

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

LAURA VAILLANT RIBEIRO MAURI

PRODUÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM *Spodoptera eridania*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ALEGRE

2019

LAURA VAILLANT RIBEIRO MAURI

**PRODUÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM *Spodoptera eridania*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal na linha de pesquisa em Fitossanidade.

Orientador: Prof. Dr. Dirceu Pratisoli.

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Cláudia de Melo Dolinski e Prof. Dr. Hugo José Gonçalves Santos Junior.

ALEGRE

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

V131p Vaillant Ribeiro Mauri, Laura, 1995-
Produção de nematoides entomopatogênicos em Spodoptera eridania (Lepidoptera: Noctuidae) / Laura Vaillant Ribeiro Mauri. - 2019.
68 f. : il.

Orientador: Dirceu Pratissoli.

Coorientadores: Cláudia de Melo Dolinski, Hugo José Gonçalves Santos Junior.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Produção in vivo. 2. Nematoides. 3. Hospedeiro. 4. Lipídio. I. Pratissoli, Dirceu. II. de Melo Dolinski, Cláudia. III. Gonçalves Santos Junior, Hugo José. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

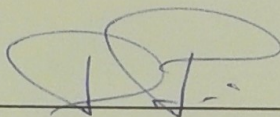
CDU: 63

PRODUÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM *Spodoptera eridania*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

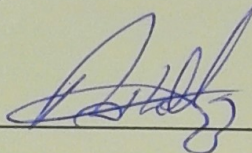
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal na linha de pesquisa em Fitossanidade.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2019.

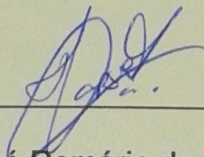
COMISSÃO EXAMINADORA



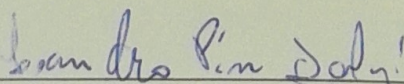
Prof. Dr. Dirceu Pratissoli
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias- CCAE/UFES
Orientador



Prof. Dr. Anderson Mathias Holtz
Instituto Federal do Espírito Santo-Campus Itapina



Prof. Dr. José Romário de Carvalho
Secretaria Estadual de Educação-ES



Prof. Dr. Leandro Pin Dalvi
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias- CCAE/UFES

AGRADECIMENTOS

“... Até aqui nos ajudou o Senhor...” (1 Sm 7:12). Graças dou ao meu bom Deus e Pai, que me sustenta em suas poderosas mãos. Louvado seja o Senhor por essa vitória!

A meus pais Mauro e Silvia e a minha irmã Layla, que desde o início da minha caminhada acadêmica estão ao meu lado.

Ao meu esposo Renan pela compreensão e parceria.

A minha coorientadora e amiga Cláudia Dolinski, que apesar da distância, sempre me apoiou e me orientou em cada decisão.

Ao meu coorientador Hugo Gonçalves pela orientação e amizade.

Ao meu orientador Dirceu Pratisoli por acreditar em mim e apoiar as minhas decisões.

A Roberta Ximenes e a Roberta Santos, minhas estagiárias amadas, que colaboraram diretamente para a conclusão desse trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Entomologia por toda amizade e carinho.

À equipe do Laboratório de Nematologia da Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF), professor Ricardo, Olívio, Bruna, Thaís e Alexandre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES), pelo auxílio financeiro para as pesquisas.

Ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário (NUDEMAFI) pelo suporte para realização deste trabalho, ao Programa de Produção Vegetal e à Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de realizar o mestrado.

BIOGRAFIA

Laura Vaillant Ribeiro Mauri, 24 anos, nasceu em 23 de janeiro de 1995 na cidade de Alegre-ES. É cristã, filha de Mauro Torres Ribeiro e Silvia Pinheiro Vaillant Ribeiro e irmã de Layla Vaillant Ribeiro. Casou-se com Renan Mateini Mauri em dezembro de 2017, residente no município de Alegre-ES. Cresceu e viveu até aos 14 anos de idade em Sobreira, zona rural do município de Alegre-ES. Na escola estadual “Oscar de Almeida Gama”, no distrito de Araraí Alegre-ES, completou todo o ensino primário e fundamental até o ano de 2008. Em 2009 iniciou seus estudos no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia-Campus de Alegre, no curso Técnico em Agroindústria concomitante ao ensino médio. Em 2012 ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo-Centro de Ciências Agrárias e Engenharias e em 2016 adquiriu o título de Engenheira Agrônoma. No ano de 2017 deu início ao mestrado no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, na área de Fitossanidade/Entomologia, cuja conclusão se deu em fevereiro de 2019.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
1.2 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	9
1.2.1 Associação simbiote com bactérias	9
1.2.2 Ciclo de vida.....	10
1.2.3 Sobrevivência.....	12
1.2.4 Estratégias de busca	13
1.3 UTILIZAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS	14
1.4 SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS ..	15
1.4.1 Produção <i>in vitro</i>	16
1.4.2 Produção <i>in vivo</i>.....	18
1.5 <i>Spodoptera eridania</i> (CRAMER).....	20
1.6 REFERÊNCIAS.....	22
2 CAPITULO 1 PRODUÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM <i>Spodoptera eridania</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).....	29
2.1 INTRODUÇÃO	30
2.2 OBJETIVO GERAL	31
2.2.1 Objetivos específicos	32
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.3.1 Obtenção e multiplicação dos insetos.....	32
2.3.1.3 Obtenção de larvas de <i>T. molitor</i>	35
2.3.1.4 Obtenção de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	35
2.3.2 Obtenção e multiplicação dos nematoides	36
2.3.3 Produção de <i>S. carpocapsae</i> e <i>H. mexicana</i> em diferentes ínstares de <i>S. eridania</i>.....	37
2.3.4 Comparação da produtividade de JIs entre lagartas de <i>S. eridania</i>, <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i>.....	39
2.3.5 Virulência dos JIs produzidos em <i>S. eridania</i>, <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i>	42

2.3.6 Determinação do teor de lipídio e umidade de lagartas de <i>S. eridania</i>, <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i>	42
2.3.7 Obtenção dos custos das dietas dos hospedeiros	43
2.4 RESULTADOS.....	44
2.4.1 Produção de <i>S. carpocapsae</i> e <i>H. mexicana</i> em diferentes instares de <i>S. eridania</i>	44
2.4.2 Comparação da produtividade de JIs entre <i>S. eridania</i>, <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i>	49
2.4.3 Teor de lipídio total e de umidade de lagartas de <i>S. eridania</i>, <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i>	55
2.5 DISCUSSÃO	56
2.6 CONCLUSÕES.....	61
2.7 REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são parasitas obrigatórios de insetos e demonstram alta eficiência quando utilizados no manejo de insetos praga. A multiplicação massal desses organismos pode ser realizada em sistemas de produção *in vitro* ou *in vivo*. Na produção *in vitro* os nematoides são multiplicados juntamente com a bactéria simbiote em tanques de fermentação com meio nutritivo artificial e controlado. Para a produção *in vivo* são utilizados insetos hospedeiros saudáveis e suscetíveis, os quais são a fonte de nutrição e ambiente para a reprodução dos nematoides. Muitos insetos foram estudados para serem empregados na produção *in vivo* de NEPs, no entanto, nenhum foi tão eficiente quanto o hospedeiro padrão *Galleria mellonella*, o qual é altamente produtivo, contudo, tem custo elevado. Para reduzir custos e tornar esse produto biológico mais competitivo no mercado, é necessário encontrar um inseto altamente produtivo e barato, uma vez que o hospedeiro é o insumo que representa a maior parte dos custos de produção. Nesse sentido, a espécie *Spodoptera eridania* tem potencial para ser utilizada na produção *in vivo* de NEPs, reduzir custos e maximizar a produção, pois apresenta ciclo curto, alta capacidade reprodutiva, criação massal fácil e barata, as lagartas são grandes e robustas, o que pode refletir em alta disponibilidade de recurso nutricional para a reprodução dos nematoides e elevada produtividade de juvenis infectantes (JIs). Diante desse pressuposto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produtividade de duas espécies de NEPs em diferentes instares de *S. eridania* e verificar a viabilidade dessa espécie para a produção *in vivo* de NEPs. O experimento foi conduzido em duas etapas em laboratório, sob condições climáticas de 25 ± 1 °C, 70 ± 10 % de umidade relativa, no escuro. Na primeira etapa, lagartas de 3º, 4º, 5º e 6º instar de *S. eridania* foram inoculadas separadamente com os nematoides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana* e as variáveis obtidas foram porcentagem de mortalidade, viabilidade de cadáveres, produtividade de JIs mL⁻¹ e produtividade de JIs a cada 100 lagartas inoculadas. Na segunda etapa, os melhores instares de *S. eridania* para a produção dos nematoides foram estudados em comparação com dois hospedeiros padrão, *G. mellonella* e *Tenebrio molitor*, obtendo-se as variáveis porcentagem de mortalidade,

viabilidade de cadáveres, produtividade de JIs mL⁻¹, produtividade de JIs g⁻¹, lagarta equivalente e virulência dos JIs obtidos dos diferentes hospedeiros, além de ter sido realizada a análise o teor de lipídio de cada inseto. Os resultados demonstraram que o melhor estágio larval de *S. eridania* para a multiplicação de *S. carpocapsae* e *H. mexicana* é o 4^o e 6^o ínstar, respectivamente. A produtividade de *H. mexicana* no 6^o ínstar de *S. eridania* foi estatisticamente igual à produção em *G. mellonella* e superior a *T. molitor*, no entanto, para *S. carpocapsae* a produtividade no 4^o ínstar de *S. eridania* foi estatisticamente igual à produtividade obtida em *T. molitor*, mas inferior a *G. mellonella*. Pode-se observar também que o tamanho das lagartas, assim como o teor de lipídio de cada hospedeiro, interferiu diretamente na produtividade de JIs.

Palavras-chave: Produção *in vivo*. Nematoides. Hospedeiro. Lipídio.

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are obligatory parasites of insects and demonstrate high efficiency when used in pest insect management. Massive multiplication of these organisms can be performed in *in vitro* or *in vivo* production systems. In the *in vitro* production the nematodes are multiplied together with the symbiotic bacteria in fermentation tanks with artificial and controlled nutritional medium. For *in vivo* production, healthy and susceptible host insects are used, which are the source of nutrition and environment for nematode reproduction. Many insects have been studied to be employed in the *in vivo* production of EPNs, however, none have been as efficient as the standard host *Galleria mellonella*, which is highly productive, however, has a high cost. To reduce costs and make this biological product more competitive in the market, it is necessary to find a highly productive and inexpensive insect, since the host is the input that represents most of the costs of production. In this sense, the species *Spodoptera eridania* has the potential to be used in the *in vivo* production of EPNs, to reduce costs and to maximize production, since it has a short cycle, high reproductive capacity, easy and inexpensive mass rearing, caterpillars are large and robust, what may to reflect high availability of nutritional resources for nematode reproduction and high productivity of infective juveniles (IJs). The objective of this work was to study the productivity of two species of ENPs in different instars of *S. eridania* and verify the viability of this species for the *in vivo* production of EPNs. The experiment was conducted in two stages in the laboratory, under climatic conditions of 25 ± 1 ° C, $70 \pm 10\%$ relative humidity, in the dark. In the first stage, *S. eridania* 3rd, 4th, 5th and 6th instar caterpillars were inoculated separately with the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis mexicana* and the variables obtained were percentage of mortality, cadavers viability, IJ mL⁻¹ and productivity of IJs per 100 inoculated caterpillars. In the second stage, the best instars of *S. eridania* for the production of nematodes were studied in comparison with two standard hosts, *G. mellonella* and *Tenebrio molitor*, obtaining the variables mortality percentage, cadavers viability, IJ mL⁻¹, IJ g⁻¹ yield, equivalent caterpillar and virulence of the IJs obtained from the different hosts, in addition to the analysis of the lipid content of

each insect. The results showed that the best larval stage of *S. eridania* for the multiplication of *S. carpocapsae* and *H. mexicana* is the 4th and 6th instar, respectively. The productivity of *H. mexicana* in the 6th instar of *S. eridania* was statistically equal to the production in *G. mellonella* and superior to *T. molitor*, however, for *S. carpocapsae* the productivity in the 4th instar of *S. eridania* was statistically equal to productivity obtained in *T. molitor*, but inferior to *G. mellonella*. It can also be observed that the size of the caterpillars, as well as the lipid content of each host, directly interfered in the productivity of IJs.

Keywords: In vivo production. Nematodes. Host. Lipid.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) são parasitas obrigatórios de insetos e possuem relação simbiote com bactérias entomopatogênicas. Pertencem às famílias Steinernematidae, composta pelos gêneros *Steinernema* e *Neosteinernema*, e Heterorhabtidae, composta pelo gênero *Heterorhabditis* (ADANS; NGUYEN, 2002).

A primeira descrição desses organismos foi realizada no ano de 1923 e, desde então, foram descritas 118 espécies de *Steinernema* e 20 espécies de *Heterorhabditis* (HUNT; SUBBOTIN, 2016).

Os NEPs são eficientes para o controle de pragas que possuem pelo menos um estágio do ciclo de vida no solo, mas também podem controlar insetos na parte aérea das plantas. No entanto, a rápida dissecação na superfície foliar é um fator limitante. São eficazes e seguros ao meio ambiente e organismos não alvo, e podem ser multiplicados em larga escala (LACEY; GEORGIS, 2012; TESTA; SHIELDS, 2017).

1.2.1 Associação simbiote com bactérias

As bactérias entomopatogênicas são específicas de acordo com o gênero e espécie do NEP. As espécies do gênero *Heterorhabditis* têm associação com bactérias do gênero *Photorhabdus*, carregando-as na região anterior do intestino, enquanto

espécies do gênero *Steinernema* possuem associação com bactérias do gênero *Xenorhabdus*, carregando-as em uma vesícula na região mediana do intestino (BIRD; AKHURST, 1983; BOEMARE; LAUMOND; MAULEON, 1996).

A dependência do nematoide pelas bactérias entomopatogênicas está relacionada à função das mesmas em matar o hospedeiro, transformar seus tecidos em fonte de alimento, disponibilizá-lo como recurso alimentar e propiciar um ambiente adequado para reprodução, por produzirem antibióticos e outros metabólitos secundários que protegem o cadáver do desenvolvimento de microrganismos oportunistas e competidores. Por outro lado, a dependência da bactéria pelos nematoides relaciona-se à disseminação e proteção, tanto do ambiente externo quanto do sistema imunológico do hospedeiro (STOK; BLAIR, 2008).

1.2.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida dos NEPs é caracterizado pelos estádios de ovo, juvenil (J1, J2, J3 e J4) e adulto, os quais se desenvolvem dentro do hospedeiro. O juvenil infectante (juvenil de estágio 3) é o único estágio de vida livre e o responsável por localizar e infectar novos hospedeiros (ADANS; NGUYEN, 2002) (Figura 1).



Figura 1: Juvenis infectantes de nematoides entomopatogênicos. Fotografia obtida em microscópio óptico (objetiva com aumento de 200x).

Os juvenis infectantes (JIs) penetram no hospedeiro pela cavidade oral, ânus e espiráculos, ou através do tegumento, como acontece com espécies do gênero *Heterorhabditis*, que possuem a extremidade anterior projetada e queratinizada, a qual utilizam para perfurar a cutícula do hospedeiro (KOPPENHÖFER; GREWAL; FUZY, 2007).

Uma vez dentro do hospedeiro, os juvenis precisam alcançar a hemolinfa para liberarem a bactéria simbiote, que produzirá toxinas responsáveis por provocar a morte do inseto em um intervalo de 24-72 horas. Concomitante à morte do inseto, o ciclo de desenvolvimento do JI é retomado (DILMAN; STERNBERG, 2012).

Em Steinernematidae, o JI se alimenta das bactérias e dos subprodutos por elas produzidos, muda para o 4º estágio, e depois para machos e fêmeas da primeira geração, os quais se acasalam. As fêmeas produzem ovos dos quais eclodem os juvenis de 1º estágio, seguindo-se do 2º, 3º, 4º estágios e fêmeas e machos da segunda geração, que se acasalam e dão origem à prole de terceira geração. Em Heterorhabditidae, o ciclo é semelhante, diferindo-se em relação à primeira geração de adultos, a qual é composta somente por fêmeas hermafroditas (NGUYEN; SMART JUNIOR, 1992; SMART JUNIOR, 1995).

Na terceira geração, quando, geralmente, os recursos nutricionais do cadáver se esgotam, os juvenis de 2º estágio incorporam células da bactéria simbiote e mudam para o 3º estágio de JI, mas retêm a cutícula do 2º estágio, como uma bainha de proteção, e por fim, saem do cadáver em busca de novos hospedeiros (SMART JUNIOR, 1995) (Figura 2).

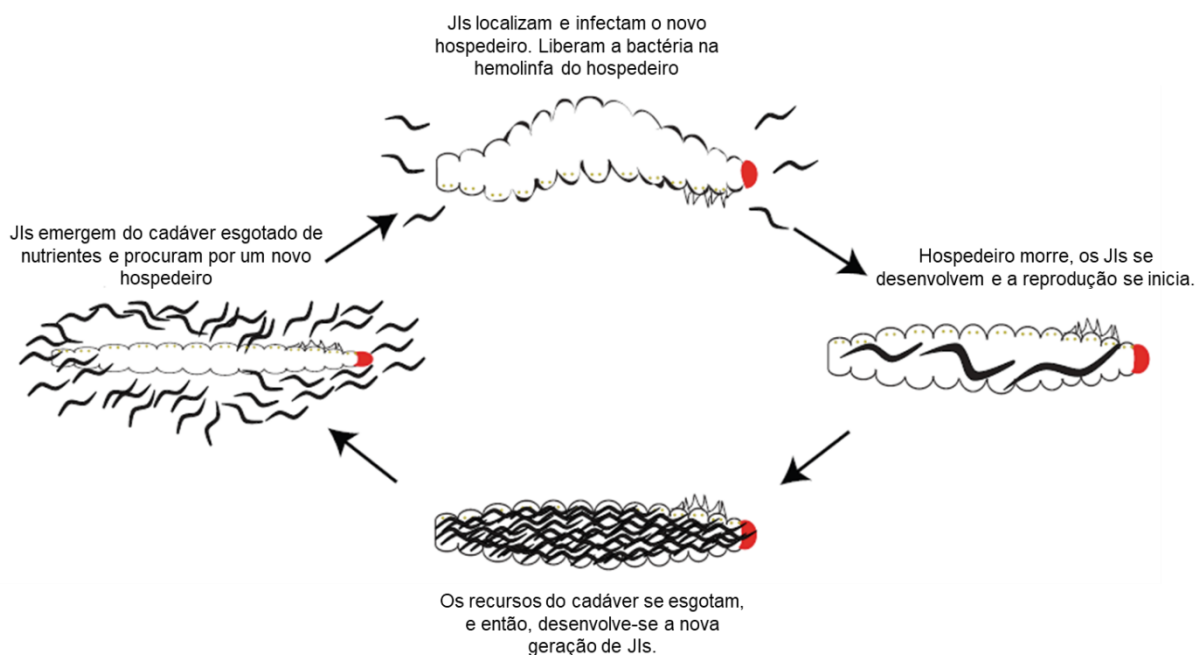


Figura 2: Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos, modificado de Dilman et al., 2012.

O período que compreende a entrada do JI no hospedeiro e a emergência da nova geração de JI é de 12 – 15 dias, variando de acordo com as espécies associadas e fatores abióticos como temperatura (DEVI, 2018).

1.2.3 Sobrevivência

Ao saírem do cadáver, os JIs retornam ao solo, local onde permanecem até encontrarem um novo hospedeiro. Os JIs não se alimentam e a sobrevivência no ambiente é dependente das taxas metabólicas e dos níveis de energia iniciais que armazenaram durante o desenvolvimento dentro do último cadáver. A energia dos JIs provém 60% do metabolismo de lipídios e está proporcionalmente relacionada à sobrevivência e capacidade infectante (HATAB et al., 1998).

Para sobreviver em condições de estresse ambiental, os nematoides podem manifestar estratégias de migração, afastando-se da condição adversa, adaptação

ou sincronização do ciclo de vida com o do hospedeiro. Os JIs podem persistir no solo por mais de 400 dias, de acordo com a espécie ou linhagem, densidade do hospedeiro no ambiente e de fatores ambientais, tanto abióticos, como temperatura, umidade, luz ultra-violeta, pH, teor de matéria orgânica e tipo de solo, quanto bióticos, como patógenos e predadores (KUNG; GAUGLER, 1990; PATEL; STOLINSKI; WRIGHT; 1997; WHARTON, 2004; WILLIAMS et al., 2013; TOLEDO et al., 2014; SHAPIRO-ILAN; HAZIR; LETE, 2015; WILSON et al., 2016; HELMBERGER et al., 2017).

1.2.4 Estratégias de busca

As estratégias para encontrar novos hospedeiros variam de acordo com as espécies de NEPs. O hábito de forrageamento dos JIs pode ser classificado em “ambusher” e/ou “cruiser”. O tipo “ambusher” utiliza a estratégia “sentar e esperar”, permanece em pé sobre a calda, comportamento denominado nictação, e espera até que um hospedeiro se aproxime, enquanto o tipo “cruiser” procura ativamente os hospedeiros pelo solo. Contudo, também existem espécies que apresentam hábito intermediário (BAL et al., 2017).

Os NEPs também possuem quimiorreceptores que captam compostos voláteis, principalmente dióxido de carbono, liberado pelas trocas gasosas do inseto, que os direcionam para os hospedeiros, assim como, voláteis que são emitidos por raízes de plantas em resposta ao ataque de insetos (ENNI et al., 2010; TURLINGS; HILPOLD; RASMANN, 2012).

1.3 UTILIZAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS

Apesar de os NEPs terem sido descobertos em 1923, a primeira comercialização ocorreu após 60 anos e, atualmente, treze espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são produzidas e comercializadas (LACEY et al., 2015).

O aumento da demanda de NEPs impulsiona investimentos na construção de biofábricas, as quais estão localizadas atualmente na Ásia, América do Norte e Europa, num total de 12 grandes empresas (LACEY et al., 2015).

Os NEPs são eficazes no controle de pragas e podem ser utilizados em cultura pura, ou em combinação com inseticidas químicos ou com outros agentes de controle microbiano, de modo a maximizar os resultados dentro de um programa de manejo (NIEKERK; MALAN, 2015; SHAPIRO-ILAN et al., 2016; SHAURUB et al., 2016; KARY et al., 2018).

A adequação da espécie de NEP a ser utilizada está em função da suscetibilidade e comportamento da praga. Para insetos ativos e sobre a superfície do solo é recomendado se utilizar NEPs com hábito *ambusher*, enquanto que, para insetos que estão sob o solo ou em ambientes crípticos, NEPs com hábito *cruiser* terão maior sucesso para encontrá-los (MORTON et al., 2008).

Os NEPs podem ser aplicados tanto por meio de equipamentos comuns a aplicação de inseticidas químicos, como pulverizadores pressurizados ou eletrostáticos, quanto como por meio de irrigação por gotejamento ou cadáveres de insetos previamente infectados, sendo que, para aplicação em suspensão aquosa, várias formulações podem ser utilizadas como em argila, vermiculita, carvão ativado e grânulos dispersos em água (VALLE et al., 2009; SHAPIRO-ILAN; HAN; DOLINSKI, 2012).

Trabalhos com a amostragem de NEPs em território nacional têm sido realizados de modo a encontrar espécies com potencial para o controle biológico e incentivar a utilização desses organismos no manejo de pragas com espécies nativas,

adaptadas à entomofauna e condições edafoclimáticas regionais (DOLINSKI; MOINO JUNIOR, 2006; BRIDA et al., 2017).

Foram descritas 11 espécies e 56 linhagens de NEPs em território nacional, as quais têm mostrado potencial para o controle biológico, como é o caso da espécie *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rondônia-BR) (DOLINSKI et al., 2017).

A linhagem *Heterorhabditis baujardi* LPP7 foi utilizada em um trabalho de campo realizado pela pesquisadora Cláudia Dolinski, que implementou um programa de manejo do gorgulho da goiabeira (*Conotrachelus psidii*) com produtores de Cachoeira de Macacu, Rio de Janeiro-BR. Nesse programa, além de práticas culturais, foram distribuídos 20 cadáveres de *G. mellonella* previamente infectados com juvenis do NEP a cada 9 m², o que resultou na redução de 80% da população de adultos da praga (DOLINSKI et al., 2008; DOLINSKI; CHOO; DUNCAN, 2012).

Os resultados para a utilização de NEPs no Brasil são promissores, contudo, a falta de incentivo financeiro debilita as pesquisas e retarda o avanço do país para o emprego desses bioagentes do controle de pragas de importância agrícola, médica e veterinária (DOLINSKI et al., 2017).

1.4 SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Os sistemas de produção de NEPs podem ser de *in vivo* ou *in vitro*, cada qual com vantagens e desvantagens (Tabela 1).

Tabela1*: Comparação entre os sistemas de produção de nematoides entomopatogênicos.

	Sistemas de produção		
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i> -meio sólido	<i>In vitro</i> -meio líquido
Dispendio de capital	Baixo	Intermediário	Alto
Especialização técnica	Nominal	Intermediária	Ampla
Obtenção de qualidade	Fácil	Difícil	Difícil
Mão-de-obra	Alta	Intermediária	Baixa
Economia de escala	Baixa	Intermediária	Alta
Facilidade de adaptação a novas espécies	Fácil	Difícil	Difícil

*Adaptada de Shapiro-Ilan, Han e Qiu, 2014.

1.4.1 Produção *in vitro*

A produção *in vitro* de NEPs baseia-se na introdução de juvenis em uma cultura pura da bactéria simbiote em um meio nutritivo estéril. O meio contém ingredientes que evitam contaminação com bactérias indesejáveis, retém a bactéria simbiote e fornece todos os nutrientes necessários para a multiplicação dos nematoides (DEVI, 2018) (Figura 4).

O cultivo dos nematoides nesse método pode ser em meio sólido ou líquido, o qual é esterilizado, inoculando-se a bactéria simbiote e, posteriormente, os nematoides, cuja produtividade é influenciada diretamente pela concentração de nutrientes do meio, e a colheita é realizada após duas a cinco semanas (LEITE et al., 2016).

A produção em meio sólido é realizada em recipientes do tipo Erlenmeyers, e em meio líquido, é realizada em biorreatores de aço inoxidável de até 100.000 litros,

com controle de pH, temperatura e agitação constante, de modo a suprir a demanda por oxigênio dos NEPs (Figura 4) (DEVI, 2018).



Figura 4: Cultivo de *Heterorhabditis. bacteriophora* em meio líquido. À esquerda encontra-se um fermentador com o meio líquido antes da inoculação com a bactéria simbiote *Photorhabdus*, e à direita, o mesmo meio, após 21 dias de cultivo dos nematoides (INMAN; SINGH; HOLMES, 2012).

O conhecimento da biologia do nematoide, assim como da bactéria simbiote, é de extrema importância, pois cada gênero e/ou espécie tem características específicas, o que resultará no sucesso ou fracasso desse sistema de produção (DEVI, 2018).

Apesar da alta produtividade e baixa demanda de mão de obra, a produção *in vitro* ainda é restrita, pois demanda de altos investimentos, mão de obra especializada, além da difícil adaptação às diferentes espécies de NEPs (SHAPIRO-ILAN; HAN; QIU, 2014).

1.4.2 Produção *in vivo*

Consiste em um sistema bidimensional que utiliza hospedeiros vivos e sadios para a multiplicação dos NEPs. Geralmente, segue as etapas de inoculação do hospedeiro com o nematoide, colheita, concentração e descontaminação.

A inoculação pode ser realizada por imersão, pulverização ou aplicando a suspensão sobre um substrato condutor. Após um intervalo de 2 a 5 dias, os cadáveres são recolhidos e dispostos em armadilhas do tipo “White”, por meio das quais os JIs migram do cadáver para a água (Figura 3) (WHITE, 1927; SHAPIRO-ILAN et al., 2002).



Figura 3: Armadilha de White (1927) modificada, constituída de anel de PVC (25 mm de diâmetro e 50 mm de altura), papel filtro e água.

As principais despesas para a produção *in vivo* incluem os insetos hospedeiros e a mão de obra (Shapiro-Ilan et al., 2014).

Tecnologias para reduzir a mão de obra e promover uma escala de produção massal foram desenvolvidas e aprimoradas, como é o caso do método LOTEK, no qual as etapas de colheita, separação e limpeza são automatizadas para reduzir custos (GAUGLER et al., 2002).

A escolha da espécie hospedeira e do nematoide a ser produzido é dependente, principalmente, do rendimento de NEPs por custo do hospedeiro e adequação da espécie do nematoide ao inseto praga alvo. O hospedeiro deve ser suscetível, ter alto potencial reprodutivo e multiplicado facilmente com a utilização de materiais de baixo custo (COSTA; DIAS; MORENZ, 2007).

A qualidade do hospedeiro é um dos fatores limitantes, pois quanto maior for o recurso nutricional do inseto para o NEP, maior será a produtividade e qualidade dos nematoides produzidos (FLANDERS; MILLER; SHIELDS, 1996).

O teor de lipídio é um dos principais fatores que propiciam qualidade ao meio de cultivo, visto que se a fonte de lipídio for insuficiente à demanda dos nematoides, ocorrerá a produção subótima de JIs, além de poder afetar a persistência e desempenho dos JIs em infectar novos hospedeiros (HATAB; GAUGLER, 2001).

A espécie *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) é o hospedeiro mais utilizado por apresentar alta suscetibilidade à maioria das espécies de NEPs e propiciar alta produtividade de juvenis. Contudo, a produção de galerias desses insetos em meio a dieta e fortes casulos, o custo de multiplicação e a fragilidade dos cadáveres são algumas desvantagens (MONTEIRO et al., 2014; DEVI et al., 2018).

A larva da farinha, *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae), é um hospedeiro alternativo; o baixo custo de produção e a rigidez do tegumento são algumas vantagens, no entanto, a produtividade de juvenis é substancialmente inferior a *G. mellonella* (MONTEIRO et al., 2014).

Espécies de Lepidoptera, *Cydia pomonella*, *Helicoverpa armigera*, *Corcyra cephalonica* e *Agrotis ipsilon*, de Diptera, *Hermetia illucens* e *Bactrocera dorsalis*, e de Coleoptera, *Alphitobius diaperinus*, são exemplos de outros hospedeiros estudados como alternativos à *G. mellonella*. No entanto, apesar de, geralmente, o custo desses hospedeiros ser menor, a produtividade de JIs é inferior a *G. mellonella*, por questões de suscetibilidade e/ou tamanho do inseto (COSTA; DIAS; MORENZ, 2007; ALI et al., 2008; EBSSA; KOPPENHOVER, 2011; ZIL; MALAN, 2015; TOURTOIS; ALI; GRIESHOP, 2017; GODJO et al., 2018).

Além do hospedeiro, outros fatores que interferem na produção *in vivo* são temperatura, concentração de JIs, método de inoculação e densidade de hospedeiro

por recipiente durante a inoculação dos nematoides, dentre outros (SHAPIRO-ILAN; GAUGLER, 2002; SHAPIRO-ILAN et al., 2012; TESTA; SHILDS, 2017).

Apesar do avanço da tecnologia, a adoção do sistema de produção *in vivo* é crescente, sendo utilizado principalmente em países em desenvolvimento ou em indústrias artesanais em países desenvolvidos, devido ao investimento relativamente baixo, não dependência de mão de obra especializada e facilidade no processo (GAUGLER et al., 2002; HAZIR et al., 2003).

Em geral, o inseto hospedeiro ainda representa a maior fração dos custos de produção *in vivo* de NEPs; dessa forma, há necessidade de se encontrar um inseto altamente produtivo e com baixo custo de multiplicação, o que irá maximizar a produção e reduzir o custo do produto final (SHAPIRO-ILAN et al., 2002; TESTA; SHILDS, 2017).

1.5 *Spodoptera eridania* (CRAMER)

A espécie *S. eridania* pertence à Ordem Lepidoptera, família Noctuidae. É endêmica das Américas e considerada praga chave para o Brasil. Apresenta hábito alimentar do tipo polífago, abrangendo mais de 200 plantas hospedeiras, como recurso alimentar para a fase larval que é desfolhadora, contudo, pode ser multiplicada em laboratório com dieta artificial (GRENEE; LEPPLA; DICKERSON, 1976; MONTEZANO et al., 2014).

É um inseto com desenvolvimento relativamente rápido, uma vez que o ciclo de vida compreende o período de aproximadamente 27 dias (25 ± 2 °C, 70 ± 10 % UR), com alta viabilidade dos estádios de ovo, larva e pupa. Os adultos têm alta capacidade reprodutiva, cada fêmea pode ovipositar cerca de 2.400 ovos. A fase larval passa por seis ínstaros, as lagartas são robustas e podem alcançar 35 mm de comprimento (TEODORO et al., 2008; FAVETTI et al., 2015; SPECHT et al., 2016).

As características apresentadas por essa espécie podem ser problemáticas do ponto de vista fitossanitário, no entanto, tais aspectos a promovem em um inseto promissor para ser utilizado como hospedeiro para a multiplicação massal de organismos benéficos, como os nematoides entomopatogênicos, cujo sistema de produção *in vivo* depende de insetos suscetíveis, com baixo custo e facilidade de multiplicação, e tais exigências são encontradas em *S. eridania* (COSTA; DIAS; MORENZ, 2007; CARVALHO, 2018).

1.6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 1-28.
- ALI, S. S.; PERVEZ, R.; HUSSAIN, M. A.; AHMAD, R. Susceptibility of three lepidopteran pests to five entomopathogenic nematodes and *in vivo* mass production of these nematodes. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 41, n. 4, p. 300 – 304, 2008.
- BAL, H. K.; ACOSTA, N.; CHENG, Z.; GREWAL, P. S.; HOY, C. W. Effect of habitat and soil management on dispersal and distribution patterns of entomopathogenic nematodes. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 48–59, 2017.
- BIRD, A. F.; AKHURST, R. J. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. **International Journal for Parasitology**, v. 13, n. 6, p. 599-606, 1983.
- BOEMARE, N.; LAUMOND, C.; MAULEON, H. The entomopathogenic nematode-bacterium complex: biology, life cycle and vertebrate safety. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p. 333- 345, 1996.
- BRIDA, A. L.; ROSA, J. M. O.; OLIVEIRA, C. M. G.; CASTRO, B. M. C.; SERRÃO, J. E.; ZANUNCIO, J. C.; LEITE, L. G.; WILCKEN, S. R. S. Entomopathogenic nematodes in agricultural areas in Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-7, 2017.
- CARVALHO, J. R. **Comportamento e desempenho de agentes de controle biológico sobre *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2018. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES.
- COSTA, J. C. R.; DIAS, R. J. P.; MORENZ, M. J. F. Determining the adaptation potential of entomopathogenic nematode multiplication of *Heterorhabditis riobravus* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida:Heterorhabditidae, Steinernematidae) in larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Parasitology Research**, v. 102, p. 139–144, 2007.

- DEVI, G. Mass production of entomopathogenic nematodes- a review. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v.3, n. 1032-1043, 2018.
- DILLMAN, A. R.; CHASTON, J. M.; ADAMS, B. J.; CICHE, T. A.; GOODRICH-BLAIR, H.; STOCK, S. P.; STERNBERG, P. W. An entomopathogenic nematode by any other name. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 3, 2012.
- DILLMAN, A. R.; STERNBERG, P. W. Entomopathogenic nematodes. **Current biology**, v. 22, n. 11, 2012.
- DOLINSKI, C.; MOINO JUNIOR, A. Utilização de nematoides entomopatogênicos nativos ou exóticos: o perigo das introduções. **Nematologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 139-149, 2006.
- DOLINSKI, C.; CHOO, H. W.; DUNCAN, H. W. Grower acceptance of entomopathogenic nematodes: case studies on three continents. **Journal of Nematology**, v. 44, n. 2, p. 226–235, 2012.
- DOLINSKI, C.; KAMITANI, F. L.; MACHADO, I. R.; WINTER, C. E. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 150-159, 2008.
- DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALÓ, V.; LEITE, L. G. Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. **Nematoda**, v. 4, 2017.
- EBSSA, L.; KOPPENHOVER, A. M. Entomopathogenic nematodes for the management of *Agrotis ipsilon*: effect of instar, nematode species and nematode production method. **Pest Management Science**, 2011.
- ENNIS, D. E.; DILLON, A. B.; GRIFFIN, C. T. Simulated roots and host feeding enhance infection of subterranean insects by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 140–143, 2010.
- FLANDERS, K. L.; MILLER, J. M.; SHIELDS, A. J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. **Journal Economic Entomology**, v. 89, n. 2, p. 373-380, 1996.

GAUGLER, R.; BROWN, I.; SHAPIRO-ILAN, D.; ATWA, A. Automated technology for *in vivo* mass production of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 24, p. 199–206, 2002.

GODJO, A.; ZADJI, L.; DECRAEMER, W.; WILLEMS, A.; AFOUDA, L. Pathogenicity of indigenous entomopathogenic nematodes from Benin against mango fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) under laboratory conditions. **Biological Control**, v. 117, p. 68–77, 2018.

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

HAZIR, S.; KAYA, H. K.; STOCK S. P.; KESKÜN, N. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. **Turkish Journal of Biology**, v. 27, p. 181-202, 2003.

HELMBERGER, M. S.; SHIELDS, E. J.; WICKINGS, K. G. Ecology of belowground biological control: entomopathogenic nematode interactions with soil biota. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 201–213, 2017.

HUNT, D. J.; SUBBOTIN, S. A. Taxonomy and systematics. In: HUNT, D. J.; NGUYEN, K. B. **Nematology monographs and perspectives**. Boston: Brill, 2016. p. 13-58.

INMAN, F. L.; SINGH, S.; HOLMES, L. D. Mass production of the beneficial nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and its bacterial symbiont *Photorhabdus luminescens*. **Indian Journal Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 316–324, 2012.

KARY, N. E.; SANATIPOUR, Z.; MOHAMMADI, D.; KOPPENHÖFER, A. M. Developmental stage affects the interaction of *Steinernema carpocapsae* and abamectin for the control of *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Biological Control**, v. 122, p. 18–23, 2018.

KOPPENHÖFER, A. M.; GREWAL, P. S.; FUZY, E. M. Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into four white grub species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 94, p. 184–195, 2007.

KUNG, S. P.; GAUGLER, R. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 55, n. 4, 1990.

LACEY, L. A.; GEORGIS, R. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. **Journal of Nematology**, v. 44, n. 2, p. 218–225, 2012.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.

LEITE, L. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAZIR, S.; JACKSON, M. A. The effects of nutrient concentration, addition of thickeners, and agitation speed on liquid fermentation of *Steinernema feltiae*. **Journal of Nematology**, v. 48, n. 2, p.126–133, 2016.

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

MONTEZANO, D. G.; SPECHT, A.; SOSA–GÓMEZ, D. R.; ROQUE–SPECHT, V. F.; BARROS, N. M. Immature stages of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae): developmental parameters and host plants. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 238, 2014.

MORTON, A.; PINO, F. G. Effectiveness of different species of entomopathogenic nematodes for biocontrol of the mediterranean flatheaded rootborer, *Capnodis tenebrionis* (Linne´) (Coleoptera: Buprestidae) in potted peach tree. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 128–133, 2008.

NGUYEN, K. B.; SMART JUNIOR, G. C. Life Cycle of *Steinernema scapterisci*. **Journal of Nematology**, v. 24, n. 1, p. 160-169, 1992.

NIEKERK, S. V.; MALAN, A. P. Adjuvants to improve aerial control of the citrus mealybug *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) using entomopathogenic nematodes. **Journal of Helminthology**, v. 89, p. 189–195, 2015.

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

SHAPIRO-ILAN, D. I.; COTTRELL, T. E.; MIZELL, R. F.; HORTON, D. L. Efficacy of *Steinernema carpocapsae* plus fire gel applied as a single spray for control of the lesser peachtree borer, *Synanthedon pictipes*. **Biological Control**, v. 94, p. 33–36, 2016.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R.; TEDDERS, W. L.; BROWN, I.; LEWIS, E. E. Optimization of inoculation for *in vivo* production of entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 34, n. 4, p. 343–350, 2002.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAN, R.; DOLINKSI, C. Entomopathogenic Nematode Production and Application Technology. **Journal of Nematology**, v. 44, n. 2, p. 206–217, 2012.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAN, R.; QIU, X. Production of entomopathogenic nematodes. In: MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I. **Beneficial organisms invertebrates and entomopathogens**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 321-346.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAZIR, S.; LETE, L. Viability and virulence of entomopathogenic nematodes exposed to ultraviolet radiation. **Journal of Nematology**, v. 47, n. 3, p.184–189, 2015.

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

SHAURUB, E. H.; REYAD, N. F.; ABDEL-WAHAB, H. A.; AHMED, S. H. Mortality and nematode production in *Spodoptera littoralis* larvae in relation to dual infection with *Steinernema riobrave*, *Heterorhabditis bacteriophora*, and *Beauveria bassiana*, and the host plant. **Biological Control**, v. 103, p. 86–94, 2016.

SMART JUNIOR, G. C. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. **Journal of Nematology**, v. 27, n. 4, p. 529-534, 1995.

SPECHT, A.; MONTEZANO, D. G.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PAULA-MORAES, S. V.; ROQUE-SPECHT, V. F.; BARROS, N. M. Reproductive potential of *Spodoptera eridania* (Stoll) (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory: effect of multiple couples and the size. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 526-530, 2016.

STOCK, S. P.; BLAIR, H. G. Entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts: the inside out of a mutualistic association. **Symbiosis**, v. 46, p. 65–75, 2008.

TESTA, A. M.; SHILDS, E. J. Low labor *in vivo* mass rearing method for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 106, p. 77–82, 2017.

TEODORO, A. V.; PROCÓPIO, S. O.; BUENO, A. F.; NEGRISOLI JUNIOR, A. S.; CARVALHO, H. W. L.; NEGRISOLI, C. R. C. B.; BRITO, L. F.; GUZZO, E. C. *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae): **Novas Pragas de Cultivos da Região Nordeste**. 1ª edição. Aracaju-SE: Embrapa, 2013.

TOLEDO, J.; SÁNCHEZ, J. E.; WILLIAMS, T.; GÓMEZ, A.; MONTOYA, P.; IBARRA, J. E. Effect of soil moisture on the persistence and efficacy of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) against *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae. **Florida Entomologist**, v. 97, n. 2, 2014.

TOURTOIS, J.; ALI, J. G.; GRIESHOP, M. J. Susceptibility of wounded and intact black soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) to entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 150, p. 121–129, 2017.

TURLINGS, T. C. J.; HILTPOLD, I.; RASMANN, S. The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. **Plant Soil**, v. 358, p. 51–60, 2012.

WHARTON, D. A. Survival strategies. In: GAUGLER, R.; BILGRAMI, A. L. **Nematode behavior**. New Jersey, Cabi Publishing, 2004. p.371-392.

WILLIAMS, C. D.; DILLON, A. B.; GIRLING, R. D.; GRIFFIN, C.T. Organic soils promote the efficacy of entomopathogenic nematodes, with different foraging strategies, in the control of a major forest pest: a meta-analysis of field trial data. **Biological Control**, n. 65, p. 357–364, 2013.

WILSON, M. J.; WILSON, D. J.; RODGERS, A.; GERARD, P. J. Developing a strategy for using entomopathogenic nematodes to control the african black beetle (*Heteronychus arator*) in New Zealand pastures and investigating temperature constraints. **Biological Control**, v. 93, p. 1–7, 2016.

ZIL, C. V.; MALAN, A. P. Cost-effective culturing of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* and entomopathogenic nematode production in various hosts. **African Entomology**, v. 23, n. 2, p. 361-375, 2015.

2 CAPÍTULO I

PRODUÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS EM *Spodoptera eridania* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

2.1 INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) são importantes ferramentas para o controle biológico de pragas, são eficazes e ambientalmente seguros, e por isso, utilizados com frequência no manejo de insetos que possuem algum estágio do ciclo de vida no solo, habitat natural desses organismos. Podem ser tão eficientes quanto inseticidas químicos sintéticos, além da vantagem de alcançar alvos em locais críticos (MORTON et al., 2008; SHAPIRO-ILAN et al., 2016).

Para que os NEPs sejam utilizados como agentes de biocontrole, primeiramente precisam ser produzidos massalmente. A produção massal pode ser *in vitro* ou *in vivo*. Enquanto que o sistema de produção *in vitro* multiplica os NEPs e bactéria simbiote em fermentadores com meios nutritivos artificiais, o sistema de produção *in vivo* utiliza insetos hospedeiros como fonte nutricional e ambiente para a reprodução dos nematoides (SHAPIRO-ILAN; HAN; QIU, 2014).

O sistema de produção *in vivo* apresenta vantagens que o fazem ser adotado de maneira crescente, mesmo com o avanço da tecnologia, como investimento relativamente baixo, demanda por mão de obra não especializada, alta qualidade dos nematoides produzidos e fácil adaptação a diferentes espécies de NEPs, contudo, existem obstáculos que precisam ser superados para tornar o produto mais competitivo no mercado, e o principal deles é o custo com a obtenção do inseto hospedeiro (GAUGLER et al., 2002; SHAPIRO-ILAN et al., 2014; TESTA; SHIELDS, 2017).

Os insetos hospedeiros mais utilizados, considerados como padrão, são *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), a qual apresenta alta produtividade de nematoides, contudo, é de elevado custo, e *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae), que é de baixo custo, porém, resulta em uma produtividade relativamente baixa, fato que revela a problemática enfrentada pelo sistema de produção *in vivo* em relação aos hospedeiros (SHAPIRO-ILAN et al., 2002; MONTEIRO et al., 2014).

Diversos insetos foram estudados como alternativos a *G. mellonella*, no entanto, nenhum foi tão produtivo e ainda faz-se necessário encontrar um hospedeiro barato e altamente produtivo (ZIL; MALAN, 2015; TOURTOIS; ALI; GRIESHOP, 2017; GODJO et al., 2018).

Nesse sentido, a espécie *Spodoptera eridania* (CRAMER) (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto promissor para a produção *in vivo* de NEPs, pois apresenta alta capacidade reprodutiva, ciclo curto, lagartas grandes, pode ser multiplicada com dieta artificial em alta densidade de indivíduos por recipiente, é de fácil criação massal, além de ser suscetível a diferentes espécies de NEPs, qualidades que a caracterizam como um hospedeiro em potencial para a produção *in vivo* de NEPs (FAVETTI et al., 2015; CARVALHO, 2018).

Então, diante desse pressuposto, o objetivo desse trabalho foi estudar a produtividade de duas espécies de NEPs em diferentes ínstares de *S. eridania* e verificar a viabilidade dessa espécie para a produção *in vivo* de NEPs como alternativa aos hospedeiros padrão *G. mellonella* e *T. molitor*, de modo a maximizar a produção de NEPs e reduzir custos.

2.2 OBJETIVO GERAL

Estudar a produtividade de duas espécies de NEPs em diferentes ínstares de *S. eridania* e verificar a viabilidade dessa espécie para a produção *in vivo* de NEPs.

2.2.1 Objetivos específicos

Estudar a suscetibilidade do 3º, 4º, 5º e 6º ínstar de *S. eridania* aos nematoides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana*.

Determinar o melhor ínstar de *S. eridania* para a produção *in vivo* de *S. carpocapsae* e *H. mexicana*.

Comparar a produtividade de *S. eridania* com os hospedeiros padrão *G. mellonella* e *T. molitor*.

Estimar o custo de multiplicação dos três hospedeiros estudados.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Entomologia do NUDEMAFI (Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças), localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES) em Alegre, Espírito Santo, Brasil.

2.3.1 Obtenção e multiplicação dos insetos

Os insetos foram obtidos da criação massal do NUDEMAFI.

2.3.1.1 Obtenção de lagartas de *S. eridania*

Os adultos foram mantidos em gaiolas de PVC (15 cm de diâmetro x 20 cm de altura) revestidas com folhas de papel sulfite para postura e foram alimentados com solução de mel a 10%, em sala climatizada a temperatura de 25 ± 2 °C.

Diferentes ínstares de *S. eridania* de mesmo dia foram obtidos coletando massas de ovos de 24 horas em intervalos pré-definidos, que foram acondicionadas em recipientes plásticos (12 cm de diâmetro x 9 cm de altura) e mantidas em câmara climatizada à temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e fotoperíodo de 12 horas, até a eclosão (ATAÍDE et al., 2018).

Após eclodirem, as lagartas foram transferidas para recipientes plásticos (25 cm de comprimento x 10 cm de largura x 15 de altura) com cubos de dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedura de cerveja, e mantidas em câmara climatizada à temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e fotoperíodo de 12 horas, onde permaneceram até completarem a idade determinada para a realização do experimento, em uma densidade de 50 lagartas por recipiente (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976) (Tabela 2 e Figura 5).

Tabela 2: Estádios larvais de *Spodoptera eridania* multiplicada a temperatura 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e fotoperíodo de 12 horas.

Estádios	Duração dos estádios* (dias)	Idade (dias)
ovo	3	
1º instar	3	3
2º instar	2	5
3º instar	3	8
4º instar	3	11
5º instar	3	14
6º instar	2	16

*Ataíde et al., (2018).

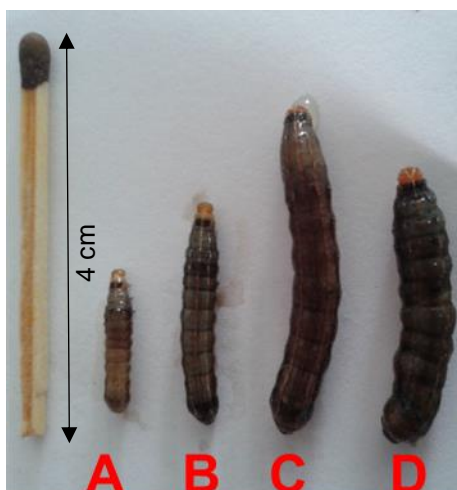


Figura 5: Lagartas de *Spodoptera eridania* no 3^o (A), 4^o (B), 5^o (C) e 6^o (D) ínstar multiplicadas à temperatura 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e fotoperíodo de 12 horas.

2.3.1.2 Obtenção de lagartas de *G. menonella*

Os adultos foram mantidos em gaiolas de PVC (15 cm de diâmetro x 20 cm de altura) revestidas com folhas de papel sulfite sanfonadas para oviposição. As posturas obtidas foram colocadas em dieta artificial à base de mel de abelhas, glicerina, germe de trigo, farelo de trigo, leite em pó e extrato de levedura, para eclosão e desenvolvimento das lagartas, as quais foram mantidas na temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e escotofase de 24 horas (ZYL; MALAN, 2015).

2.3.1.3 Obtenção de larvas de *T. molitor*

Os adultos foram mantidos em farinha de trigo integral, na qual realizavam postura. A cada 15 dias a farinha era então recolhida e acondicionada em recipientes plásticos para a eclosão das larvas. Após 20 dias da eclosão, as larvas eram transferidas para uma nova farinha de trigo integral. A temperatura de multiplicação foi de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e fotoperíodo de 12 horas (ZYL; MALAN, 2015).

2.3.1.4 Obtenção de lagartas de *Spodoptera frugiperda*

Os adultos foram mantidos em gaiolas de PVC (15 cm de diâmetro x 20 cm de altura) revestidas com folhas de papel sulfite para postura e alimentados com solução de mel a 10%. As posturas foram recolhidas e acondicionadas em recipientes plásticos (12 cm de diâmetro x 9 cm de altura) até a eclosão.

Após eclodirem, as lagartas foram transferidas para recipientes plásticos (10 cm de comprimento x 10 cm de largura x 2 cm de altura) com cubos de dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e extrato de levedura para lagartas, onde permaneceram até completarem a idade determinada para a realização do experimento, em uma densidade de 30 lagartas por recipiente. A temperatura de multiplicação foi de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e fotoperíodo de 12 horas (NALIN, 1991).

2.3.2 Obtenção e multiplicação dos nematoides

Após a realização de pré-testes de virulência com as linhagens do banco de NEPs do NUDEMAFI sobre lagartas de *S. eridania*, foram escolhidas as espécies *Steinernema carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis mexicana* MEX cedidas pelo Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG) e pelo Laboratório de Nematologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), respectivamente, para serem utilizadas nesse trabalho, as quais estavam armazenadas em câmara climatizada a 16 ± 1 °C, 60 ± 10 %, no escuro.

Para serem revigorados, os nematoides foram aplicados sobre lagartas de último ínstar de *G. mellonella* na concentração de 200 JIs em 0,5 mL de suspensão por lagarta. Após dois dias, os cadáveres foram recolhidos e dispostos em armadilha modificada de White (Figura 6), a qual foi mantida à temperatura 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 %, no escuro. Após 11 dias, os JI começaram a emergir dos cadáveres, foram recolhidos e mantidos em recipientes plásticos com água deionizada em câmara climatizada 16 ± 1 °C, 60 ± 10 % de UR, no escuro, por no máximo quatro dias até a realização do experimento (VALLE et al., 2009).



Figura 6: Armadilha de White modificada, constituída de um recipiente plástico (8 cm de diâmetro x 5 cm de altura), anel de PVC (3 cm de diâmetro x 0,5 de altura), uma fita de papel filtro (2 cm de largura x 6 cm de comprimento) e água deionizada até a metade da altura do anel; e um cadáver de *Galleria mellonella* disposto sobre a mesma.

2.3.3 Produção de *S. carpocapsae* e *H. mexicana* em diferentes ínstares de *S. eridania*

Nesse experimento foi estudada a capacidade produtiva de nematoides entomopatogênicos em lagartas de *S. eridania*, em delineamento inteiramente casualizado do tipo fatorial duplo com duas espécies de nematoides (*S. carpocapsae* e *H. mexicana*) e quatro ínstares de *S. eridania* (3º, 4º, 5º e 6º), com 23 repetições por tratamento.

Lagartas de *S. eridania* de 3º, 4º, 5º e 6º ínstar, com peso médio de $0,0149 \pm 0,0001$ g, $0,1413 \pm 0,0005$ g, $0,6891 \pm 0,0028$ g, $0,6344 \pm 0,0038$ g, respectivamente, foram dispostas individualmente em recipiente de acrílico (5 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) com papel filtro no fundo e um cubo de dieta artificial (1cm x 1cm x 1cm) (Figura 7).



Figura 7: Lagarta de 5º ínstar de *Spodoptera eridania* na unidade experimental com substrato do tipo papel filtro e um cubo de dieta artificial.

A inoculação de cada espécie de nematoide foi realizada por meio da aplicação de 0,5 mL de suspensão com 200 JIs sobre cada lagarta com auxílio de um pipetador automático. Sobre as lagartas que constituíram a testemunha foi aplicada água deionizada (VALLE et al., 2009).

Os recipientes contendo as lagartas inoculadas foram mantidos em câmara climatizada à temperatura 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 %, no escuro.

A mortalidade em cada ínstar foi avaliada após 96 horas.

Para a avaliação da produtividade dos nematoides em cada ínstar de *S. eridania*, os cadáveres de cada tratamento foram recolhidos e dispostos em armadilha de White (1927) modificada e mantidos em câmara climatizada à temperatura 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 %, no escuro (Figura 8).



Figura 8: Armadilhas de White modificadas de cada tratamento em câmara climatizada à temperatura 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % para desenvolvimento dos nematoides e produção dos juvenis infectantes.

Após 11 dias, aproximadamente, os juvenis começaram a emergir. Foram recolhidos por 10 dias consecutivos e armazenados em recipientes plásticos em câmara climatizada 16 ± 1 °C, 60 ± 10 % de UR, no escuro, para posterior quantificação.

A quantificação dos JI foi realizada de forma indireta por meio da contagem em triplicata do número de JI contidos em 0,1 mL de suspensão sob microscópio estereoscópico, de modo a estimar a concentração de JI por mL (Figura 9).

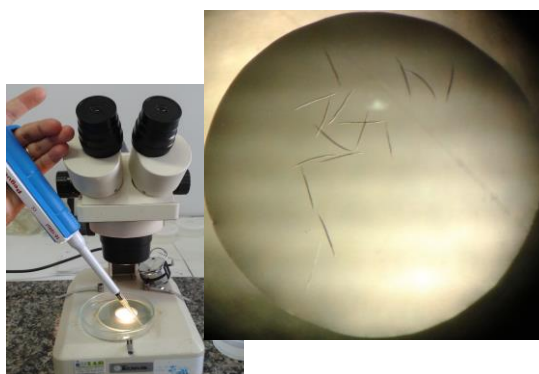


Figura 9: Contagem e visualização dos juvenis infectantes sob microscópio estereoscópico (aumento de 200x).

Com base nos dados de mortalidade e produtividade por mL, foram analisados os seguintes parâmetros:

- Viabilidade dos cadáveres (%): refere-se à porcentagem de cadáveres dos quais emergiram JIs em cada tratamento;
- Produtividade de JIs por 100 lagartas inoculadas: refere-se a uma estimativa do número total de JIs que poderão ser obtidos a cada 100 lagartas inoculadas, levando em consideração a viabilidade dos cadáveres e a produtividade média de JIs em cada cadáver (modificado de SUBRAMANIAN et al., 2006);
- Observação: a produtividade média de cada cadáver foi calculada com base na produtividade mL⁻¹ vezes o volume total de suspensão de cada repetição (100 mL como padrão de diluição).

A porcentagem de mortalidade e de cadáveres viáveis foi analisada por modelo linear generalizado (MLG) com distribuição residual binomial. Previamente, os dados de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de Abbott (1925). Os dados referentes à produtividade de juvenis mL⁻¹ e produtividade de juvenis por 100 lagartas inoculadas foram analisados por MLG com distribuição residual binomial negativa. Todas as análises foram realizadas por meio do software R. Com base nos resultados obtidos na ANOVA e teste F, os tratamentos que apresentaram diferença foram submetidos ao teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

2.3.4 Comparação da produtividade de JIs entre lagartas de *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor*

Com base no parâmetro produtividade de JIs por 100 lagartas inoculadas, do experimento anterior, foi selecionado o ínstar de *S. eridania* mais produtivo para cada um dos nematoides estudados.

Foram selecionados o 4º e 6º ínstar de *S. eridania* para *S. carpocapsae* e *H. mexicana*, respectivamente, como os melhores resultados para a comparação de produtividade com os hospedeiros padrão *G. mellonella* e *T. molitor* (SHAPIRO-ILAN et al., 2002).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema do tipo fatorial com duas espécies de nematoides (*S. carpocapsae* e *H. mexicana*) e três espécies de hospedeiro (*S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor*) com 23 repetições por tratamento.

As lagartas de *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor* foram dispostas individualmente em recipiente de acrílico (5 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) com papel filtro no fundo e um cubo de dieta artificial, para *S. eridania*.

Sobre lagartas de *S. eridania* de 4º ($0,1629 \pm 0,0010$ g) e 6º ($0,674 \pm 0,0044$ g) ínstar foram inoculadas individualmente com 0,5 mL de suspensão com 200 JIs de *S. carpocapsae* e *H. mexicana*, respectivamente. Enquanto que lagartas de último ínstar de *G. mellonella* ($0,2047 \pm 0,0017$ g) e de *T. molitor* ($0,1157 \pm 0,0004$ g) foram inoculadas tanto com *S. carpocapsae*, quanto com *H. mexicana*, separadamente. Sobre as lagartas que constituíram a testemunha de cada hospedeiro foi aplicada água deionizada.

Os recipientes contendo as lagartas inoculadas com os NEPs foram mantidos em câmara climatizada à temperatura 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 %, no escuro e a mortalidade foi avaliada após 96 horas.

Para a avaliação da produtividade dos nematoides nos melhores ínstares de *S. eridania* em comparação aos hospedeiros padrão, os cadáveres de cada tratamento foram recolhidos e dispostos em armadilha de White modificada, e mantidos em câmara climatizada à temperatura 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 %, no escuro.

Após 11 dias, aproximadamente, os juvenis começaram a emergir. Foram recolhidos por 10 dias consecutivos e armazenados em câmara climatizada 16 ± 1 °C, 60 ± 10 % de UR, no escuro, para posterior quantificação.

A quantificação dos JIs foi realizada de forma indireta por meio da contagem em triplicata do número de JIs contidos em 0,1 mL de suspensão sob microscópio estereoscópico, de modo a estimar a concentração de JI por mL.

Com base nos dados de mortalidade, produtividade por mL e massa dos hospedeiros, foram analisados os seguintes parâmetros:

- Viabilidade dos cadáveres (%): refere-se à porcentagem de cadáveres dos quais emergiram JIs em cada tratamento;
- Produtividade de JIs por 100 lagartas inoculadas: refere-se a uma estimativa do número total de JIs que poderão ser obtidos a cada 100 lagartas inoculadas, levando em consideração a viabilidade dos cadáveres e a produtividade média de JIs em cada cadáver (modificado de SUBRAMANIAN et al., 2006);
- Produtividade de JIs por grama de lagarta: refere-se ao número total de JI que são produzidos por grama de lagarta, levando em consideração a massa das lagartas e a produtividade média de JIs em cada cadáver;
- Lagarta equivalente: refere-se ao número de cadáveres necessários para se obter uma dose comercial de nematoides ($2,5 \times 10^9$ JIs ha^{-1}) (modificado de SUBRAMANIAN et al., 2006; KOPPENHOVER et al., 2015);
- Observação: a produtividade média de cada lagarta foi calculada com base na produtividade mL^{-1} vezes o volume total de suspensão de cada repetição (100 mL como padrão de diluição).

A porcentagem de mortalidade e de cadáveres viáveis foi analisada por modelo linear generalizado (MLG) com distribuição residual binomial. Previamente, os dados de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de Abott (1925). Os dados referentes à produtividade de juvenis mL^{-1} , produção de juvenis g^{-1} e lagarta equivalente foram analisados por MLG com distribuição residual binomial negativa. Todas as análises foram realizadas por meio do software R. Com base nos resultados obtidos na ANOVA e teste F, os tratamentos que apresentaram diferença foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, quando necessário.

2.3.5 Virulência dos JIs produzidos em *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor*

Para se verificar a diferença de virulência entre os JIs obtidos de *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor* foi escolhido um quarto inseto, de modo a não influenciar algum hospedeiro. Dessa forma, foi utilizada a espécie *S. frugiperda*.

Lagartas de *S. frugiperda* com 14 dias de idade foram dispostas individualmente em recipiente de acrílico (5 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura) com papel filtro no fundo e um cubo de dieta artificial (1cm x 1cm x 1cm). A inoculação das lagartas de *S. frugiperda* foi realizada por meio da aplicação de 0,5 mL de suspensão com 200 JIs sobre cada lagarta com auxílio de um pipetador automático. Sobre as lagartas que constituíram a testemunha foi aplicada água deionizada. As três progênes foram aplicadas separadamente (VALLE et al., 2009).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema do tipo fatorial duplo com três hospedeiros de origem de JIs (*S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor*) e duas espécies de nematoides entomopatogênicos (*S. carpocapsae* e *H. mexicana*) com 23 repetições por tratamento.

Os recipientes contendo as lagartas inoculadas com os NEPs foram mantidos em câmara climatizada à temperatura 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 %, no escuro e a mortalidade foi avaliada após 72 horas.

2.3.6 Determinação do teor de lipídio e umidade de lagartas de *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor*

Lagartas de *S. eridania* ($0,6891 \pm 0,0028$ g), *G. mellonella* ($0,2047 \pm 0,0017$ g) e de *T. molitor* ($0,1157 \pm 0,0004$ g) foram secas em estufa de ar forçado a 60°C por quatro dias. Após a secagem a massa das lagartas foi novamente mensurada para

se calcular o teor de umidade. Logo após, as lagartas foram maceradas com os instrumentos grau e pistilo até a obtenção de um pó homogêneo.

Do pó de cada lagarta foram pesadas três amostras de 1,5 a 2,5 g, as quais foram envolvidas em papel filtro, colocadas em um suporte dentro do extrator de gordura que utilizou éter de petróleo como solvente de acordo com a metodologia da “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC). Após 6 horas, a gordura das amostras concentrou-se no fundo de copo coletor.

O teor de umidade foi calculado pela fórmula:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{\text{massa inicial (g)} - \text{massa final (g)}}{\text{massa inicial (g)}} \times 100$$

O teor de gordura (lipídeos totais) foi calculado pela fórmula:

$$\% \text{ Gordura} = \frac{(\text{massa copo} + \text{gordura (g)}) - \text{massa copo (g)}}{\text{massa amostra (g)}} \times 100$$

2.3.7 Obtenção dos custos das dietas dos hospedeiros

Para obter o custo com dieta para a multiplicação dos hospedeiros, foi realizado o orçamento atual dos ingredientes, e com base em trabalhos e pré-testes realizados previamente, foi estimado o consumo por 1.000 lagartas de *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor* do início ao fim do estágio larval (BARBOSA, 2005; ZIL; MALAN, 2015)

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Produção de *S. carpocapsae* e *H. mexicana* em diferentes ínstares de *S. eridania*

2.4.1.1 Mortalidade

Para os resultados referentes à mortalidade não houve interação entre os fatores espécies de nematoide e ínstares de *S. eridania* ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p=0,7205$), desta forma os mesmos foram analisados isoladamente.

Entre as espécies de nematoide não houve diferença na mortalidade ($p=0,0497$), contudo, há diferença de suscetibilidade entre os ínstares de *S. eridania* aos nematoides aplicados ($p=0,002$). Os 3º, 4º e 6º ínstares foram os que apresentaram maior suscetibilidade apresentando 78,26, 73,91 e 54,34 % de lagartas mortas, respectivamente. O 5º ínstar foi o menos suscetível com apenas 41,30% de mortalidade, e não diferiu da mortalidade apresentada no 6º ínstar (Figura 10).

No 6º ínstar foi observado que a maior parte das lagartas inoculadas com *H. mexicana* morreram no estágio de pré pupa ou pupa, inferindo-se que a infecção iniciou em um estágio e concluiu-se em outro, pois houve emergência de juvenis na maior parte delas.

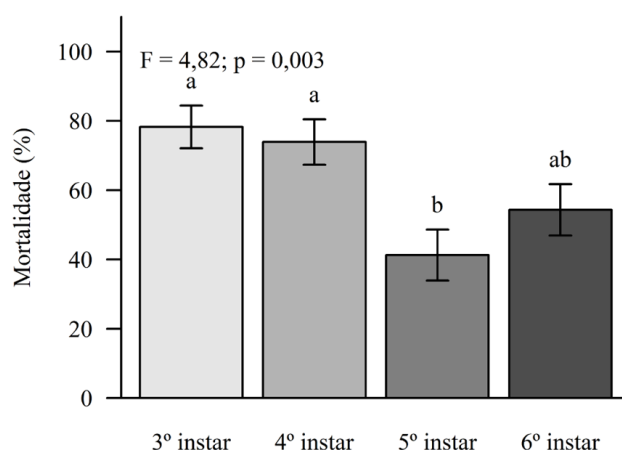


Figura 10: Mortalidade (\pm erro-padrão) após 96 h de lagartas de 3º, 4º, 5º e 6º instar de *Spodoptera eridania* inoculadas com duas espécies de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana* separadamente) (Temp.: $25\pm 1^\circ\text{C}$, UR: $70\pm 10\%$, escotofase = 24h).

2.4.1.2 Produtividade de juvenis infectantes por mL (JIs mL⁻¹)

Em relação à variável produtividade de nematoide mL⁻¹, observa-se interação significativa entre os fatores instar e nematoide ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p=0,001$).

Ao analisar a produtividade do nematoide *H. mexicana* em cada instar de *S. eridania*, a maior produtividade foi no 6º instar com $2.718,33 \pm 743,54$ JIs mL⁻¹, e o de menor produtividade foi o 3º instar com apenas $72,50 \pm 11,68$ JIs mL⁻¹. A produtividade no 5º instar foi de $1.666,66 \pm 421,28$ JIs mL⁻¹, valor semelhante ao 4º instar que apresentou $482,14 \pm 92,85$ JIs mL⁻¹ e ao 6º. A produtividade de *S. carpocapsae* não diferiu estatisticamente entre os instares de *S. eridania*, com valores de $118,75 \pm 45,88$, $229,33 \pm 37,90$, $385,00 \pm 230,74$ e, $351,66 \pm 214,07$ JIs mL⁻¹ para o 3º, 4º, 5º e 6º instar, respectivamente. Observa-se também que a produtividade de *H. mexicana* em lagartas de *S. eridania* é maior que a de *S. carpocapsae*, para todos os instares estudados, exceto o 3º instar (Figura 11).

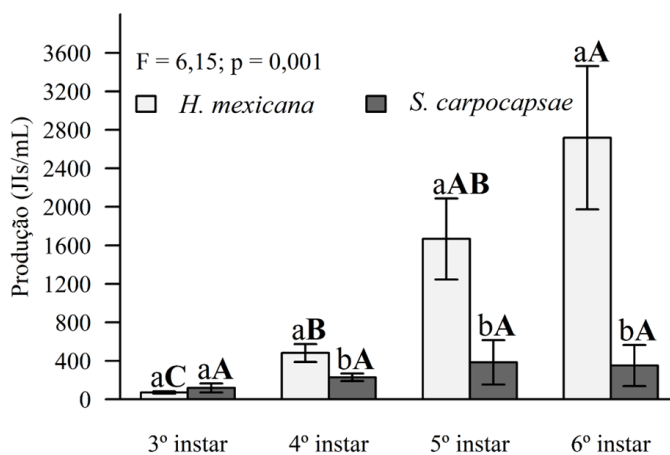


Figura. 11: Produtividade de juvenis infectantes IJs mL⁻¹ (\pm erro-padrão) de duas espécies de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana*) em lagartas de 3º, 4º, 5º e 6º ínstar de *Spodoptera eridania* (Temp.: 25 \pm 1°C, UR: 70 \pm 10%, escotofase = 24h). Letras maiúsculas comparam os ínstars de *S. eridania* dentro de cada espécie de nematoide, e letras minúsculas comparam as espécies de nematoides dentro de cada ínstar de *S. eridania*.

2.4.1.3 Viabilidade dos cadáveres

Para a variável viabilidade dos cadáveres não houve interação entre os fatores ínstar de *S. eridania* e espécies de nematoides de acordo com o teste F ($p=0,588$). A viabilidade dos cadáveres não diferiu entre as espécies de nematoides ($p=0,951$), contudo, foi significativamente diferente entre os ínstars ($p<0,001$) (Figura 12).

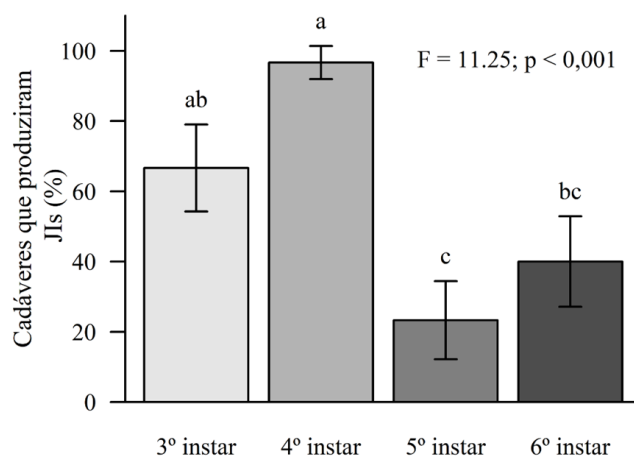


Figura 12: Cadáveres de 3º, 4º, 5º e 6º instar de *Spodoptera eridania* que produziram juvenis infectantes de duas espécies de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana*) (Temp.: 25±1°C, UR: 70±10%, escotofase = 24h).

O 4º instar apresentou 96,66% de cadáveres viáveis, diferindo-se estatisticamente do 5º e 6º instar, que apresentaram 23 e 40% respectivamente, contudo, não diferiu do 3º instar, que apresentou 66,66%.

2.4.1.4 Produtividade de juvenis infectantes a cada 100 lagartas inoculadas

A variável produtividade de JIs por 100 lagartas inoculadas apresentou interação significativa entre os fatores instar de *S. eridania* e espécies de nematoide ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p=0,011$).

Assim, analisando-se o fator instar dentro de nematoide, observa-se que para a espécie *H. mexicana* os ínstars de *S. eridania* de 4º a 6º proporcionaram maiores produtividades, com 4.500.000 ± 866.652,83 JIs/100 lag, 3.333.333 ± 842.562,23 JIs/100 lag, e 10.873.333 ± 2.974.171,78 JIs/100 lag, respectivamente. A menor produtividade foi encontrada no 3º instar com 580.000 ± 93.484,73 JIs/100 lag (Figura 13).

Para a espécie *S. carpocapsae* o ínstars que mais produziram juvenis foram o 4º, 5º e o 6º instar com 2.293.333,30 ± 379.029,70; 1.026.666,80 ± 615.310,90;

1.406.666,70 \pm 856.312,50 JIs/100 lag, respectivamente. No entanto o 5^o e 6^o ínstar não se diferiram do 3^o ínstar, que apresentou a menor produtividade com 633.333,30 JIs/100 lag (Figura 13).

Comparando-se as espécies de nematoides dentro de cada ínstar de *S. eridania*, observa-se que a produtividade de *H. mexicana* no 4^o e 6^o ínstar foi superior a *S. carpocapsae*, contudo, no 3^o e 5^o ínstar obtiveram produtividade estatisticamente semelhante (Figura13).

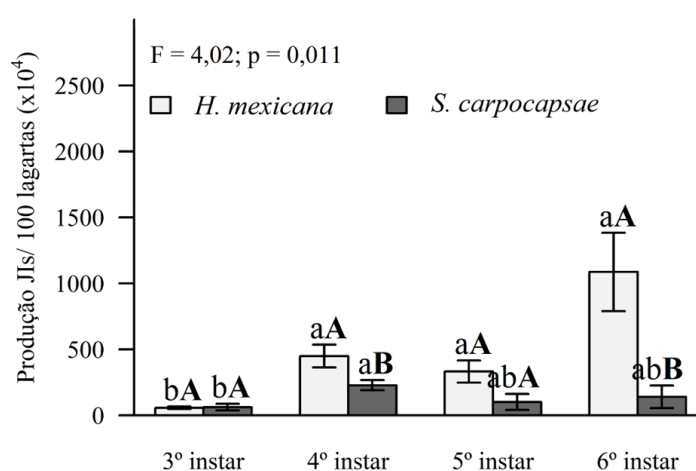


Figura 13: Produtividade de juvenis infectantes a cada 100 lagartas de *Spodoptera eridania* de 3^o, 4^o, 5^o e 6^o ínstar inoculadas com duas espécies de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana* separadamente), levando em consideração a viabilidade dos cadáveres. Letras minúsculas comparam os ínstares de *S. eridania* dentro de cada espécie de nematoide, e letras maiúsculas comparam as espécies de nematoides dentro de cada ínstar de *S. eridania*.

2.4.2 Comparação da produtividade de JIs entre *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor*

2.4.2.1 Mortalidade

Não houve interação significativa entre os fatores espécies de nematoide e hospedeiros ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p=0,277$), desta forma os mesmos foram avaliados isoladamente. Entre as espécies de nematoide não houve diferença de mortalidade ($p=0,149$).

Em relação aos hospedeiros estudados houve diferença significativa ($p=0,019$). *G. mellonella* apresentou mortalidade de 95,65% superior a *S. eridania* e *T. molitor*, que apresentaram mortalidade de 67,39% e 71,73 %, respectivamente, e não diferiram entre si (Figura 14).

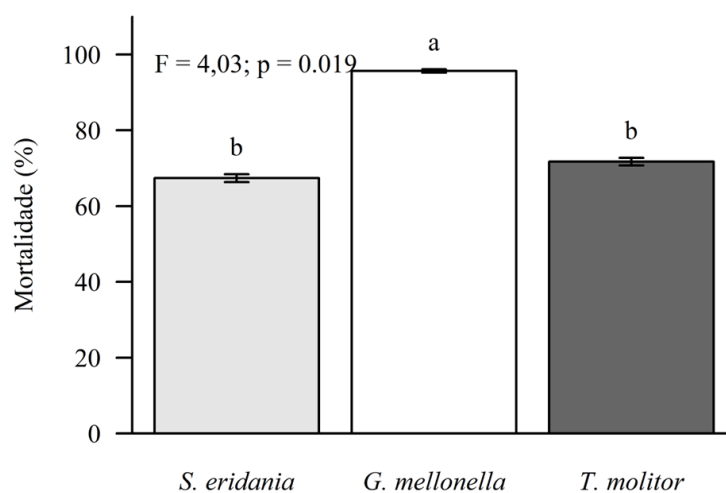


Figura 14: Mortalidade (\pm erro-padrão) após 96 h de lagartas de *Spodoptera eridania*, *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* inoculadas com duas espécies de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana* separadamente) (Temp.: $25\pm 1^\circ\text{C}$, UR: $70\pm 10\%$, escotofase = 24h).

2.4.2.2 Produtividade de juvenis infectantes (JIs mL⁻¹)

A produtividade de juvenis por mL apresentou interação significativa entre os fatores hospedeiro e espécies de nematoide ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p < 0,006$).

Ao analisar o fator hospedeiro dentro de nematoides, a produtividade de *H. mexicana* em *S. eridania* foi de $3.594,30 \pm 242,73$ JIs mL⁻¹ e em *G. mellonella* foi de $4.191,40 \pm 259,15$ JIs mL⁻¹, valores que não diferiram entre si e foram superiores à produtividade em *T. molitor* que foi de $1.976,14 \pm 87,36$ JIs mL⁻¹ (Figura 15).

Para *S. carpocapsae* a produtividade em *S. eridania* foi de $460,00 \pm 85,89$ JIs mL⁻¹ e em *T. molitor* foi de $442,50 \pm 153,10$ JIs mL⁻¹, valores que não diferiram entre si e foram inferiores à produtividade em *G. mellonella* que foi de $1.891,11 \pm 200,97$ JIs mL⁻¹ (Figura 15).

Ao comparar as espécies de nematoides dentro de cada hospedeiro, a produtividade de *H. mexicana* foi superior a *S. carpocapsae* em todas as espécies avaliadas (Figura 15).

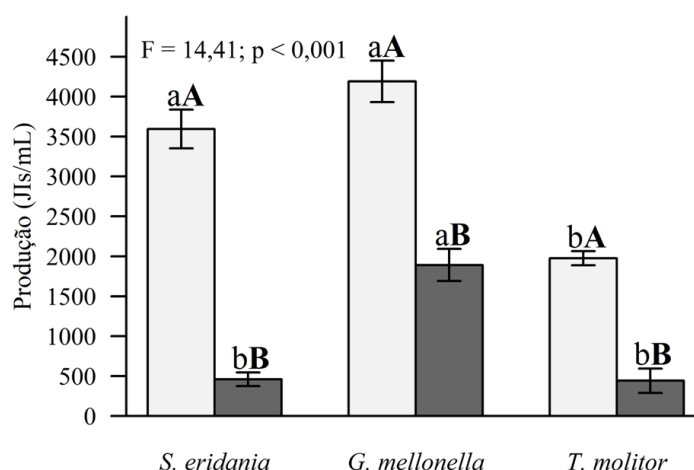


Figura 15: Produtividade de juvenis infectantes (\pm erro-padrão) de duas espécies de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana*) em lagartas *Spodoptera eridania*, *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* (Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $70 \pm 10\%$, escotofase = 24h). Letras minúsculas analisam o fator hospedeiro dentro de nematoides e as letras maiúsculas comparam as espécies de nematoides dentro de cada hospedeiro.

2.4.2.3 Viabilidade dos cadáveres dos diferentes hospedeiros

Em relação à viabilidade dos cadáveres não houve interação entre os fatores hospedeiro e nematoide ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p=0,052$), desta forma os mesmos foram analisados isoladamente. Houve diferença entre os hospedeiros ($p=0,005$) e entre nematoides ($p=0,032$).

A viabilidade dos cadáveres de *S. eridania* foi de 63,33%, estatisticamente semelhante à viabilidade de *T. molitor* que foi de 66,66%, valores inferiores a encontrada nos cadáveres de *G. mellonella* que foi de 100% (Figura 16).

Ao analisar os nematoides, observa-se que cadáveres infectados com *H. mexicana* apresentaram valor superior a *S. carpocapsae*, com 86,66% e 68,08% de viabilidade, respectivamente (Figura 16).

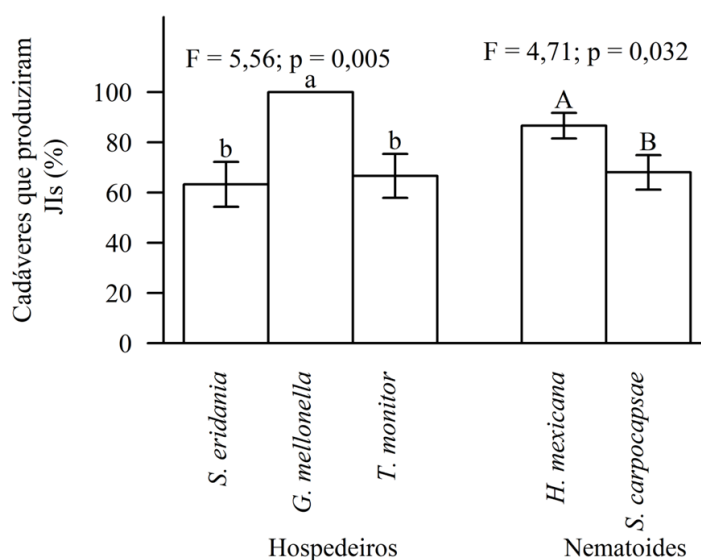


Figura 16: Viabilidade de cadáveres de *Spodoptera eridania*, *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* infectados com duas espécies de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana* separadamente). (Temp.: $25\pm 1^\circ\text{C}$, UR: $70\pm 10\%$, escotofase = 24h).

2.4.2.4 Produtividade de juvenis infectantes por grama do hospedeiro (JIs g⁻¹)

Para o parâmetro produtividade de JIs g⁻¹ do hospedeiro ocorreu interação significativa entre os fatores hospedeiro e nematoides ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p=0,010$).

Ao analisar o fator hospedeiro dentro de nematoides a produtividade de *H. mexicana* em *S. eridania* foi de $533.046,60 \pm 35.999,50$ JIs g⁻¹, valor relativamente inferior à produtividade em *G. mellonella* e *T. molitor*, que produziram $2.047.549,20 \pm 126.609,56$ JIs g⁻¹ e $1.708.029,80 \pm 75.537,42$ JIs g⁻¹, valores estatisticamente iguais (Figura 17).

Para *S. carpocapsae* produtividade em *S. eridania* foi de $282.381,80 \pm 52.724,74$ JIs g⁻¹, valor estatisticamente igual ao valor obtido em *T. molitor* de $419.964,10 \pm 145.373,87$ JIs g⁻¹. A maior produtividade foi obtida em *G. mellonella* com $1.027.802,60 \pm 109.241,79$ JIs g⁻¹ (Figura 17).

Ao comparar as espécies de nematoide em cada hospedeiro pode-se observar que *H. mexicana* foi mais produtivo que *S. carpocapsae* para todos os hospedeiros testados (Figura 17).

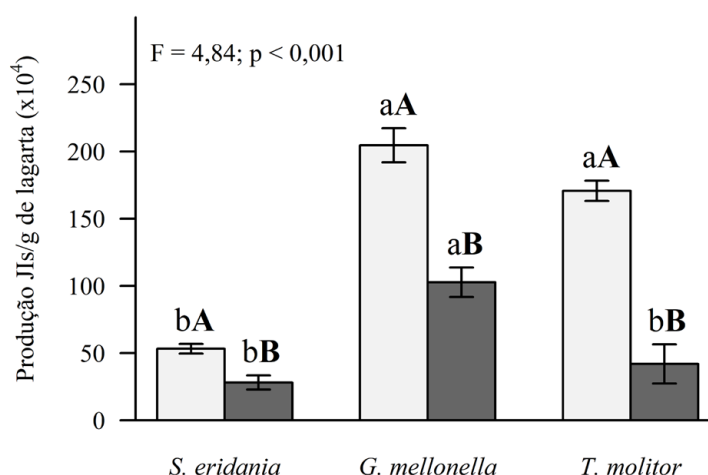


Figura 17: Produtividade de juvenis infectantes de duas espécies de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana*) por grama de *Spodoptera eridania*, *Galleria*

mellonella e *Tenebrio molitor*. Letras minúsculas analisam o fator hospedeiro dentro de nematoides e as letras maiúsculas comparam as espécies de nematoides dentro de cada hospedeiro.

2.4.2.5 Lagarta equivalente

De acordo com os dados houve interação entre os fatores hospedeiro e nematoide ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p < 0,001$).

Ao analisar o fator hospedeiro dentro de nematoide verifica-se que para se obter uma dose de *H. mexicana* serão necessários $7.241,34 \pm 479,17$ cadáveres de *S. eridania*; $6.229,41 \pm 314,22$ cadáveres de *G. mellonella* e; $13.047,70 \pm 714,09$ cadáveres de *T. molitor*. Os valores entre *S. eridania* e *G. mellonella* são estatisticamente iguais e inferiores a *T. molitor* (Figura 18).

Para se obter uma dose de *S. carpocapsae* serão necessários $76.115,14 \pm 18.063,58$ cadáveres de *S. eridania*; $16.731,94 \pm 2.375,29$ cadáveres de *G. mellonella* e; $215.592,81 \pm 127.796,95$ cadáveres de *T. molitor*, valores estatisticamente diferentes, indicando que o número de cadáveres necessários é decrescente entre *T. molitor*, *S. eridania* e *G. mellonella*, respectivamente (Figura 18).

Ao comparar as espécies de nematoide em cada hospedeiro pode-se observar que *H. mexicana* necessita de um menor número de cadáveres para o preparo de uma dose comercial independente do hospedeiro avaliado (Figura 18).

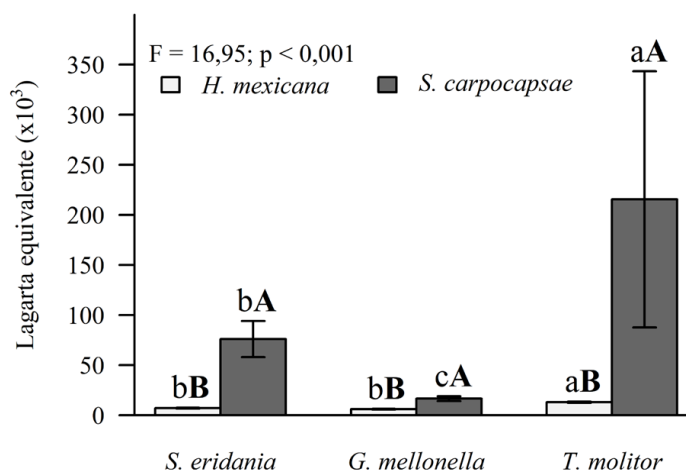


Figura 18: Número de lagartas de *Spodoptera eridania*, *Galleria mellonella* e *T. molitor* necessárias para se obter uma dose ($2,5 \times 10^9$ JIs ha^{-1}) de *Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana*. Letras minúsculas analisam o fator hospedeiro dentro de nematoides e letras maiúsculas comparam as espécies de nematoides dentro de cada hospedeiro.

2.4.2.6 Virulência dos juvenis obtidos dos diferentes hospedeiros sobre *S. frugiperda*

A partir dos dados analisados, não houve interação entre os fatores nematoide e hospedeiro (nesse caso hospedeiro refere-se à origem dos juvenis) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F ($p=0,165$), desta forma os mesmos foram analisados isoladamente.

Entre as espécies de nematoide não houve diferença na mortalidade, indicando que juvenis de *H. mexicana* foram tão virulentos quanto juvenis de *S. carpocapsae* a lagartas de *S. frugiperda* ($p=0,397$).

Em relação ao hospedeiro, a mortalidade em *S. frugiperda* provocada pelos juvenis de *H. mexicana* oriundos de *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor*, foi de $40,90 \pm 10,72\%$; $18,18 \pm 8,41\%$; e $40,90 \pm 10,72\%$, respectivamente, e de *S. carpocapsae* oriundos de *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor* foi de $34,78 \pm 10,15\%$; $26,08 \pm 9,36\%$; e $17,39 \pm 8,08\%$, respectivamente, valores estatisticamente iguais ($p=0,254$),

indicando que os juvenis oriundos de *S. eridania* são tão virulentos quanto juvenis oriundos dos hospedeiros padrão *G. mellonella* e *T. molitor* (Figura 19).

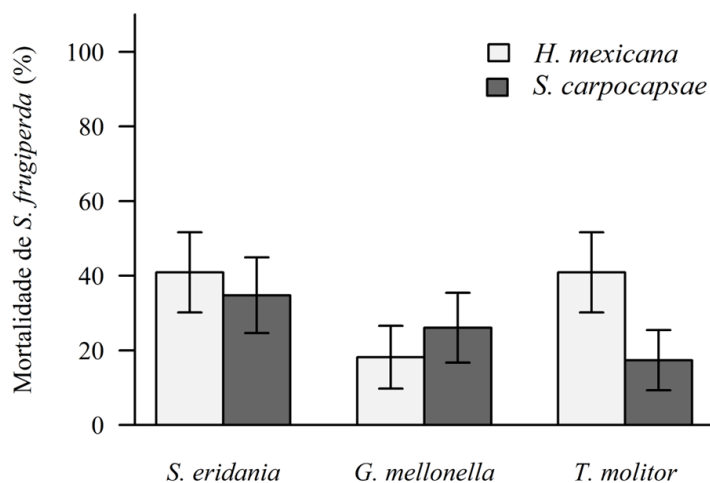


Figura 19: Virulência de juvenis infectantes de duas espécies de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis mexicana*) reproduzidos em *Spodoptera eridania*, *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* sobre lagartas de 14 dias de *Spodoptera frugiperda*. (Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $70 \pm 10\%$, escotofase = 24h).

2.4.3 Teor de lipídio total e de umidade de lagartas de *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor*

O teor de umidade encontrado em *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor* foi de 87,07%; 53,79% e; 60,99%; e de lipídio total foi de 10,32%; 54,41% e; 30,44%, respectivamente, ou seja, o maior teor de umidade correspondeu ao menor teor de lipídeos (Figura 20).

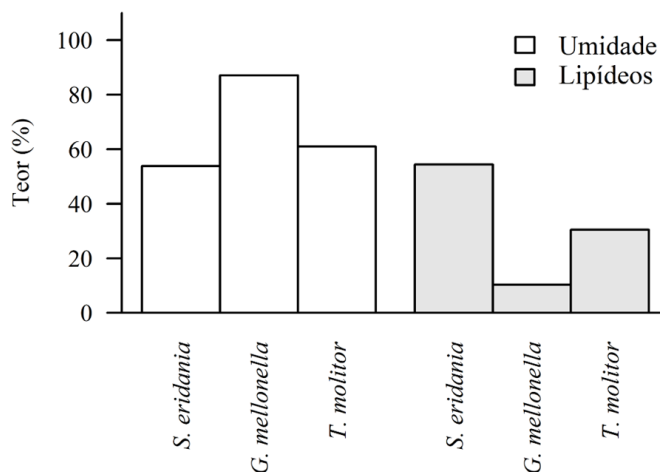


Figura 20: Teores umidade e de lipídio total encontrados em lagartas de último ínstar de *Spodoptera eridania*, *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*.

2.5 DISCUSSÃO

Todos os ínstars estudados de *S. eridania* apresentaram suscetibilidade aos nematoides *S. carpocapsae* e *H. mexicana* em igual proporção sendo o 5º ínstar o menos suscetível.

A taxa de mortalidade apresentada no 3º e 4º ínstar de *S. eridania* indica a maior suscetibilidade desses estádios em relação ao 5º ínstar. Diferenças de suscetibilidade são comumente observadas entre estádios larvais, e quanto maior o tamanho da larva, menor será a suscetibilidade à nematoides entomopatogênicos, o que pode ser observado neste trabalho, uma vez que o ínstar de maior massa foi o 5º, e também o menos suscetível. A perda de massa no último ínstar é comum em lepidopteros, o que resultou em lagartas de 6º ínstar com massa inferior ao 5º e superior ao 3º e 4º ínstar, apresentando, assim, uma mortalidade intermediária (GLAZER, 1992; GOTTHARD, 2008; DAMME et al., 2016).

O 3 e 4º ínstar de *S. eridania* resultaram em produtividade de JIs mL⁻¹ relativamente baixa, fato que pode ser explicado pela fragilidade desses estádios que pode ter condicionado a entrada de um maior número de juvenis por indivíduo, provocando,

assim, uma competição interespecífica, ou então, o pequeno porte das larvas limitou o recurso nutricional e reduziu a multiplicação (ZIL; MALAN, 2015; TOURTOIS et al., 2017).

A partir da viabilidade e produtividade mL^{-1} dos cadáveres, estimou-se quantos JIs poderiam ser obtidos a cada 100 lagartas inoculadas. Dessa forma, a maior produtividade de JIs em *S. eridania* foi obtida da inoculação de *S. carpocapsae* em lagartas de 4^o ínstar e de *H. mexicana* em lagartas de 6^o ínstar, pois apesar de não ter demonstrado diferença estatística entre outros tratamentos, deve-se considerar o dia a dia de uma biofábrica, a qual dependerá do número máximo de indivíduos que poderão ser obtidos.

O experimento que contrastou o 4^o ínstar de *S. eridania* para *S. carpocapsae*, e o 6^o ínstar para *H. mexicana*, com os hospedeiros padrão *G. mellonella* e *T. molitor*, permitiu observar o quanto a espécie hospedeira pode interferir na produção *in vivo* de NEPs, seja pelo tamanho ou pela constituição hospedeiro.

Para *H. mexicana* o tamanho das lagartas de 6^o ínstar de *S. eridania* foi o fator que condicionou a produtividade mL^{-1} tão alta quanto em lagartas de *G. mellonella* e superior à larvas de *T. molitor*, porque mesmo ao resultar baixa produtividade g^{-1} , apresentou maior massa corporal que ambos, o que foi compensatório, pois geralmente, quanto maior o inseto, maior a produtividade de juvenis (RAHOO et al., 2019).

Para *S. carpocapsae* houve baixa produtividade mL^{-1} tanto em lagartas de 4^o ínstar de *S. eridania*, quanto em larvas de *T. molitor*, assim como, a produtividade g^{-1} de hospedeiro, ambos inferiores a *G. mellonella*. Nesse estágio, *S. eridania* tem massa corporal semelhante a *T. molitor*, e *G. mellonella* tem maior massa que ambos, demonstrando o quanto a massa do hospedeiro interfere na produção de NEPs (FLANDERS, 1996).

Outro fator que interfere a produtividade de NEPs é a constituição do meio no qual ocorre a reprodução, sendo os lipídios os constituintes mais importantes. Nesse trabalho, a análise do teor de lipídio de cada inseto hospedeiro é inédita e auxilia na explicação da diferença de produtividade encontrada em cada espécie.

O resultado da análise de lipídio demonstrou que mais 50% da massa corporal de *G. mellonella* é composta por lipídio, o que pode explicar a alta produtividade de JIs

nesse hospedeiro em comparação a *S. eridania* que possui apenas 10% de lipídio, uma vez que o não suprimento da demanda lipídica dos nematoides pode resultar em produções subótimas de JIs (HATAB; GAUGLER, 1998).

Então, apesar de a espécie *S. eridania* apresentar lagartas relativamente grandes, provavelmente devido ao elevado teor de água que possui, é um meio de baixo conteúdo nutricional para a multiplicação de *S. carpocapsae* e *H. mexicana*, indicando que o baixo teor de lipídio pode ter sido o fator limitante para a produção de NEPs nesse hospedeiro, por ser este a principal fonte de nutrição e energia desses organismos (PATEL; STOLINSKI; WRIGHT, 1997).

Contudo, outros fatores podem ter interferido na multiplicação dos nematoides em *S. eridania*, dentre eles, o sistema imunológico do inseto, pois, embora os JIs tenham conseguido liberar a bactéria simbiote e provocar mortalidade nas lagartas, respostas do sistema imune, como encapsulamento ou melanização, podem ter sido desencadeadas, o que pode ter impedido o sucesso da infecção e a consequente reprodução dos nematoides, fato que também pode explicar a baixa viabilidade dos cadáveres em relação a taxa de mortalidade apresentada (LI et al., 2007; GIRLING et al., 2010).

Ao verificar a influência do hospedeiro de origem na virulência dos JIs de *S. carpocapsae* e *H. mexicana* sobre lagartas de *S. frugiperda*, observou-se que os JIs obtidos de *S. eridania* são tão virulentos quanto os JIs obtidos dos hospedeiros padrão.

No entanto, o período de sobrevivência desses JIs poderá ser afetado, pois a quantidade e a qualidade dos lipídios de reserva dos JIs é fator primordial para sobrevivência e são influenciadas pelo hospedeiro ou meio no qual são reproduzidos. Mais de 60% do conteúdo corporal dos JIs é constituído de lipídios, teor tão elevado reflete a dependência de lipídios como principal fonte de energia e recurso nutricional para o JIs após a emergência do cadáver (HATAB; GAUGLER, 1998; HATAB; GAUGLER, 2001).

Além das questões de qualidade, suscetibilidade e produtividade, também é preciso analisar o custo de multiplicação do hospedeiro para a produção massal de NEPs (SHAPIRO-ILAN et al., 2002).

Dessa forma, ao analisar o custo dos hospedeiros, estimando-se os gastos somente com dieta e, considerando os demais custos de multiplicação semelhantes entre si, chega-se à conclusão de que lagartas de *S. eridania* são mais baratas que lagartas de *G. mellonella*, porém, mais caras que larvas de *T. molitor*. Pois para se multiplicar 1.000 indivíduos de *S. eridania*, *G. mellonella* e *T. molitor* o custo é de R\$ 9,17, R\$ 56,00 e R\$ 3,60, ou seja, o custo por indivíduo gira em torno de R\$ 0,009, R\$ 0,056 e R\$ 0,003, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Valor dos ingredientes que compõem a dieta artificial das espécies *Spodoptera eridania*, *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor* e custo estimado para se multiplicar 1000 indivíduos de cada espécie, do início ao fim do estágio larval.

Ingredientes	Valor unit. (R\$)	Quantidade por 1 receita de dieta		
		<i>S. eridania</i>	<i>G. mellonella</i>	<i>T. molitor</i>
Ácido ascórbico	36,00 Kg	1,8 g	-	-
Ácido sórbico	85,00 kg	0,9 g	-	-
Água deionizada	-	600 mL	-	-
Caragenina	105,00 Kg	11,5 g	-	-
Farelo de soja	7,85 Kg	15 g	-	-
Farelo de trigo integral	9,00 Kg	-	400 g	400 g
Feijão var. Carioca	6,19 Kg	37,5 g	-	-
Formol 40%	11,47 Lt	1,5 mL	-	-
Germe de trigo	2,30 Kg	30 g	200 g	-
Glicerina	17,00 Lt	-	82 mL	-
Leite em pó	23,50 Kg	15 g	200 g	-
Levedura de cerveja	16,40 kg	18,75 g	120 g	-
Mel	50,00 Lt	-	153 mL	-
Nipagin	54,00 Kg	1,5 g	-	-
Solução vitamínica	27,60 Lt	4,5 mL	-	-
Tetraciclina	0,99 (500 mg)	56,5 mg	-	-
Quantidade total de receita		738, 51 g	1155 g	400 g
Custo por receita		R\$ 2,71	R\$ 19,76	R\$ 3,60
Custo por 1 Kg de dieta		R\$ 3,67	R\$ 17,10	R\$ 9,00
Consumo por 1000 lagartas		2500 g	3293 g	400 g
Custo por 1000 lagartas		R\$ 9,17	R\$ 56,00	R\$ 3,60

Com base na variável lagarta equivalente, estimou-se que para se obter uma dose comercial de *H. mexicana* são necessários, aproximadamente, 7.241, 6.229 e 13.047 cadáveres de *S. eridania* de 6º ínstar, *G. mellonella* e *T. molitor*, respectivamente. E para *S. carpocapsae* são necessários, 76.115, 16.731 e 215.592 cadáveres de *S. eridania* de 4º ínstar, *G. mellonella* e *T. molitor*, respectivamente.

Mas ao levar em consideração a viabilidade dos cadáveres, estima-se que é necessário inocular aproximadamente 11.435, 6.230, 19.574 lagartas de *S. eridania* de 6º ínstar, *G. mellonella* e *T. molitor*, com o custo de R\$ 102,91, R\$ 348,88 e R\$ 58,72, e 120.189, 16.732, 323.422 lagartas de *S. eridania* de 4º ínstar, *G. mellonella* e *T. molitor*, com o custo de R\$ 1.081,70, R\$ 936,99 e R\$ 970,26 para se obter o número de cadáveres necessários para uma dose comercial de *H. mexicana* e *S. carpocapsae*, respectivamente.

Então, para a produção de *H. mexicana* o custo com *S. eridania* é inferior a *G. mellonella*, no entanto, superior a *T. molitor*. Contudo, para a produção de *S. carpocapsae* o custo com *S. eridania* é superior tanto a *G. mellonella* quanto a *T. molitor*, pois apesar de apresentar custo de multiplicação inferior a *G. mellonella*, a baixa viabilidade e produtividade dos cadáveres de *S. eridania* refletem na demanda um alto número de indivíduos para se obter a mesma dose comercial, o que eleva o custo, assim como pode ser observado na comparação entre *T. molitor* e *G. mellonella*.

As observações realizadas demonstram que o custo da dose ha^{-1} de NEPs provindos do sistema de produção *in vivo* não depende somente do custo por inseto, mas do conjunto entre a viabilidade e a produtividade dos cadáveres do hospedeiro em questão.

Para a multiplicação de *H. mexicana* foi observado que o custo com lagartas de *S. eridania* é inferior a *G. mellonella*, no entanto, um questionamento é levantado em relação à sobrevivência no decorrer do tempo, uma vez que o baixo teor de lipídio apresentado por *S. eridania* pode gerar JIs com baixa reserva lipídica, o que pode acarretar baixa persistência em campo e comprometer diretamente a virulência ao longo do tempo, fato que pode inviabilizar a utilização dessa espécie como hospedeiro alternativo para a produção *in vivo* de NEPs (PATEL; STOLINSKI; WRIGHT, 1997).

2.6 CONCLUSÕES

O ínstar de *S. eridania* com menor suscetibilidade a *S. carpocapsae* e *H. mexicana* é o 5º.

O melhor ínstar de *S. eridania* para a produção de *S. carpocapsae* e *H. mexicana* é o 4º e 6º ínstar, respectivamente.

Lagartas de 6º ínstar de *S. eridania* são tão produtivas quanto lagartas de último ínstar de *G. mellonella*.

Lagartas de 4º ínstar de *S. eridania* são tão produtivas quanto larvas de último ínstar de *T. molitor*.

O custo com lagartas de *S. eridania* para a produção de *H. mexicana* é inferior a *G. mellonella* e superior a *T. molitor*.

O custo com lagartas de *S. eridania* para a produção de *S. carpocapsae* é superior tanto a *G. mellonella* quanto a *T. molitor*.

2.7 REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265–267, 1925.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 15. Ed. Washington D. C., 1990. 1141 p. In **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Viçosa: UFV, 2002. p. 235.

ATAÍDE, J. O.; TAMASHIRO, L. A. G.; RIBEIRO, L. V.; SANTOS, M. A.; HOLTZ, F. G.; CARVALHO, J. R.; FRAGOSO, L. L. P.; PRATISSOLI, D. Comparação de dietas artificiais, com fontes protéicas variáveis, para criação de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). **XXII INIC Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, 2018.

BARBOSA, C. R. C. **Técnicas de produção *in vivo* de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) em *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e hospedeiros alternativos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agronomia/Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

CARVALHO, J. R. **Comportamento e desempenho de agentes de controle biológico sobre *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2018. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES.

DAMME, V. M. V.; BECK, B. K. E.G.; BERCKMOES, E.; MOERKENS, R.; WITTEMANS, L.; VIS, R. D.; NUYTTENS, D.; CASTEELS, H. F. C.; MAES, M.; TIRRY, L.; CLERCQ, P. D. Efficacy of entomopathogenic nematodes against larvae of *Tuta absoluta* in the laboratory. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1702–1709, 2016.

DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALÓ, V.; LEITE, L. G. Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. **Nematoda**, v. 4, 2017.

FAVETTI, B. M.; BUTNARIU, A. R.; FOERSTER, L. A. Biology and reproductive capacity of *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera, Noctuidae) in different soybean cultivars. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 89–95, 2015.

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

GAUGLER, R.; BROWN, I.; SHAPIRO-ILAN, D.; ATWA, A. Automated technology for *in vivo* mass production of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 24, p. 199–206, 2002.

GIRLING, R. D.; ENNIS, D.; DILLON, A. B.; GRIFFIN, C. T. The lethal and sub-lethal consequences of entomopathogenic nematode infestation and exposure for adult pine weevils, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 195–202, 2010.

GLAZER, I. Invasion rate as a measure of infectivity of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes to insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 59, p. 90-94, 1992.

GODJO, A.; ZADJI, L.; DECRAEMER, W.; WILLEMS, A.; AFOUDA, L. Pathogenicity of indigenous entomopathogenic nematodes from Benin against mango fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) under laboratory conditions. **Biological Control**, v. 117, p. 68–77, 2018.

GOTTHARD, K. Adaptive growth decisions in butterflies. **BioScience**, v. 58, n. 3, p. 222-230, 2008.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, n. 69, p. 487-497, 1976.

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

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

KOPPENHÖFER, A. M.; KOSTROMYTSKA, O. S.; MCGRAW, B. A.; EBSSA, L. Entomopathogenic nematodes in turfgrass: ecology and management of important insect pests in North America. In: CAMPOS-HERRERA, R. **Nematode pathogenesis of insects and other pests**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. p. 309–328.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.

LI, X. Y.; COWLES, R. S.; COWLES, E. A.; GAUGLER, R.; COX-FOSTER, D.L. Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and

the host immune response. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 365–374, 2007.

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

MORTON, A.; PINO, F. G. Effectiveness of different species of entomopathogenic nematodes for biocontrol of the mediterranean flatheaded rootborer, *Capnodis tenebrionis* (Linne´) (Coleoptera: Buprestidae) in potted peach tree. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 128–133, 2008.

NALIN, D. M. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais**. 1991. Tese (Doutorado em Entomologia). Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

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

RAHOO, A. M.; MUKHTAR, T.; BUGHIO, B. A.; RAHOO, R. K. Relationship between the size of *Galleria mellonella* larvae and the production of *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 51, n. 1, p. 79-84, 2019.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; COTTRELL, T. E.; MIZELL, R. F.; HORTON, D. L. Efficacy of *Steinernema carpocapsae* plus fire gel applied as a single spray for control of the lesser peachtree borer, *Synanthedon pictipes*. **Biological Control**, v. 94, p. 33–36, 2016.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R.; TEDDERS, W. L.; BROWN, I.; LEWIS, E.E. Optimization of inoculation for *in vivo* production of entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 34, n. 4, p. 343–350, 2002.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAN, R.; QIU, X. Production of entomopathogenic nematodes. In: MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I. **Beneficial organisms invertebrates and entomopathogens**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 321-346.

SUBRAMANIAN, S.; SANTHARAM, G.; SATHIAH, N.; KENNEDY, J.S.; RABINDRA, R.J. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v.37, n.3, p. 367-374, 2006.

TESTA, A. M.; SHILDS, E. J. Low labor “in vivo” mass rearing method for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 106, p. 77–82, 2017.

TOURTOIS, J.; ALI, J. G.; GRIESHOP, M. J. Susceptibility of wounded and intact black soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae) to entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 150, p. 121–129, 2017.

VALLE, E. E. D.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E. L. S.; SOUZA, R. M. S. 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**, v. 50, p. 21–24, 2009.

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

ZIL, C. V.; MALAN, A. P. Cost-effective culturing of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* and entomopathogenic nematode production in various hosts. **African Entomology**, v. 23, n. 2, p. 361-375, 2015.