

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS BIOLOGIA, PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO NO CONTROLE DE PRAGAS

Claudia Dolinski

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são importantes agentes do controle biológico, notadamente no solo e em ambientes crípticos, pois infectam e matam insetos de diversas ordens e de dezenas de famílias. Como principais características poderiam ser citadas a produção dos juvenis infectantes de maneira barata em insetos hospedeiros ou em meios artificiais e a capacidade de armazenamento. Além disso, os nematoides têm a vantagem de ser facilmente aplicados a campo na água de irrigação ou pulverizados, além de possuir a habilidade de buscar o hospedeiro. Compatíveis com a maioria dos pesticidas, seguros a invertebrados e vertebrados, reproduzem-se no inseto hospedeiro produzindo novas gerações e reciclando os nematoides no solo. Possuem também um estreito espectro de hospedeiros, além de bastante específicos e de não causar mortalidade indiscriminada.

Introdução

Nematoídes entomopatogênicos (NEPs) pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea), onde estão localizadas as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. A família Steinernematidae possui dois gêneros, *Steinernema* Travassos e *Neosteinerinema* Nguyen & Smart, enquanto a família Heterorhabditidae possui somente o gênero *Heterorhabditis* Poinar. Adams *et al.*¹ listaram 43 espécies do gênero *Steinernema*, uma do gênero *Neosteinerinema* e nove do gênero *Heterorhabditis*, descritas até então. Depois disso, outras 25 espécies foram descritas no gênero *Steinernema* e nove no gênero *Heterorhabditis* (quadro 1).

Os NEPs são assim conhecidos porque causam doença e morte a diferentes espécies de insetos com rapidez (24 a 72 horas).² Estes nematoídes particularizam-se pela associação simbiote com bactérias entomopatogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (associação com espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, respectivamente). Tais bactérias são as principais responsáveis pela rápida morte do hospedeiro por septicemia, além da produção de antibióticos e fungistáticos que mantêm o inseto infectado livre de oportunistas. Nematoídes entomopatogênicos infectam e matam insetos de dezenas de famílias e ordens, e muitas dessas espécies já fazem parte do Manejo Integrado de Pragas de várias culturas.³

Ciclo de vida da família Steinernematidae

O ciclo de vida desses nematoídes inclui três fases de desenvolvimento: ovo, juvenil e adulta (fêmeas e machos). A fase juvenil é composta por quatro estádios (J1, J2, J3 ou Juvenil Infectante e J4). O juvenil infectante (JI) é o estádio do nematoíde encontrado no solo. Estes juvenis buscam o hospedeiro e os localizam pelos produtos de excreção, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura. A infecção é iniciada com a penetração dos nematoídes pelas aberturas naturais (boca, ânus ou espiráculos); dentro do inseto migram para a hemolinfa e liberam suas bactérias simbiotes do gênero *Xenorhabdus*. As bactérias produzem toxinas que provocam a morte do inseto-hospedeiro por septicemia em 24 a 72 horas. Depois essas bactérias se multiplicam rapidamente e posteriormente os JIs se alimentam delas e dos tecidos por elas decompostos, passando então para o estádio J4. Deste estádio sairão fêmeas e machos (fase adulta) da primeira geração. As fêmeas colocarão ovos que darão origem à segunda geração (figura 1).⁴

¹ ADAMS, B. J.; FODOR, A.; KLEIN, M. G.; SMITH, H. L.; STACKEBRANDT, E. & STOCK, S. P. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control*, vol. 1, n. 1, p. 32-49, 2006.

² DOWDS, B. C. A. & PEETERS, A. Virulence Mechanisms. In: GAUGLER R. (Ed.). *Entomopathogenic Nematology*. New York: CABI Publishing, 2002. p. 79-98.

³ WOUTS, W. M. *Steinernema* and *Heterorhabditis* species. In: NICKLE W. R. (Ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. p. 855-897.

⁴ FORST, S. & CLARKE, D. Bacteria-Nematode Symbiosis. In: GAUGLER R. (Ed.). *Entomopathogenic Nematology*. New York: CABI Publishing, 2002. p. 57-77.

Quadro 1: Lista de espécies das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae até hoje descritas

Família Steinernematidae Chitwood & Chitwood, 1937

Gênero: *Steinernema* Travassos, 1927

Espécie tipo: *S. kraussei* (Steiner, 1923) Travassos, 1927

- S. abbasi* Elawad, Ahmad & Reid, 1997
S. aciari Qui, Yan, Zhou, Nguyen & Pang, 2005
S. affine (Obvien, 1937) Wouts *et al.*, 1982
S. akhursti Qiu, Hu, Zhou, Nguyen & Pang, 2005
S. anatoliense Hazir, Stock & Keskin, 2003
S. apuliae Trigiani, Mráček & Reid, 2004
S. arenarium (Artyukhovsky, 1967) Wouts *et al.*, 1982
S. asiaticum Anis, Shahina, Reid, 2004
S. australe Edgington *et al.*, 2009
S. backanense Phan *et al.*, 2006
S. beddingi Qiu, Hu, Zhou, Nguyen & Pang, 2005
S. bicornutum Tallosi, Peters & Ehlers, 1995
S. boemarei Lee, Sicard, Skeie, Stock, 2008
S. brazilense Nguyen *et al.*, 2010
S. carpocapsae (Weiser, 1955) Wouts *et al.* 1982
S. caudatum Xu, Wang & Li, 1991
S. ceratophorum Jian, Reid & Hunt, 1997
S. cholashanense Nguyen, Puza, & Mracek, 2008
S. colombiense López-Núñez *et al.*, 2008
S. costaricense Uribe-Lorío, Mora, Stock, 2007
S. cubanum Mracek, Hernandez & Boemare, 1994
S. cumgarensis Phan *et al.*, 2006
S. diaprepesi Nguyen & Duncan, 2002
S. eapokense Phan *et al.*, 2006
S. everestense Khatri-Chhetri *et al.*, 2011
S. feltiae (Filipjev, 1934) Wouts *et al.*, 1982
S. glaseri (Steiner, 1929) Wouts *et al.* 1982
S. guangdongense Qui *et al.*, 2004
S. hebeiense Chen *et al.*, 2006
S. ichnusae Tarasco, Mracek, Nguyen & Trigiani, 2008
S. intermedium (Poinar, 1985) Mamiya, 1988
S. jollieti Spiridonov, Krasomil-Osterfeld & Moens, 2004
S. kavii Waturu, Hunt & Reid, 1997
S. kboisanae Nguyen, Malan & Gozel, 2007
S. kushidai Mamiya, 1988
S. lamjungense Khatri-Chhetri *et al.*, 2011
S. leizhouense Nguyen, Qiu, Zhou & Pang, 2006
S. loci Phan, Nguyen & Moens, 2001
S. longicaudum Shen & Wang, 1992
S. monticolum Stock, Choo & Kaya, 1997
S. neocurtillae Nguyen & Smart, 1992
S. oregonense Liu & Berry, 1996
S. pakistanense Shahina *et al.*, 2001
S. phyllophagae Nguyen, Buss, 2011
S. piu Qiu *et al.*, 2011

- S. puertoricense* Román & Figueroa, 1994
S. puntauvene Uribe-Lorío, Mora, Stock, 2007
S. rarum (De Doucet, 1986) Mamiya, 1988
S. riobrave (Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994)
S. ritteri Doucet & Doucet, 1990
S. robustispiculum Long, *et al.*, 2005
S. sangi Ohan, Nguyen & Moens, 2001
S. sasonense Phan *et al.*, 2006
S. scapterisci Nguyen & Smart, 1990
S. scarabei Stock & Koppenhofer, 2003
S. siamkayai Stock, Somsook & Reid, 1998
S. sichuanense Mráček *et al.*, 2006
S. silvaticum Sturhan, Spiridonov, Mrá, Ciracek, 2005
S. tami Van Luc, Nguyen, Reid & Spiridonov, 2000
S. texanum Nguyen *et al.*, 2007
S. thanhi Phan, Nguyen & Moens, 2001
S. thermophilum Gangula & Singh, 2000
S. vulcanicum Clausi *et al.*, 2011
S. websteri Cutler & Stock, 2003
S. weiseri Mráček, Sturhan & Reid, 2003
S. xiueshanense Mráček *et al.*, 2009
S. yirgalemense Nguyen, Tesfamariam, Gozel, Gaugler, Adams, 2005

Gênero: *Neosteinerinema*

N. longicurvicauda Nguyen & Smart, 1994

Família Heterorhabditidae Poinar, 1976

Gênero: *Heterorhabditis* Poinar, 1976

Espécie tipo: *H. bacteriophora* Poinar, 1976

- H. amazonensis* Andaló, Nguyen, Moino Jr., 2006
H. atacamensis Edgington, Buddie, Moore, France, Merino, Hunt, 2010
H. baujardi Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003
H. brevicaudis Liu, 1994
H. dowesi Stock *et al.*, 2002
H. floridensis Khuong, Gozel, Koppenhöfer, Adams, 2006
H. georgiana Nguyen, Shapiro-Ilan, Mbata, 2008
H. gerrardi Plichta, Joyce, Clarke, Waterfield, Stock, 2009
H. hawaiiensis (Gardner *et al.*, 1994)
H. indica Poinar *et al.*, 1992
H. marelatus Liu, 1996
H. megidis Poinar *et al.*, 1987
H. mexicana Nguyen *et al.*, 2004
H. poinari Kakulia & Mikaiia 1997
H. safricana Malan, Nguyen, de Waal, Tiedt, 2008
H. sonorensis Stock, Rivera-Orduño, Flores-Lara, 2008
H. taysearae Shamseldean *et al.*, 1996
H. zealandica Poinar, 1990

Os nematóides podem ter duas ou três gerações dentro do hospedeiro, dependendo da disponibilidade de alimento no cadáver. Quando o alimento se exaure, juvenis no terceiro estágio retêm células da bactéria em seu interior e abandonam o cadáver como JIs. Os JIs permanecem no solo à procura de um novo inseto hospedeiro por dias, semanas ou meses, dependendo da temperatura, da umidade do solo e da espécie de nematoide envolvida.⁵

O ciclo do *Neosteinerinema* é similar ao do *Steinerinema*, com a diferença de que em *Neosteinerinema* só há uma geração no hospedeiro.⁶

Ciclo de vida da família Heterorhabditidae

O ciclo dos heterorhabditídeos é muito semelhante aos dos steinermatídeos, com algumas ressalvas. Os JIs desta família, além de penetrar pelas aberturas naturais, também podem fazê-lo através da cutícula do inseto hospedeiro por meio de um dente quitinoso localizado frontalmente em sua extremidade anterior. Estes chegam à hemolinfa do inseto hospedeiro e liberam bactérias do gênero *Photorhabdus*. Na primeira geração dentro do inseto, ao invés de surgirem fêmeas e machos, ocorrem apenas adultos hermafroditas que produzem os demais estádios (ovos, J1, J2, J3 e J4). Na segunda geração, os adultos se diferenciam em machos e fêmeas.⁷

⁵ PATEL, M. N.; STOLINSKI, M. & WRIGHT, D. J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinerinema* species. *Parasitology*, vol. 114, p. 489-496, 1997.

⁶ NGUYEN, K. B. & SMART, G. C. *Neosteinerinema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinerematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *Journal of Nematology*, vol. 26, p. 162-174, 1994.

⁷ POINAR Jr., G. O. Biology and taxonomy of Steinerematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R. & KAYA, H. K. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1990. p. 23-58.

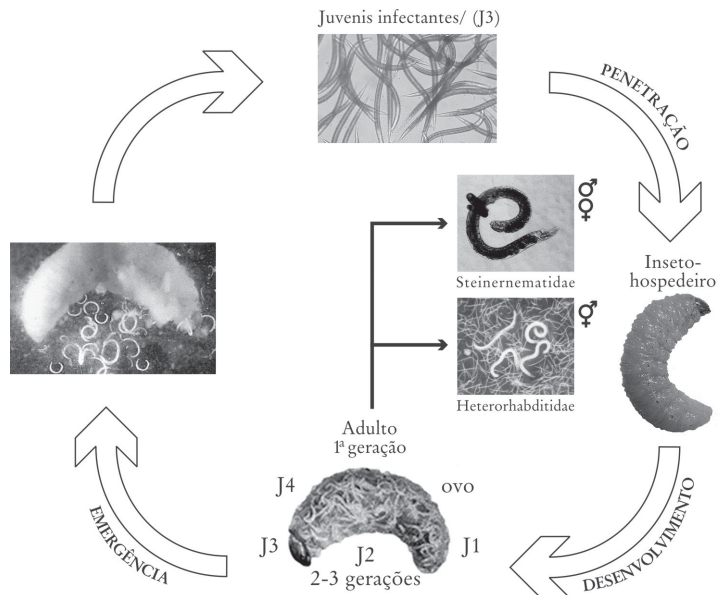


Figura 1: Ciclo de vida dos nematóides entomopatogênicos dos gêneros *Steinerinema* e *Heterorhabditis*

Biogeografia

As espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* já foram encontradas em todas as regiões do mundo, com exceção da Antártida, em diferentes tipos de solos e ambientes, adaptadas co-evolutivamente a um grande número de insetos hospedeiros.⁸

Hominick⁹ compilou uma lista com a distribuição geográfica de diferentes espécies de nematoides entomopatogênicos de acordo com seus locais de isolamento. Algumas espécies do gênero *Steinernema* são cosmopolitas quanto à sua distribuição, como no caso de *S. glaseri* e *S. carpocapsae*. Outras são adaptadas a temperaturas mais amenas, como *S. feltiae*. Outras, ainda, possuem uma distribuição geográfica mais restrita, como, por exemplo, *S. kushidai*, encontrada apenas no Japão.

O gênero *Heterorhabditis* também está amplamente distribuído no mundo, como por exemplo, *H. bacteriophora*, encontrada desde as Américas, Europa Meridional e Central, Austrália até a Ásia Oriental (China, Japão e Coreia). *H. indica* possui ampla distribuição, mas apenas nas regiões tropicais e subtropicais, e zonas temperadas subtropicais e quentes do Japão. Em contraste, *H. zealandica* e *H. marelatius* aparecem em poucas áreas, como Nova Zelândia e, nos Estados Unidos, nos estados de Oregon e Califórnia. *H. megidis* até hoje só foi encontrada no hemisfério norte.

No Brasil, a amostragem e isolamento de nematoides entomopatogênicos foram feitos em Rondônia¹⁰, Amazonas¹¹, Minas Gerais¹² e São Paulo¹³, e em sua maioria foram isoladas espécies do gênero *Heterorhabditis*.

Como nematoides entomopatogênicos têm potencial para serem encontrados em solos de diferentes lugares, recomenda-se que antes de qualquer introdução de NEPs seja feita uma amostragem local ou de maior amplitude, visando obter a maior variabilidade possível de nematoides para uma futura aplicação a campo, já que esses nematoides locais estão adaptados às condições ambientais em que vivem.

Formas de isolamento dos nematoides entomopatogênicos

O isolamento de nematoides entomopatogênicos pode ser feito através de diferentes técnicas de extração dos JIs do solo (quadro 2). Na técnica da “isca viva”, um hospedeiro susceptível é adicionado ao solo, por exemplo, larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). Por essa técnica recupera-se uma parte da população de nematoides entomopatogênicos que figuram no local onde a larva é adi-

⁸ WOODRING, J. L. & KAYA, H. K. *Sternematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques*. Southern Cooperative. Arkansas: Arkansas Agricultural Experimental Station Fayetteville, 1988. (Series Bulletin, 331).

⁹ HOMINICK, W. H. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. New York: CABI Publishing, 2002. p. 115-143.

¹⁰ DOLINSKI, C.; KAMITANI, F. L.; MACHADO, I. R. & WINTER, C. E. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 103, p. 150-159, 2008.

¹¹ ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. B. & MOINO Jr., A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology*, vol. 8, p. 853-867, 2007.

¹² ACEVEDO, J. P. M.; MOINO Jr., A.; CAVALCANTI, R. S. & DOLINSKI, C. M. Amostragem e avaliação de técnicas para isolamento de nematoides entomopatogênicos nativos. *Nematologia Brasileira*, vol. 29, n. 1, p. 17-23, 2005.

¹³ FOWLER, H. G. Occurrence and infectivity of entomogenous nematodes in mole crickets in Brazil. *International Rice Research Newsletter*, vol. 113, n. 3, p. 34-35, 1988.

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

cionada. Se as larvas não apresentarem sintomas de infecção, a amostra é considerada negativa pela ausência de nematoides ou pela falta de infectividade das populações de NEPs existentes no momento da amostragem.¹⁴

Quadro 2: Diferentes técnicas para extração de nematoides entomopatogênicos do solo

| | Centrifugação | Funil de Baerman | Isca viva |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|--------------|
| Atividade do nematoide | passiva | ativa | infectante |
| Eficiência | alta | mais baixa | a mais baixa |
| População obtida | misturada | misturada | uma |
| Mão-de-obra necessária | alta | alta | baixa |
| Cultura estabelecida | não | possível | sim |
| Estádios recuperados | juvenis infectantes | juvenis infectantes | todos |
| Experiência taxonômica necessária | alta | alta | moderada |
| Trabalho taxonômico possível | não | não | sim |
| Quantitativo | sim | sim | sim |

¹⁴ HOMINICK, W. M.; REID, A. P.; BOHAM, A. P. & BRISCOE, B. R. Entomopathogenic nematodes: Biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Bio-control Science and Technology*, vol. 6, p. 317-331, 1996.

¹⁵ HOMINICK, W. H. *Op. cit.*

¹⁶ JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Diseases Reporter*, vol. 48, p. 692, 1964.

¹⁷ SPIRIDONOV, S. E. & MOENS, M. Two previously unreported species of steinernematids from woodlands in Belgium. *Russian Journal of Nematology*, vol. 7, p. 39-42, 1999.

¹⁸ STURHAN, D. & MRACEK, Z. Comparison of the *Galleria* baiting technique and a direct extraction method for recovering *Steinernema* infective stage juveniles from soil. *Folia Parasitologia*, vol. 47, p. 315-318, 2000.

Um outro método também usado é o do funil de Baerman, que extrai nematoides do solo por gravidade. A técnica consiste no uso de um funil de vidro ou plástico com água onde o solo é posto acima da água com breve contato. A água atrai os nematoides do solo e estes são recolhidos na suspensão. A desvantagem deste método é o espaço ocupado pelos funis e o laborioso trabalho para “pescar” os nematoides da suspensão e identificá-los.¹⁵ Já o método de Jenkins¹⁶ consiste em peneirar, centrifugar e separar os nematoides em solução de sacarose. Tanto para o método do funil Baerman como para o de Jenkins, vários tipos de nematoides são recuperados do solo, e a experiência em identificação é necessária para se diferenciar corretamente os NEPs dos outros nematoides.

Em relação ao método mais eficiente e apropriado para recuperação de nematoides entomopatogênicos, Spiridonov & Moens¹⁷ recuperaram duas espécies de steinernematídeos do solo de uma floresta na Bélgica, pelo método de Jenkins, mas nenhuma espécie foi recuperada usando-se larvas de *G. mellonella* como iscas vivas por três vezes. Em um esforço para comparar a eficiência do método de extração com *G. mellonella*, Sturhan & Mracek¹⁸ usaram as duas técnicas nas mesmas amostras. Ambos os métodos recuperaram cinco espécies, mas a técnica de iscas vivas com *G. mellonella* foi tida como menos efetiva, especialmente na identificação de espécies misturadas. No entanto, essa técnica funciona bem em laboratório, pois ocupa um espaço menor e é bem me-

nos trabalhosa que as demais. De fato, o método de escolha depende do objetivo de estudo e nenhum deles é desprovido de limitações ou concessões. O mau uso das diferentes técnicas torna difícil a afirmação convicta de que uma espécie não exista em uma determinada localidade.

Sintomatologia e sinais de infecção

Insetos infectados por NEPs exibem sintomas específicos, causados pelas bactérias simbiotes associadas a eles. É importante destacar que estas bactérias são específicas para cada espécie de nematoide. Como relatado anteriormente, as bactérias associadas a heterorhabditídeos pertencem ao gênero *Photorhabdus* e aquelas associadas aos steinernematídeos pertencem ao gênero *Xenorhabdus*¹⁹. Bactérias de ambos os gêneros são móveis, Gram negativas, pertencem à família Enterobacteriaceae e produzem toxinas que causam a morte do inseto. São, portanto, antibióticos e fungistáticos que impedem o crescimento de outros microrganismos oportunistas. Além disso, produzem pigmentos que dão aos cadáveres hospedeiros cores características. Por exemplo, cadáveres infectados pelo complexo *Heterorhabditis-Photorhabdus* adquirem cores avermelhadas ou alaranjadas e são bioluminescentes, enquanto que cadáveres infectados pelo complexo *Steinernema-Xenorhabdus* adquirem cores que variam de creme a pardo escuro, sem apresentar bioluminescência.²⁰

Tais bactérias não sobrevivem no meio ambiente, razão pela qual precisam dos nematoides como proteção e meio de transporte. Por outro lado, os nematoides se beneficiam do alimento por elas provido.²¹ Nos heterorhabditídeos, as bactérias se localizam na parte anterior do intestino.²² Nos JIs do gênero *Steinernema*, as células bacterianas estão apreendidas em uma vesícula localizada no intestino.²³

Mobilidade

Quanto à movimentação, os juvenis infectantes dos nematoides entomopatogênicos podem ser classificados como “ambusher” ou “cruiser”. As espécies “ambusher” promovem uma movimentação própria chamada de nictação, a qual consiste na suspensão do corpo, ficando este apoiado apenas na ponta da cauda. A parte anterior do nematoide fica livre, aguardando a passagem de um hospedeiro para então “saltar” sobre ele. Exemplos de nematoides entomopatogênicos que fazem nictação: *S. carpocapsae* e *S. scapterisci*.²⁴ Os nematoides do tipo “cruiser” não aguardam a passagem do hospedeiro, mas o buscam ativamente no

¹⁹ BOEMARE, N. Biology, taxonomy and systematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic Nematology*. New York: CABI Publishing, 2002. p. 35-56.

²⁰ BOEMARE, N. *Op. cit.*

²¹ FORST, S. & CLARKE, D. *Op. cit.*

²² CICHE, T. A. & ENSIGN, J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, n. 4, p. 1.890-1.897, 2003.

²³ MARTENS, E. C. & GOODRICH-BLAIR, H. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. *Cellular Microbiology*, vol. 7, n. 12, p. 1.723-1.735, 2005.

²⁴ LEWIS, E. E.; GAUGLER, R. & HARRISON, R. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Canadian Journal of Zoology*, vol. 71, n. 4, p. 765-769, 1993.

solo, respondendo positivamente aos seus voláteis deslocando-se a uma certa distância até localizá-lo (resposta direcional). É o caso de espécies como *H. bacteriophora* e *S. glaseri*.²⁵ Ainda, existem espécies de NEPs que apresentam características tanto de “ambrushers” como de “cruisers”, de acordo com a proximidade do hospedeiro, como é o caso de *S. feltiae*.²⁶

Fatores bióticos e abióticos que afetam a eficiência dos NEPs

Organismos como fungos, bactérias e nematoídes predadores fazem parte dos fatores bióticos que podem causar mortalidade aos NEPs a campo. Os fungos nematófagos são considerados os mais importantes, pois afetam negativamente a capacidade dos NEPs como controladores biológicos. As espécies do gênero *Arthrobotrys* têm recebido uma atenção maior dos pesquisadores, por se tratar de fungos comuns a diversos solos e por possuírem alta capacidade predatória de nematoídes. Recomenda-se que antes de se aplicar os NEPs em determinada área, faça-se um levantamento dos fungos nematófagos existentes no local, uma vez que aqueles podem vir a ser predados pelos fungos, e por consequência, afetar a eficiência no controle dos insetos-praga. Havendo fungos nematófagos no solo, faz-se necessário aumentar a quantidade de juvenis infectantes.

Fatores abióticos como falta d'água, presença de pesticidas e temperaturas elevadas também afetam a viabilidade dos juvenis no solo. A mortalidade seria ainda maior se os NEPs não tivessem desenvolvido mecanismos de sobrevivência. Quando os JIs emergem de seu hospedeiro e estão no solo, conservam a cutícula da fase anterior (J2), garantindo sua viabilidade por mais tempo.²⁷

Produção dos nematoídes entomopatogênicos

Os atuais sistemas de produção são capazes de gerar NEPs em pequena, média e larga escala, mas os altos custos da maioria dos processos ainda constituem um fator limitante para o uso desses nematoídes em programas de Manejo Integrado de Pragas. Há duas técnicas para a produção dos NEPs: produção *in vivo* e produção *in vitro*. A associação entre nematoíde-bactéria favorece o cultivo do nematoíde por ambos os métodos, mas as bactérias precisam estar em condições nutricionais e ambientais favoráveis para que os nematoídes possam se desenvolver e multiplicar. Existem 27 empresas fabricando e/ou comercializando cerca de sete espécies de nematoídes entomopatogênicos no mundo.²⁸

²⁵ ISHIBASHI, N. & KONDO, E. Behaviour of infective juveniles. In: GAUGLER, R. & KAYA, H. K. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1990. p. 139-150.

²⁶ GREWAL, P. S.; LEWIS, E.; GAUGLER, R. & CAMPBELL, J. F. Host finding behavior as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, vol. 108, n. 2, p. 207-215, 1994.

²⁷ EPSKY, N. D.; WALTER, D. E. & CAPINEIRA, J. I. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Economic Entomology*, vol. 8, n. 1, p. 821-825, 1998. KAYA, H. K. Soil Ecology. In: GAUGLER, R. & KAYA, H. K. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1990. p. 93-115.

²⁸ SHELTON, A. Biological Control: a guide to natural enemies in North America. 2005. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/nematodes.html>. Acessado em setembro de 2011.

Produção *in vivo*

- ²⁹ GLASER, R. W. The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science*, vol. 73, n. 1901, p. 614-615, 1931.
- ³⁰ DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V. & CANTWELL, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal Insect Pathology*, vol. 6, p. 417-422, 1964.
- ³¹ MOLINA, J. P. A.; MOINO Jr., A. & CAVALCANTI, R. S. Produção *in vivo* de nematoides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, n. 3, p. 347-354, 2004.
- ³² POINAR Jr., G. O. *Op. cit.*
- ³³ SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R.; TEDDERS W. L.; BROWN, I. & LEWIS, E. Optimization of inoculation for *in vivo* production of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, vol. 34, n. 4, p. 343-350, 2002.
- ³⁴ WHITE, C. F. A method for obtaining larvae from culture. *Science*, vol. 66, p. 302-303, 1927.
GAUGLER, R.; BROWN, I.; SHAPIRO-ILAN, D. & ATWA, A. Automated technology for *in vivo* mass production of entomopathogenic nematodes. *Biological control*, vol. 24, p. 199-206, 2002.

Sem dúvida, hoje o método mais simples e o mais utilizado para multiplicar nematoides entomopatogênicos é o realizado em insetos hospedeiros. A técnica foi tentada pela primeira vez por Glaser²⁹, mas foi Dutky *et al.*³⁰ que primeiro obtiveram uma grande produção de juvenis infectantes em larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), a traça pequena dos favos (figura 2A). O número de JIs obtidos vai depender da susceptibilidade do hospedeiro, mas também da espécie de nematoide multiplicada.³¹ Em geral, obtêm-se de 100.000 a 300.000 JIs por larva infectada.³² Neste tipo de produção, o inseto hospedeiro atuará como um pequeno reator biológico, onde as bactérias utilizarão nutrientes dissolvidos na hemolinfa, mas também quebrarão compostos e tecidos do inseto com suas próprias enzimas.

As larvas de insetos são infectadas adicionando-se juvenis infectantes em meio aquoso a um papel absorvente ou submergindo as larvas no mesmo meio, sendo que este “banho” não deve passar de dois segundos. Em geral são utilizados cerca de 100 JIs por larva no primeiro método e 4.000 JIs/ml no segundo, devendo ser submersas nesta solução mais de 400 larvas.³³ Após 24 a 48 horas de infecção, as larvas adquirem a coloração característica do complexo nematoide-bactéria que as estão colonizando e, depois de completados dois a três ciclos do nematoide no hospedeiro (cerca de 5 a 10 dias), já não haverá mais alimento disponível e os juvenis infectantes começarão a deixar o cadáver em busca de novos hospedeiros. Esta etapa, também chamada de colheita, pode ser feita em diferentes escalas, desde placas de Petri até sistemas de colheita para grande volume de nematoides, como o LOTEK.³⁴



Figura 2: A. Larvas no sétimo instar de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). B. Larvas de *G. mellonella* sendo colocadas sobre papel absorvente com solução aquosa de juvenis infectantes (JIs). C. Larvas de *G. mellonella* sendo submersas em solução aquosa de JIs. Fotos 2B. e 2C. cedidas por Edwin Lewis, University of California Davis

A cultura *in vivo* possui uma série de vantagens dentre elas a simplicidade, o baixo custo da matéria-prima e dos equipamentos empregados, e a não necessidade de mão-de-obra especializada. O maior gasto neste sistema está na criação das larvas de *G. mellonella*, cuja dieta colabora com a maior parcela dos gastos de criação. Essa dieta vem sendo modificada com sucesso, para que se torne mais barata e a multiplicação dos nematoídes mais viável (dados não publicados).

Nos EUA, larvas de *G. mellonella* podem ser compradas por US\$0,01 cada; levando-se em consideração que cada larva produz cerca de 1 a 3,5 x 10⁵ JIs³⁵, então 25.000 larvas são necessárias para tratar um hectare com base em 2,5 x 10⁹ JIs/ha. Para baixar ainda mais o custo de produção, é preciso continuar melhorando alguns aspectos da criação das larvas e implementar sistemas de armazenamento e conservação de nematoídes.³⁶

Produção *in vitro*

A produção em meios artificiais começou 30 anos antes de Dutky *et al.*³⁷ ter proposto a multiplicação *in vivo*. Glaser³⁸ cultivava NEPs em bandejas cobertas com 4mm de um meio composto por vísceras de animais e dextrose ágar. Nesse sistema, eram produzidos cerca de 9.000 a 12.000 nematoídes por cm² de meio de cultura, atingindo 140 milhões de juvenis ao dia. Muitos outros meios foram testados, uns com mais e outros com menos sucesso, mas somente a partir da descoberta da bactéria simbiote, foi que se pode eliminar do meio as vísceras animais, tão fáceis de contaminar e tão desagradáveis de se trabalhar. Apesar de não conhecer a bactéria simbiote, Glaser observou que nematoídes mantidos neste meio por muito tempo, perdiam sua infectividade e que de tempos em tempos deveria infectar larvas de insetos para recuperá-los. Hoje a produção *in vitro* pode ser feita em meio artificial sólido e líquido.

a) Meio Artificial Sólido

A produção em meio sólido era feita com pedaços de um suporte inorgânico, como esponja de poliuretano, embebidos em um meio nutritivo constituído de tecidos animais e óleo como substrato, para a reprodução e desenvolvimento do complexo nematoide-bactéria. Dos meios desenvolvidos, o de Bedding³⁹ mostrou ser o de maior sucesso, e graças a este meio sólido e sua alta produção de JIs, a exploração comercial dos NEPs teve início. Ao invés de bandejas, Bedding usou garrafas de Erlenmeyers com es-

³⁵ DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V. & CANTWELL, G. E. *Op. cit.*

³⁶ FLANDERS, K. L.; MILLER, J. M. & SHIELDS, E. J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* "Oswego" (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *Journal of Economic Entomology*, vol. 89, n. 2, p. 373-380, 1996.

³⁷ DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V. & CANTWELL, G. E. *Op. cit.*

³⁸ GLASER, R. W. *Op. cit.*

³⁹ BEDDING, R. A. Low cost *in vitro* mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica*, vol. 27, p. 109-114, 1981.

ponja e substrato, obtendo produções da ordem de 1.300 milhões de juvenis em 3kg de meio sólido.

O meio nutritivo deve ser autoclavado juntamente com os pedaços de esponja em sacos plásticos ou Erlenmeyers. A bactéria simbiote é adicionada ao meio, e 24 horas depois os nematoides são adicionados. Após 14 ou 15 dias faz-se a colheita, espremendo-se a esponja (ou centrifugando-a) em peneiras, onde são retidos os juvenis infectantes. Hoje, ao invés de vísceras de animais utilizam-se meios nutritivos à base de extrato de levedura, óleos vegetais e ração de cachorro.⁴⁰ Essa mudança nos componentes do substrato vem tornando o processo mais acessível e hoje o custo de produção está menor do que US\$ 0,01 por 1 milhão de nematoides.⁴¹

Multiplicação de nematoides em meio sólido é considerado um método maleável, pois pode ser de pequena, média e grande escala, com custos de capital e matéria-prima relativamente baixos, sem a necessidade de mão-de-obra especializada. Por isso, é considerado atrativo a muitas pequenas empresas que começam a produzir nematoides entomopatogênicos. Ainda são necessários ajustes e melhorias nos processos de mistura do meio com o suporte, na inoculação da bactéria e dos JIs e na colheita dos JIs.⁴² A grande vantagem em relação ao método *in vivo* é a maior produção de JIs em um mesmo espaço de tempo.

b) Meio Artificial Líquido

O método de multiplicação de nematoides utilizando-se meio sólido, apesar de prático, é considerado laborioso, pois todo meio e esponja precisam ser autoclavados antes das inoculações. Além do mais, as esponjas não são biodegradáveis e descartar toneladas de esponja pode ser dispendioso e danoso ao meio ambiente. Pensando-se nisso, surgiu a produção de NEPs *in vitro* em meio líquido, utilizando-se fermentadores do tipo tanque de 3 a 10.000 L, com produções de 90×10^3 JIs/mL. Friedman⁴³ relata concentrações superiores a 95×10^3 JIs/mL em fermentadores “airlift”, nos quais a aeração é feita através de hélices no fundo destes, que fazem o líquido circular de baixo para cima. Apesar dos aspectos positivos deste sistema, como a não utilização de esponjas ou centrífugas, o controle de qualidade e o volume produzido, os rendimentos continuam insatisfatórios devido ao alto custo de produção. Nesse método, bactérias precisam ser multiplicadas em fermentadores menores de 2 L de capacidade, para então serem adicionadas a um fermentador maior com os nematoides. Uma desvantagem adicional é ter

⁴⁰ HUSSAINI, S. S.; SINGH, S. P.; PARTHASARATHY, R. & SHAKEELA, V. *In vitro* production of entomopathogenic nematodes in different artificial media. *Indian Journal of Nematology*, v. 32, n. 1, p. 44-46, 2002.

⁴¹ WOUTS, W. M. *Op. cit.*

⁴² FRIEDMAN, M. J. Commercial production and development. In: GAUGLER, R. & KAYA, H. R. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press., 1990. p. 153-172.

⁴³ FRIEDMAN, M. J. *Op. cit.*

que renovar a virulência das bactérias, multiplicando-se os nematoides *in vivo* constantemente. O processo leva de 15 a 18 dias e, não raro, depois deste tempo, verifica-se a presença de contaminação por outros microrganismos e que não houve multiplicação dos nematoides, exigindo que todo o material seja descartado.

Outra desvantagem é o custo elevado do equipamento utilizado e o de produção. O fermentador deve ser controlado por um software, o qual faz leituras constantes do pH, do nível de espuma, da temperatura e da pressão, e todos estes fatores precisam ser corrigidos caso haja necessidade de mão-de-obra especializada⁴⁴. A composição do meio líquido empregado não é conhecida. Em geral, as empresas se protegem patenteando todo o processo de produção, que vai variar de acordo com a espécie de NEP a ser produzida. A mudança de espécies encarece mais ainda o sistema, pois todo o equipamento deve ser desinfetado antes de usado para outra espécie de nematoide.⁴⁵

Formulação dos nematoides entomopatogênicos

Diferentes tipos de formulações têm sido testados para diferentes espécies de nematoides entomopatogênicos. Formulações variam desde esponja a grânulos solúveis em água, e estudos vêm sendo feitos para lançar uma formulação que utilize insetos cadáveres. O tipo de formulação vai depender da forma como os nematoides são produzidos, disponibilidade de material, tipo de nematoide e financiamento disponível.⁴⁶

Alguns nematoides possuem uma característica única, que é a de perder água paulatinamente sem perder sua integridade. O fenômeno é chamado de anidrobiose. NEPs são capazes de entrar em anidrobiose parcial, chamada de anidrobiose quiescente.⁴⁷ Tal característica foi explorada para gerar formulações com maior tempo de prateleira, como é o caso dos grânulos solúveis em água (tabela 1). Atualmente, as formulações comerciais disponíveis podem ser subdivididas em formulações nas quais os nematoides permanecem ativos, com mobilidade reduzida, ou ainda em anidrobiose parcial. Formulações em que os nematoides são levados a campo em insetos cadáveres serão comentadas também.

Formulações com nematoides ativos

Nessas formulações, o tempo de prateleira é curto, porque os nematoides permanecem se movimentando e despendendo energia.

⁴⁴ EHLERS, R. U.; NIEMANN, I.; HOLLMER, S.; STRAUCH, O.; JENDE, D.; SHANMUGASUNDRAM, M.; MEHTA, U. K.; EASWARAMOORTHY, S. K. & BURNELL, A. Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica-Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol Science and Technology*, v. 10, p. 607-616, 2000.

⁴⁵ WOUTS, W. M. *Op. cit.*

⁴⁶ GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R. & KAYA, H. K. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 173-191.

⁴⁷ WOMERSELY, C. Z. Dehydration survival and anhydrobiotic potential. In: GAUGLER, R. & KAY, H. K. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1990. p. 117-137.

Tabela 1: Tempo de prateleira de diferentes formulações usadas com nematoides entomopatogênicos

| Formulações | Espécies de nematoides | Linhagens | Tempo de prateleira (meses) em diferentes temperaturas | |
|---|-------------------------|-----------|---|----------|
| | | | 22-25°C | 2-10°C |
| Nematoides ativos | | | | |
| Esponja* | <i>S. carpocapsae</i> | All | 0,03-0,1 | 2,0-3,0 |
| | <i>H. bacteriophora</i> | | 0 | 1,0-2,0 |
| Vermiculita* | <i>S. carpocapsae</i> | All | 0,1-0,2 | 5,0-6,0 |
| | <i>H. megidis</i> | UK | 0 | 2,0-3,0 |
| Nematoides com mobilidade reduzida | | | | |
| Gel de alginato | <i>S. carpocapsae</i> | All | 3,0-4,0 | 6,0-9,0 |
| Concentrado líquido | <i>S. carpocapsae</i> | All | 0,16-0,2 | 0,4-0,5 |
| | <i>S. riobrave</i> | RGV | 0,1-0,13 | 0,23-0,3 |
| Nematoides em anidrobiose | | | | |
| Pó molhável* | <i>S. carpocapsae</i> | All | 2,0-3,5 | 6,0-8,0 |
| | <i>S. feltiae</i> | UK | 2,5-3,0 | 5,0-6,0 |
| Grânulos* | <i>S. carpocapsae</i> | All | 4,0-5,0 | 9,0-12,0 |
| | <i>S. feltiae</i> | SN | 1,5-2,0 | 5,0-7,0 |
| | <i>S. riobrave</i> | RGV | 2,0-3,0 | 4,0-5,0 |

* Formulação disponível comercialmente.

a) Esponja de poliuretano

Bastante utilizada por seu custo baixo e facilidade de manuseio, seu tempo de prateleira, contudo, deixa a desejar. Outra desvantagem seria a extração dos nematoides, pois as esponjas precisam ser encharcadas e espremidas para a sua retirada e, no caso de grandes áreas de aplicação, isto se torna inviável. Os nematoides em suspensão aquosa são adicionados às camadas de esponja. Em geral, consegue-se manter 500-1.000 JIs/cm². “I3 MAX” e “GrubStake™”, com os nematoides *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*, respectivamente, são exemplos de produtos com formulação em esponja atualmente comercializados.

b) Vermiculita

Formulações utilizando vermiculita conseguem maior tempo de prateleira do que em esponja, além de serem melhores para aplicação e conseguirem uma concentração maior de nematoides por volume. Da mesma forma que a primeira, nematoides em suspensão são adicionados e misturados à vermiculita, e esta mistura pode ser armazenada ou misturada em água para pulverização.

Formulações com nematoídes com mobilidade reduzida

Nesses tipos de formulações, nematoídes se movimentam menos, portanto perdem menos energia e permanecem viáveis por mais tempo.

a) Alginato de cálcio

O que se pretende neste caso é “prender” os nematoídes, para que não haja movimentação. Nematoídes são adicionados a telas plásticas circulares – com 10cm de diâmetro – cobertas com alginato de cálcio, as quais permanecem viáveis por vários meses, em temperatura ambiente ou sob refrigeração (tabela 1). Foi a primeira formulação criada com tempo de prateleira maior do que um mês a temperatura ambiente. Na hora da aplicação, as telas são lavadas com citrato de sódio, que dissolve o gel e libera os nematoídes. As desvantagens do método estão no trabalho em retirar os nematoídes, no custo das telas e no lixo produzido, já que as telas não são biodegradáveis.⁴⁸ Até hoje essa formulação só mostrou bons resultados com uma espécie de *Steinernema* (tabela 1).

⁴⁸ GEORGIS, R. *Op. cit.*

b) Concentrado líquido

Nesse processo diminui-se o metabolismo dos nematoídes adicionando-se um inibidor, que faz com que o nematoíde se movimente menos, respire menos, portanto gaste menos energia. O composto foi patenteado e não se sabe do que se trata. Esta formulação é bastante usada nos EUA para aplicação de *S. riobrave* em *Diaprepes*, na Flórida.

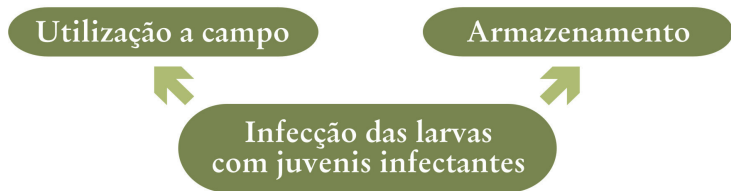
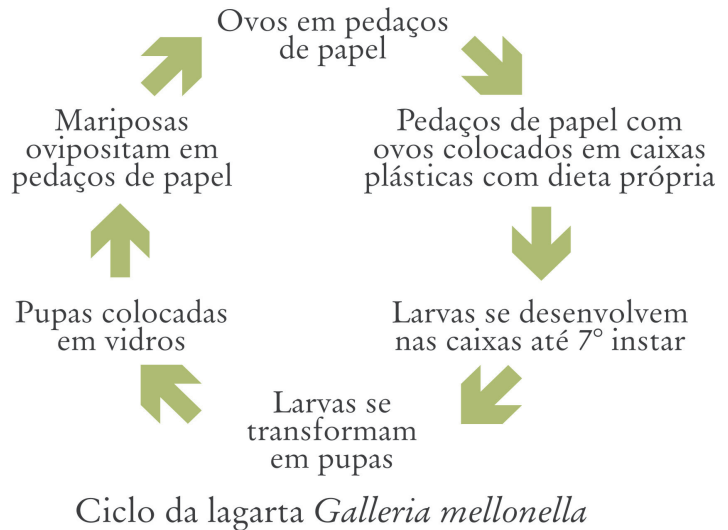
Formulações com nematoídes em anidrobiose parcial

Nematoídes requerem pelo menos um filme de água ao seu redor para manter o metabolismo ótimo e poder se movimentar. Nessas formulações, nematoídes são parcialmente desidratados, ou seja, a água livre ao seu redor é retirada, mas a umidade relativa da formulação permanece alta (80%).

a) Pó molhável

Esta formulação foi primeiramente proposta e patenteada por Bedding⁴⁹: nematoídes eram misturados em argila, que os desidratava parcialmente. A argila não é um bom material inerte, pois entope os bicos dos pulverizadores. Outras tentativas foram feitas adicionando-se absorvantes de água à formulação, mas o tipo de absorvante não é conhecido. O produto Nemasys[®] da Inglaterra, a base do nematoíde *S. feltiae*, dentre outros, é formulado com absorvantes (figura 4A).

⁴⁹ BEDDING, R. A. *Op. cit.*



Ciclo do nematoide entomopatogênico

Figura 3: Diagrama da criação de *Galleria mellonella* L. para utilização na produção *in vivo* de nematoides entomopatogênicos

b) Grânulos

Os grânulos solúveis em água foram um avanço em termos de formulação dos NEPs, pois permitem longo tempo de prateleira, são fáceis de aplicar, mas, por outro lado, demandam mão-de-obra e equipamentos especializados, o que se reflete em seu custo. Em grânulos de 10 a 20mm de diâmetro, os JIs em altas concentrações são primeiramente envoltos em um gel à base de celulose, lignina e outros componentes. Gotas do gel caem sobre uma bandeja com diferentes pós, como sílica, argila, amido, talco, dentre outros. Ao entrar em contato com os pós, o gel começa a perder água e endurece.⁵⁰ Os nematoides em seu interior entram em anidrobiose parcial em 4 a 7 dias depois de formado o grânulo. Somente as espécies que são capazes de entrar em anidrobiose podem ser usadas nesta formulação. Nematoides grandes como *S. glaseri*, ou que se movimentam muito como *H. bacteriophora*, também não são recomendados (figura 4B).

⁵⁰ GREWAL, P. S. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic Nematology*. New York: CABI Publishing, 2002. p. 265-287.

Formulação em insetos cadáveres

Este tipo de formulação pode ser usado com todos os nematoides entomopatogênicos e seu custo é baixo. Pode ser utilizado quando a multiplicação dos nematoides é feita *in vivo* em larvas de *G. mellonella*. Os juvenis infectantes provenientes dos cadáveres são mais viáveis do que aqueles em outras formulações.⁵¹

Larvas no último instar de *G. mellonella* são infectadas com o nematoide que se quer utilizar a campo, e após quatro dias de infecção são envoltas em óleo vegetal e amido.⁵² Isto confere turgidez e durabilidade ao cadáver, sem afetar os nematoides em seu interior (figuras 4C e 4D). Desta forma, as larvas infectadas podem ser embaladas em caixas e transportadas sem o risco de se romperem ou grudarem umas às outras. Para aplicar, são feitos pequenos buracos com 5cm de profundidade onde os cadáveres são colocados e depois cobertos por solo. Os insetos cadáveres podem ainda ser colocados em cápsulas de gelatina. Essa formulação é indicada para locais onde formigas do gênero *Atta* estejam presentes, pois elas carregam e destroem os insetos cadáveres.⁵³

⁵¹ SHAPIRO, D. I. & GLAZER, I. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. *Environmental Entomology*, vol. 25, p. 1.455-1.461, 1996.

⁵² SHAPIRO-ILAN, D. I.; LEWIS, E. E.; BEHLE, R. W. & MCGUIRE, M. R. Formulation of entomopathogenic nematode-infected cadavers. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 78, p. 17-23, 2001.

⁵³ DEL VALLE, E. E.; DO-LINSKI, C.; BARRETO, E. L. S. & SOUZA, R. M. Effect of cadaver coatings on emergence and infectivity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) and the removal of cadavers by ants. *Biological Control*, vol. 50, p. 21-24, 2009.

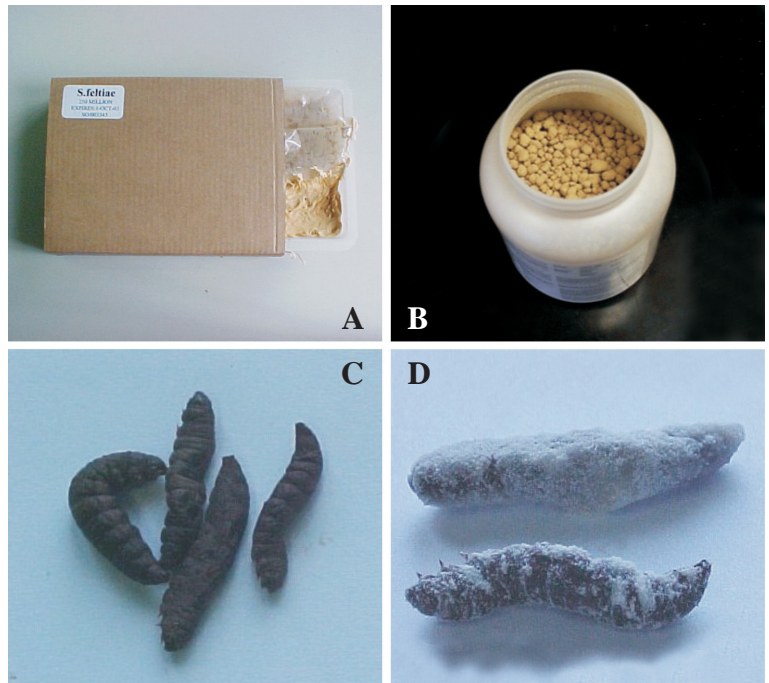


Figura 4: Diferentes formulações. A. Pó molhável. B. Grânulo. C. Larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Heterorhabditis baujardi* LPP7 sem cobertura. D. Larvas cobertas por óleo e amido

Legislação e regulamentação

A alta demanda de nematoides entomopatogênicos nos Estados Unidos na década de 1980, levou muitos grupos de pesquisadores em vários países do mundo a isolar novas espécies e linhagens. As amostragens e isolamentos expandiram enormemente o germoplasma de nematoides entomopatogênicos disponíveis para pesquisa, e aumentou o risco da introdução de nematoides exóticos em terras onde não eram nativos. Especificamente para o controle de pragas, os nematoides *S. scapterisci* e *S. feltiae* foram introduzidos, multiplicados e comercializados sem nenhum critério. Isto resultou em muitas críticas por parte de alguns pesquisadores, e William R. Nickle e colaboradores, em 1988, propuseram um guia para introdução de nematoides entomopatogênicos. Algum tempo depois, uma legislação sobre a introdução de espécies exóticas foi estabelecida.⁵⁴

Hoje todas as introduções de nematoides devem ser notificadas e todos os nematoides são analisados, identificados e estudados quanto a diversos fatores, que foram extensivamente discutidos por Jansson⁵⁵ antes da legislação ser estabelecida. Dentre esses fatores, o autor destaca como de maior importância o impacto dos nematoides exóticos em organismos não-alvos, bem como os efeitos que produzem no microcosmos local por sua capacidade de deslocar ou eliminar nematoides entomopatogênicos nativos.

Após tantas introduções aleatórias, os Estados Unidos se comportam como exemplo, pois promovem levantamentos do microcosmos e testes de patogenicidade com invertebrados locais, antes de qualquer introdução de nematoide entomopatogênicos exóticos. Exemplo que deveria ser seguido.

Na Europa, a situação foi um pouco diferente. Enquanto discussões estavam ocorrendo nos Estados Unidos, na Europa um comitê foi estabelecido para analisar o caso dos nematoides entomopatogênicos, prevendo-se problemas associados com a introdução de nematoides exóticos. Os membros do comitê concluíram que as evidências científicas suportavam a premissa de que os nematoides entomopatogênicos são inócuos, e poucos riscos foram identificados. Eles concluíram que os nematoides não precisavam de registro, mas que a introdução de nematoides não nativos devia ser regulada. Concluiu-se também que nematoides entomopatogênicos são organismos benéficos, pois vêm sendo usados há muitos anos sem causar problemas até o momento e afinal constituem menor ameaça ao ambiente do que os pesticidas.⁵⁶

⁵⁴ RIZVI, S. A.; HENNESSEY, R. & KNOTT, D. Legislation on the introduction of exotic nematodes in the US. *Biocontrol Science and Technology*, vol. 6, p. 477-480, 1996.

⁵⁵ JANSSON, R. K. Introduction of exotic entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) for biological control of insects: potential and problems. *Florida Entomologist*, vol. 76, n. 1, p. 82-96, 1993.

⁵⁶ EHLERS, R. U. & HOKKANEN, H. M. T. Insect control with non-endemic entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.): conclusions and recommendations of a combined OECD and COST workshop on scientific and regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology*, vol. 6, p. 295-302, 1996.

RICHARDSON, P. N. British and European legislation regulating rhabditid nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, vol. 6, p. 449-463, 1996.

Quadro 3: Exemplos de efeitos causados por nematoides entomopatogênicos em invertebrados

| Organismo não-alvo | Espécie de nematoide testada | Efeito |
|--|---|--|
| Parasitoides | | |
| <i>Apanteles militares</i> (Hym.: Braconidae) | <i>Steinernema carpocapsae</i> , <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> | Indireto em laboratório (hospedeiro morto) |
| <i>Compsilura concinnata</i> (Dip.: Tachinidae) | <i>S. carpocapsae</i> | Indireto em laboratório (hospedeiro morto) |
| <i>Cephalcia arvensis</i> (Hym.: Ichneumonidae) | <i>S. feltiae</i> | Reduzida emergência no campo |
| Insetos Predadores | | |
| <i>Harmonia axyridis</i> (Col.: Coccinellidae) | <i>S. carpocapsae</i> | Em placa de Petri, algumas joaninhas ficaram temporariamente paralisadas e outras morreram |
| <i>Harpalus</i> sp. e <i>Pterostaticus</i> sp. (Col.: Carabidae); <i>Cicindela</i> sp. e <i>Tetracha</i> sp. (Col.: Cicindelidae); <i>Philonthus</i> sp. (Col.: Staphylinidae); <i>Labidura</i> <i>riparia</i> (Derm.: Labiduridae) | <i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i> | Em laboratório, formas imaturas foram mortas, mas não adultos; não houve efeito nas populações no campo |
| <i>Bembidion proerans</i> , <i>Pterostichus cupreus</i> (Col.: Carabidae) | <i>S. carpocapsae</i> | Em testes no laboratório, adultos mortos, larvas não; pequena redução nas populações no campo |
| Outros invertebrados | | |
| <i>Onychiurus</i> (Collembola) | <i>S. carpocapsae</i> | Redução nas populações no campo |
| <i>Scutigera immaculata</i> (Symphyla) | <i>S. carpocapsae</i> | Mortos em laboratório |
| <i>Armadillidium vulgare</i> , <i>Porcellio scaber</i> (Crustácea: Isopoda) | <i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i> , <i>S. glaseri</i> | Mortos em laboratório pelos dois primeiros, mas não por <i>S. glaseri</i> |
| <i>Atyia innocous</i> , <i>Macrobrachium acanthurus</i> (Crustacea: Caridae) | <i>S. carpocapsae</i> | Sem efeito no laboratório |
| Várias espécies de Arachnida | <i>H. bacteriophora</i> | Mortos no laboratório |
| <i>Aporrectodea</i> sp. | <i>S. carpocapsae</i> | Minhocas intactas não foram afetadas |
| <i>Aporrectodea caliginosa</i> | <i>Steinernema</i> sp. | Sem efeito nos casulos das minhocas em laboratório |
| <i>Aporrectodea turgida</i> , <i>Aporrectodea tapezoides</i> , <i>Lumbricus terrestris</i> e <i>Eisenia</i> sp. | <i>S. carpocapsae</i> , <i>S. glaseri</i> | Sem efeito no laboratório |
| <i>Macrobotus richtersi</i> (Tardigrada) | <i>S. carpocapsae</i> | Infecções no laboratório |
| <i>Dericeras agreste</i> , <i>D. reticulatum</i> (Gastropoda) | <i>S. carpocapsae</i> | Mortos no laboratório |

Quadro 4: Testes dos efeitos de nematoides entomopatógenos e suas bactérias simbiotes em vertebrados

| Animal testado | Espécie de nematoide | Aplicação | Efeito |
|--------------------|--|---|--|
| Porquinho da Índia | <i>Xenorhabdus bovienii</i> | Oral, nasal, intradermal, subcutânea, intraperitoneal | Sem patologia |
| Rato | <i>Steinernema glaseri</i> | Intraperitoneal | Sem patologia |
| | <i>S. carpocapsae</i> | Oral, intraperitoneal | Sem patologia ou efeito no ganho de peso |
| | <i>X. bovienii</i> | Oral, intradermal, subcutânea, intraperitoneal | Sem patologia |
| Camundongo | <i>S. carpocapsae</i> | Oral, subcutânea, intraperitoneal | Úlceras na pele quando administrado subcutaneamente |
| | <i>S. feltiae</i> , <i>S. glaseri</i> | Oral, subcutânea, intraperitoneal | Sem patologia |
| | <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> | Oral | Sem patologia |
| | <i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i> | Subcutânea | Sem patologia |
| | <i>X. nematophila</i> , <i>Photorhabdus luminescens</i> | Subcutânea, intracerebral | Sem patologia |
| | <i>X. bovienii</i> | Oral, nasal, intradermal, subcutânea, intraperitoneal | Sem patologia |
| Coelho | <i>S. glaseri</i> | Oral, abdominal, cavidade orbital | Sem patologia |
| | <i>X. bovienii</i> | Conjuntiva | Sem patologia |
| Macaco | <i>S. glaseri</i> | Oral, abdominal, nasal | Sem patologia |
| Galinha | <i>S. carpocapsae</i> | Oral | Sem patologia |
| | <i>X. nematophila</i> , <i>P. luminescens</i> | Subcutânea | Sem patologia |
| Sapo | <i>S. carpocapsae</i> | Na água | Girinos mortos |
| Rã | <i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i> , <i>S. anomali</i> , <i>S. feltiae</i> , <i>Heterorhabditis</i> sp. | Na água | Girinos mortos, adultos não afetados |
| Peixe | <i>S. carpocapsae</i> | Na água | Sem patologia |
| Salamandra | <i>S. carpocapsae</i> , <i>S. glaseri</i> , <i>S. anomali</i> , <i>S. feltiae</i> , <i>Heterorhabditis</i> sp. | Oral | Sem patologia; presença de outras bactérias no fígado (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Chromobacterium</i>) |

- ⁵⁷ BARBERCHECK, M. E. & MILLAR, L. C. Environmental impacts of entomopathogenic nematodes used for biological control in soil. In: FOLLETT, P. A. & DUAN, J. J. (Eds.). *Non target effects of Biological Control*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 287-308.
- ⁵⁸ AKHURST, R. & SMITH, K. Regulation and safety. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic Nematology*. New York: CABI Publishing, 2002. p. 311-332.
- ⁵⁹ SOSA Jr., O. & BEAVERS, J. B. Entomogenous nematodes as biological control organisms for *Ligyris subtropicus* (Coleoptera: Scarabaeidae) in sugarcane. *Environmental Entomology*, vol. 14, n. 1, p. 80-82, 1985.
- ⁶⁰ CABANILLAS, H. E. & RAULSTON, J. R. Impact of *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernema) on the control of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. *Journal of Economic Entomology*, vol. 88, p. 58-64, 1995.
- ⁶¹ SHAPIRO-ILAN, D. I.; STUART, R. & MCCOY, W. Comparison of beneficial traits among strains of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, for control of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control*, vol. 28, p. 129-136, 2003.
- ⁶² ANDALÓ, V.; MOINO Jr., A.; SANTACECÍLIA, L. V. C. & SOUZA, G. C. Seleção de isolados de fungos e nematoides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). *Arquivos do Instituto Biológico*, vol. 71, n. 2, p. 181-187, 2004.
- ⁶³ DOLINSKI, C. Developing a research and extension program for control of the guava weevil in Brazil using entomopathogenic nematodes. In: XXXV Annual Meeting of the Society of Nematologists. Abstracts,

O impacto causado por NEPs após aplicação inundativa foi estabelecido por Barbercheck & Millar⁵⁷. Segundo os autores, NEPs teriam o potencial de infectar espécies não-alvo suscetíveis, com estágios no solo no momento da aplicação dos nematoides. Vale ressaltar que isto não ocorre com a maioria dos parasitoides ou predadores. Alguns testes com diferentes invertebrados são mostrados no quadro 3. Importa ressaltar a não susceptibilidade das minhocas a estes nematoides. Com relação aos vertebrados, inúmeros nematoides foram testados contra diversas espécies, desde peixes até macacos. O quadro 4 resume os referidos testes. Somente os girinos se mostraram suscetíveis, quando nematoides foram adicionados à água onde estavam. Akhurst & Smith⁵⁸ acreditam que as dosagens usadas nos girinos tenham sido absurdamente altas e que outras dosagens deveriam ser testadas.

Finalizando, as bactérias entomopatogênicas associadas aos NEPs não são consideradas perigosas ao meio ambiente, pois raramente são encontradas fora do nematoide ou do hospedeiro. Sua sobrevivência no solo é mínima, já que não possuem formas de sobrevivência.

Conclusões

Dentre os inúmeros testes de NEPs com diferentes insetos-praga revelados na literatura, vale citar algumas avaliações feitas com diferentes linhagens de nematoides entomopatogênicos contra os coleópteros *Cosmopolites sordidus*, *Diaprepes abbreviatus*, *Curculio caryae* e *Ligyris subtropicus* (testes a campo), ou contra o lepidóptero *Choristoneura rosaceana* (testes em laboratório e a campo), apenas para citar alguns. Vale ainda lembrar alguns trabalhos com testes de infectividade de *S. carpocapsae* contra *Agrotis ipsilon*⁵⁹, *S. riobrave* contra *Helicoverpa zea*⁶⁰, *S. carpocapsae* contra *Curculio caryae*⁶¹. Atualmente, a aplicação de NEPs é parte do MIP em citros, nozes, cogumelos, flores ornamentais, grama em campos de golfe e framboesa.

No Brasil, trabalhos com nematoides entomopatogênicos são ainda escassos. Mais recentemente, testes com a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro (*Dysmicoccus texensis*)⁶² e contra o gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii*)⁶³ no contexto de programas de manejo integrado, estão em andamento. Além destes, NEPs vêm sendo testados no controle biológico do carrapato bovino, *Boophilus microplus*⁶⁴, e de diferentes pragas da cana-de-açúcar⁶⁵.

Apesar do grande potencial de utilização dos nematoides entomopatogênicos como agentes do controle bioló-

Hawaii, Lihue, vol. 38, p. 270, 2006.

DOLINSKI, C. M.; DEL VALLE, E. E. & STUART, R. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*, vol. 38, n. 3, p. 422-427, 2006.

⁶⁴ VASCONCELOS, V. O.; FURLONG, J.; FREITAS, G. M.; DOLINSKI, C. M.; AGUILLERA, M. M.; RODRIGUES, R. C. & PRATA, M. C. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae), as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Parasitology Research*, vol. 94, p. 201-206, 2004.

FREITAS, G. M.; FURLONG, J.; VASCONCELOS, V. O. & DOLINSKI, C. M. Analysis of biological parameters of *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 exposed to entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* SANTA ROSA and ALL strains (Steinernema: Rhabditidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 48, p. 911-919, 2005.

⁶⁵ GIOMETTI, F. H. C.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; SCHMIT, F. S.; BATISTA FILHO, A. & DELL'ACQUA, R. Virulência de nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). *Bragantia*, vol. 70, n. 1, p. 81-86, 2011.

gico de pragas, a escolha do nematoide deve ser feita com critério e parcimônia para que o método realmente tenha sucesso. Além disso, é importante conhecer a área onde os NEPs serão aplicados, assim como os fatores bióticos e abióticos que possam ali intervir.

Nematoides nativos devem ser devidamente identificados em nível específico, e ter sua biologia definida antes de serem usados a campo. Com relação à biologia, diferentes aspectos devem ser observados, por exemplo, a progênie produzida em larvas de *G. mellonella*. Outra característica importante seria a temperatura ótima para migração e reprodução. Testes de virulência em laboratório devem ser feitos para que se conheça a espécie ou linhagem que melhor controlaria uma dada praga. Alguns nematoides possuem alta especificidade, mas outros não, por isso o ideal é buscar sempre aqueles com menor espectro de hospedeiros.

A utilização dos nematoides nativos deve ter prioridade sobre os exóticos, que devem ser aplicados em último caso. Os nativos já estão adaptados às condições climáticas como também a entomofauna local. Como não se conhece o impacto real que estes nematoides exóticos podem causar aos nativos, recomenda-se que pelo menos sejam feitos testes em laboratório contra os inimigos naturais encontrados na área a ser aplicada. Estes nematoides exóticos devem ser aplicados localmente e um cuidado além deve ser tomado para não serem dispersos.

A metodologia para a produção de NEPs evoluiu de forma significativa nos últimos 70 anos, principalmente no cultivo *in vitro*. Isto ocorreu devido a necessidade de se obter maior quantidade de JIs para aplicação nas lavouras contra importantes pragas. No Brasil, a aplicação dos nematoides a campo está apenas no começo e mais estudos nesta área são necessários.

O sistema de multiplicação de nematoides deve ser escolhido de acordo com a necessidade e a disponibilidade de espaço e investimento. A produção *in vivo* pode ser uma boa alternativa em laboratórios, para associações ou pequenas empresas. Este tipo de produção favorece a formulação em cadáveres. A desvantagem deste método seria a impossibilidade de se aumentar a produção ("scale-up"), pois demanda muito espaço e mão-de-obra. A produção *in vitro* em meio sólido, também parece ser uma boa alternativa para pequenos mercados em franca expansão. A multiplicação em meio líquido precisa ser estudada com mais afinco antes de ser implementada, para que não haja perda

da confiabilidade nos nematoides entomopatogênicos pelo mercado. Por ser um método mais elaborado deve-se fazer uma boa pesquisa de mercado para constatar a real necessidade de se produzir tão grande quantidade de juvenis infectantes e aplicar tantos recursos. Este tipo de produção deve estar associado à formulação em pós molhável ou em grânulos, para que possa atingir grandes mercados. Produtos biológicos não deveriam chegar ao mercado com preços mais elevados do que produtos químicos já estabelecidos. Por isso, o custo de produção precisa ser baixo e o produto de alta qualidade.

Outro ponto que se deve ter em mente é que uma espécie de NEPs não deve e não pode ser utilizada para o controle de todas as pragas, portanto quando se almeja produzir várias espécies ao mesmo tempo, deve-se focar no cultivo *in vivo* ou *in vitro* em meio sólido.

Claudia Dolinski é engenheira agrônoma, mestre em Fitopatologia, PhD. em Plant Pathology e professora da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.
claudia.dolinski@censanet.com.br