foram colocados 5 envelopes de tela (6 x 5 cm) com 10 larvas em cada, com um total de 6

repetições. A concentração de 10.000 JIs/30 mL de água foi adicionada na extremidade oposta àquela onde os insetos foram colocados. A mortalidade dos insetos foi avaliada 10 dias após a aplicação dos JIs.

Para este primeiro experimento, foi utilizado como testemunha a mesma concentração de nematóides, sem passar pelo sistema de irrigação. Para os testes estatísticos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. O teste Tukey foi usado para comparar as mortalidades e a viabilidades médias.

Experimento 2. Nas mesmas linhas utilizadas anteriormente foram feitas quatro covas de 20 cm x 20 cm x 20 cm ao redor de cada microaspersor. As covas foram forradas com tela nas quais foram colocadas 10 larvas de *G. mellonella* em cada (Figura 2). Foram avaliadas as concentrações de 100.000, 300.000 e 500.000 JIs de *H. baujardi* LPP7 e como testemunha foi aplicada só água. O número de plantas por tratamento foi de 7 com 28 repetições por tratamento. A mortalidade das larvas foi avaliada 5 dias após a aplicação dos JIs.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. O teste Tukey foi usado para comparar as mortalidades e a viabilidades médias. Este experimento foi repetido uma vez.



Figura 2. A. Telas utilizadas para conter as lagartas de *Galleria mellonella* no solo durante a aplicação dos JIs de *Heterorhabditis baujardi* LPP7. B. Disposição das telas nas covas ao redor do microaspersor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi calculado o Coeficiente de Uniformidade de Christiansen (CUC), sendo este de 94,6%, o qual significa que aproximadamente 94,6% da área receberam uma lâmina maior ou igual à lâmina média de aplicação.

No experimento 1, para a variável viabilidade dos JIs não foram encontradas diferenças estatísticas quando comparado com a testemunha (GL=1; F=1,14; p= 0,2960) (Tabela 1). Esses resultados são similares aos encontrados por Smits (1996), que na fase de mistura dos nematóides com a água no tanque e após aplicação, não encontrou alta mortalidade de JIs, concluindo que os JIs teriam alta tolerância às condições geradas pelo sistema.

Na variável mortalidade de *G. mellonella* não foram encontradas diferenças estatísticas entre a testemunha e o tratamento (GL=1; F=0,69; p>0,05) (Tabela 1). Os dados aqui apresentados concordam com Hayes et al. (1999), que avaliaram o nematóide *Steinernema carpocapsae* em um sistema de irrigação. Depois de passar pelo sistema a viabilidade e a patogenicidade dos JIs sobre larvas de *G. mellonella* não foram afetadas, encontrando mortalidade de 95% em vasos.

Na variável mortalidade de larvas de *G. mellonella*, após o deslocamento dos JIs até elas, não foram encontradas diferenças estatísticas (GL=1; F=0,34; p>0,05) (Tabela 1). O que pode indicar que o sistema de irrigação não afeta a capacidade de busca dos JIs.

Tabela 1. Percentagem de mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* com juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 aplicados pelo sistema de microaspersão.

Tratamento	% Viabilidade	% Patogenicidade	% Mortalidade após o deslocamento
JIs sem passar pelo sistema de irrigação	91,84 A	83,75 A	85 A
JIs depois de passar pelo sistema de irrigação	89,47 A	77,50 A	82 A

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No segundo experimento, foi testada a capacidade de infecção dos JIs de *H. baujardi* LPP7 sobre larvas de *G. mellonella*, aplicados pelo sistema de microaspersão à campo em três dosagens.

Na primeira repetição foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos (GL=3; F=10,77; p=0,00011) quando comparados à testemunha. A maior mortalidade absoluta foi encontrada na dosagem de 300.000 JIs /árvore, seguida pela dosagem de 500.000 JIs /árvore, contudo não diferiram estatisticamente. A testemunha foi similar ao tratamento 2 (100.000 JIs /árvore) (Tabela 2).

Na segunda repetição ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos quando comparados à testemunha (GL=3; F=39,14; p< 0,05). Similarmente a primeira repetição, os maiores valores de mortalidade de larvas de *G. mellonella* foram encontrados nas maiores dosagens de nematóides por árvore (tratamentos 3 e 4) (Tabela 2), o que demonstra que não existe uma resposta positiva à maior adição de JIs, sendo a dosagem ideal entre 300.000 e 500.000 JIs /árvore.

Tabela 2. Percentagem de mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* com juvenis infectantes de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 aplicados pelo sistema de microaspersão.

Tratamento	Dosagem (JIs / árvore)	1ª Repetição (%)	2ª Repetição (%)
T1 (Testemunha)	0	6,07 A	3,92 A
T2	100.000	24,85 B	21,42 B
T3	300.000	28,35 B	31,92 C
T4	500.000	25,00 B	37,00 C

Nas colunas, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A diferença existente entre as percentagens de mortalidade encontradas nos vasos do experimento 1 (77,5%) e a maior mortalidade no campo do experimento 2 (37%) pode ser explicada, entre outros fatores, pela presença de formigas e outros inimigos naturais. Além disso, a textura do solo pode ter influenciado, já que nos vasos o solo utilizado tinha uma composição de areia (58%), silte (23%) e argila (19%), enquanto na área experimental do goiabal os valores foram areia (24%), silte (47%) e argila (29%). Autores como Kaya (1990) e

Koppenhofer et al. (1995), explicam que os nematóides entomopatogênicos requerem uma textura adequada do solo para sua sobrevivência e movimentação. Em geral, os nematóides sobrevivem e se movimentam melhor em solos arenosos (>50% areia).

CONCLUSÕES

Não foram encontradas diferenças estatísticas para as variáveis viabilidade, patogenicidade e deslocamento dos JIs em comparação à testemunha quando se aplicaram os nematóides pelo sistema de irrigação.

Quando foram aplicadas três dosagens do nematóide entomopatogênico *H. baujardi* LPP7, encontrou-se que as maiores dosagens apresentaram as maiores mortalidades de *G. mellonella*.

É viável a aplicação de NEPs em sistema de microaspersão, mas deve-se avaliar condições adicionais como: conhecer a textura e umidade do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Capinera, J.L., Epsky, N.D. (1992) Potencial for biological control of soil insects in the caribbean basin using entomopathogenic nematodes. Florida Entomologist 75 (4): 525-532.
- Curran, J. (1992) Influence of application method and pest population size on the field efficacy of entomopathogenic nematodes. Supplement to Journal of Nematology 24 (4S): 631-636.
- Duncan, L.W., Shapiro, D.I., McCoy, C.W., Graham, J.H. (1999) Entomopathogenic nematodes as a component of citrus root weevil IPM. In: Polavarapu, S. (Ed.). Optimal Use of Insecticidal Nematodes in Pest Management. Rutgers University, New Brunswick, NJ, pp. 69-78.

- Ehlers, R.U. (1996) Current and future use of nematodes. *In* biocontrol: Practice and comercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology*. 6: 303 - 316.
- Grewal, P.S. (1998) Formulation of entomopathogenic nematodes for storage and application. *Japanese Journal of Nematology* 28: 68-74.
- Hayes, A.E., Fitzpatrick, S.M., Webster, J.M. (1999) Infectivity, distribution and persistence of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* All Strain (Rhabditida: Steinernematidae) applied by sprinklers or boom sprayer to dry-pick cranberries. *Journal Economy Entomology* 92(3): 539-546.
- Hominick, W., Reid, A.P., Bohan, D.A., Briscoe, B.R. (1996) Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology* 6: 317-331.
- Kaya, H.K. (1990) Soil Ecology: *In*: Entomopathogenic nematodes in biological control of insect pests. H.Kaya (Edit.) Boca Ratón, CRC Press, p. 93-115.
- Koppenhofer, A.M., Kaya, H.K., Taormino. S.P. (1995) Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal Invertebrate Pathology* 65, 193-199.
- Lara, J.C., López, J.C. (2005) Evaluación de diferentes equipos de aspersión para la aplicación de nematodos entomopatógenos. *Revista Colombiana de Entomología* 31(1): 1-4
- Machado, I. (2006) Isolamento e identificação de nematóides entomopatogênicos provenientes da floresta Amazônica em Monte Negro-Ro. Universidade Estadual Norte Fluminense. Monografia.
- Mantovani, E.C., Salassier, B., Palaretti, L.F. (2006) Irrigação: princípios e métodos. Viçosa: Ed. UFV
- Nilsson, U., Gripwall, E. (1999) Influence of application technique on the viability of the biological control agents *Verticillium lecanii* and *Steinernema feltiae*. *Crop Protection* 18: 53-59.
- Poinar, Jr. G.O., (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In*: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Boca Raton, FL.Press, p. 23-61.
- Shetlar, D.J. (1999) Application methods in different cropping systems. *In*: Polavarapu, S. (Ed.). Proceedings of workshop: Optimal Use of

Insecticidal Nematodes in Pest Management. New Brunswick, NJ, pp. 31-36.

Smits, P.H. (1996) Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science Technology* 6: 379-387.

White, G.F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

- As 5 pressões avaliadas (20, 100, 180, 260 e 340 psi) não tiveram um efeito negativo sobre os JIs de *H. baujardi* LPP7, pois estatisticamente não diminuíram a sua viabilidade, patogenicidade, nem a sua capacidade de deslocamento.
- As 5 temperaturas avaliadas foram divididas em dois grupos, pois temperaturas entre 25 e 35°C não apresentaram um efeito negativo sobre o nematóide nas variáveis avaliadas. Por outro lado, temperaturas superiores a 35°C ocasionaram a morte dos nematóides.
- O óleo mineral avaliado afetou os JIs de *H. baujardi* LPP7 e não é recomendável misturá-lo ao nematóide nas dosagens avaliadas.
- A aplicação dos JIs pelo sistema de irrigação por microaspersão é viável de ser utilizado, pois a viabilidade, patogenicidade e deslocamento dos mesmos não são afetados durante a passagem pelo sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, B.J., Nguyen, K.B. (2002) Taxonomy and Systematics *In*: Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology. CABI, New York. Press, p. 1-33
- Adams, B.J., Fodor, A., Koppenhoffer, H.S., Stackebrandt, E., Stock, P., Klein, M. (2006) Biodiversity and systematics of nematode – bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37(1): 32-49
- Akhurst, R.J., Boemare, N.E. (1990) Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. *In*: Gaugler, R., Kaya, H.K., (eds.) Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca raton, FL, CRC Press, p. 75-90.
- Associação Brasileira dos Produtores de Goiaba. 2004. <http://www.goiabras.org.br>
- Bailez, O.E., Viana-Bailez, A.M., Lima, J.O.G., Moreira, D.D.O. (2003) Life history of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), under laboratory conditions. *Neotropical Entomology* 32(2): 203-207.
- Barbercheck, M.E. (1992) Effects of soil physical factors on biological control agents of soils insect pests. *Florida Entomologist* 75 (4): 539 – 548.
- Barelli, N.L., Galli, J.C. (1998) Avaliação de danos causados por *Anastrepha* spp. (Díptera: Tephritidae) e por *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) em frutas de goiaba da cultivar “Paluma”. XVII Congresso Brasileiro de Entomologia. Rio de Janeiro. p.12.
- Capinera, J.L., Epsky, N.D. (1992) Potencial for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes. *Florida Entomologist* 75 (4): 525-532.

- Christofidis, D. (2002) Irrigação, a fronteira hídrica na produção de alimentos. Revista ITEM 54: 46-55.
- Curran, J. (1992) Influence of application method and pest population size on the field efficacy of entomopathogenic nematodes. Supplement to Journal of Nematology 24 (4S): 631-636
- Dolinski, C., Del Valle, E.E., da Silva Burla, R., Ribeiro Machado, I. (2006) Biological traits of two native Brazilian entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae: Rhabditida). Iheringia Zoologia, in press.
- Ehlers. R.U. (1996) Current and future use of nematodes. In biocontrol: Practice and comercial aspects with regard to regulatory policy issues. Biocontrol Science and Technology. 6: 303 - 316.
- Forst, S., Clarke, D. (2002) Bacteria-Nematode Symbiosis *In*: Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology. CABI Press, p. 57-77.
- Gaugler, R., Campbell, J.F., McGuire, T.R. (1989) Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. Journal of Invertebrate Pathology 54: 363 - 372.
- Georgis, R., Dunlop, D.B, Grewal, P.S. (1995) Formulation of entomopathogenic nematodes. *In*: Hall, F. R., Barry, J. W. (Eds.) Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 197-205.
- Grewal, P.S. (1998) Formulation of entomopathogenic nematodes for storage and application. Japanese Journal of Nematology 28: 68-74.
- Grewal, P.S. (2002) Formulation and application technology. *In*: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 265-288.
- Gonzaga, L., Monteiro, J., Teixeira, A.H., Bezerra, A.S. (2001) Goiaba Produção. Aspectos Técnicos / editor técnico Luiz Gonzaga Neto; Embrapa Semi-Árido (Petrolina, PE). – Brasília: Embrapa. Informação Tecnológica, 72 p. il.; (Frutas do Brasil; 17).
- Hominick, W., Reid, A.P., Bohan, D.A., Briscoe, B.R. (1996) Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. Biocontrol Science and Technology 6: 317-331.
- Ide, C.D. (2001) A cultura da goiaba: perspectivas, tecnologias e viabilidade. Niterói: PESAGRO-RIO, 36 p. (PESAGRO-RIO. Documentos, 72)
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2003). <http://www.ibge.gov.br/>

- Ishibashi, N., Kondo, E. (1990) Behavior of infective juveniles. *In*: R. Gaugler and H.K. Kaya, eds. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 139 – 150
- Kaya, H.K. (1990) Soil Ecology: *In*: Entomopathogenic nematodes in biological control of insect pests. H.K: Editores. Boca Ratón, CRC Press, p. 93-115.
- Kaya, H.K.; Gaugler, R. (1993) Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology. 38: 181 – 206.
- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H.K. (1991) Effects of soil temperature, moisture and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. Journal of Invertebrate Pathology 57: 242 - 249.
- Lara G., J.C., López N., J.C. (2005) Evaluación de diferentes equipos de aspersión para la aplicación de nematodos entomopatógenos. Revista Colombiana de Entomología 31(1): 1-4
- Lara, J.C. López, J.C., Bustillo, A.E. (2004) Efecto de entomonemátodos sobre poblaciones de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), en frutos en el suelo. Revista Colombiana de Entomología 30(2): 179-185
- Mantovani, E.C., Salassier, B., Palaretti, L.F. (2006) Irrigação: princípios e métodos. Viçosa: Ed. UFV
- Mason, J., Matthews, G., Wright, D. (1999) Evaluation of spinning disc technology for the application of entomopathogenic nematodes against a foliar pest. Journal of Invertebrate Pathology 73: 282-288.
- Orlando, A., Sampaio, A.S.M., De Carvalho, A., Scaranari, H.J., Arruda, H.V., (1974) Notas sobre “O gorgulho das goiabas” *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae) e experimentos de combate. O Biológico 40 (10): 281-289.
- Perez, E.E., Lewis, E.E., Shapiro-Ilan, D.I. (2003) Impact of host cadaver on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under desiccating conditions. Journal of Invertebrate Pathology 82: 111-118.
- Poinar, Jr. G.O., (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In*: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. Boca Raton, FL. Press, p. 23-61.

- Salassier, B., Soares, A.A., Mantovani, E.C. (2005) Manual de Irrigação. 7ª Edição. Viçosa: Ed. UFV.
- Schroer, S., Ehlers, R.U. (2005) Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for biological control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). *Biological control* 33: 81-86
- Shapiro, D.I., Glazer, I. (1996) Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. *Environment Entomology* 25: 1455-1461.
- Shapiro, D.I., Lewis, E.E. (1999) Comparison of entomopathogenic nematode infectivity from infected hosts versus aqueous suspension. *Environment Entomology* 28: 907-911.
- Shapiro, D.I., Lewis, E.E., Paramasivam, S., McCoy, C.W. (2000) Nitrogen partitioning in *Heterorhabditis bacteriophora*-infected hosts and the effects of nitrogen on attraction/repulsion. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 43-48.
- Shetlar, D.J. (1999) Application methods in different cropping systems. *In*: Polavarapu, S. (Ed.). *Proceedings of workshop: Optimal Use of Insecticidal Nematodes in Pest Management*. New Brunswick, NJ, pp. 31-36.
- Sistema Integrado de Agrotóxicos (2006)
<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/sia.htm>
- Souza, A., Rabelo, F., Nemauro, F., Alencar, J.A., Vargas, J., Freitas, M., Coelho, P.R., Datt, R., Cavalcanti, S., Moreira, W.A. (2001) *Goiaba Fitossanidade / editor técnico Flávia Rabelo Barbosa; Embrapa Semi-Árido (Petrolina, PE). – Brasília: Embrapa. Informação Tecnológica, 2001. 63 p. il.; (Frutas do Brasil 18).*
- Souza, J.C., Haga, A., Souza, M.A (2003) *Pragas da goiabeira. Boletim Técnico 71. Epamig. 60 pp.*
- Sudhaus, W. (1993) The nematode genera *Heterorhabditis* and *Steinernema*, both entomopathogenic by means of symbiotic bacteria, are not sister taxa. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 86: 146.
- Torres, G., Covello, V.N., Sales, R., Pedrosa, E., Moura, R. (2004) *Meloidogyne mayaguensis* em *Psidium guajava* no Rio Grande do Norte. *Notas Fitopatológicas. Fitopatologia Brasileira* 29(5).

Villalba, G., D.A. (2003) Tecnología y equipos de aspersión para el control de la broca del café. *In: Curso Tecnología y Equipos de aspersión para el control de la broca del café. Chinchiná (Colombia).*

Zuckerman, B.M., Jansson, H-B. (1984) Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host-prey recognition. *Annual Review of Phytopathology* 22: 95 - 113.

APÊNDICES

APÊNDICE A

RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DO EFEITO DA PRESSÃO SOBRE
OS JUVENIS INFECTANTES DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda:
Heterorhabditidae)

Quadro 1A. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de nematóides vivos.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Total	119	3631,754			
Total de redução	39	1178,674	30,22242	0,99	*****
TEMPO	3	69,76415	23,25472	0,77	*****
ERRO (A)	16	480,5820	30,03638		
PRES	5	321,7976	64,35953	2,10	0,0740
PRES*TEMPO	15	306,5305	20,43537	0,67	*****
Resíduo	80	2453,080	30,66350		
C.V					5,6372

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 2A. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de nematóides vivos em cada período de avaliação.

Período (minutos)	G.L.	F	P
15	5	0,65	>0,05
20	5	1,00	0,43
25	5	23,40	0,63
30	5	1,72	0,16

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 3A. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de mortalidade de *Galleria mellonella*.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Total	119	45979,17			
Total de redução	39	24465,83	627,3291	2,33*	0,0007
TEMPO	3	7582,500	2527,500	3,80*	0,0133
ERRO (A)	16	10646,67	665,4167		
PRES	5	2014,167	402,8333	1,50	0,1998
PRES*TEMPO	15	4222,500	281,5000	1,05	0,4185
Resíduo	80	21513,33	268,9167		
C.V					21,046

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 4A. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de mortalidade de *Galleria mellonella* em cada período de avaliação.

Período (minutos)	G.L.	F	P
15	5	0,64	>0,05
20	5	2,68	0,05
25	5	0,66	>0,05
30	5	0,69	>0,05

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 5A. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de deslocamento.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Total	119	12999,17			
Total de redução	39	5079,167	130,2350	1,32	0,1504
TEMPO	3	2462,500	820,8333	11,73*	0,0000
ERRO (A)	16	1120,000	70,00000		
PRES	5	464,1667	92,83333	0,94	*****
PRES*TEMPO	15	1032,500	68,83333	0,70	*****
Resíduo	80	7920,000	99,00000		
C.V					12,582

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 6A. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de deslocamento em cada período de avaliação.

Período (minutos)	G.L.	F	P
15	5	0,57	>0,05
20	5	0,60	>0,05
25	5	0,32	>0,05
30	5	2,24	0,08

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

APÊNDICE B

RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DO EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE OS JUVENIS INFECTANTES DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae).

Quadro 1B. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de nematóides vivos.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Total	89	155199,9			
Total de redução	49	102934,1	2100,697	1,61	0,0621
TEMP	5	64285,80	12857,16	19,29*	0,0000
ERRO (A)	24	15999,26	666,6358		
TEMPO	2	3308,580	1654,290	1,27	0,2930
TEMP*TEMPO	10	14363,27	1436,327	1,10	0,3861
REP*TEMPO	8	4977,222	622,1528	0,48	*****
Resíduo	40	52265,74	1306,644		
C.V					50,412

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 2B. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de nematóides vivos em cada período de avaliação.

Período (horas)	G.L.	F	P
0	5	1,92	0,12
1	5	3,62*	0,01
2	5	16,83*	<0,05

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 3B. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de mortalidade de *Galleria mellonella*.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Total	89	83240,00			
Total de redução	49	58386,67	1191,565	1,92*	0,0180
TEMP	5	18280,00	3656,000	3,04*	0,0202
ERRO (A)	24	28826,67	1201,111		
TEMPO	2	846,6667	423,3333	0,68	*****
TEMP*TEMPO	10	4313,333	431,3333	0,69	*****
REP*TEMPO	8	6120,000	765,0000	1,23	0,3065
Resíduo	40	24853,33	621,3333		
C.V					38,153

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 4B. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de mortalidade de *Galleria mellonella* em cada período de avaliação.

Período (horas)	G.L.	F	P
0	5	0,75	>0,05
1	5	1,87	0,13
2	5	2,87*	0,03

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 5B. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de deslocamento.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Total	89	46290,00			
Total de redução	49	34585,56	705,8277	2,41*	0,0025
TEMP	5	17583,33	3516,667	15,33*	0,0000
ERRO (A)	24	5506,667	229,4444		
TEMPO	2	446,6667	223,3333	0,76	*****
TEMP*TEMPO	10	1140,000	114,0000	0,39	*****
REP*TEMPO	8	9908,889	1238,611	4,23*	0,0010
Resíduo	40	11704,44	292,6111		
C.V					39,174

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 6B. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de deslocamento em cada período de avaliação.

Período (horas)	G.L.	F	P
0	5	2,12	0,09
1	5	1,80	0,14
2	5	8,87*	0,00

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

APÊNDICE C

RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DO EFEITO DO ÓLEO MINERAL
ASSIST® SOBRE OS JUVENIS INFECTANTES DE *Heterorhabditis baujardi*
LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae)

Quadro 1C. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de nematóides vivos.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Total	99	15136,59			
Total de redução	19	10232,59	538,5574	8,79*	0,0000
TEMPO	4	6136,040	1534,010	25,02*	0,0000
ÓLEO	3	974,1100	324,7023	5,30*	0,0022
TEMPO*ÓLEO	12	3122,440	260,2033	4,24*	0,0000
Resíduo	80	4904,000	61,30000		
C.V					16,584

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 2C. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de nematóides vivos em cada período de avaliação.

Período (horas)	G.L.	F	P
0	3	0,89	>0,05
3	3	14,38*	<0,05
6	3	53,11*	<0,05
9	3	20,80*	<0,05
12	3	56,60*	<0,05

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 3C. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de mortalidade de *Galleria mellonella*.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Total	99	3657,040			
Total de redução	19	2752,240	144,8547	12,81*	0,0000
TEMPO	4	1536,340	384,0850	33,96*	0,0000
ÓLEO	3	738,9600	246,3200	21,78*	0,0000
TEMPO*ÓLEO	12	476,9400	39,74500	3,51*	0,0003
Resíduo	80	904,8000	11,31000		
C.V					59,628

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 4C. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de mortalidade de *Galleria mellonella* em cada período de avaliação.

Período (horas)	G.L.	F	P
0	3	0,33	>0,05
3	3	0,21	>0,05
6	3	1,39	0,27
9	3	1,54	0,24
12	3	1,04	0,39

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 5C. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de deslocamento.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Total	99	13474,94			
Total de redução	19	11368,63	598,3491	22,73*	0,0000
TEMPO	4	4266,771	1066,693	40,51*	0,0000
ÓLEO	3	4331,636	1443,879	54,84*	0,0000
TEMPO*ÓLEO	12	2770,226	230,8522	8,77*	0,0000
Resíduo	80	2106,303	26,32878		
C.V					42,702

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 6C. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de deslocamento em cada período de avaliação.

Período (horas)	G.L.	F	P
0	3	0,48	>0,05
3	3	0,68	>0,05
6	3	1,54	0,24
9	3	3,23	0,05
12	3	10,00*	<0,05

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

APÊNDICE D

RESUMO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DA AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR MICROASPERSÃO PARA A APLICAÇÃO DOS JUVENIS INFECTANTES DE *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Heterorhabditidae)

Quadro 1D. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de nematóides vivos depois da passagem pelo sistema de microaspersão.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Tratamento	1	36,60002	36,60002	1,146	0,29605
Resíduo	22	702,7963	31,94528		
C.V					6,231

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 2D. Resumo da análise de variância para a variável mortalidade de *G. mellonella* depois da passagem pelo sistema de microaspersão no laboratório.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Tratamento	1	156,2500	156,2500	0,697	****
Resíduo	14	3137,500	224,1071		
C.V					18,568

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 3D. Resumo da análise de variância para a variável percentagem de deslocamento até larvas de *G. mellonella* depois da passagem pelo sistema de microaspersão no laboratório.

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Tratamento	1	22,50000	22,50000	0,340	****
Resíduo	8	530,0000	66,25000		
C.V					9,748

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 4D. Resumo da análise de variância para a variável mortalidade de *G.mellonella* com diferentes dosagens de *H. baujardi* LPP7 aplicados com um sistema de microaspersão (1ª repetição).

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Tratamento	3	591,7411	197,2470	10,776*	0,00011
Resíduo	24	439,2857	18,30357		
C.V					48,401

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

Quadro 5D. Resumo da análise de variância para a variável mortalidade de *G.mellonella* com diferentes dosagens de *H. baujardi* LPP7 aplicados com um sistema de microaspersão (2ª repetição).

Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Sig.
Tratamento	3	1022,321	340,7783	39,145*	0,00000
Resíduo	24	208,9286	8,705357		
C.V					26,227

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F