UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

AVALIAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) NO CONTROLE DE MOSCAS-DAS-FRUTAS (Diptera: Tephritidae) E DO GORGULHO-DA-GOIABA (Coleoptera: Curculionidae)

ANGELA CANESIN

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2011

AVALIAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) NO CONTROLE DE MOSCAS-DAS-FRUTAS (Diptera: Tephritidae) E DO GORGULHO-DA-GOIABA (Coleoptera: Curculionidae)

ANGELA CANESIN
Bióloga

Orientador: PROF. DR. MARCOS GINO FERNANDES

Co-Orientador: DR. LUÍS GARRIGÓS LEITE

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora

Dourados
Mato Grosso do Sul
2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

595.771 Canesin, Angela
C221a Avaliação de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) no controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e do gorgulho-da-goiaba (Coleoptera: Curculionidae) / Angela Canesin. Dourados, MS: UFGD, 2011.
116 f.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes
Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Controle biológico. 2. Moscas-das-frutas - Controle biológico. 3. Gorgulho-da-goiaba - Controle biológico. I.Título.

AVALIAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) NO CONTROLE DE MOSCAS-DAS-FRUTAS (Diptera: Tephritidae) E DO GORGULHO-DA-GOIABA (Coleoptera: Curculionidae)

Por

Angela Canesin

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTORA EM AGRONOMIA

Aprovada em: 03/03/2011

Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes Orientador – UFGD/FCBA	Dr. Luís Garrigós Leite Co-Orientador – Instituto Biológico de Campinas, SP
Dr. Guilherme Lafourcade Asmus Embrapa Agropecuária Oeste/ Dourados, MS	Prof. Dr. Fabricio Fagundes Pereira UFGD/FCBA
Prof. Dr. Elmo Pontes de Melo UNIGRAN – Centro Universitário da Grande Dourados/Dourados, MS	

Aos meus pais Vicente Canezin (in memorium) e Maria Vidor Canezin

e aos meus filhos Danilo Cesar e Fabio Henrique

dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a concretização desse trabalho.

Ao Dr. Luís Garrigós Leite, do Instituto Biológico de Campinas, SP, pela confiança, pela paciência, pela criteriosa orientação neste trabalho, pelos ensinamentos sobre nematoides entomopatogênicos e pelo auxílio no desenvolvimento de todas as fases dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Honório Roberto dos Santos e ao Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes pela amizade, pela confiança e por todas as orientações na elaboração desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação pelo auxílio financeiro que permitiu minha permanência em Campinas, SP para realização dos experimentos do trabalho de tese.

Aos professores da Pós-Graduação, por cada ensinamento, por cada auxílio no decorrer de todo o curso.

Ao Instituto Biológico de Campinas, SP, pela oportunidade de realização dos experimentos referentes ao meu trabalho de tese no Laboratório de Controle Biológico do Centro Experimental.

À FCBA/UFGD por todas as condições que possibilitaram a realização do Curso.

Ao Fabio Silber Schmidt, Fernando Martins Tavares e Raphaela Dell`Acqua do Laboratório Controle Biológico/IB pelo convívio e por todo auxílio na execução dos experimentos de laboratório e de campo.

Aos Srs. Adenílson Roncaglia, Adilson Roncaglia e Dorival Roncaglia proprietários do pomar orgânico, Campinas, SP pelo apoio dado ao desenvolvimento dos experimentos de campo.

Aos biólogos Maria de Lourdes Zamboni *Costa* e Luiz Anselmo Lopes do CENA/Esalq/Piracicaba por providenciar os tefritídeos para os experimentos.

À Empresa Citrovita Agro Pecuária LTDA, Itapetininga, SP pela colaboração na realização de experimentos de campo em sua área.

Ao Sr. Massao Kumagai, Campinas, SP por permitir a realização de experimentos de campo em sua propriedade.

À Prof$^{a.}$ Dr$^{a.}$ Zefa Valdivina Pereira pelo auxílio na disciplina Fisiologia Vegetal.

À Prof$^{a.}$ M$^{a.}$ Áurea Rita de Ávila Lima Ferreira e Prof$^{a.}$ M$^{a.}$ Ana Claudia Verlindo Canesin pela valiosa colaboração na finalização desse trabalho.

À Bibliotecária Erondina Alves da Silva, da Biblioteca Central da UFGD, pelo auxílio na busca das referências bibliográficas.

À Maria Lucia Teles pelo auxílio na efetivação de minhas questões burocráticas relacionadas ao Curso.

Ao Dr. Antonio Batista Filho, Dr. Eidi Sato, Dr. José Eduardo Marcondes, Dr. Miguel Francisco Souza Filho, Dr. Valmir Antônio Costa do Instituto Biológico de Campinas, SP, pela convivência, e especialmente à Dr$^{a.}$ Zuleide Alves Ramiro pela carinhosa acolhida e pelas sugestões estatísticas.

À Cintya, Larissa, Jacqueline, Bruce, Diogo, Sidney, meus companheiros de alojamento, pelos momentos de descontração

À Leila, Lorita, Mônica, Nicinha, Simone pelo incentivo e em especial à Emília e Mara pelo apoio nos momentos mais complicados.

Aos meus irmãos Alvaro e Junior por toda colaboração.

Aos meus filhos Danilo Cesar e Fabio Henrique pela suas presenças em meu dia a dia.

SUMÁRIO

PÁGINA

LISTA DE TABELAS..... ix
LISTA DE FIGURAS..... x
RESUMO..... xii
ABSTRACT..... xiv
INTRODUÇÃO..... 01

I CAPÍTULO: REVISÃO DE LITERATURA..... 04
1.1 Aspectos sócioeconômicos da laranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae) e da goiaba *Psidium guajava* L. (Myrtaceae)..... 04
1.1.1 Laranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae)..... 04
1.1.2 Goiaba *Psidium guajava* L. (Myrtaceae)..... 06
1.2 Aspectos gerais, biologia e ocorrência das moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera, Tephritidae) e do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae)..... 09
1.2.1 Moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824)..... 09
1.2.1.1 Aspectos gerais e taxonomia..... 09
1.2.1.2 Biologia..... 11
1.2.1.3 Ocorrência de moscas-das-frutas em citros 12
1.2.2 Gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae)..... 14
1.3 Filo Nematoda..... 17
1.3.1 Nematoides entomopatogênicos..... 18
1.3.1.1 Família Steinernematidae..... 19
1.3.1.2 Família Heterorhabditidae..... 20
1.3.1.3 Estratégias de forrageamento..... 21
1.3.1.4 Infectividade por fases..... 24
1.3.1.5 Características das bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*..... 25
1.3.1.6 Ciclo de vida: simbiose bactéria-nematoide entomopatogênico..... 26
A) Estágio I..... 26
B) Estágio II..... 27
C) Estágio III..... 29
1.4 Nematoides entomopatogênicos e o controle das moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera, Tephritidae) e do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae)..... 31
1.4.1 Moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera, Tephritidae)..... 31

1.4.2 Gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae)..... 34
1.5 Fatores que interferem na persistência do nematoide entomopatogênico no solo..... 35
1.5.1 Fatores abióticos..... 37
1.5.1.1 Textura do solo..... 37
1.5.1.2 Umidade..... 38
1.5.1.3 Temperatura..... 40
1.5.1.4 Aeração..... 42
1.5.1.5 Solução do solo..... 42
1.5.2 Fatores bióticos..... 43
1.5.3 Reciclagem..... 46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 47

II CAPÍTULO – ARTIGO: AVALIAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Heterorhabditidae) NO CONTROLE DE MOSCA-DAS-FRUTAS (Diptera: Tephritidae)..... 64
RESUMO..... 64
ABSTRACT..... 66
I NTRODUÇÃO..... 68
II MATERIAL E MÉTODOS..... 70
2.1 Testes de laboratório..... 70
2.1.1 Virulência de isolados do gênero *Heterorhabditis* contra *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 71
2.1.2 Suscetibilidade de diferentes fases de *Ceratitis capitata* ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24.. 71
2.2 Testes de campo..... 72
2.2.1 Efeito de doses do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 73
2.2.2 Persistência do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 no solo e efeito contra *Ceratitis capitata*..... 74
III RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 76
3.1 Resultados..... 76
3.1.1 Virulência de isolados do gênero *Heterorhabditis* contra *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 76
3.1.2 Suscetibilidade de diferentes fases de *Ceratitis capitata* ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24.. 77
3.1.3 Efeito de doses do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 78
3.1.4 Persistência do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 no solo e efeito contra *Ceratitis capitata*..... 80
3.2 DISCUSSÃO..... 84
3.2.1 Virulência de isolados do gênero *Heterorhabditis* contra *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*..... 84
3.2.2 Suscetibilidade de diferentes fases de *Ceratitis capitata* ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24... 84
3.2.3 Efeito de doses do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *Anastrepha fraterculus* e

Ceratitis capitata..... 86
3.2.4 Persistência do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 no solo e efeito contra *Ceratitis capitata*..... 86
CONCLUSÕES..... 91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 92

III CAPÍTULO – ARTIGO: EFEITO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) NA MORTALIDADE DE PRÉ-PUPAS DO GORGULHO-DA-GOIABA *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae)..... 98
RESUMO..... 98
ABSTRACT..... 99
I INTRODUÇÃO..... 100
II MATERIAL E MÉTODOS..... 102
2.1 Testes de virulência..... 102
Teste 1..... 103
Teste 2..... 103
2.2 Teste de campo..... 103
2.3 Análise estatística..... 105
III RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 105
3.1 Resultados..... 105
3.2 Discussão..... 107
3.2.1 Testes de virulência..... 107
3.2.2 Teste de campo..... 109
CONCLUSÕES..... 111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 111

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 115

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

III CAPÍTULO – ARTIGO: EFEITO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) NA MORTALIDADE DE PRÉ-PUPAS DO GORGULHO-DA-GOIABA *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae)

Tabela 1 Espécies de *Steinernema* e *Heterorhabditis* utilizados no estudo de virulência..... 103

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

I CAPÍTULO: REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 Ciclo de vida simplificado dos nematoides entomopatogênicos das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. O estágio juvenil é composto do J1, J2, J3 (juvenil infectivo) e J4. Em *Steinernema* a primeira geração é formada por machos e fêmeas e em *Heterorhabditis* por hermafroditas. Fonte (LEITE, 2006)..... 20

II CAPÍTULO – ARTIGO: AVALIAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Heterorhabditidae) NO CONTROLE DE MOSCA-DAS-FRUTAS (Diptera: Tephritidae)

Figura 1. Envelopes de tela de plástico (12 fios/cm linear) de 20 x 20 cm, contendo pré-pupas de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* distribuídos em área da Citrovita, Itapetininga, SP..... 73

Figura 2. Mortalidade observada de pré-pupas de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus* expostas aos isolados *Heterorhabditis indica* IBCB n5 (IBCB n5), *H. amazonensis* IBCB n24 (IBCB n24), *Heterorhabditis* sp. IBCB n44 (IBCB n 44), *Heterorhabditis* sp. IBCB n45 (IBCB n45) e *Heterorhabditis* sp. IBCB n46 (IBCB n46), na dose de 50 JIs/Inseto, em laboratório (T= 25 ± 1ºC, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 76

Figura 3. Mortalidade corrigida (formula de Abbott) de pré-pupas de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus* expostas aos isolados *Heterorhabditis indica* IBCB n5 (IBCB n5), *H. amazonensis* IBCB n24 (IBCB n24), *Heterorhabditis* sp. IBCB n44 (IBCB n 44), *Heterorhabditis* sp. IBCB n45 (IBCB n45) *e Heterorhabditis* sp. IBCB n46 (IBCB n46), na dose de 50 JIs/Inseto, em laboratório (T= 25 ± 1ºC, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas)..... 77

Figura 4. Mortalidade de pré-pupas de *Ceratitis capitata* expostas a *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24, na dose de 200 JIs/Inseto, em laboratório (T= 25 ± 1ºC, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas), (F = 12,22 P < 0,01). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 78

Figura 5. Mortalidade real e corrigida (fórmula de Abbott) de *Ceratitis capitata* exposto, na fase de pupa, a diferentes doses do isolado *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24, em campo de citros, área da Citrovita, Itapetininga, SP. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P < 0,05)..... 79

Figura 6. Mortalidade real e corrigida (fórmula de Abbott) do inseto *Anastrepha fraterculus* exposto, na fase de pupa, a diferentes

doses do isolado *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24, em campo de citros, área da Citrovita, Itapetininga, SP. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan (P < 0,05)..... 79

Figura 7. Mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* pelo nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24, expostas ao solo de campo de citros, coletado anteriormente e, em diferentes dias, após a aplicação do *H. amazonensis*..... 81

Figura 8. Mortalidade real (observada) e corrigida (fórmula de Abbott) de *Ceratitis capitata* expostos na fase de pré-pupa ao *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24..... 83

III CAPÍTULO – ARTIGO: EFEITO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) NA MORTALIDADE DE PRÉ-PUPAS DO GORGULHO-DA-GOIABA *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae)

Figura 1. Porcentagem de pré-pupas de *Conotrachelus psidii* infectadas pelos nematoides *Steinernema brazilense* IBCB n6 (S), *Heterorhabditis indica* IBCB n5 (H5) e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 (H24) testados nas doses de 50, 175 e 612 JIs/Inseto no Teste 1, e 2000, 4000, e 6000 JIs/Inseto no Teste 2. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05)..... 106

Figura 2. Mortalidade de pré-pupas de *Conotrachelus psidii* em pomar de goiaba tratado com o nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 nas doses de $1x10^9$ e $5x\ 0^9$ JIs/ha. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05)..... 107

RESUMO

AVALIAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) NO CONTROLE DE MOSCAS-DAS-FRUTAS (Diptera: Tephritidae) E DO GORGULHO-DA-GOIABA (Coleoptera: Curculionidae)

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas e, visando a atender exigências do mercado externo e interno, tem se empenhado na busca por alternativas aos produtos químicos no controle de pragas de frutíferas. Os nematoides entomopatogênicos despontam-se como um dos agentes alternativos de controle biológico. O trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) no controle de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e do gorgulho-da-goiaba (Coleoptera: Curculionidae). *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* são identificadas como as principais moscas-das-frutas que infestam a cultura de citros no estado de São Paulo e o gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* é considerado uma das pragas-chave da goiabeira. Esses insetos passam parte de seu ciclo de vida no solo, tornando-se alvo dos nematoides entomopatogênicos. Para o estudo do efeito de nematoides entomopatogênicos no controle das moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*, sob condições de laboratório, efetuado no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico (Campinas, SP) avaliou-se a virulência do *Heterorhabditis sp. IBCB n44, Heterorhabditis sp. IBCB n45, Heterorhabditis sp. IBCB n46, H. indica IBCB n5 e H. amazonensis* IBCB n24*,* na dose de 50 JIs/Inseto. Consideram-se seis tratamentos e sete repetições. Dez pré-pupas foram liberadas em potes, e os isolados foram aplicados na superfície. A avaliação foi realizada 12 e 15 após a aplicação dos tratamentos para *C. capitata* e *A. fraterculus*, respectivamente, com base no número de insetos adultos emergentes. Avaliou-se também a suscetibilidade de diferentes fases de *C. capitata* ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24. Consideraram-se cinco tratamentos e dez repetições: *H. amazonensis* na dose de 200 JIs/Inseto aplicados contra *C. capitata* nas fases de pré-pupa e pupas com três, seis e nove dias de desenvolvimento e testemunha. As larvas foram liberadas em potes e o *H. amazonensis* foi aplicado na superfície. A avaliação ocorreu 12 dias após com base no número de adultos emergidos e na verificação da mortalidade de pupas. Sob condições de campo de citros (área da Empresa Citrovita Agro Pecuária LTDA, Itapetininga, SP.), avaliou-se o efeito de doses do *H. amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *A. fraterculus* e *C. capitata*. Consideraram-se quatro tratamentos: *H. amazonensis* nas doses de $1x10^8$, $3,5x10^8$ e $1x10^9$ JIs/ha e testemunha, aplicados na projeção da copa da planta, onde foram enterrados parcialmente oito envelopes com 100g de solo e dez pré-pupas do inseto. A avaliação ocorreu 16 dias após a aplicação do nematoide para *C. capitata* e 26 para *A. fraterculus,* com base no número de adultos emergidos. Avaliou-se também a persistência do *H. amazonensis* no solo e seu efeito contra *C. capitata*. Consideraram-se três tratamentos e quatro repetições: *H. amazonensis* nas doses de $1x10^8$ JI/cm^2 e $1x10^9$ JIs/cm^2 e testemunha, aplicados na projeção da copa da planta, onde foram enterrados parcialmente dez envelopes com 100g de solo e dez pré-pupas do inseto. A primeira avaliação da persistência teve início antes das aplicações das doses do *H. amazonensis*,

as avaliações seguintes ocorreram nos dias 6, 20, 33 e 49 após as aplicações. Para cada avaliação, retiraram-se de cada tratamento três amostras de 500 g de solo, onde foram enterradas cinco larvas de *G. mellonella*, e avaliadas cinco dias após, segundo a mortalidade por nematoides *Heterorhabditis* e *Steinernema*, por fungos entomopatogênicos e por outras causas. A avaliação do efeito de *H. amazonensis* na mortalidade de *C. capitata* ocorreram nos dias 15, 30, 45 e 59 após as aplicações, de acordo com o número de adultos emergidos nos envelopes. Para *A. fraterculus*, *H. amazonensis* foi considerado o mais virulento, com 70% de mortalidade corrigida. Para *C. capitata*, os isolados mais virulentos foram *H. indica, Heterorhabditis* sp. IBCB n44 e *Heterorhabditis* sp. IBCB n45, com mortalidade corrigida de 35%, 24% e 32%, respectivamente. *H. amazonensis* proporcionou 40% de mortalidade para pré-pupas de *C. capitata*. *H. amazonensis* proporcionou níveis de mortalidade corrigida que variaram de 46% a 71% para *C. capitata* e de 55% a 67% para *A. fraterculus*. *H. amazonensis* proporcionou taxas de mortalidade para larvas de *G. mellonella* entre 7% a 68% na dose de $1x10^8$ JIs/cm^2 e de 17% a 87% na dose de $1x10^9$ JIs/cm^2, o que possibilitou constatar a existência de períodos de persistência e de reciclagem do *H. amazonensis* em campo de citros. O elevado índice de mortalidade de insetos nas testemunhas prejudicou a análise dos resultados de avaliação do efeito do *H. amazonensis* na mortalidade de *C. capitata*. Para estudar o efeito de nematoides entomopatogênicos no controle do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii*, avaliou-se a virulência do *Steinernema brazilense* IBCB n6*, Heterorhabditis indica* IBCB n5 e *H. amazonensis* IBCB n24 contra pré-pupas do gorgulho-da-goiaba em testes de laboratório, realizados no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico (Campinas, SP). No primeiro teste de laboratório avaliaram-se as doses de 50, 175 e 612 JIs/Inseto; no segundo, as doses de 2000, 4000 e 6000 JIs/Inseto. Em teste de campo, realizado em pomar de goiaba convencional (Campinas, SP), avaliou-se o efeito de *H. amazonensis* na mortalidade do gorgulho-da-goiaba. Consideram-se três tratamentos e três repetições: *H. amazonensis* nas doses de $1x10^9$ e $5x10^9$ JIs/ha e testemunha, aplicados na projeção da copa da planta, onde foram enterrados cinco envelopes com 200g de solo e dez pré-pupas do inseto. Os insetos foram avaliados quanto à mortalidade 15 e 12 dias após a instalação do ensaio para os testes de laboratório e de campo, respectivamente. *H. amazonensis* e *S. brazilense* mostraram-se mais virulentos nos testes de laboratório, proporcionando níveis de infecção entre 22,4% a 31,4% e 11% a 17,8%, respectivamente, nas menores doses, e entre 76,7% a 83,3% e 60% a 73,3%, respectivamente, nas maiores doses. No teste de campo, *H. amazonensis* proporcionou 53,8% e 66,0% de infecção nas doses de $1x10^9$ e $5x10^9$ JIs/ha, respectivamente.

Palavras-chave: *Anastrepha fraterculus*; *Ceratitis capitata*; *Conotrachelus psidii*; controle biológico; *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24; persistência.

ABSTRACT

EVALUATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) FOR CONTROLLING FRUIT FLY (Diptera: Tephritidae) AND GUAVA WEEVIL (Coleoptera: Curculionidae)

Since Brazil is the third largest world fruit grower there has been a searching for chemical insecticides alternatives in order to control fruit pests. Entomopathogenic nematodes are remarkably an alternative agent for biological control. This search aimed to evaluate the effects of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) for controlling fruit fly (Diptera: Tephritidae) and guava weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* are identified as the main fruit fly which attacks the citrus culture in São Paulo State, Brazil while guava weevil *Conotrachelus psidii* is considered one of the major pests of guava. These insects spend part of their life cycle in the soil so that they become the target of entomopathogenic nematodes. It was evaluated the virulence of *Heterorhabditis* sp. IBCB n44, *Heterorhabditis* sp. IBCB n45, *Heterorhabditis* sp. IBCB n46, *H. indica* IBCB n5 and *H. amazonensis* IBCB n24 at doses of 50 IJs/Insect in order to study the entomopathogenic nematodes effect for controlling the fruit fly *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata.* This evaluation was done under laboratory condition at a Laboratório de Controle Biológico, Instituto Biológico (Campinas, SP). It was taken into account six treatments and seven repetitions. Groups of ten prepupae in cups and isolates were applied on the surface. The evaluation was done 12 and 15 days soon after the treatment was applied for *C. capitata* and *A. fraterculus,* respectively, based on the number of emerged adult insects. Susceptibility was also evaluated at different stages of *C. capitata* to *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 nematodes. Five treatments and ten repetitions were considered: *H. amazonensis* at doses of 200 IJs/Insect applied against *C. capitata* along prepupae phase and pupae on three, six and nine days of development and control. Larvae were released in cups and *H. amazonensi*s was applied on the surface. The evaluation occurred 12 days later based on the number of emerged adults and pupae mortality. Under citrus field conditions (Empresa Citrovita Agro Pecuária LTDA, Itapetininga, SP) it was evaluated the doses effects of *H. amazonensis* IBCB n24 in *A. fraterculus* and *C. capitata* mortality. Four treatments were considered: *H. amazonensis* at doses of $1x10^8$, $3,5x10^8$ and $1x10^9$ IJs/ha and control applied on cup plant projection in which eight envelops were partially buried with 100g of soil and ten prepupae of the insect. Evaluation was done 16 days after applying nematodes for *C. capitata* and 26 for *A. fraterculus*, based on the numbers of emerged adult. Also, it was evaluated the persistence of *H. amazonensis* in the soil and its effect against *C. Capitata*. Three treatments and four repetitions were considered: *H. amazonensis* at doses of $1x10^8$ IJ/cm^2 and $1x10^9$ IJs/cm^2 and control applied on cup plant projection in which ten envelops were partially buried with 100g of soil and ten prepupae of the insect. First evaluation for persistence started before applying the doses for *H. amazonensis.* Following evaluations took place on days 6, 20, 33 and 49 after the application. For each evaluation was taken three samples of 500 g soil from each treatment, where five *G. mellonela* larvae were buried and five days later were evaluated according to the mortality: by *Heterorhabditis* and *Steinernema* nematodes, by entomopathogenic fungi and by any other reason. *H. amazonensis* effect evaluations

in *C. capitata* mortality occurred on days 15, 30, 45 and 59 after the applications according to the numbers of emerged adults in the envelops. The most virulent was regarded to *A. fraterculus, H. amazonensis* with 70% of corrected mortality. For *C. capitata,* the most virulent isolates were *H. indica, Heterorhabditis* sp. IBCB n44 and *Heterorhabditis* sp. IBCB n45, with corrected mortality of 35%, 24% and 32%, respectively. *H. amazonensis* caused 40% of prepupae mortality of C. capitata. *H. amazonensis* caused levels of corrected mortality ranged from 46% to 71% for *C. capitata* and from 55% to 67% for *A. fraterculus. H. amazonensis* caused mortaliy level for *G. mellonella* larvae from 7% to 68% at doses of $1x10^8$ IJs/cm^2 and from 17% to 87% at doses of $1x10^9$ IJs/cm^2, what was possible to find out periods of persistence and recycling of *H. amazonensis* in citrus field. The high level of insect mortality for the control damaged the evaluation results of *H. amazonensis* effect in mortality of *C. capitata.* It was evaluated the virulence of *Steinernema brazilense* IBCB n6, *Heterorhabditis indica* IBCB n5 and *H. amazonensis* IBCB n24 against prepupae of guava weevil in laboratory tests in order to study the effect of entomopathogenic nematodes for controlling guava weevil *Conotrachelus psidii*. This evaluation was done at a Laboratório de Controle Biológico, Instituto Biológico (Campinas, SP). The first laboratory trial allowed to be analyzed the doses of 50, 175 and 612 IJ/Insect; on the second, the doses were 2000, 4000 e 6000 IJs/Insect. Field tests, done at a conventional guava orchard (Campinas-SP, Brazil), also evaluated the effect of *H. amazonensis* for guava weevil mortality. Three treatments and three repetitions were considered: *H. amazonensis* at doses of $1x10^9$ and $5x10^9$ IJs/ha and control, applied on cup plant projection which five envelops were partially buried with 200g of soil and ten prepupae of the insect. Insects were evaluated according to their mortality 15 and 12 days after preparing the facilities for laboratory and field tests, respectively. *H. amazonensis* and *S. brazilense* showed to be more virulent on lab trials with infection rates from 22.4% to 31.4% and from 11% to 17.8%, in lower doses respectively. In higher doses were found 76.7% to 83.3% and from 60% to 73.3%, respectively. Field tests, *H. amazonensis* caused 53.8% to 66.0% of infection at doses of $1x10^9$ and $5x10^9$ IJs/ha, respectively.

Key-words: *Anastrepha fraterculus*; biological control; *Ceratitis capitata*; *Conotrachelus psidii*; *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24; persistence.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, superado pela China e Índia (IBRAF, 2011). Clima e biodiversidade que possibilitam produção diversificada e em várias épocas do ano, desenvolvimento de pesquisa e tecnologia produtiva qualificada são fatores que têm propiciado sua elevação ao primeiro posto no ranking mundial, ampliando sua inserção no mercado externo, alavancando a economia de regiões produtoras. No que se refere ao mercado interno, percebe-se que o consumidor brasileiro vem mudando seus hábitos alimentares, buscando melhor qualidade de vida que envolve alimentação balanceada com a inclusão de produtos saudáveis, com o consumo de mais frutas e de sucos de frutas (livres de agroquímicos) em sua dieta.

A diversidade ambiental e as tecnologias disponíveis, sem dúvida, são fatores viáveis para proporcionar ao Brasil o posto de maior produtor mundial de frutas. No entanto, um ponto fundamental deve ser solucionado – a busca por métodos alternativos aos produtos químicos no controle de pragas de frutíferas.

O controle de insetos pragas com pesticidas químicos tem gerado inúmeros problemas, tais como resistência a inseticidas, surto de pragas secundárias, risco de segurança para seres humanos e animais domésticos, contaminação das águas subterrâneas e do solo, perda da biodiversidade. Esses problemas, assim como a utilização de programas subsidiados predominantemente por inseticidas convencionais têm estimulado o interesse e a necessidade de se substituir o manejo intensivo químico por estratégias de controle alternativo.

Além disso, o comércio internacional de frutas frescas impõe normas que visam a impedir a introdução de pragas oriundas do país exportador para o país importador como, por exemplo, os Estados Unidos e o Japão que impõem barreiras fitossanitárias com vistas a impedir a introdução de espécies exóticas de moscas-das-frutas em seus territórios. Nesse sentido, a adequação às normas e às exigências dos mercados, a busca por segurança alimentar e quarentenária exigem rápidas mudanças nas técnicas de controle utilizadas na fruticultura brasileira.

Um dos marcos importantes da fruticultura nacional foi a adoção da Produção Integrada de Frutas (PIF) que tem por objetivos a utilização de modernas tecnologias, o respeito ao fruticultor, ao meio ambiente e ao trabalhador do campo, com vistas a garantir a sustentabilidade das cadeias produtivas (SOBCZACK, 2009). A PIF é

uma exigência dos principais mercados importadores, por exemplo, a União Européia, que busca segurança alimentar impondo regras para a comercialização de frutas frescas.

A agricultura sustentável no Século XXI vai depender cada vez mais de intervenções alternativas, ecologicamente corretas, para o manejo de pragas e para a redução do contato humano com produtos químicos pesticidas. O interesse por programas de controle biológico de pragas tem crescido consideravelmente no mundo em função de novos direcionamentos internacionais relacionados à produção agrícola que favorecem a conservação e o uso sustentável dos recursos biológicos. A utilização de inimigos naturais de pragas é uma alternativa promissora.

Os inimigos naturais são importantes para a agricultura sustentável e podem substituir ou reduzir a necessidade de utilização dos agrotóxicos, além de serem fundamentais como componentes no manejo ecológico de pragas. Os nematoides entomopatogênicos, assim como as bactérias, os fungos, vírus e insetos têm se despontado como excelente recurso de controle biológico.

Os nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* Travassos e *Heterorhabditis* Poinar (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae) são parasitas letais de insetos (KAYA e GAUGLER, 1993). O juvenil infectivo de terceiro estágio penetra na hemocele do inseto hospedeiro por meio das aberturas naturais e libera a bactéria simbiótica que carrega em seu canal alimentar (*Xenorhabdus* spp. Thomase Poinar para Steinernematidae, e *Photorhabdus* spp. Boemere et al. para Heterorhabditidae) (ADAMS e NGUYEN, 2002). As toxinas produzidas pelo nematoide em desenvolvimento e pela bactéria matam o hospedeiro por septicemia dentro de 24 a 48 horas. O nematoide completa de duas a três gerações dentro hospedeiro e, quando o cadáver do inseto é consumido, o juvenil infectivo deixa-o para buscar novos hospedeiros no solo (DOWDS e PETERS, 2002).

A comercialização de nematoides entomopatogênicos no controle de pragas de insetos e o rápido aumento do uso, nos últimos anos, desses agentes, devem-se aos seguintes fatores: criação massal *in vitro* a custos economicamente viáveis; resistência a defensivos agrícolas químicos e biológicos; não toxidade às plantas cultivadas; especificidade para insetos; persistência por longos períodos no ambiente; não toxicidade ao homem ou a animais domésticos; isenção de registro dos produtos biológicos junto a órgãos ligados ao meio ambiente; possibilidade de efeito de sinergismo para combinações com inseticidas (LEITE, 2006); possibilidade de seleção genética (KAYA e GAUGLER, 1993).

Este trabalho tem como objetivo avaliar nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) contra as pragas de frutíferas moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) e gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) e está dividido em três capítulos: o primeiro apresenta revisão de literatura, abordando aspectos da sistemática, da biologia, da ação patogênica dos nematoides entomopatogênicos, dos fatores que interferem na persistência do agente no solo e da ação dos nematoides entomopatogênicos no controle do gorgulho-da-goiaba e das moscas-das-frutas no Brasil. O segundo compreende estudo (elaborado sob forma de artigo) que teve como objetivo avaliar o efeito de nematoides entomopatogênicos na mortalidade das moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em condições de laboratório e de campo, assim como a persistência do nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 em campo. O terceiro constitui-se em estudo (também elaborado sob forma de artigo) que teve como proposta avaliar o efeito de nematoides entomopatogênicos (Steinernematidae; Heterorhabditidae) na mortalidade de pré-pupas do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) em condições de laboratório e de campo.

I CAPÍTULO: REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Aspectos sócioeconômicos da laranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae) e da goiaba *Psidium guajava* L. (Myrtaceae)

1.1.1 Laranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Rutaceae)

A laranja, pertencente à família das Rutáceas (Rutaceae), é uma das mais importantes frutas cultivadas do Brasil (ASSOCITRUS, 2008). Originária da Ásia foi trazida da Espanha em 1501, pelos portugueses, com o objetivo de se criar abastecimento de vitamina C a ser utilizada como antídoto do escorbuto, doença que dizimava a maioria das tripulações no período dos descobrimentos (NEVES e JANK, 2006).

A cultura da laranja, no Brasil, desenvolveu-se significativamente a partir dos anos 60, quando grande parte dos laranjais da Flórida, Estados Unidos, foi destruída por geada. Isso fez com que houvesse demanda de importações impulsionando países como o Brasil a investir nessa cultura. Muitos estados brasileiros dispõem de considerável produção de laranjas, assim como de outros frutos cítricos, destacando-se São Paulo (principal produtor), Rio de Janeiro, Minas Gerais, Sergipe, Rio Grande do Sul, Paraná e Goiás (ASSOCITRUS, 2008).

Atualmente, a citricultura é um dos setores mais competitivos e de maior potencial de crescimento do agronegócio no Brasil que detém 30% da produção mundial da laranja e 59% da de suco de laranja (São Paulo e Flórida dominam a oferta mundial). A laranja é o terceiro produto mais importante no agronegócio paulista e sinônimo de emprego e renda no campo (SOBCZACK, 2009).

O sistema agroindustrial citrícula movimenta nove bilhões por ano e gera mais de quatrocentos mil empregos diretos e indiretos. O país exporta US$ 1,2 bilhões em suco de laranja, o que representa 80% do mercado mundial (NEVES; JANK, 2006). O principal mercado consumidor do suco brasileiro é a Europa, com 70% dos volumes negociados. Os Estados Unidos respondem por 15% de participação, a Ásia, por 10% e outros mercados por 5% (TURRA e GHISI, 2010).

Em 2009, no Brasil, a produção de laranja foi de 17.618.450 toneladas; no estado de São Paulo, foi de 13.642.165 toneladas – o que equivale a 77% da produção do país e ao valor de produção de R$ 3.235.004 mil reais. (IGBE, 2010). O patrimônio

citrícula do Brasil é representado por cerca de 2 mil tipos de árvores de laranja, tangerina e limão (SOUZA, 2001), plantadas em 802.528 ha (IBGE, 2010).

A indústria de suco concentrado produz diversos subprodutos da laranja com diferentes aplicações no mercado interno e externo, as quais incluem fabricação de produtos químicos e solventes, aromas, fragrâncias, tintas, cosméticos, complementos para ração animal, inclusive subprodutos do processamento industrial, tais como farelo de polpa cítrica, essência cítrica (BOTEON, 2010).

No que diz respeito à citricultura orgânica, ela ainda é incipiente no país, mas vem demonstrando fortes sinais de crescimento. Há produtores de citros orgânico em todas as regiões do Brasil, sobretudo na região sudeste, com destaque para o estado de São Paulo. Mais de 90% da fruta cítrica orgânica produzida tem como destino a indústria processadora – o principal suco de laranja orgânico produzido é o concentrado congelado (TURRA e GHISI, 2010).

Quanto ao processo de certificação da cultura orgânica perene, as exigências relacionam-se à necessidade de a plantação estar livre de produtos agrotóxicos, há pelo menos três a quatro anos – tempo mínimo para que o solo seja descontaminado e para que se evite a presença de resíduos químicos nas frutas –, ao atendimento adequado dos procedimentos adotados no sistema de produção, tais como tipo de preparo do solo, controle biológico ou cultural das principais doenças, insumos utilizados; à observação das legislações ambientais, das relações trabalhistas (TURRA e GHISI, 2010).

Tanto na citricultura orgânica quanto na citricultura convencional, os produtores têm apontado como principal dificuldade de produção o avanço de pragas e de doenças que causam danos irreversíveis às plantas, ameaçam a quantidade e a qualidade das frutas cítricas, podendo levar à erradicação completa do pomar. Isso configura risco potencial de inviabilidade técnica e econômica da produção (NEVES e JANK, 2006; TURRA e GHISI, 2010).

A laranjeira e os outros citros são atacados por ácaro *Plyllocoptruta oleivora* (ácaro da falsa ferrugem), *Brevipalpus phoenicis* (ácaro da leprose), broca *Cratosomus flavofosciatus* (broca-da-laranjeira), *Leptostylus* sp. (broca da limeira ácida), cochonilha *Orthezia praelonga* (de placas), *Chrysomphalus ficus* (cabeça-de-prego), *Pinnaspis aspidistrae*, *Mytilococcus beckii* (de escamas), coleobrocas *Diploschema rotundicolle*, *Trachyderes* thoracicus (besouros que perfuram tronco e ramos), mariposa-das-laranjeiras *Ecdytolopha aurantiana*, mosca-das-frutas *Anastrepha fraterculus*, *Ceratitis*

capitata, pulgão *Toxoptera citricida* (pulgão preto), Icerya purchasi (pulgão branco) SEAGRI, 2010).

1.1.2 Goiaba *Psidium guajava* L. (Myrtaceae)

A goiabeira, considerada importante espécie frutífera, é cultivada mundialmente em regiões tropicais e sub-tropicais (TODA FRUTA, 2010), pertence à família Myrtaceae que abrange 140 gêneros e três mil espécies. A goiaba, *Psidium guajava* L., tem como centro de origem o sul do México e o Peru, na América do Sul (MEDINA, 1991), onde pode ser encontrada em estado silvestre (ROZANE et al., 2010). Tem significativa relevância do ponto de vista econômico e social por ser seu cultivo gerador de emprego no meio rural e industrial (FRANCISCO et al., 2005).

P. guajava tem sido utilizada na área medicinal (PEREIRA, 2008), por conter elevado teor de vitaminas C e A, cálcio, tiamina, niacina, fósforo, ferro, beta-caroteno e licopeno (PIEDADE NETO, 2003), no reflorestamento de áreas degradadas, no restabelecimento do ciclo hidrológico, nos serviços ambientais como seqüestro de carbono, nos sistemas agroflorestais (PEREIRA, 2008).

No Brasil, as condições de clima e de solo favorecem a produção comercial da goiabeira, o que é relevante do ponto de vista econômico, social, considerando-se a perspectiva de incremento da produção agrícola, a ampliação da atividade industrial e o potencial de exportação (ROZANE et al., 2010).

A goiaba foi introduzida no Brasil em 1587 (MEDINA, 1991). Atualmente está distribuída por todo o território nacional, sendo uma das frutas nativas mais cultivadas. Entretanto, foi considerada por muito tempo sem valor econômico, abrindo espaço para frutas consideradas exóticas tais como laranja, maçã, uva, pêra, pêssego, que sempre ocuparam as primeiras posições no ranking brasileiro, considerando-se a quantidade produzida e o retorno econômico (SOUZA et al., 2009).

Até o início da década de 1970, o mercado da goiaba *in natura* era praticamente inexplorado e as indústrias eram abastecidas pelos goiabais nativos, abundantes no estado de São Paulo, que gradativamente foram destruídos, dando lugar às culturas tradicionais e à formação de pastagens (ARRUDA NETO, 1972; WATANABE, 2009).

Na década de 1980, havia alguns cultivares com características produtivas e qualitativas que nem sempre atendiam às exigências dos produtores e consumidores.

Vale ressaltar que, nesse período, fruticultores familiares de origem japonesa, radicados nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, dão início à implantação de pequenos pomares com a utilização de modernas técnicas produtivas, tais como seleção de cultivares, poda, raleio e ensacamento de frutos, seleção e classificação, o que proporciona melhoria significativa na qualidade da planta. (WATANABE, 2009).

Na década de 1990, recomendações sobre calagem, adubação e nutrição em pomares de goiabeiras em implantação e formação fizeram com que a cultura ganhasse novo impulso apresentando expressivo aumento da área cultivada, especialmente no estado de São Paulo. Esses avanços no manejo dos pomares têm permitido a produção de três safras de goiaba a cada dois anos (SILVA et al., 2009). Atualmente, o Brasil é o país que possui a maior variedade de goiabeiras, a maior diversidade de cores de polpas e a maior produtividade natural. O país é o maior produtor mundial de goiabas vermelhas e a Índia o de goiabas brancas (NATALE, 2009).

A produção anual de 2008, no Brasil, foi de 312.348 toneladas de goiabas com área plantada de 15.641 mil ha, cujo valor da produção foi de 206.262 milhões de reais. Grande parte dos pomares de produção de goiaba está concentrada nas regiões Nordeste (135.016 toneladas, 6.974 ha) e Sudeste (125.201 toneladas, 5.692 ha), com destaque para os estados de Pernambuco e São Paulo, os dois com aproximadamente 3.700 ha de área plantada. Em 2008 a produção anual para os estados de Pernambuco e São Paulo foi de 71.406 milhões e 53.432 milhões de reais, respectivamente (IBGE, 2010).

Atualmente, a atividade agroindustrial ligada à cultura da goiaba é uma das mais importantes do Brasil, uma vez que a maior parte da fruta produzida no país é consumida na forma industrializada (SOUZA et al., 2009).

A globalização acirrou a necessidade de normalização dos processos de produção e dos produtos em todo o mundo. Os países importadores de frutas passam a pressionar os exportadores no sentido de se estabelecer regras de produção que levem em consideração os resíduos de agrotóxicos, o meio ambiente, as condições de trabalho e higiene. Dessa forma, o Brasil elege, em conformidade com as exigências oficiais para produtos agrícolas, a Agricultura Orgânica e a Produção Integrada (KAVATI, 2009).

A Agricultura Orgânica adota tecnologias que otimizam o uso de recursos naturais e sócioeconômicos, tendo por objetivo a auto-sustentação no tempo e no espaço, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energias não renováveis, e a eliminação do emprego de agrotóxicos e de outros insumos

artificiais tóxicos, de organismos geneticamente modificados (OMG/transgênicos), de radiações ionizantes em qualquer fase do processo de produção, armazenamento e consumo, o que privilegia a preservação da saúde ambiental e humana e assegura a transparência em todos os estágios de produção e de transformação (BRASIL, 1999).

As perspectivas para a Agricultura Orgânica são altamente promissoras em nível de mercado (TUPY et al., 2010) e constituem alternativa de organização e de estruturação do processo produtivo desenvolvido por produtores agrícolas de menor porte, na busca de competitividade (BRASIL, 1999). A produção paulista de goiaba é típica de pequenos produtores, considerando as exigências constantes de podas, irrigação e colheita de fruta para mesa o que vem contribuindo para aumentar a demanda de mão de obra qualificada na agricultura e a utilização de mão de obra familiar (FRANCISCO et al., 2005).

A Produção Integrada de Goiaba é definida como sendo a produção econômica de goiabas de alta qualidade, priorizando métodos de produção mais seguros ecologicamente, atenuando os efeitos colaterais indesejáveis da produção agrícola e reduzindo o uso de agroquímicos para assegurar a proteção do meio ambiente e da saúde humana (COMITÊ GESTOR DA PRODUÇÃO INTEGRADA DE GOIABA, 2010).

Tanto no sistema de Agricultura Orgânica quanto no de Produção Integrada, os problemas fitossanitários, sobretudo os relacionados às pragas que atingem a cultura da goiaba, constituem uma das principais barreiras ao acesso de frutas frescas no que se refere aos mercados internos e principalmente aos externos.

Souza Filho e Costa (2009) relatam que até o momento são conhecidas 213 espécies de artrópodes, entre ácaros e insetos, associados à goiabeira no mundo, no Brasil são conhecidas 70 espécies. Essas pragas, dependendo da região ou das condições do ambiente, podem expressar-se na forma agressiva ou de surtos, causando sérios prejuízos à cultura. No estado de São Paulo são conhecidas o ácaro-branco *Polyphagotarsonemus latus*, a vespinha-da-goiaba *Eurytoma* sp., o tripes *Liothrips* sp., *Pseudophilothrips* sp. e *Selenothrips rubrocinctus,* a broca *Retrachyderes thoracicus* e *Timocratica palpalis*, a lagarta *Citheronia laocoon*, *Megalopyge lanata*, *Mimallo amilia* e *Pyrrhopyge charybdis*, a cochonilha *Ceroplastes* spp., *Planococcus minor* e *Hemiberlesia lataniae*, a mosca-branca *Aleurothrixus* spp., e espécies de lagarta que ocorrem nas brotações (lagartas-dos-ponteiros) e nos frutos (família Tortricidae). Além dessas, são consideradas pragas-chave da goiabeira o besouro–amarelo *Costalimaita*

ferruginea (Coleoptera: Chrysomelidae), o percevejo *Leptoglossus stigma* e *L. zonatus* (Hemiptera: Coreidae), o psilídio-da-goiabeira *Triozida limbata* (Hemiptera: Triozidae), a mosca-das-frutas *Anastrepha fraterculus*, *A. bistrigata*, *A. striata*, *A. sororcula*, *A. obliqua* e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) e o gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii*) (Coleoptera: Curculionidae), para as quais se devem orientar o monitoramento e o controle.

1.2 Aspectos gerais, biologia e ocorrência das moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera, Tephritidae) e do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae)

1.2.1 Moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824)

1.2.1.1 Aspectos gerais e taxonomia

As moscas-das-frutas pertencem à ordem Diptera, subordem Brachycera, infraordem Muscomorpha (Cyclorrhapha), seção Schizophora, superfamília Tephritoidea e família Tephritidae (McALPINE, 1989). As espécies de tefritídeos que utilizam frutas como substrato para o desenvolvimento de suas larvas são as mais estudadas por constituírem o grupo de insetos-praga de maior importância econômica (ALUJA; NORRBOM, 2000).

No Brasil são encontrados da família Tephritidae os gêneros *Anastrepha* Schiner, 1868, *Ceratitis* MacLeay, 1829, *Bactrocera* Macquart, 1835 e *Rhagoletis* Loew, 1862. Espécies do gênero *Anastrepha*, com predominância de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1924), são consideradas as principais moscas-das-frutas (ZUCCHI, 2000).

As moscas das espécies de *Anastrepha* são endêmicas na região Neotropical e restritas a ambientes tropicais e subtropicais (ALUJA, 1994). Ocorrem no sul da região Neártica e todas as espécies estão estabelecidas em sua provável área de origem (MALAVASI et al., 2000).

Atualmente, estão descritas 212 espécies de *Anastrepha* (URAMOTO, 2007). Dessas, 43% são encontradas na América do Sul (ALUJA, 1994), 95 espécies distribuem-se em todo o território brasileiro (ZUCCHI, 2000; RONCHI-TELES, 2000), favorecidas pela diversidade de hospedeiros e regiões ecológicas. Geralmente essas

espécies são polífagas por atacarem frutos de diversas famílias e por apresentarem ampla distribuição (MALAVASI et al., 1980). As espécies *A. grandis*, *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. pseudoparallela*, *A. sororcula*, *A. striata* e *A. zenildae* são consideradas de importância econômica (ZUCCHI, 2000).

As espécies das regiões subtropicais e tropicais caracterizam-se como multivoltinas, polífagas, estabelecendo-se em locais onde se encontram frutos em amadurecimento. A exploração de recursos leva ao aumento de densidade populacional que declina à medida que a quantidade de recurso disponível diminui. Isso influencia na capacidade de dispersão da espécie (SELIVON, 2000).

Anastrepha fraterculus é a espécie de distribuição mais ampla e sua importância econômica decresce do sul para o norte do país. Na região sul e sudeste do Brasil, ataca maçãs (*Pyrus malus* L.) e citros (*Citrus* spp.); à medida que avança para o norte a *A. fraterculus* vai sendo substituída por *A. sororcula, A. striata* e *A. zenildae* (MALAVASI et al.; 2000).

O gênero *Ceratitis* pertence à subfamília Trypetinae, Tribo Dacini, subtribo Ceratitidina (ZUCCHI, 2001). É nativo do norte da África, alcançando o sul da Europa (zona do Mar Mediterrâneo), Oriente Médio, Austrália, Ilhas do Pacífico, América do Sul, Norte e Central e ilhas isoladas dos Estados Unidos (MALAVASI et al., 2000). Infesta mais de 374 espécies de frutos nativos e exóticos, pertencentes a 69 famílias, em várias regiões do mundo (LIQUIDO et al*.,* 1991).

O gênero *Ceratitis* é composto, aproximadamente, de 70 espécies (NORRBOM et al., 1998). No Brasil, é representado por uma única espécie, a mosca do mediterrâneo, *Ceratitis capitata*. Considerada a espécie mais cosmopolita e invasora, está distribuída em quase todas as áreas tropicais e temperadas quentes do mundo, causando danos econômicos à fruticultura mundial (ZUCCHI, 2000). No Brasil é praga de importância quarentenária, infesta, preferencialmente, frutos introduzidos (MALAVASI et al., 1980, AGUIAR-MENEZES e MENEZES, 1996); provavelmente, apresenta elevado potencial de adaptação e polifagia entre as moscas-das-frutas presentes no Brasil (MALAVASI et al., 1980, RONCHI-TELES e SILVA, 1996).

Ceratitis capitata foi registrada pela primeira vez em maio de 1901, no Brasil, infestando *Citrus* spp. no estado de São Paulo (IHERING, 1901). Até 1968, registrou-se sua ocorrência nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia – seu limite norte na década de 1980 (MALAVASI et al., 1980, NASCIMENTO e ZUCCHI, 1981). Atualmente, está

disseminada nos estados do Amapá, Pará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Espírito Santo, Goiás (MALAVASI et al., 2000), Mato Grosso do Sul (UCHÔA-FERNANDES e ZUCCHI, 2000), Maranhão (MORGANTE, 1991), Rondônia (RONCHI-TELES e SILVA, 1996) Ceará (BRAGA SOBRINHO et al., 2002), Pernambuco (HAJI e MIRANDA, 2000).

1.2.1.2 Biologia

A fêmea das moscas-das-frutas, após a emergência, necessita de alimentos protéicos e de carboidratos para que ocorra o período de maturidade sexual, que varia de oito a dez dias, dependendo da espécie e a viabilidade dos ovos. As moscas-das-frutas danificam diretamente os frutos a partir do momento em que a fêmea acasalada introduz seu ovipositor (CARVALHO, 2005).

Em citros, a fêmea perfura o epicarpo (casca) do fruto para realizar a oviposição – de 1 e até 10 ovos por postura para *A. fraterculus* e *C. capitata*, respectivamente.– no interior do albedo (parte branca sob a casca do fruto). A epiderme fica marcada no local da punctura e, com o desenvolvimento fisiológico do fruto, forma-se uma concavidade ou uma deformação que o deprecia (CARVALHO, 2005; GRAVENA et al., 2010).

Frutos infestados por moscas-das-frutas apresentam intensa fermentação, e exsudação pelo orifício de oviposição. Na casca do fruto verde, ao redor do orifício de postura, aparece uma tonalidade amarelada indicando processo de podridão úmida e amolecida que leva à queda precoce do fruto (GRAVENA et al., 2010).

Aproximadamente dois dias após a oviposição, ocorre a eclosão das larvas que passam a alimentar-se continuamente da polpa do fruto por um período que depende da espécie e das condições ambientais. As larvas de coloração branco-amarelada, afiladas na região anterior e arredondadas na posterior, caminham fazendo galerias em direção à polpa consomem-na causando, geralmente, apodrecimento da área (CARVALHO, 2005; GRAVENA et al., 2010). As larvas de terceiro instar saem do fruto, penetram de 2 a 8 cm no perfil do solo ao redor da planta hospedeira e se empupam entre 2 a 12 horas. O adulto emerge da pupa em torno de 10 a 15 dias, rasteja próximo à vegetação até que o seu tegumento endureça. Após sete dias a reprodução tem início (LINDEGREN e VAIL, 1986; GREWAL et al., 2001).

A dinâmica populacional das moscas-das-frutas dependente de fatores abióticos como a temperatura e a precipitação pluvial e de fatores bióticos, como, principalmente, a disponibilidade de frutos. O ciclo de vida (ovo a adulto) é diretamente dependente da temperatura, sendo mais prolongado em épocas ou regiões de temperaturas baixas. A duração da fase de ovo no interior do fruto é de 3 a 4 dias para *A. fraterculus* e de 2 a 4 dias para *C. capitata*. A fase de larva, no interior do fruto tema a duração de 11 a 14 dias para *A. fraterculus* e 7 a 11 dias para *C. capitata*. A pupa de *A. fraterculus* permanece no solo por período entre 10 a 15 dias e a pupa de *C. capitata* permanece no solo por período entre 9 a 20 dias. O ciclo de vida de ovo a adulto tem a duração de 24 a 33 dias para *A. fraterculus* e 60 a 300 dias para *C. capitata*. Para *A. fraterculus*, o tempo de vida dos adultos é de até 5 meses e a fecundidade da fêmea não excede 450 ovos, enquanto que para *C. capitata* o tempo de vida dos adultos é de até 10 meses e a fecundidade da fêmea é de até 800 ovos (GRAVENA et al., 2010).

1.2.1.3 Ocorrência de moscas-das-frutas em citros

Em estudo sobre hospedeiros de moscas-das-frutas no Brasil, Malavasi e Morgante (1980) observaram que 13,7% das moscas que emergiram dos frutos de *Citrus* spp. eram espécies do gênero *Anastreph*a e 43,1 %, da espécie *C. capitata*. Dando continuidade ao trabalho, Malavasi et al. (1980) verificaram a ocorrência de moscas-das-frutas em todo o estado de São Paulo, com predominância em áreas de produção comercial de frutas e em campos cerrados com frutos silvestres. As espécies encontradas foram *C. capitata* e *A. fraterculus* em laranja doce (*Citrus sinensis*, *C. aurantium*, *C. deliciosa*, *C. grandis*, *C. madurensis* e *C. reticulata*).

Fernandes (1987), em levantamento realizado com armadilhas em pomar de laranja *C. sinensis* (cultivar Pera) em São Paulo, verificou que 95,65% das moscas capturadas eram *C. capitata* e 4,35%, *Anastrepha* spp., com predominância de *A. fraterculus*.

Souza Filho et al. (2000) consideraram *C. capitata*, ocorrendo principalmente em planta introduzida, e *A. fraterculus* como as principais espécies de moscas-das-frutas do Estado de São Paulo.

Raga et al. (2004) coletaram frutos de diferentes variedades e híbridos de citros em 25 municípios do Estado de São Paulo. Do total das amostras recuperaram 5.252 pupários e 3.039 adultos de Tephritoidea, sendo que 78,1% dos adultos foram

Tephritidae (77,1% de *Anastrepha fraterculus* e 1,0% de *C. capitata*). Concluíram que as laranjas doces são as variedades mais suscetíveis à infestação de Tephritoidea no estado de São Paulo.

Em levantamento realizado no pomar experimental de citros do Departamento de Fitotecnia/CCA/UFPI foram capturadas as espécies: *A. obliqua*, *A. striata*, *A. zenildae*, *A. flavipennis*, *A. dissimilis*, *A. sororcula* e *A. ethalea*, sendo *A. obliqua* a que apresentou maior frequência (SANTOS e PÁDUA, 2004).

Em pomares de citros (cultivar Valência) da região Oeste de Santa Catarina, *A. fraterculus* predominou sobre outras espécies de moscas-das-frutas (CHIARADIA et al., 2004).

Em levantamento por armadilha realizado em pomares de laranja doce *C. sinensis* e tangerina *C. reticulata*, no município de Araruama, RJ, Souza et al. (2008) registraram a ocorrência de *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *A. sororcula* e *C. capitata,* com predominância de *A. fraterculus*.

O problema das moscas-das-frutas é ampliado na medida em que o foco de infestação localiza-se em áreas próximas a pomares comerciais o que leva a migração, infestação de frutos e re-infestação dos pomares. Isso dificulta o controle da praga, impede a diversificação de novos pomares e inviabiliza a comercialização de frutas frescas, caso não seja implementado rígido programa de supressão populacional das moscas nessas áreas (CARVALHO, 2005).

Para o estado de São Paulo foi definido que *C. capitata* representa a maior parte da população nas regiões citrícolas do centro-norte e noroeste e *A. fraterculus* na região centro-sul. Nestas regiões citrícolas, o potencial de ataque está relacionado às condições climáticas favoráveis e à sucessão de hospedeiros, em que os adultos migram de uma frutífera para outra, à medida que estas forem frutificando em diferentes épocas do ano, fenômeno denominado de sucessão hospedeira. Embora haja preferência por frutos na fase de maturação ou de alisamento da casca, as moscas do gênero *Anastrepha*, devido ao seu robusto acúleo (ovipositor), podem infestar os frutos cítricos verdes, na fase de 50% do desenvolvimento máximo, sobretudo das variedades precoces. O primeiro pico populacional desta espécie ocorre entre março e abril, migrante a partir de frutíferas com maturação durante as estações de primavera e verão, como: goiaba, manga, sirigüela, acerola, carambola, maracujá e pêssego. Um segundo pico populacional, ocorre entre julho e setembro, podendo-se prolongar-se até dezembro, quando em função do inverno, pela baixa disponibilidade de hospedeiros, o

inseto obrigatoriamente migra para os citros, atraídos pela maturação dos frutos de meia estação e tardios. Existe também a migração entre as variedades cítricas, nos casos em que não houve um controle satisfatório nas as variedades precoces, criando um potencial de ataque sobre aquelas de maturação tardia. Por fim, com o avançar da colheita restringe-se a área de frutos em fase de maturação, havendo a concentração dos insetos sobre as variedades de maturação tardia. *C. capitata* tem a cultura do café como hospedeiro primário assim, a máxima densidade populacional ocorre no período de julho a novembro, que coincide com a época de maturação e colheita do café arábica. Neste período grandes populações desse inseto migram para pomares de citros em busca de alimentação e locais para oviposição. As fêmeas de *C. capitata*, que apresentam um acúleo rudimentar em relação às moscas do gênero *Anastrepha*, encontram no período de migração os frutos cítricos extremamente favoráveis à oviposição, por apresentarem a casca lisa e tenra em função do estádio de maturação. A precipitação é o fator abiótico de maior influência sobre os picos populacionais de ambas as espécies, pois define a época de florescimento e frutificação dos hospedeiros (GRAVENA et al., 2010).

A aplicação indiscriminada de agrotóxicos que afeta a população de inimigos naturais das moscas-das-frutas nos pomares, o crescimento da área plantada, a diversificação de hospedeiros contribuem para o aumento da densidade populacional das moscas-das-frutas. Essa situação exige um programa de supressão populacional que dê ênfase ao uso de agentes naturais, como, por exemplo, o uso de nematoides entomopatogênicos.

1.2.2 Gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae)

Gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* é uma das principais pragas da goiaba. No Brasil, sua ocorrência foi registrada pela primeira vez em 1913 por Bondar. Posteriormente outros autores como, por exemplo, Carvalho e Carvalho em 1939, Duarte em 1948, Lima em 1956, Gonçalves em 1962, Robbs em 1956 e 1960, Mariconi e Soubihe Sobrinho em 1961, Mariconi em 1963, Silva e D'Araujo em 1967, Gallo em 1970 fazem referência a esse inseto, demonstrando sua importância para a goiabeira e sugerindo informações para seu controle (ORLANDO et al., 1974).

No Brasil, no estado de São Paulo, na década de 1970, com a intensificação da cultura da goiaba, tanto para a produção industrial quanto para o consumo *in natura,*

foi identificado elevado índice de frutos atacados pelo gorgulho, atingindo 80% de infestação (ORLANDO et al., 1974). No Sul de Minas Gerais, ano de 1988, foi verificado o ataque do gorgulho em 43% dos frutos (SOUZA et al., 2003). Em São Paulo, na região de Valinhos, ano de 2009, o ataque do gorgulho comprometeu quase 100% do pomar de goiaba em produção orgânica (Adenílson Roncaglia, dados não publicados).

Ainda não existem, no país, informações suficientes sobre a biologia e o controle do gorgulho da goiaba. Para Bailez et al. (2003), o estudo do comportamento e do controle são urgentemente necessários para o estabelecimento de um programa de gestão para o controle dessa praga.

Na Venezuela, também na América do Sul, ano 1978, o gorgulho-da-goiaba foi registrado causando danos estimados em 88% em pomares que não receberam nenhuma medida de controle e 64% em pomares comerciais que passaram por aspersões de inseticidas nas folhagens (BOSCÁN de MARTÍNEZ e CASARES, 1980).

Os adultos machos e fêmeas do gorgulho-da-goiaba alimentam-se de botões florais, frutos pequenos (BÓSCAN de MARTÍNEZ e CASCARES, 1980), pecíolos e pedúnculos (SILVA-FILHO et al., 2007).

O inseto adulto mede aproximadamente 6 mm de comprimento por 4 mm de largura, tem coloração pardo-escura, rostro cilíndrico e alongado, onde se localizam as peças bucais. O gorgulho-da-goiaba é considerado uma praga do fruto. A fêmea adulta perfura o fruto ainda verde com o tamanho entre 1,5 cm até 3 cm de diâmetro, colocando um ovo em cada orifício. Esse período corresponde ao período crítico de ataque da praga coincidindo com a época quente e chuvosa. Os ovos são encontrados em câmaras de ovos construídas pelas fêmeas em frutos de goiabas verdes, apresentam forma ovóide, túrgidos de cor branca perolada. Em condições de laboratório, Bailez et al. (2003) observaram que o período de incubação tem a duração de 3,9 ± 0,60 dias.

Do ovo eclode uma larva – de coloração branca e cabeça escura, ápoda, fusiforme e afilada na cabeça, com até 10 mm de comprimento – que se alimenta imediatamente, após a eclosão, da polpa e das sementes do fruto. O local da postura no fruto fica endurecido e não se desenvolve com o restante do fruto. Posteriormente, na área da postura, aparece uma depressão na casca, apresentando uma pequena área circular necrótica central, enegrecida, com um orifício, sintomas que caracterizam o ataque da praga. Os frutos atacados desenvolvem-se de maneira deformada, entrando em maturação anormal, forçada, e são inaceitáveis para o consumo *in natura* e para a

industrialização. Após 35 a 40 dias, a larva de quarto instar, de 10 a 15 cm abandona o fruto e se aprofunda no solo. Essa fase corresponde ao período pré-pupal, considerado o mais longo do ciclo de vida do gorgulho, que compreende o número de dias em que a larva abandona o fruto e se enterra no solo até a pupação. A fase de pré-pupa permanece por aproximadamente quatro a cinco meses nos Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo; por oito meses ou mais na região Sul de Minas Gerais, onde seu ciclo acontece em torno de um ano. No solo, a pré-pupa constrói uma câmara de terra para se abrigar. Após esses períodos, a pré-pupa transforma-se em pupa e permanece nessa fase por cerca de 15 dias. Em seguida, de acordo com as condições favoráveis de umidade no solo, o adulto emerge, dando origem a uma nova geração da praga no pomar (MEDINA, 1978; SOUZA et al., 2003; BAILEZ et al., 2003; SOUZA FILHO e COSTA, 2009).

Em condições de laboratório, Bailez et al. (2003) observaram que, após a emergência na areia, os adultos permanecem sedentários, raramente se alimentam e não procuram o companheiro até o final da segunda semana quando o primeiro comportamento de corte foi observado. Da terceira semana em diante, os gorgulhos intensificam sua mobilidade, alimentação, acasalamento e o comportamento de oviposição inicia-se dois dias depois. Durante o período reprodutivo, as fêmeas acasalam-se pelo menos cinco vezes.

A queda dos frutos atacados causa prejuízos diretos na produção e na industrialização, devido à destruição da polpa. A região das sementes fica destruída, enegrecida e é caracterizada por uma podridão úmida e generalizada. Com isso o fruto acaba caindo ao solo. Os frutos atacados, apodrecidos servem de alimento para alguns besouros que passam a viver dentro da goiaba, na árvore ou no chão, mas não são considerados pragas (SOUZA, et al. , 2003).

As condições climáticas interferem no ciclo vital do inseto. Em São Paulo, onde as condições climáticas limitam a produção da planta a uma vez por ano, foi observado adulto do inseto nos ramos e principalmente nos frutos da goiabeira, nos meses de janeiro, fevereiro e março. Nos meses de junho e julho foram observadas pupas; nos de outubro e novembro foi observada a emergência de adultos que ficaram na terra até novembro e dezembro. Com as primeiras chuvas, em conseqüência da umidade do solo, verificou-se que os adultos saíam do solo, subiam nas árvores e davam início a um novo ciclo (ARRUDA NETO, 1972). Na Bahia, onde a produção de goiaba ocorre durante quase todo o ano, o inseto muda seu comportamento, por isso encontram-se adultos na maioria dos meses do ano, com mais abundância no verão

(BARBOSA et al., 2001). Na região Sul de Minas Gerais os gorgulhos só atacam os frutos na safra das águas que geralmente é colhida em fevereiro e março (SOUZA et al., 2003). O período em que o inseto adulto permanece enterrado pode estar relacionado à sua necessidade de completar o processo de esclerotização e à ausência de estímulo para a sua saída do solo (BAILEZ et al., 2003). Para Bóscan de Martínez e Cascares (1982), esse estímulo pode ser providenciado pela precipitação, a qual facilita a saída do inseto do solo.

O uso abusivo de agrotóxico, ocasionando aquisição de resistência por parte do inseto, propiciando a permanência de resíduos químicos no ambiente que comprometem a saúde e impactando a biodiversidade, faz com que surjam novas propostas de produção que visam ao controle do gorgulho com agentes naturais, por exemplo, as que fazem uso de nematoides entomopatogênicos.

1.3 Filo Nematoda

O Filo Nematoda, conta com apenas 20.000 espécies descritas, porém há especulações de milhões esperando ser descobertas. Esses animais habitam ambientes intersticiais úmidos em todos os hábitats, inclusive os corpos de plantas e de animais. Eles ocorrem em grande quantidade nos hábitats bentônicos marinhos e de água doce, na terra e aparecem como parasitas de significativa variedade de hospedeiros vegetais e animais. Aparecem desde os pólos aos trópicos em todo tipo de ambiente, por exemplo, em desertos, em altas montanhas, em fontes termais, florestas, mar profundo. Os nematoides de vida livre são animais da mesofauna que vivem nos espaços intersticiais de bancos de algas, sedimentos aquáticos e solos terrestres em grande quantidade. As espécies terrestres vivem no filme de água que envolve cada partícula de terra. Já foram registrados nematoides nas axilas foliares e nos ângulos dos ramos das árvores. Os nematoides parasitas exibem todos os graus de parasitismo e atacam frequentemente plantas e animais em relações espécies-específicas. Muitos podem suspender os processos vitais, quando as condições ambientais se tornam desfavoráveis com referência à perda de água, e entrar em um processo chamado de criptobiose (vida escondida) ou anidrobiose. Ressurgem quando as condições se tornam novamente favoráveis (RUPPERT et al., 2005).

Os nematoides associados aos animais, especificamente os associados aos insetos exibem interações de espécies de nematoides com insetos que vão do

comensalismo ao parasitismo obrigatório. Nas relações de comensalismo, os nematoides podem ser encontrados no exoesqueleto ou, internamente, no sistema excretor, reprodutivo, digestivo e na hemocele, causando pouco ou nenhum dano ao hospedeiro. A maioria dessas espécies de nematoides, tal como as espécies de vida livre, podem se alimentar da microflora ou microfauna associadas aos insetos mortos (KAYA e STOCK, 1997).

A relação de parasitismo pode ser uma associação facultativa ou obrigatória. Na associação facultativa, a espécie de nematoide apresenta um ciclo de vida livre independente do inseto hospedeiro e entra na fase de ciclo parasita quando o inseto hospedeiro ocorre no ambiente. Na associação obrigatória, as espécies de nematoides não sobrevivem na ausência do inseto hospedeiro. Tanto na associação facultativa quanto na obrigatória, os efeitos deletérios resultantes do parasitismo de nematoide sobre insetos incluem esterilidade, redução da fecundidade, redução da longevidade, redução do vôo, atraso no desenvolvimento ou aberrações de ordem comportamental, morfológica ou fisiológica (POINAR, 1979).

O estudo de nematoides associados aos insetos teve início na década de 1930, intensificando-se na década de 1980. São reconhecidas aproximadamente trinta famílias de nematoides em diferentes associações com os insetos (KAYA e STOCK, 1977). Entre essas famílias distinguim-se aquelas as quais abrangem os nematoides entomopatogênicos, parasitas de insetos, que matam os hospedeiros com a ajuda de bactérias transportadas em seu intestino. Estes nematoides têm grande potencial como agentes do controle biológico de diversidade de insetos economicamente importantes.

1.3.1 Nematoides entomopatogênicos

Os nematoides parasitas de insetos, conhecidos como nematoides entomopatogênicos (NEPs), pertencem às famílias Steinernematidae Chitwood e Chitwood, 1937, 1950, Rhabditoidea (Oerley), Rhabditida (Oerley) (syn. Neoplectanidae Sobolev) e Heterorhabditidae Poinar, 1976, Rhabditida (Oerley).

Fazem associação mutualística com bactérias entomopatogênicas, são considerados parasitas letais e hábeis para infectar ampla gama de espécies de insetos, causando doença e morte por septicemia entre 24 e 72 horas. Os estágios de vida desses nematoides são parasitas dentro do hospedeiro, exceto o estágio imaturo de vida livre conhecido como juvenil infectivo (JI). Este vive no solo, não se alimenta, não se

reproduz, emerge do hospedeiro depredado e sai em busca de um novo hospedeiro (KAYA e GAUGLER, 1993; AKHURST, 1993; CAMPBELL e KAYA, 2000; DOWDS e PETERS, 2002).

O juvenil infectivo é morfologicamente, fisiologicamente e comportamentalmente adaptado para a função de transmissão – de ingrediente ativo como inseticida biológico. O par de anfídeos (órgão sensorial), situado na região anterior do corpo, tem função de detectar sinais potencialmente associados com o hospedeiro e de desencadear uma série de comportamentos apropriados para encontrar esse hospedeiro. A dispersão do juvenil infectivo no perfil do solo é considerada uma característica ambiental que impacta o potencial de biocontrole (GRIFFIN et al., 2005). Ela se dá de forma horizontal e vertical (LEWIS, 2002) e inclui movimentos fora do cadáver, visando a localizar hábitats para sobrevivência, a buscar abrigo em microambientes, a aprofundar-se no perfil do solo, a causar infecção (ISHIBASHI e KONDO,1990).

1.3.1.1 Família Steinernematidae

A família Steinernematidae é composta pelos gêneros *Neosteinernema* Nguyen & Smart, 1994, representado pela espécie *N. longicurvicauda*, e *Steinernema* Travassos, 1927, representado por 61 espécies válidas (NGUYEN, 2010). A ocorrência de esteinernematídeos tem sido registrada em todos os continentes com exceção ao da Antárctica (GRIFFIN et al., 1990).

O ciclo de vida em *Steinernema* inicia-se quando o juvenil infectivo entra no inseto hospedeiro pelas aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos), e alcança a hemocele do inseto, onde libera a bactéria simbiôntica do gênero *Xenorhabdus*, a qual se multiplica rapidamente, matando o hospedeiro entre 24 a 48 horas. Dentro do inseto, os juvenis infectivos se alimentam da bactéria e dos tecidos em decomposição, se desenvolvem e sofrem muda para o quarto estágio juvenil, quando então formam os adultos machos e as fêmeas de primeira geração. Após o acasalamento, as fêmeas colocam os ovos que eclodem em juvenis de primeiro estágio, mudam sucessivamente para os de segundo, os de terceiro e os de quarto estágio e passam para adultos fêmeas e machos de segunda geração. Os nematoides se reproduzem continuamente, frequentemente, por duas ou três gerações até a depredação do cadáver do inseto. Se o recurso alimentar for limitado, os ovos colocados pelas fêmeas de primeira geração se

desenvolvem diretamente em juvenil infectivo. Após se extinguirem os recursos alimentares do cadáver, o último segundo estágio juvenil cessa de se alimentar, incorpora uma quantidade de células bacterianas numa vesícula especial – que se situa na região anterior do intestino –, converte-se num estágio pré-infectivo, muda para o juvenil infectivo (JI) – que retém cutícula do segundo estágio como um revestimento –, deixa o cadáver e procura por um novo hospedeiro (POINAR, 1990; KAYA e GAUGLER, 1993; ADAMS e NGUYEN, 2002) (Figura 1).

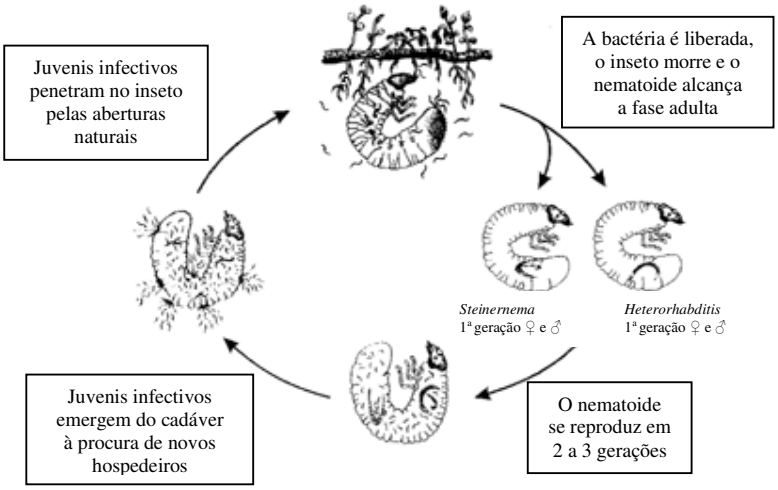

Figura 1 Ciclo de vida simplificado dos nematoides entomopatogênicos das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. O estágio juvenil é composto do J1, J2, J3 (juvenil infectivo) e J4. Em *Steinernema* a primeira geração é formada por machos e fêmeas e em *Heterorhabditis* por hermafroditas. Fonte (LEITE, 2006).

1.3.1.2 Família Heterorhabditidae

A família Heterorhabditidae abrange o gênero *Heterorhabditis*, que tem *H. bacteriophora* como espécie tipo e mais 13 espécies válidas (NGUYEN, 2010).

Os heterorhabditídeos possuem baixa diversidade morfológica (CURRAN, 1990) e apresentam um ciclo de vida complexo, o qual alterna hermafroditismo com anfimixia (JOHNIGK e EHLERS, 1999) e influencia a estrutura genética da população (JAGDALE et al., 2006).

Além das aberturas naturais, os heterorhabditídeos podem também penetrar o inseto hospedeiro pela cutícula com auxílio de uma estrutura semelhante a um dente situado na região terminal da cabeça (BEDDING e MOLYNEUX, 1982). A primeira

geração é formada por fêmeas adultas hermafroditas cujos ovos produzem juvenis que desenvolvem machos, fêmeas ou juvenis infectivos. O macho e a fêmea de segunda geração se acasalam e produzem ovos que se desenvolvem em juvenis infectivos. A bactéria simbionte é a *Photorhabdus* (ADAMS e NGUYEN, 2002) (Figura 1).

Os heterorhabditídeos ocorrem nas Américas, em regiões Sul e Central da Europa, na Austrália, no Leste da Ásia (China, Japão e Coréia), no Sul da Índia, Sri Lanka, Malaysia, Indonésia, Egito, Kenya (BURNELL e STOCK, 2000).

Steinernema e *Heterorhabditis* têm origem na Era Paleozóica, há 375 milhões de anos, e compartilham da mesma estratégia de entomopatogenicidade: infectam o hospedeiro e, em seguida, liberam as bactérias simbiontes que matam rapidamente o inseto. Essa similaridade compartilhada resulta de uma convergência evolutiva e não de uma ancestralidade comum. *Heterorhabditis* provavelmente originou-se de um rabditídeo marinho que se alimentava de bactéria de vida livre, enquanto que *Steinernema* desenvolveu-se de uma linhagem em ambiente terrestre (POINAR JR., 1993).

Os nematoides entomopatogênicos possuem atributos que são característicos de um agente de controle biológico ideal, por exemplo, ampla gama de hospedeiros, possibilidade de criação massal *in vitro* a custos economicamente viáveis, capacidade de serem efetivos na presença de inseticidas químicos e de outros agentes, possibilidade de agirem em sinergia com estes. Tais nematóides são inseto-específicos e têm demonstrado eficácia no controle de certos insetos ou grupos de insetos, particularmente no de pragas que completam parte de seu ciclo de vida no solo, em muitos casos apresentam a capacidade de buscar a espécie hospedeira, persistem no ambiente por longos períodos, não são tóxicos para o homem, para animais domésticos e de interesse zootécnico e suas formulações são isentas de registros em agências de proteção ambiental (LEITE, 2006).

1.3.1.3 Estratégias de forrageamento

Compreender o mecanismo de comportamento de forrageamento é essencial para a construção do conhecimento sobre a eficácia dos nematoides entomopatogênicos como agentes do controle biológico, pois o modo de forrageamento indica onde os nematoides podem ser encontrados e quais hospedeiros provavelmente encontrarão (GAUGLER et al., 1997).

As estratégias de forrageamento são divididas nas categorias *ambusher* e *cruiser*, que representam pontos finais sobre um *continuum* de estratégias de forrageamento. Essa divisão tem como referência diferenças do tempo de forrageamento gasto pelos nematoides para a exploração do ambiente, as quais estão correlacionadas com um conjunto de características morfológicas, fisiológicas, comportamental e ecológica do nematoide (HUEY e PIANKA, 1981).

Os forrageadores *cruiser* são caracterizados por apresentarem alta mobilidade, alocando seu tempo de forrageamento para explorar sinais associados aos hospedeiros enquanto se movem pelo ambiente ou durante pausas de curta duração. Os forrageadores *ambusher* caracterizam-se por apresentarem baixa mobilidade, explorando o ambiente por pausas de longa duração, que são interrompidas por intervalos de reposição da postura do corpo, ou por movimento de curta duração. Essas diferenças de movimento são significativas, uma vez que a duração das pausas de exploração influencia o tipo de recurso que o nematoide está apto a encontrar. Os forrageadores do tipo *cruiser* têm maior probabilidade de encontrar insetos crípticos ou sedentários, aprofundados no perfil do solo, enquanto que os *ambusher* permanecem próximos à superfície do solo e têm maior probabilidade de localizar hospedeiros móveis (LEWIS et al., 1992; 1993; CAMPBELL e GAUGLER, 1997; CAMPBELL e KAYA, 2000).

A maioria das espécies de nematoides entomopatogênicos rasteja por um movimento sinusoidal sobre o substrato, usando as forças de tensão superficial associadas ao filme de água para propelir-se para frente e para trás. Podem explorar sinais do ambiente (gradientes de temperatura e químicos) enquanto se locomovem durante as curtas pausas (CAMPBELL e KAYA, 2000).

Os nematoides podem elevar a porção anterior de seu corpo sobre o substrato e balançá-lo de um lado para o outro. Algumas espécies podem levantar ainda mais seu corpo do substrato e balançá-lo, apoiando-o sobre a cauda. Esse comportamento é conhecido como *standing*, podendo funcionar como um intervalo de exploração imóvel e como um mecanismo de ataque ao hospedeiro em movimento (LEWIS et al., 2006).

O juvenil infectivo em comportamento *standing* pode realizar saltos com o corpo, formando círculo, propelindo o nematoide pelo ar, a uma distância, muitas vezes, maior que o comprimento do corpo, o que ocorre como um meio de dispersão e como um mecanismo de ataque por emboscada. O movimento *standing* do juvenil infectivo

do *S. carpocapsae*, por exemplo, é influenciado pela presença ou pela localização do inseto hospedeiro (LEWIS et al., 2006). O comportamento *standing* aumenta a área de contato com o hospedeiro que se movimenta no entorno e reduz a força da tensão superficial, segurando o nematoide no substrato (CAMPBELL e GAUGLER, 1993). O comportamento *standing* e a realização de saltos estão correlacionados com as estratégias do forrageador *ambusher* (LEWIS et al., 2006).

O comportamento *standing* é restrito ao juvenil infectivo de aproximadamente 11 espécies de *Steinernema*, não tendo sido observado em *Heterorhabditis* (CAMPBELL e KAYA, 2002).

Os nematoides entomopatogênicos disponíveis comercialmente *S. carpocapsae* e *S. scapterisci* são *ambusher* extremos e podem realizar o movimento *standing* durante muitas horas. *Heterorhabditis* spp. e *S. glaseri* são *cruiser* (LEWIS, 2002). Os juvenis infectivos não encontram o hospedeiro por meio de movimento randômico, mas respondem comportamentalmente (tomada de decisões de infectar) com base nos estímulos provenientes do ambiente os quais contribuem para melhorar a probabilidade de encontrar o hospedeiro (CAMPBELL e KAYA, 2000).

Os forrageadores *cruiser* (*Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* spp.) respondem a sinais voláteis do hospedeiro tais como fezes, cutícula e mudam o comportamento para busca localizada, após o contato com o hospedeiro (LEWIS et al., 1992; 1993; CAMPBELL et al., 2003; GREWAL et al., 1993a; LEWIS et al., 2006). *S. glaseri* (Steiner). Essa resposta acontece na presença de CO_2, que, provavelmente, induz respostas comportamentais (LEWIS et al., 1993).

Para os nematoides, um inseto hospedeiro representa fonte de alimento e encontro para acasalamento. A decisão de infectar deve ser moldada por essas necessidades e deve evitar competição. Fatores extrínsecos (presença de outros nematoides), fatores intrínsecos (sexo, idade, dispersão, infecção), estágios e espécies de hospedeiros influenciam a decisão de infectar (GREWAL et al., 1993b; LEWIS et al., 2006).

Há ainda uma categoria intermediária de forrageadores, a que se refere a espécies que levantam o corpo sobre o substrato por apenas alguns segundos, realizam o movimento *standing*, se orientam por meio dos sinais do hospedeiro (GREWAL et al., 1994) e são efetivas contra pragas móveis e sedentárias (LEWIS, 2002). *S. riobrave* e *S. feltie* adotam uma estratégia de forrageamento intermediária entre *ambusher* e c*ruiser* (GRIFFIN et al., 2005).

1.3.1.4 Infectividade por fases

Sob condições aparentemente ideais, 40% de juvenis infectivos emergidos do cadáver é efetiva para procurar e infectar um novo hospedeiro. Nem todos os juvenis infectivos, provenientes da emergência de um hospedeiro, são potencialmente capazes de causar infecção ao mesmo tempo. Alguns indivíduos são imediatamente infectivos; outros tornam-se dormentes por determinado tempo (HOMINICK e REID, 1990). Segundo a "hipótese da infectividade por fases", que procura explicar os motivos dos baixos níveis de penetração e de estabelecimento da infecção (HOMINICK e REID, 1990; KAYA e GAUGLER, 1993; HAY e FENLON, 1995; GRIFFIN,1996; BOHAN e HOMINICK, 1995; 1996; CAMPBELL et al., 1999), existem dois modelos aceitos atualmente.

Um tem como base a alteração entre juvenil infectivo e não-infectivo (que pode se alterar com o tempo) (HOMINICK e REID, 1990; BOHAN e HOMINICK, 1996). A população de juvenil infectivo apresenta a capacidade de penetrar e de se estabelecer em um hospedeiro; e a de não-infectivo caracteriza-se por ser temporariamente não-infectiva – inata ou induzida pela baixa umidade (KUNG et al.,1991) e temperatura (GRIFFIN, 1996) – e por ser permanentemente não-infectiva, devido à inabilidade de completar o processo de infecção por problemas genéticos ou estresse ambiental antes e depois da formação dos juvenis infectivos (CAMPBELL et al., 1999).

O segundo modelo é baseado em níveis de infectividade – indivíduos dentro de uma população variam, de forma gradual sobre o tempo, na habilidade ou na motivação para infectar (GRIFFIN, 1996).

A probabilidade de um juvenil infectivo encontrar um hospedeiro susceptível é determinada pelos seguintes fatores: estratégia de forrageamento do juvenil infectivo e a mobilidade de hospedeiro (CAMPBELL e GAUGLER, 1997), mortalidade do juvenil infectivo e a imigração para áreas onde o hospedeiro poderia ser detectado (CAMPBELL et al., 1999), comportamento de quiescência, quando o nematoide entomopatogênico para de se movimentar, estimulado por alterações de sinais exógenos (ISHIBASHI e KONDO, 1986a), mortalidade do juvenil infectivo durante o processo de infecção devido à resposta imune do hospedeiro (CAMPBELL et al., 1999).

A questão que permanece refere-se ao como a dinâmica da infecção pode ser manipulada para promover a eficácia do nematoide enquanto inseticida biológico. Determinar o comportamento dos juvenis infectivos é essencial para esse entendimento. As pesquisas sobre conhecimento do comportamento de busca e de reconhecimento do hospedeiro têm avançado, contrapondo-se aos estudos sobre dinâmica de infecção pelos nematoides entomopatogenicos que estão começando a ser explorados (CAMPBELL et al., 1999).

1.3.1.5 Características das bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*

Xenorhabdus e *Photorhabdus* são gêneros de bactérias entomopatogênicas, gram-negativas, anaeróbicas facultativas que não formam esporos e apresentam metabolismo respiratório e fermentativo. Pertencem à γ-subclasse Proteobacteria, Família Enterobacteriaceae (BOEMARE, 2002). *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* são negativas para nitrato-redutase (característica rara em Enterobacteriaceae); espécies de *Xenorhabdus* são catalase-negativas (GRIFFIN et al., 2005).

Os ancestrais filogenéticos das famílias de nematoides patogênicos obrigatórios de insetos, provavelmente, foram saprozoóicos que se alimentavam de carcaças de insetos as quais continham uma flora bacteriana rica em ancestrais de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*. As toxinas encontradas em alguns isolados de *X. nemathophilus* e *P. luminescens* podem ser remanescentes do tempo em que essas bactérias não eram ainda associadas aos nematóides, mas eram patógenos facultativos ou obrigatórios de insetos. Possivelmente, os nematóides se adaptaram para agir como transmissores de bactérias patogênicas (DOWDS e PETERS, 2002). A co-especiação é resultado da co-evolução entre ambos os parceiros (nematóide e bactéria) da associação simbiótica (BOEMARE, 2002).

A simbiose ocupa dois nichos ecológicos no ciclo de vida bactérias-nematoides entomopatogênicos: o primeiro, considerado um estado forético em que as bactérias são retidas no intestino do nematoide, interagindo com o juvenil infectivo sem haver uma multiplicação aparente – *Xenorhabdus* ocorre numa vesícula intestinal especial (BIRD e AKHURST, 1983) e *Photorhabdus* se localiza principalmente na parte proximal do intestino (FORST e CLARKE, 2002). O segundo nicho ocorre quando a bactéria supera o sistema de defesa do inseto e se multiplica em sua hemocele (GRIFFIN et al., 2005).

1.3.1.6 Ciclo de vida: simbiose bactéria-nematoide entomopatogênico

A simbiose entre bactéria e nematoide entomopatogênico pode ser descrita como uma associação cíclica que começa e termina com o juvenil infectivo no solo. O ciclo de vida de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* envolve a formação de simbiose mutualística com um hospedeiro, o nematoide, seguido de uma relação patogênica com outro hospedeiro, o inseto. A bactéria se beneficia da interação com o nematoide por estar protegida contra o ambiente competitivo do solo e por ser transportada para a hemolinfa do inseto, rica em nutrientes. O nematoide beneficia-se dessa interação, aproveitando-se do potencial patogênico da bactéria o qual causa a morte do inseto hospedeiro. Nesse processo, a bactéria ainda fornece base nutritiva para o crescimento e desenvolvimento do nematoide e suprime a contaminação do cadáver do inseto por organismos oportunistas do solo (AKHURST, 1993; DUNPHY e THURSTON, 1990; FORST e CLARKE, 2002). Juntos, nematoide e bactéria matam o inseto entre 24 a 48 horas após a entrada do nematoide na hemocele do inseto (HU et al., 1999).

Forst e Clarke (2002) dividem o ciclo de vida dos simbiônticos (bactéria-nematoide) em três estágios, com base no desenvolvimento temporal da bactéria e do nematoide. O ciclo de vida do nematoide inclui um estágio reprodutivo que ocorre exclusivamente dentro do inseto e que não retém a bactéria simbiôntica e um estágio posterior ao reprodutivo, quando nematoide não se alimenta, vive no solo, é conhecido como infectivo juvenil, e retém a bactéria.

A) Estágio I

No estágio I, o nematoide está na forma de terceiro estágio infectivo (juvenil infectivo), portanto, vive no solo e é resistente ao estresse ambiental, o que permite sua persistência (POINAR, 1979). O estágio I termina quando os juvenis infectivos localizam e penetram o inseto hospedeiro (BEDDING e MOLYNEUX, 1982).

Após a penetração dos juvenis infectivos na hemocele do inseto, esses são expostos ao sistema de resposta imune, caracterizada por resposta celular e resposta humoral.

A reposta imune celular é mediada por hematócitos que fagocitam, formam nódulos e realizam a encapsulação celular (DOWDS e PETERS, 2002; FORST e CLARKE, 2002). Na encapsulação celular, os hematócitos circulantes reconhecem o

material estranho e recrutam outros hematócitos para encapsular o organismo invasor. A cápsula é melanizada pela ação do sistema de enzimas fenoloxidase e removida da circulação (KANOST et al., 2004).

A resposta humoral é mediada pela encapsulação melanocítica (cápsula de proteína/polifenol), pela produção de peptídeos antimicrobianos, os quais podem ser induzidos (cecropins) ou constitutivos (lisozima), e também pela ação do sistema de enzima fenoloxidase (DOWDS e PETERS, 2002; FORST e CLARKE, 2002).

Os nematoides resistem à encapsulação, evitando que sejam reconhecidos pelo inseto (evasão), superlotando o sistema imune do inseto por múltiplas infecções (tolerância), ou suprimindo ativamente a resposta de encapsulação (supressão) (DOWDS e PETERS, 2002).

A encapsulação de nematoide já foi observada em espécies de Orthoptera, Coleoptera, Diptera, e Lepidoptera.

B) Estágio II

O início do estágio II é associado à liberação da bactéria na hemolinfa do inseto, à morte do inseto, à reprodução do nematoide e à sua conversão para juvenil infectivo.

Com a superação da resposta imune do inseto, os nematoides chegam até a hemocele e liberam as bactérias na hemolinfa. A liberação das bactérias pode ocorrer quando a encapsulação, promovida pelo inseto, não é completamente formada; ou quando essa liberação ocorre antes do processo de encapsulação, o que leva à morte do inseto (DUNPHY e THURSTON, 1990).

As bactérias enfrentam também a resposta celular imune do inseto, podendo ser reconhecidas pelos hematócitos e fagocitadas ou encapsuladas (FORST e CLARKE, 2002; ffrench-CONSTANT, 2003).

Os hematócitos podem encapsular as bactérias dentro de sucessivas camadas de células, que são posteriormente melanizadas, formando nódulos. Dessa forma, a bactéria é isolada dentro da hemocele podendo ser morta dentro do nódulo ou cápsula. *Photorhabdus* pode escapar do sistema imune celular do inseto, entrando nos tecidos, onde a fagocitose é menos eficiente, ou pode destruir, suprimir a fagocitose por se reproduzir dentro do hematócito (ffrench-CONSTANT, 2003), causando a morte do inseto. Em Lepidoptera e Orthoptera, a bactéria se multiplica no interior dos nódulos,

reaparece na hemolinfa e danifica os hematócitos, enquanto causa desintegração da gordura do corpo do inseto, que é considerada a principal fonte de peptídeos antimicrobianos. A cera presente no inseto hospedeiro induz à liberação de lipopolissacarídeo (LPS ou endotoxina) da parede celular da bactéria que é tóxico para os hematócitos do inseto. LPS de *X. nematophilus* e *P. luminescens* inibem a ativação de profenoloxidase em *G. mellonella* e *Lymantria dispar*, que protege os nematoides, como por exemplo, em *S. carpocapsae* que pode ser morto se o sistema de enzima fenoloxidase for ativado (DUNPHY e THURSTON, 1990).

A resposta humoral segue com certo atraso em função da necessidade de síntese das proteínas imunes antibacterianas (lisozimas e cecropins) (JAROSZ, 1998). A patogenicidade é um pré-requisito para a simbiose bactéria-nematóide. Depende de cada uma das três partes: do inseto, da bactéria e do nematóide. Sofre influência da resistência do inseto (defesa celular e humoral) e dos fatores de virulência (endotoxinas) da bactéria e do nematóide para atingir juntos ou separadamente o sistema de defesa do hospedeiro (DOWDS e PETERS, 2002).

As bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* são liberadas na hemolinfa por meio do ânus dos nematoides, por várias vezes, durante um período de 30 minutos a 5 horas (FORST e CLARKE, 2002). Contradizendo essa afirmação, Ciche e Ensign (2003) observaram que *P. luminescens* é regurgitada individualmente, saindo pela boca, de forma gradual e constante, alcançando a hemolinfa. Provavelmente, a liberação lenta e contínua de poucas bactérias seja relevante para neutralizar os mecanismos de defesa do inseto.

Tendo superado ou suprimido os efeitos da fagocitose do inseto, *Photorhabus* destrói o intestino médio e conseqüentemente o inseto para de se alimentar. Antes da morte do inseto, *Photorhabus* está associada com o intestino e a hemocele. Após a morte do inseto, grande número da bactéria é recuperado em todos os tecidos do inseto (ffrench-CONSTANT, 2003).

A proliferação da bactéria até que atinja alta densidade populacional, resulta na bioconversão do inseto – normalmente entre 24 a 48 horas pós-infecção – em uma fonte de nutrientes disponíveis para o desenvolvimento e a reprodução do nematoide. A bactéria entomopatogênica produz moléculas (antibióticos, toxinas, enzimas extracelulares, exoenzimas hidrolíticas) que são responsáveis pela morte do inseto, e são importantes no processo da simbiose, degradando tecidos do hospedeiro que se converterão em alimento para os simbiontes (DOWDS e PETERS, 2002). As bactérias

simbiontes parecem providenciar nutrientes específicos para os nematoides durante seu desenvolvimento (GOODRICH-BLAIR e CLARKE, 2007).

Os nematoides entomopatogênicos geralmente matam seus hospedeiros em 48 horas, completam seu ciclo de vida entre 7 a 15 dias e produzem o juvenil infectivo de terceiro instar encontrado no cadáver (BAUR et al., 1998).

A emergência da nova geração de juvenis infectivos acontece entre 7 a 21 dias após a entrada dos juvenis infectivos no hospedeiro, dependendo da espécie e das condições ambientais (FORST e CLARKE, 2002). Durante esse período, antibióticos produzidos pela bactéria simbionte também são importantes para o decréscimo da competição por alimento e hábitat, para imobilizar, matar ou repelir outras espécies de nematoides (nematoides saprofíticos, isolados de nematoides entomopatogênicos de outras espécies oportunistas) no interior ou no entorno do cadáver (HU et al., 1999; FORST e CLARKE, 2002), para matar microrganismos como, por exemplo, a microflora do intestino do hospedeiro (HU E WEBSTER, 2000) e para repelir insetos catadores de cadáver (BAUR et al., 1998).

Na hemolinfa, o nematoide dá início à sua mudança de forma, processo esse chamado de recuperação. Os juvenis infectivos de *Heterorhabditis* se desenvolvem em formas hermafroditas, enquanto que os juvenis infectivos de *Steinernema* se desenvolvem em machos ou fêmeas anfimíticas. (FORST e CLARKE, 2002).

C) Estágio III

Nesse estágio acontece a formação dos juvenis infectivos e a retenção das bactérias simbiônticas no interior de seu intestino. Assim que a população do nematoide se torna elevada e os nutrientes se tornam limitantes no inseto-cadáver, a progênie do nematóide se diferencia na forma de juvenil infectivo que retém as bactérias simbiônticas no intestino e emerge no solo para forragear novos hospedeiros. Esse ciclo reprodutivo co-dependente é o resultado de interação envolvendo a bactéria e o nematoide. A retenção das bactérias nos juvenis infectivos acontece quando *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* ocorrem em altas densidades. A retenção requer específicas interações entre o intestino do nematoide e a superfície da célula bacteriana. A especificidade da simbiose bactéria-nematoide depende, portanto, da forma da bactéria e provavelmente requer a expressão de genes específicos da bactéria (FORST e CLARKE, 2002).

A reprodução de *Photorhabdus* acontece na região proximal do intestino do juvenil infectivo heterorhabditídeos, intimamente em contato com o epitélio do intestino (ffrench-CONSTANT et al., 2003). Uma interação receptor-adesina pode permitir a adesão de *Photorhabdus* à receptores específicos situados na região anterior do intestino do juvenil infectivo (CICHE e ENSIGN, 2003).

S. carpocapsae retém uma ou duas células de *Xenorhabdus* que se reproduzem até formar uma colônia madura (MARTENS et al., 2003). O local de colonização dos esteinernematídeos é uma vesícula especial presente na porção ventricular intestinal (BIRD e AKHURST, 1983). No interior da vesícula, *X. nematophila* adere a agrupamentos anucleados esféricos chamados de estruturas intravesiculares. Provavelmente, a mucosa ou as estruturas esféricas representam um local de adesão específica para a colonização da bactéria simbionte (MARTENS e GOODRICH-BLAIR, 2005). Na simbiose entre *S. carpocapsae-X. nematophila,* possivelmente ocorre uma interação específica mediada por um receptor-adesivo que é restrito anatomicamente à região onde acontece a colonização. Essa pode ser iniciada pela competição entre bactérias que são capazes de fixarem-se à região onde ocorre a colonização; ou pela presença de moléculas de proteínas ou antibióticos que interferem na interação inicial. O crescimento desenfreado da bactéria pode conduzir à morte do juvenil infectivo, porém a ausência da *X. nematophila* na vesícula pode bloquear a reprodução do nematoide. *S. carpocapsae* provavelmente apresenta mecanismo balanceado para promover a colonização de *X. nematophila*; e, concomitantemente, limita a área específica de colonização (MARTENS et al., 2003).

A infectividade do nematoide (relacionada à habilidade de invadir o hospedeiro) e a virulência (associada à bactéria simbiôntica e relacionada à capacidade de produzir doença) sofrem interferência do método, do tempo de aplicação do nematoide, das condições ambientais e do estágio da praga no solo para que haja sucesso no controle do inseto (SHAPIRO-ILAN et al., 2002; 2004b).

1.4 Nematoides entomopatogênicos e o controle das moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera, Tephritidae) e do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae)

1.4.1 Moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera, Tephritidae)

Grande parte dos estudos relacionados ao uso de nematoides entomopatogênicos no controle das moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) são realizados em laboratório e em casa de vegetação. Os conduzidos em condição de campo são escassos.

Lindegren e Vail (1986) avaliaram, em experimentos de laboratório, o efeito de *S. feltiae* nas concentrações de 5.000, 15.000, 50.000, 150.000 e 500.000 JIs sobre larvas da mosca-do-mediterrâneo *C. capitata*, da mosca do mamoeiro *Dacus cucurbitae* Coquillette e da mosca-das-frutas oriental *D. dorsalis* Hendel – pragas de áreas tropicais e subtropicais do mundo. Em trabalho complementar, Lindegren et al. (1990) avaliaram, em condições de campo, no Hawaii, o efeito de *S. feltiae* nas concentrações de 150, 500, 1.500 e 5.000 JIs/cm^2 sobre larvas de *C. capitata* e concluíram que o nematoide em estudo tem potencial para uso em programas de controle biológico.

Gazit et al. (2000) testaram a virulência dos nematoides *S. riobrave* Texas, *S. feltiae* SF, *S. carpocapsae* All e Mexican, *S. glaseri*, *H. bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis* sp. IS-5, IS-12, IS-21, IS-25 e IS-23 contra o terceiro instar larval de *C. capitata*. *S. riobrave* Texas e *Heterorhabditis* sp. IS-5 foram os mais virulentos – induzindo mais de 80% de mortalidade – e foram testados quanto a diferentes tipos de solo, a condições de umidade e de temperatura e à persistência. *S. riobrave* Texas exibiu elevada taxa de infectividade e de persistência, e foi considerado como agente potencial no controle biológico em locais onde as condições climáticas são variáveis.

Karagoz et al. (2009) avaliaram a virulência de *S. weiseri*, *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* (isolados dos solos da Turquia) contra larvas e pupas de *C. capitata* e verificaram que *S. feltiae* e *S. carpocapsae* proporcionaram maiores índices de mortalidade de larvas e que nenhum dos nematoides infectaram pupas.

Malan e Manrakhan (2009), em laboratório, testaram o potencial do *H. bacteriophora*, *H. zealandica* e *S. khoisanae* para infectar larvas, pupas e adultos de *C. capitata* e *C. rosa*. Concluíram que *H. bacteriophora* infectou mais larvas de *C.*

capitata; *H. zealandica* infectou mais larvas de *C. rosa* e que *S. khoisanae* teve efeito sobre as duas espécies de moscas.

Rohde et al. (2010), em laboratório, avaliaram a influência da temperatura do solo e da umidade sobre a infectividade de *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *Steinernema carpocapsae* ALL contra o terceiro instar larval de *C. capitata* e verificaram que a infectividade foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura.

Silva et al. (2010), em laboratório e em casa de vegetação, testaram a virulência de sete isolados de *Steinernema* e *Heterorhabditis* contra *C. capitata*; e, em condições de campo, testaram o efeito de *H. indica* IBCB n5 no controle deste inseto. *C. capitata* mostrou-se suscetível aos nematoides nos estágio de pré-pupa e de pupa (com um dia de desenvolvimento) e ao *H. indica* IBCB n5 em condições de campo.

Barbosa-Negrisoli et al. (2009), em laboratório, casa de vegetação e campo, realizaram experimentos com o objetivo de selecionar nematoides nativos do Rio Grande do Sul para controlar *A. fraterculus*. Entre 19 isolados de nematoides testados, *H. bacteriophora* RS88 e *S. riobrave* RS59 proporcionaram maior mortalidade de pré-pupas e de pupas de *A. fraterculus*. No experimento em casa de vegetação, não houve diferença na mortalidade de pupas entre *H. bacteriophora* RS88 e *S. riobrave* RS59 (250 JI e 500JIs/cm^2). Em testes de campo, *H. bacteriophora* RS88, aplicado em suspensão aquosa ou em cadáver infectado, foi mais eficiente no controle de pupa.

Beavers e Calkins (1984), em laboratório, testaram *S. feltiae* All, Mexican e Breton, *S. glaseri*, *H. heliothidis* Khan, Brooks e Hirschmann e *H. bacteriophora* contra os estágios de larva, pupa e adulto de *Anastrepha suspensa* (Loew) e verificaram que larvas e adultos são susceptíveis aos nematoides.

Lezama-Gutierrez et al. (1996), em laboratório, avaliaram *S. carpocapsae* (Weiser) All e Tecoman, *S. feltiae* (Filipjev), *S. glaseri* (Steiner) NC, *S. riobravis* (Cabanillas, Poinar e Raulston) e *H. bacteriophora* Poinar NV, Patronato e Tecoman contra larvas de terceiro instar de *A. ludens* e constataram que *S. riobravis* e *S. carpocapsae* proporcionaram as maiores taxas de mortalidade de larvas. Lezama-Gutierrez et al. (2006), em experimento complementar, verificaram, em solos de texturas franco-arenosa, siltosa e argilosa a eficácia da *S. carpocapsae* e *S. riobravis* contra o último instar larval de *A. ludens* (presente em pomares de manga, pêssego e citros do México) e constataram, em laboratório, que as taxas de mortalidade mais elevadas foram obtidas em textura franco-arenosa e siltosa; e que, em condições de campo, *S. carpocapsae* reduziu a emergência de adultos em 64%, e *S. riobravis* em

14%, em solo de textura franco-arenosa, o que demonstra a interferência do tipo de solo na ação dos nematoides.

Toledo et al. (2001) concluíram que as larvas de *A. ludens* são susceptíveis ao *S. feltiae* e que o tipo de textura do solo (textura arenosa, argilo-arenosa e areno-siltosa) e a temperatura estão relacionados à eficiência do *S. feltiae*.

Toledo et al. (2005a), em laboratório e em campo, verificaram que *H. bacteriophora* propiciaram elevados índices de infecção contra o terceiro instar larval de *A. ludens*. Toledo et al. (2006a), em pomar de manga, verificaram que *H. bacteriophora*, na dose de 250JIs/cm^2 , proporcionou maior índice de mortalidade de *A. ludens* e concluíram que o sucesso do controle de *H. bacteriophora* sobre *A. ludens* depende de sua habilidade em superar a capacidade da mosca de evitar a infecção.

Em laboratório, avaliou-se o efeito da temperatura, da textura do solo e da profundidade do hospedeiro sobre a habilidade do *H. bacteriophora* de causar infecção em larvas de terceiro instar inicial (seis dias) e tardio (oito dias) de *A. obliqua* (praga dos pomares de manga da América Tropical). Concluiu-se que as larvas de terceiro instar inicial, em solo de textura areno-argilosa, a 15% de umidade e a 2 cm de profundidade são mais suscetíveis ao *H. bacteriophora* (TOLEDO et al., 2005b). Em outro experimento similar de laboratório, Toledo et al. (2009) avaliaram a atividade do *S. carpocapsae* contra *A. obliqua*. Os autores observaram que a infectividade de *S. carpocapsae* é afetada pela temperatura, pela profundidade das larvas no solo e pela interação entre esses fatores e que *S. carpocapsae* tem potencial para o controle de *A. obliqua* em ecossistemas tropicais com temperatura e nível de umidade do solo elevados.

Em laboratório, testou-se *H. bacteriophora* quanto à virulência ao terceiro instar larval de *A. serpentina* e concluiu-se que seriam necessários aproximadamente 700JIs de *H. bacteriophora*/cm^2 para se obter nível de controle significativo de *A. serpentina*, que tem como hospedeiro o sapoti, no México (TOLEDO et al., 2006b).

Stark e Lacey (1999) avaliaram a virulência de *S. feltiae, S. carpocapsae, S. riobrave, H. bacteriophora* e *H. marelatus* a larvas de *Rhagoletis indifferens*, que atacam cerejas, no Noroeste do Pacífico, Estados Unidos. *S. carpocapsae*, na concentração de 10^{6}JIs/m^2 , foi o que proporcionou a porcentagem mais elevada de mortalidade de pupas. Yee e Lacey (2003), em laboratório e em campo, compararam a patogenicidade de *S. carpocapsae, S feltiae* e *S. intermedium* contra larvas, pupas e adultos de *R. indifferens*. *S. carpocapsae e S feltiae,* na dose de 100 JIs/cm^2,

propiciaram 40% e 100% de mortalidade de larvas, respectivamente; as pupas não foram infectadas; os adultos sofreram infecção entre 11% a 53% na emergência. Os autores também verificaram que *S. carpocapsae e S feltiae* foram efetivos contra larvas no campo.

Mahmoud e Osman (2007) investigaram o efeito do *S. feltiae* a *Bactrocera zonata* – praga do pêssego, da manga e da goiaba na Índia, Paquistão, Indonesia, Vietnã – e concluíram que larvas de terceiro instar são mais suscetíveis a *S. feltiae* em todas as concentrações testadas: 50, 100, 200, 400, 800 JIs/ml. Sirjani et al. (2009) compararam a infectividade de seis espécies de nematoides entomopatogênicos disponíveis, comercialmente, contra *B. oleae*, mosca-das-frutas da oliveira. Avaliaram o período do ano adequado para aplicação dos nematoides, que foram selecionados tendo em vista a abundância da larva de *B. oleae* suscetível no campo e a temperatura no campo, no outono e no início do inverno. Concluíram que *S. feltiae* apresentou potencial para suprimir a população de inverno de *B. oleae*.

1.4.2 Gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae)

No Brasil, investigaram-se 15 espécies/isolados de nematoides entomopatogênicos contra *C. psidii*.

Em experimento de laboratório avaliou-se a eficácia de *S. feltiae* Gvoulot, *S. glaseri*, *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* Brecon contra o gorgulho-da-goiaba. *S. feltiae* causou 100% de mortalidade desse inseto (DOLINSKI e SAMMUELS, 2002).

H. baujardi LPP7 Phan, Subbotin, Nguyen & Moens (linhagem original) e *H. baujardi* LPP7(28) (linhagem melhorada com tolerância a elevada temperaturas) nos resultados dos testes de laboratório em placas de Costar 24-wells a 31°C (considerada temperatura limite para a linhagem original), quanto à patogenicidade a larvas no quarto instar de *C. psidii*, mostraram valores próximos a 70% de mortalidade para as duas populações. Nos testes em colunas de areia a 28 °C, os resultados demonstraram que a população de *H. baujardi* LPP7(28) não perdeu a capacidade de buscar e causar infecção no hospedeiro. A tolerância a altas temperaturas acarretou queda na capacidade reprodutiva em larvas de gorgulho-da-goiaba a 25°C (DEL VALLE et al., 2005).

Em experimentos de virulência em placa de Petri, demonstrou-se que as espécies de *Heterorhabditis* (*H. bacteriophora* HP88 Poinar, *H. indica* Hom1 Poinar,

Karanukar & David, *H. baujardi* LPP7 Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, *H. baujardi* LPP1) foram significativamente mais virulentas para *C. psidii* que as espécies de *Steinernema* (*S. glaseri* NA (Steiner), *S. feltiae* SN (Filipjev), *S. carpocapsae* All (Weiser), *S. carpocapsae* Mex e *S. riobrave* 355 Cabanillas, Poinar & Rauston). Em experimento de coluna de areia testaram-se *H. indica* Hom1, *S. riobrave* 355 e *H. baujardi* LPP7 em concentração de 0, 100, 200 e 500 JIs. *H. indica* Hom1 e *H. baujardi* LPP7, na concentração de 500 JIs, apresentaram habilidade para encontrar e matar os insetos. Em casa de vegetação, em vaso com solo constituído de 76% de areia, com pH 6,4 e temperatura média de 26,8 ± 0,22 °C, contendo uma goiabeira de seis meses de idade, testou-se *H. baujardi,* LPP7 nas concentrações de 0, 500, 1000 e 2000 JIs o qual proporcionou 60% de mortalidade na concentração de 2000 JIs (DOLINSKI et al., 2006).

Em casa de vegetação e a campo avaliou-se a suscetibilidade das larvas do gorgulho-da-goiaba a juvenis infectivos de *H. baujardi* LPP7 emergidos de cadáveres infectados de *Galleria mellonella*. Em casa de vegetação, potes plásticos com 1000 cm^3 de solo (58% areia, 23% argila, 19% silte; pH 4.6; 2.4% de matéria orgânica) receberam quatro larvas de quarto instar do gorgulho-da-goiaba 24h antes da distribuição de 0, 1, 2, 4 e 6 cadáveres infectados pelo *H. baujardi* LPP7. Os resultados mostraram baixa mortalidade em gorgulho-da-goiaba causada pelos tratamentos. O experimento a campo foi conduzido em solo arenoso (58% areia, 23% argila, 19% silte; pH 4,6; 2,4% de matéria orgânica e 12,4 $cmol_c/dm^3$ de capacidade de troca catiônica), em parcelas constituídas de 0,25 cm^2 e 20 cm de profundidade onde foram colocadas 50 larvas de quarto instar do gorgulho-da-goiaba a 3 cm da superfície, 24h antes da distribuição de 0, 2, 4 e 6 cadáveres infectados com *H. baujardi* LPP7. Houve diferença significativa entre a testemunha e o tratamento, constituído de seis cadáveres (DEL VALLE et al., 2008).

Em campo, avaliou-se a mortalidade de pré-pupas do gorgulho-da-goiaba em consequencia da aplicação em suspensão aquosa do *H. indica* IBCB n5. O nematoide proporcionou taxas de mortalidade de 33 a 50% nas dosagens de 1 e 10 JIs/cm^2, respectivamente (SILVA et al., 2010).

1.5 Fatores que interferem na persistência do nematoide entomopatogênico no solo

O solo é um substrato altamente complexo, variando na composição mineral, textural e estrutural. É ambiente rico em fungos, bactérias, actinomicetos,

algas, vírus, nematoides, importante reservatório de entomopatógenos e ideal para a realização do controle microbiano de pragas. Nesse ambiente, extremamente competitivo, um nematoide entomopatogênico deve ser capaz de se estabelecer e de se manter (JACKSON, 1999).

Fatores abióticos do solo, de natureza física ou química: clima, pH, textura, estrutura (STUART et al., 2006), temperatura, gases, estado da água, umidade (BARBERCHECK, 1992), radiação ultravioleta (KAYA, 1990), compactação do solo (PORTILLO-AGUILLAR et al., 1999) também afetam a ocorrência e a persistência do nematoide, assim como o homem na medida em que ele manipula o ecossistema do solo (KAYA, 1990; KLINGER e HAUKELAND, 2006; STUART et al., 2006). Fatores bióticos tais como disponibilidade de hospedeiro, competição intraespecífica e interespecífica, inimigos naturais podem afetar a habilidade e a persistência dos nematoides entomopatogênicos.

A eficiência do nematoide na exploração do ambiente físico contribui para sua habilidade de localizar o hospedeiro, causar doença, acasalar-se, evitar predadores. O desenvolvimento de doença em um hospedeiro envolve interação complexa de fatores associada ao nematoide entomopatogênico, ao hospedeiro, ambiente, tempo (KLINGER e HAUKELAND, 2006).

Nematoides entomopatogênicos são inimigos naturais de insetos pragas em solos de todo o mundo e podem desempenhar papel fundamental na regulação de populações de pragas em diferentes circunstâncias. O sucesso dos nematoides dependem das condições bióticas e abióticas do solo serem favoráveis à sua mobilidade e infectividade. O conhecimento do ambiente do solo em relação às atividades dos nematoides é passo básico para o manejo de pragas do solo. A compreensão acerca da distribuição, abundância e dinâmica de populações; da estrutura espacial e genética das populações; da variação das populações ao longo do tempo e do espaço; das várias interações que ocorrem com o ambiente biótico e abiótico e do modo como essas características variam entre as espécies e os habitats são alguns dos aspectos que estão começando a ser entendidos.

1.5.1 Fatores abióticos

1.5.1.1 Textura do solo

O solo é composto por partículas de diferentes tamanhos – areia (2,0 a 0,05 mm de diâmetro), silte (0,05 a 0,002 mm de diâmetro), argila (<0,002 mm) – e as proporções relativas dessas partículas determinam a textura do solo (KAYA, 1990). Espécies diferentes de nematoides são afetadas pelas diferentes texturas de solo (MOLYNEUX e BEDDING, 1984; KUNG et al., 1990a), o que interfere na migração, na infectividade e no encontro do hospedeiro pelos nematoides (GEORGIS e POINAR, 1983ab; BARBERCHECK e KAYA, 1991; LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2006; TOLEDO et al., 2009).

Em solo de textura franco-arenosa, *H. bacteriophora* apresentou maior taxa de movimento em relação à *S. carpocapsae*; em solo de textura argilosa *S. carpocapsae* apresentou maior taxa de movimento em relação à *H. bacteriophora* (BARBERCHECK e KAYA, 1991). Em solo de textura siltosa e franco-arenosa, *S. riobrave* propiciou maior índice de mortalidade de larvas de *Anastrepha ludens* do que *S. carpocapsae*. Em solo de textura argilosa e em concentrações mais elevadas, esses mesmos nematoides não elevaram a taxa de mortalidade de *A. ludens* (LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2006). Em solo de textura argilo-arenosa, Toledo et al. (2005b) observaram que larvas de *A. obliqua* foram mais suscetíveis ao *H. bacteriophora* do que as que foram colocadas em solos arenosos.

A textura do solo afeta indiretamente as reservas de energia dos nematoides por regular sua movimentação e, consequentemente, a persistência dos juvenis infectivos (KUNG et al., 1990a). Solos muito argilosos comprometem o movimento dos nematoides e, apesar da presença de hospedeiros, não propiciam a dispersão dos juvenis infectivos (KAYA, 1990).

O tamanho das partículas relaciona-se ao tamanho do poro, por exemplo, partículas de maiores tamanhos determinam aumento do poro (KLINGER e HAUKELAND, 2006). Solos arenosos são formados por grandes poros (KAYA, 1990), enquanto solos argilosos são formados por pequenos poros (KAYA e GAUGLER, 1993). Solos com alto teor de argila dificultam o movimento do nematoide em função do tamanho do poro ser menor que o diâmetro do corpo do nematoide (TOLEDO et al., 2005a), em razão disso, a taxa de dispersão, infectividade (GEORGIS e POINAR,

1983a,b; BARBERCHECK e KAYA, 1991), areação (KAYA, 1990) e sobrevivência do nematoide (KUNG et al., 1990a) ficam limitadas. Em solo com elevada proporção de argila e de silte, Georgis e Poinar (1983a) observaram que *S. feltiae* apresentaram menor habilidade para migrar e infectar larvas de *G. mellonella* do que em solo de textura arenosa e franco-arenosa. O movimento mais lento em solo de textura fina pode ocasionar aumento do isolamento entre o local da população e o número de espécies que podem coexistir em determinada área (HUNT et al., 2001).

A estrutura do solo está relacionada à disposição das partículas do solo em agregados que variam no tamanho, na geometria e na porosidade (BARBERCHECK, 1992). Por um lado ela afeta o movimento da água, do ar, das substâncias químicas e dos organismos (KLINGER e HAUKELAND, 2006); por outro, sofre efeitos do clima, da atividade biológica, da densidade e continuidade da superfície de cobertura e das práticas de manejo do solo (BARBERCHECK, 1992).

A textura e a estrutura do solo afetam a sobrevivência e a patogenicidade dos nematoides (PORTILLO-AGUILAR et al., 1999), e têm forte impacto sobre o tamanho dos nematoides: espaços menores entre partículas mais finas e o aumento da tortuosidade impedem sua movimentação (KLINGER e HAUKELAND, 2006). A redução do movimento expõe os nematoides às condições desfavoráveis dos fatores bióticos e abióticos do solo o que leva a diminuir a probabilidade de encontrar hospedeiro e de reprodução (PORTILHO-AGUILLAR et al., 1999).

1.5.1.2 Umidade

A umidade (água presente nos espaços intersticiais do solo) é fator central que afeta o desempenho de nematoides entomopatogênicos (KAYA, 1990). O nematoide usa a superfície de tensão do filme de água existente ao redor e entre as partículas para se movimentar no solo, o que é facilitado pelo aspecto alongado e cilíndrico do seu corpo. Esse movimento é afetado pelo gradiente químico, pela temperatura, textura, estrutura e umidade do solo, assim como pelo tamanho do nematoide (KLINGER e HAUKELAND, 2006).

Os níveis de umidade no solo, requeridos pelos juvenis infectivos para sua sobrevivência e locomoção, variam entre as espécies e isolados de nematoides e entre os diferentes tipos de solo. Baixo nível de umidade pode ser letal aos nematoides. Algumas espécies, sob estresse contínuo de água, desenvolvem estratégias de sobrevivência,

reduzindo a superfície de seu corpo exposta ao ar e seu metabolismo. Esse processo é conhecido como anidrobiose e permite que o nematoide resista à dessecação, podendo reverter seu metabolismo quando as condições do solo voltam ao normal (KOPPENHÖFER et al., 1995). A inatividade causada por fatores abióticos, induzidas por essas trocas metabólicas podem aumentar a persistência do nematoide no solo (KLINGER e HAUKELAND, 2006).

Alta e baixa umidade do solo proporcionam decréscimo na capacidade infectiva do nematoide (MOLYNEUX e BEDDING, 1984). Rohde et al. (2010) verificaram que *S. carpocapsae* causaram 97,7% de mortalidade em larvas de *C. capitata* quando a umidade do solo atingiu 75% de sua capacidade de campo. *Heterorhabditis* sp., nos tratamentos de 100% e 75% da capacidade de campo, causou 20% e 26,7% de mortalidade de larvas de *C. capitata*. Estudos similares conduzidos com *H. bacteriophora* DI e *S. glaseri* KG (MOLYNEUX e BEDDING, 1984) e com *S. glaseri* NC e *S. carpocapsae* all (KOPPENHÖFER et al., 1995) resultaram em baixa infectividade do nematoide, em baixa e alta umidade do solo.

Para cada textura do solo existe uma umidade adequada para que os nematoides proporcionem maiores índices de mortalidade. Juvenis infectivos de *H. bacteriophora*, em solo de textura argilo-arenosa, proporcionaram maior índice de mortalidade da mosca-das-frutas mexicana *A.ludens* com 15% de umidade (TOLEDO et al., 2006a), enquanto que em solo de textura arenosa, *H. bacteriophora* foi afetado pela baixa umidade (6%) e pela alta umidade (12-24%), exibindo maior índice de mortalidade a 9% de umidade (TOLEDO et al., 2005a).

O efeito da umidade no solo sobre o nematoide tem sido estudado em relação à estratégia comportamental, à virulência e à sobrevivência. O estabelecimento do nematoide no solo (número de juvenil infectivo que penetra no hospedeiro) observada entre *S. glaseri* e *S. carpocapsae*, em diferentes níveis de umidade, deve-se principalmente à diferença de tamanho entre essas duas espécies. *S. glaseri*, por ser maior, requer para seu movimento alta umidade do solo (grosso filme de água entre os espaços intersticiais) quando comparado ao *S. carpocapsae* (KOPPENHÖFER et al., 1995). Womersley (1990) demonstrou que o nível de umidade ótimo requerido para a sobrevivência do nematoide é mais baixo que o requerido para a infecção do hospedeiro. Serwe-Rodrigues et al., (2004) observaram aumento na infectividade resultante da emergência de juvenis infectivos de hospedeiro dessecado.

Espécie de nematoide, textura do solo, umidade interagem no sentido de afetar a habilidade do nematoide na infecção do hospedeiro (KAYA, 1990). Nematoide proporcionou infecção, em areia fina, com potencial de água próximo à saturação; não propiciou infecção, em solo de textura franco-argilosa, com potenciais baixo e alto de água; proporcionou maior possibilidade de infecção, em solo de textura arenosa do que em solo de textura argilosa, com ampla faixa de potencial de água (MOLYNEUX e BEDDING, 1984). *S. carpocapsae* e *S. glaseri* em solo franco-arenoso sobrevivem a 2% e 4% de umidade, respectivamente (KUNG et al., 1990a), contudo, a busca pelo hospedeiro e a infectividade são reduzidas (KAYA, 1990). Em todos os casos, os solos saturados de água são prejudiciais aos nematoides, uma vez que o oxigênio do solo é fator limitante, comprometendo o movimeto. Tais condições são prejudiciais à maioria dos insetos, o que resulta na não disponibilidade de hospedeiros (KAYA, 1990).

As texturas argilosa e franco-argilosa apresentam poros de pequenos diâmetros e alto potencial de umidade (18 e 28%), o que proporciona pouca aeração para *S. carpocapsae* e *S. glaseri*. Isso faz com que os nematoides consumam estoques de carboidrato e de reservas alimentares ineficientemente. Inversamente, os solos de textura franco-arenosa e arenosa apresentam poros de grande diâmetro e baixo potencial de umidade (10 e 12%), o que fornece boa aeração aos nematoides. Isso faz com que *S. carpocapsae* e *S. glaseri* usem seu estoque de lipídios e suas reservas de alimento adequadamente, tendo melhor sobrevivência (KUNG et al., 1990a).

1.5.1.3 Temperatura

A temperatura no solo é determinada por fatores que controlam a transferência de calor. Solo úmido tem maior condutividade e menor aumento da temperatura que solo seco, quando expostos à mesma fonte de calor. O calor solar penetra mais profundamente em solo úmido e produz menor aumento de temperatura em relação ao solo seco (KAYA, 1990; GLAZER, 2002).

Solo seco e úmido sofre flutuações menores e mais lentas que a atmosfera. As camadas mais profundas são mais amortecidas em relação às camadas superficiais, que se aquecem e se resfriam rapidamente junto com a atmosfera, sob a influência da luz direta do sol. Durante o dia, a maior temperatura da superfície determina o fluxo de calor descendente, enquanto que à noite, quando a superfície do solo esfria, o fluxo é ascendente (KAYA, 1990).

A temperatura influencia o desenvolvimento (KAYA, 1977), a infectividade (GRIFFIN, 1993) e a sobrevivência dos nematoides (KUNG et al., 1991). Nematoides isolados de regiões frias são capazes de sobreviver em temperaturas de congelamento. *Steinernema feltiae*, *S. anomali* e *Heterorhabditis bacteriophora* são tolerantes ao congelamento (sobrevivem à formação de gelo nos seus tecidos), com menor temperatura letal de - 22°C, - 14°C e - 19°C, respectivamente (BROWN e GAUGLER, 1995).

Espécies e isolados de nematóides de regiões temperadas não sofrem prejuízo quanto à sobrevivência em temperaturas mais frias, uma vez que se movem abaixo da linha do frio para sobreviver. Provavelmente o ambiente de origem do nematoide determina sua habilidade em tolerar temperaturas extremas (MOLYNEUX e BEDDING, 1984). Em solo de textura franco-arenosa, com 12% de umidade a sobrevivência de *S. carpocapsae* foi maior a temperaturas de 5 a 15 °C do que a 35 ° C. Em contraste a sobrevivência de *S. glaseri* foi maior a 15 a 35 °C do que a 5 °C. Essas diferenças foram atribuídas à origem de ambos NEPs, *S. carpocapsae* é de regiões temperadas enquanto que *S. glaseri* é de regiões tropical ou subtropical (KUNG et al.,1990a).

Avaliações foram realizadas sobre os efeitos correlacionados da temperatura e umidade sobre a sobrevivência dos nematoides. A temperatura tem efeito direto sobre a sobrevivência de heterorhabditídeos e esteinernematídeos em areia a 7% de umidade. Mais de 90% de *S. glaseri* sobreviveram, na ausência de um inseto por 32 semanas, a 15°C. *S. carpocapsae* foi recuperado em alta proporção (605), após 32 semanas a 10°C. Heterorhabditídeos e *S. carpocapsae* apresentaram transparência e letargia em duas semanas a 23 °C e a 28 °C, enquanto que *S. glaseri* tornou-se transparente após oito semanas a 28 °C (KAYA, 1990).

Em temperaturas mais baixas, o movimento e a respiração são minimizadas, prolongando o período de sobrevivência. *Heterorhabditis* sp. D1 não sobrevive bem a 10°C, provavelmente porque seja adaptada a condições tropicais (KAYA, 1990). A capacidade de sobrevivência de *S. glaseri* é atribuída à sua habilidade de tornar-se inativo, enrolando-se como uma bobina (MOLYNEUX e BEDDING, 1984).

Rohde et al. (2010) observaram relação direta entre a temperatura e o efeito da mortalidade de larvas de *C. capitata* por isolados de *S. carpocapsae* e *Heterorhabditis* sp. Em temperatura de 31°C *S. carpocapsae* e *Heterorhabditis* sp. proporcionaram 86,7% e 80,0% de mortalidade, respectivamente, o que demonstra a

possibilidade de esses nematoides serem utilizados no controle de pragas em regiões de clima tropical. Para o parasitismo de *S. feltiae* sobre *A. ludens* a temperatura considerada ótima foi de 26°C, havendo decréscimo no índice de parasitismo em temperaturas abaixo de 20°C e acima de 30°C (TOLEDO et al., 2001). Toledo et al. (2009) observaram que *S. carpocapsae* proporcionou 91,4% de mortalidade de larvas de *A. obliqua* a 26,1°C, e porcentagens menores a 19°C, provavelmente porque em baixas temperaturas a taxa metabólica do nematoide diminui e consequentemente sua mobilidade.

1.5.1.4 Aeração

A aeração depende do consumo de oxigênio e da produção de dióxido de carbono. O oxigênio difunde da atmosfera para os poros do solo e o dióxido de carbono, dos poros para a atmosfera. O gradiente desses gases é estabelecido pelas atividades químicas e biológicas no solo e a taxa de difusão é controlada pelas propriedades físicas do solo. Como os nematoides vivem no filme de água presente nos poros, o oxigênio difunde do poro para o filme de água e o dióxido de carbono, da água para o poro (KAYA, 1990).

A porcentagem do oxigênio no solo decresce com a profundidade, a taxa de decréscimo é mais elevada em solo de textura franco argilo-siltosa do que em franco-arenosa (KUNG et al., 1990b). Em estudos de laboratório, *S. carpocapsae* pode sobreviver com tensão de oxigênio a 0,5% de saturação a 20 °C (KAYA, 1990). O oxigênio é fator limitante (restringe a mobilidade, a persistência e causa a morte do nematoide) em solos saturados de água (inundações freqüentes ou com excesso de irrigação) ou em solos que contêm alto teor de matéria orgânica (KAYA, 1990; KUNG et al., 1990b; KOPPENHÖFER et al., 1995).

1.5.1.5 Solução do solo

Nematoides são afetados por ampla faixa de gradientes químicos do solo que são transportados pela água (KLINGER e HAUKELAND, 2006).

Solo com alto teor de matéria orgânica pode, por um lado, ser prejudicial ao nematoide por apresentar predadores e patógenos e por impedir a utilização de sinais químicos do hospedeiro (TORR et al., 2004); por outro, pode sustentar ou aumentar a

população de nematoides por propiciar o aumento na abundância de hospedeiros (KAYA, 1990)

Raízes de plantas, além de influenciarem a temperatura do solo pela intercepção da radiação solar (KAYA, 1990), afetam a dispersão dos nematoides por criarem gradiente de umidade na rizosfera (KAYA, 1990), liberarem CO_2, que atraem o nematoide, possibilitando o encontro com hospedeiros sedentários que se alimentam de raízes (KAYA e GAUGLER, 1993).

Na maioria dos solos, intervalos de pH de 4 a 8 têm pouco efeito sobre a atividade do nematóide. A sobrevivência e a patogenicidade de *S. glaseri* e *S. carpocapsae* decrescem levemente quando o pH do solo cai de 8 para 4, e são severamente afetadas quando o solo atingi pH 10 (KAYA, 1990; KUNG, et al., 1990b).

Nematoides são tolerantes à exposição de agroquímicos. Heterorhabditídeos são mais sensíveis a fertilizantes inorgânicos do que esteinernematídeos (BEDNAREK e GAUGLER, 1997). Pesticidas como dodine, metomil e parathion podem reduzir as atividades dos nematoides; clorpirifós e endosulfan são compatíveis; e imidiclopride apresenta efeito sinérgico no contole de insetos pragas (KOPPENHÖFER e KAYA, 1998; NISHIMATSU e JACKSON, 1998).

1.5.2 Fatores bióticos

Vários fatores bióticos influenciam a ocorrência e a persistência dos nematoides no solo, um deles é a presença do hospedeiro. A relação adequada entre nematoide e hospedeiro inclui a estratégia de busca pelo hospedeiro, a virulência e a tolerância ambiental (STUART et al., 2006). Nematoides *ambusher* como, por exemplo, *S.carpocapsae* são mais adequados ao controle de insetos móveis próximos à superfície do solo, enquanto que nematoides *cruiser* como, por exemplo, *H. bacteriophora* são mais adequados para suprimir insetos sedentários situados abaixo da superfície do solo (LEWIS et al., 2006). As diferentes estratégias de forrageamento podem facilitar a coexistência entre nematoides (STUART et AL., 2006). Baixo nível de virulência do nematoide resulta em insucesso no controle (SHAPIRO-ILAN et al., 2006). Em alguns casos, a persistência pode compensar a virulência moderada (SHIELDS et al., 1999). Tolerância ambiental à dessecação ou à temperatura são importantes na escolha do nematoide (SHAPIRO-ILAN et al., 2006).

Os nematoides entomopatogênicos estão sujeitos a infecção, a parasitose ou a predação por bactérias, protozoas, fungos nematófagos, ácaros predadores, nematoides (KAYA, 1990). Juvenis infectivos retêm a cutícula do segundo instar como forma de proteção ao ataque de fungos entomopatogênicos (TIMPER e KAYA, 1989) ou como estrutura de defesa contra a punctura e a ingestão de fluídos por ácaros mesostigmatídeos (EPSKY et al., 1988). Determinadas espécies de formigas são predadoras de esteinernematídeos presentes em cadáveres infectados (ALATORRE-ROSAS e KAYA, 1990).

Relações foréticas foram observadas entre nematoides entomopatogênicos e nematoides de solos, entre nematoides entomopatogênicos e ácaros (EPSKY et al., 1988) e entre nematoides entomopatogênicos e minhocas (SHAPIRO et al., 1995).

Nematoides entomopatogênicos agem sinergicamente com entomopatógenos *Paenibacillus popilliae* Dutky (THURSTON et al., 1994), *Bacillus thuringiensis* (KOPPENHÖFER e KAYA, 1997) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (ANSARI et al., 2004). Apresentam antagonismo com *Beauveria bassiana* (Balsamo)Vuillemin (BRINKMAN e GARDNER, 2000) e com *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (SHAPIRO-ILAN et al. 2004a). Os esteinernematídeos podem ser antagonistas de nematoides parasitas de plantas. Em aplicações inundativas, *S. glaseri* se acumula, por exemplo, ao redor de raízes do tomateiro atraído pelo dióxido de carbono; com isso evita o estabelecimento de nematoides nessas raízes. A adição de *S. glaseri* ou *S. carpocapsae* reduz a população de nematoides parasitas de plantas ou de vida livre do solo em solo arenoso (ISHIBASHI e KONDO, 1986b). A natureza das interações entre nematoides entomopatogênicos (antagonismo, sinergismo) pode variar dependendo da espécie de nematoide, do tempo ou da aplicação do nematoide (BARBERCHECK e KAYA,1990; KOPPENHÖFER e KAYA, 1997; THURSTON et al, 1994).

Competição interespecífica e intraespecífica podem afetar a capacidade e a persistência do nematoide (KOPPENHÖFER e KAYA, 1996). A habilidade competitiva de determinado nematoide pode auxiliar em programas de controle, uma vez que essa habilidade pode impactar o estabelecimento, a persistência e a dinâmica populacional do nematoide introduzido (STUART et al., 2006).

Na competição interespecífica a progênie e a reciclagem do nematoide são afetadas em função da presença de diferentes bactérias simbiônticas (KOPPENHÖFER e KAYA, 1996). Aplicações de nematoides exóticos ou endêmicos competem com

comunidades endêmicas de nematoides. Um inseto raramente é infectado por mais de uma espécie de nematoide; esteinernematídeos e heterorhabditídeos não podem sobreviver sem sua respectiva bactéria simbionte (KAYA, 1990; ALATORRE-ROSAS e KAYA, 1990). Contudo, *S. carpocapsae* e *S. glaseri* podem infectar e produzir progênie em *G. mellonella*. *S. glaseri* será menos afetado, tendo em vista seu rápido desenvolvimento e sua habilidade em usar a bactéria simbiôntica do *S. carpocapsae* (KOPPENHÖFER et al., 1995). Juvenis infectivos de *S. carpocapsae* infectaram larvas e reproduziram-se em maior número de cadáveres do que *H. bacteriophora*, além de terem exibido vantagem competitiva quando diretamente inoculados na hemocele do inseto (ALATORRE-ROSAS e KAYA, 1991). *Xenorhabdus* spp. são conhecidas por produzir substâncias que matam *Photorhabdus* spp. (BOEMARE, 2002). Competição entre esteinernematídeos e *H. bacteriophora* pelo mesmo hospedeiro lepidóptero resultou na infecção de elevado número de hospedeiros por esteinernematídeos nas proximidades do ponto de aplicação dos nematoides, e de elevado número de hospedeiros por *H. bacteriophora* distantes do ponto de aplicação. Isso demonstra a superioridade dos esteinernematídeos no sentido de impedir *H. bacteriophora* de colonizar o hospedeiro (ALATORRE-ROSAS e KAYA, 1990).

Na competição intraespecífica a capacidade, a sobrevivência da progênie e a reciclagem do nematoide são afetadas em função da presença de muitos juvenis infectivos de uma espécie em um único hospedeiro (KOPPENHÖFER e KAYA, 1996). Competição intraespecífica influencia a emergência, a estratégia de forrageamento, a dinâmica de estabelecimento, invasão e reprodução. Em esteinernematídeos, os primeiros juvenis infectivos emergentes são maiores e, na maioria, do sexo masculino em relação aos juvenis infectivos emergentes mais tardiamente (STUART et al, 2006). Juvenis infectivos *cruiser* emergidos primeiro são propensos a terem melhor oportunidade para localizar, infectar e reproduzir-se em hospedeiros das proximidades; juvenis emergidos alguns dias mais tarde necessitam dispersar-se mais para encontrar hospedeiros não infectados (STUART et al., 1996). Diferenças de tamanho entre juvenis infectivos correlacionam-se com reservas lipídicas e com longevidade. Os primeiros juvenis infectivos emergidos são maiores que os juvenis infectivos de emergência posterior os quais são mais móveis e menos sensíveis aos sinais do hospedeiro (LEWIS e GAUGLER, 1994). Tal fato demonstra a evolução de estratégias no sentido de regular a dispersão e a infectividade. Os primeiros juvenis infectivos que invadem um hopedeiro desenvolvem-se em adultos e tendem a ter vantagens

reprodutivas, contudo, a colonização precoce submete esses nematoides a índices elevados de mortalidade por terem que enfrentar as defesas do hospedeiro (GAUGLER et al, 1994;. PETERS e EHLERS, 1994; WANG et al, 1994). Infecções iniciais de *S. feltiae* facilitam infecções subseqüentes (HAY e FENLON, 1997); infecções em curso por *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *S. riobrave* causam liberação de substância química que inibem reinfecções (FAIRBAIRN et al, 2000).

Competição entre nematoides entomopatogênicos e nematoides de vida livre – bacterívoros, fungívoros e onívoros – constitui componente importante de decomposição e ciclagem de nutrientes das teias alimentares no solo. Duncan et al. (2003) relataram que, em pomar de citros na Flórida, a presença de *S. riobrave* levou ao aumento do número do nematoide bacterívoro de vida livre *Pellioditis* sp., que se desenvolveu em cadáveres de larvas de *D. abbreviatus*, e a presença de *Pellioditis* sp.diminuiu o potencial reprodutivo de *S. riobrave*.

S. carpocapsae e *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt) coinfectam o mesmo hospedeiro, o que resultam em juvenis infectivos de desenvolvimento anormal, de menor tamanho e de taxas de reservas alimentares menores (KAYA e BURLANDO, 1989). Nematoides e Bt em sinergia aumentam os níveis de mortalidade de larvas de escaravelho (KOPPENHÖFER e KAYA, 1997).

Estratégia de defesa de ordem comportamental, morfológica e fisiológica dos insetos praga afetam a habilidade dos nematoides em infectar hospedeiros (GAUGLER , 1988). As defesas comportamentais incluem alta taxa de defecação para reduzir a infecção via ânus (escarabeídeos), baixa produção ou emissão de dióxido de carbono em rajadas para minimizar sinais químicos (pupa de lepidóptera), perfuração das raízes para escapar dos juvenis infectivos do solo (verme da raiz). As defesas morfológicas incluem células pupais envolvidas por densas partículas de solo, casulo de seda, placas em forma de peneira sobre os espiráculos, espiráculos hermeticamente fechados e superfícies do corpo rígidas (KAYA, 1990). As defesas fisiológicas incluem encapsulação como resposta celular e humoral (DUNPHY e THURSTON, 1990).

1.5.3 Reciclagem

Por serem parasitas obrigatórios, os nematoides entomopatogênicos necessitam reciclarem-se em seus hospedeiros para manterem-se no solo. O potencial de reciclagem dos nematoides depende de vários fatores: tipo de solo, cobertura vegetal,

estratégia de forrageamento, densidade do hospedeiro, hospedeiro alternativo, inimigos naturais, espécie do nematoide (KAYA, 1990; SHAPIRO-ILAN et al, 2002).

Nas liberações inundativas, a dose adequada é de 2,5 x 10^9 JIs/ha. Para insetos menos suscetíveis ou situados abaixo da superfície do solo, tal como o gorgulho da raiz *Diaprepes,* a dose de aplicação pode ser mais elevada (SHAPIRO-ILAN et al., 2002). Após a liberação inundativa, a reciclagem é necessária por prolongar o controle da praga e por dispensar ou reduzir aplicações futuras (KAYA, 1990).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 1-33.

AGUIAR-MENEZES, E. L.; MENEZES, E. B. Flutuação populacional das moscas-das-frutas e sua relação com a disponibilidade hospedeira em Itaguaí, RJ. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p. 223-232, 1996.

AKHURST, R. J. Bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes – the power behind the throne. In: BEDDING, R. A., AKHURST, R.; KAYA, H. (Eds.) **Nematode and the biological control of insects pests**. East Melbourne, Australia: CSIRO, 1993. p. 127-135.

ALATORRE-ROSAS, R.; KAYA, H. K. Interspecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an insect in sand. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 55, p. 179-188, 1990.

ALATORRE-ROSAS, R.; KAYA, H. K. Interactions between two entomopathogenic nematode species in the same host. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 1-6, 1991.

ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 155-178, 1994.

ALUJA, M.; NORRBOM, A. L. (Eds.) **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p 944.

ANSARI, M. A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. **Biological Control**, v. 31, p. 172-180, 2004.

ARRUDA NETO, J. S. de. Principais problemas fitossanitários da goiabeira. **Divulgação Agronômica**, v. 32, p. 9-15, 1972.

ASSOCITRUS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CITRICULTORES. **A origem e a característica da Laranja**. 2008. Disponível em: <http://www.associtrus.com.br/index.php?xvar=mostra-noticia&id=1939&idtipo=4>. Acesso em: 31 jan. 2011.

BAILEZ, O. E.;VIANA-BAILEZ, A. M.; LIMA, J. O. G. de; MOREIRA, D. D. O. Life-history of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), under laboratory conditions. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 203-207, 2003.

BARBERCHECK, M. E. Effect of soil physical factors on biological control agents of soil insect pests. **Florida Entomologist**, v. 75, p. 539-548, 1992.

BARBERCHECK, M. E.; KAYA, H. K. Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis.* **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 55, p. 225-234, 1990.

BARBERCHECK, M. E.; KAYA, H. K. Effect of host condition and soil texture on host finding by the entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Environmental Entomology**, v. 20, p. 582-589, 1991.

BARBOSA, F. R.; NASCIMENTO, A. S.; OLIVEIRA, J. V.; ALENCAR, J. A.; HAJI, F. N. P. Pragas. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Semi-Árido (Petrolina, PE). **Goiaba: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, 2001. p. 29-54. (Frutas do Brasil, 18).

BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. C.; GARCIA, M. S.; DOLINSKI, C.; NEGRISOLI JR., A.; BERNARDI, D.; NAVA, D. E. Efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p. 6-13, 2009.

BAUR, M. E.; KAYA, H. K.; STRONG, D. R. Foraging plantas as scavengers on entomopathogenic nematodes-killed insects. **Biological Control**, v. 12, p. 231-236, 1998.

BEAVERS, J. B.; CALKINS, C. O. Susceptibility of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to Steinernematid and Heterorhahditid nematodes in laboratory studies. **Environmental Entomology**, v. 13, p. 137-139, 1984.

BEDDING, R. A.; MOLYNEUX, A. S. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematode). **Nematologica**, v. 28, p. 354-359, 1982.

BEDNAREK, A.; GAUGLER, R. Compatibility of soil amendments with entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 29, p. 220–227. 1997.

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

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

BOHAN, D. A.; HOMINICK, W. M. Examination of the *Steinernema feltie* (Site 76 strain) infection interaction with the *Galleria mellonella* host, using an infection model. **Parasitology**, v. 111, p. 617-625, 1995.

BOHAN, D. A.; HOMINICK, W. M. Investigations on the presence of an infections proportion amongst a population of *Steinernema feltiae* (Site 76 strain) infective stages. **Parasitology**, v. 112, p. 113-118, 1996.

BOSCAN de MARTINEZ, N.; CASARES, R. El gorgojo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae). I. evaluacion de daños. **Agronomía Tropical**, v. 30, p. 77-83, 1980.

BOSCAN de MARTINEZ, N.; CASARES, R. Distribucion en el tiempo de las fases del gorgojo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) en el campo. **Agronomía Tropical**, v. 31, p. 123-130, 1982.

BOTEON, M. **Cadeia agroindustrial de citros**. Disponível em: <http://www.cepea.es alq.usp.br/citros/cadeia_citros.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2010.

BRAGA SOBRINHO, R.; PEIXOTO, M. J. A.; MESQUITA, A. L. M.; BANDEIRA, C. T. Study on population dynamic of fruit fly species in the State of Ceará. **Revista Ciência Agronômica,** v. 33, p. 69-73, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 07, de 17 de maio de 1999. Normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. **Diário Oficial da União - DOU**, Brasília, DF, p. 11, 19 maio 1999.

BRINKMAN, M. A.; GARDNER, W. A. Enhanced activity of *Beauveria bassiana* to red imported fire ant workers (Hymenoptera: Formicidae) infected with *Thelohania solenopsae*. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 17, p. 191-195, 2000.

BROWN, I. M.; GAUGLER, R. Cold tolerance of steinernematid and heterorhabditid nematodes. **Journal of Thermal Biology**, v. 23, p. 75–80, 1995.

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

CAMPBEL, J. F.; GAUGLER, R. Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). **Behaviour**, v. 126, p. 155-170, 1993.

CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: dichotomy or variation along a continuum? **Fundamental and Applied Nematology**, v. 20, p. 393-398, 1997.

CAMPBEL, J. F.; KAYA, H. K. Influence of insect associated cues on the jumping behavior of entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. **Behaviour**, v. 137, p. 591-609, 2000.

CAMPBEL, J. F.; KAYA, H. K. Variation in entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) infective stage jumping behavior. **Nematology**, v. 4, p. 471-482, 2002.

CAMPBEL, J. F.; KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K.; CHINNASRI, B. Are there temporarily non-infectious dauer stages in entomopathogenic nematode populations: attest of the phased infectivity hypothesis. **Parasitology**, v. 118, p. 499-508, 1999.

CAMPBEL, J. F.; LEWIS, E. E.; STOCK, S. P.; NADLER, S.; KAYA, H. K. Evolution of host search strategies in entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 35, p. 142-145, 2003.

CARVALHO, R. S. **Metodologia para monitoramento populacional de moscas-das-frutas em pomares comerciais.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005. 17 p.(Circular Técnica 75).

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

CHIARADIA, L. A.; MILANEZ, J. M.; DITTRICH, R. Flutuação populacional de moscas-das-frutas em pomares de citros no oeste de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 337-343, 2004.

COMITÊ GESTOR DA PRODUÇÃO INTEGRADA DE GOIABA. **Normas Técnicas e Documentos de Acompanhamento da Produção Integrada de Goiaba**. Disponível em: <www.todafruta.com.br/todafruta/arquivos/674.doc>. Acesso em: 27 jul. 2010.

ffrench-CONSTANT, R.; WATERFIELD, N.; DABORN, P.; JOYCE, S.; BENNETT, H.; AU, C. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbionts and pathogen. **FEMS Microbiol Rev**, v. 26, p. 433-456, 2003.

CURRAN, J. Molecular techniques in taxonomy. In GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Eds.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 93-115.

DEL VALLE, E. E.; DOLINSKI, C.; SOUZA, R. M.; SAMMUELS, R. I. Performance de *Heterorhabditis baujardi* LPP7(28) (Nematoda: Rhabditida), selecionada para tolerância a elevadas temperaturas, no controle de *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). **Nematologia Brasileira**, v. 29, p. 199-205, 2005.

DEL VALLE, E. E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E. L. S.; SOUZA, R. M.; SAMMUELS, R. I. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii*, (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, p. 33-41, 2008.

DOLINSKI, C.; DEL VALLE, E.; STUART, R. J. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera:

Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. **Biological Control**, v. 38, p. 422-427, 2006.

DOLINSKI, C.; SAMMUELS, R. I. Comparative efficacy of different species of entomopathogenic nematodes for the control of guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8, 2002, Foz do Iguaçu. **Program and abstracts**…Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia:UEL:SIP, 2002. p. 54-55.

DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. Virulence mechanisms. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 79-98.

DUNCAN, L. W.; DUNN, D. C.; BAGUE, G. NGUYEN, K. Competition between entomopathogenic and free-living bactivorous nematodes in larvae of the weevil *Diaprepes abbreviatus*. **Journal of Nematology**, v. 35, p. 187-193, 2003.

DUNPHY, G. B.; THURSTON, G. S. Insect immunity. In GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Eds.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 301-326.

EPSKY, N. D.; WALTER, D. E.; CAPINERA, J. L. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 81, p. 821–825. 1988.

FAIRBAIRN, J. P.; FENTON, A.; NORMAN, R.; HUDSON, P. J. Re-assessing the infection strategies of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Parasitology**, v. 121, p. 211–216. 2000.

FERNANDES, O. A. **Estudos bioecológicos e avaliação de danos causados por moscas--das-frutas (Diptera:Tephritidae) em *Citros sinensis* Osbeck var. 'Pera'**. 1987, 79 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 57-78.

FRANCISCO, V. L. F. S.; BAPTISTELLA, C. S. L.; AMARO, A. A. **A cultura da goiaba em São Paulo.** São Paulo: Instituto de Economia Agrícola/ Governo do estado de São Paulo, 2005. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1902>. Acesso em: 10 mar. 2010.

GAUGLER, R. Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 24, p. 351-360, 1988.

GAUGLER, R.; EDWIN, L.; STUART, R. J. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. **Oecologia**, v. 109, p. 483-489, 1997.

GAUGLER, R.; WANG, Y.; CAMPBELL, J. F. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defences against entomopathogenic nematode attack. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 193-199, 1994.

GAZIT, Y.; RÖSSLER, Y.; GLAZER, I. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 157-164, 2000.

GEORGIS, R.; POINAR JR., G. O. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Nemathology**, v. 15, p. 308-311, 1983a.

GEORGIS, R.; POINAR JR., G. O. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Nemathology**, v. 15, p. 329-332, 1983b.

GLAZER, I. Survival biology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 169-187.

GOODRICH-BLAIR, H.; CLARKE, D. J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Molecular Microbiology**, v. 64, p. 260-268, 2007.

GRAVENA, S.; BENVENGA, S. R.; SILVA, J. L. Manejo ecológico das moscas-das-frutas. **Portal AGROFIT**, 2010. Disponível em: <http://www.agrofit.com.br/portal/citros/54-citros/112-manejo-ecologico-das-moscas-das-frutas>. Acesso em: 20 jan. 2011.

GREWAL, P. S.; GAUGLER, R.; SELVAN, S. Host recognition by entomopathogenic nematodes: behavioral response to contact with host feces. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, p. 1219-1231, 1993a.

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

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

GREWAL, P. S.; SELVAN, S.; LEWIS, E. E.; GAUGLER, R. Males as the colonizing sex in insect parasitic nematodes. **Experientia**, v. 49, p. 605-608, 1993b.

GRIFFIN, C. T. Temperature responses of entomopathogenic nematodes: implication for the success of biological control programmes. In: BEDDING, R. A., AKHURST, R.; KAYA, H. (Eds.) **Nematode and the biological control of insects pests**. East Melbourne, Australia: CSIRO, 1993. p. 115-126.

GRIFFIN, C. T. Effects of prior storage conditions on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Heterorhabditidae). **Fundamental and Applied Nematology**, v. 19, p. 95-102, 1996.

GRIFFIN, C. T.; BOEMARE, N. E.; LEWIS. E. E. Biology and behavior. In: GREWAL, P. S.; EHLERS, R.-U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (Eds.). **Nematodes as biocontrol agents.** Cambridge: CAB Internacional, 2005, p. 47-64.

GRIFFIN, C. T.; DOWNES, M. J.; BLOCK, W. Tests of Antarctic soils for insect parasitic nematodes **Antarctic Science**, v. 2, p. 221-222, 1990.

HAJI, F. N. P.; MIRANDA, I. G. Pernambuco. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 229-233.

HAY, D. B.; FENLON, J. S. A modified binomial model that describes the infection dynamics of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Steinernematidae; Nematoda). **Parasitology**, v. 111, p. 627-633, 1997.

HOMINICK, W. M.; REID, A. P. Perspectives on entomopathogenic Nematology. In GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Eds.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 327-345.

HU, K.; LI, J.; WEBSTER, J. M. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. **Nematology**, v. 1, p. 457-459, 1999.

HU, K.; WEBSTER, J. M. Antibiotic production in relation to bacteria growth and nematode development in *Photorhabdus-Heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Microbiological Letters**, v. 189, p. 219-223, 2000.

HUEY, R. B.; PIANKA, E. R. Ecological consequences of foraging mode. **Ecology**, v. 62, p. 991-999, 1981.

HUNT, W. H.; WALL, D. H.; DECRAPPEO, N. M.; BRENNER, J. S. A model for nematode locomotion in soil. **Nematology**, v.3, p. 705-716, 2001.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal.** Banco de Dados Agregados do IBGE, Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bd a/ acervo/acervo2.asp?e=v&p=PA&z=t &o=10>. Acesso em: 19 jan. 2010.

IBRAF – INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Estatística. Frutas processadas**. 2011. Disponível em:<http://www.ibraf.org.br>. Acesso em: 20 fev. 2011.

IHERING, H. VON. Laranjas bichadas. **Revista Agrícola**, v. 6, p 179-181, 1901.

ISHIBASHI, N.; KONDO, E. A possible quiescence of the applied entomogenous nematode, *Steinernema feltiae*, in soil. **Japanese Journal of Nematology**, v. 16, p. 66-67, 1986a.

ISHIBASHI, N., KONDO, E. *Steinernema feltiae* (DD-136) and *S. glaseri*: persistence in soil and bark compost and their influence on native nematodes. **Journal of Nematology**, v. 18, p. 310-316, 1986b.

ISHIBASHI, N.; KONDO, E. Behavior of infective juveniles. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K.(Eds.) **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 130-150.

JACKSON, T.A. Factors in the success and failure of microbial control agents for soil dwelling pests**. Integrated Pest Management Reviews***,* v. 4, p. 281–285, 1999.

JAGDALE, G. B.; SAEB, A. T. M.; SOMASEKHAR, N.; GREWAL, P. S. Genetic variation and relationships between isolates and species of the entomopathogenic nematode genus *Heterorhabditis* deciphered through isozyme profiles. **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 509-516, 2006.

JAROSZ, J. Active resistence of entomophagous rhabditid *Heterorhabditis bacteriophora* to insect immunity. **Parasitology**, v. 117, p. 201-208, 1998.

JOHNIGK, S.-A.; EHLERS. R.-U. Juvenile development and life cycle of *Heterorhabitis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). **Nematology**, v. 1, p. 717–726, 1999.

KANOST, M. R.; JIANG, H.; YU, X. Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 97-105, 2004.

KARAGOZ, M.; GULCU, B.; HAZIR, C.; KAYA, H. K.; HAZIR, S. Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. **Phytoparasitica**, v. 37, p. 153-159, 2009.

KAVATI, R. Produção integrada de goiaba. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Eds.). **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização**. Jabuticabal: UNESP, 2009. p. 193-234.(volume 1).

KAYA, H. K. Development of the DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* at constant temperatures. **Journal of Nematology**, v. 9, p. 346-349, 1977.

KAYA, H. K. Soil ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Eds.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 93-115.

KAYA, H. K.; BURLANDO, T. M. Development of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in diseased insect hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, p. 164-168, 1989.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v. 38, p. 181-206, 1993.

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

KLINGER, I.; HAUKELAND, S. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: EILENBERG, J. HOKKANEN, H. M. T. (Eds.). **An ecological and societal approach to biological control**. Dordrecht (The Netherlands): Springer, 2006. p. 145-211.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K. Coexistence of two steinernematid nematode specie (Rhabditida: Steinernematidae) in the presence of two host species. **Applied Soil Ecology**, v. 4, p. 221-230, 1996.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K. Additive and synergistiv interactions between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grup the control. **Biological Control**, v. 8, p. 131-137, 1997.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 618–623. 1998.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K.; TAORMINO, S. P. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 193-199, 1995.

KUNG, S.; GAUGLER, R.; KAYA, H. K. Soil type and entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 55, p. 401-406, 1990a.

KUNG, S.; GAUGLER, R.; KAYA, H. K. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. **Journal of Nematology,** v. 22, p. 440-445, 1990b.

KUNG, S.; GAUGLER, R.; KAYA, H. K. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 242-249, 1991.

LEITE, L. G. Nematoides entomopatogênicos. In: BATISTA FILHO, A. (Ed.). **Controle biológico de insetos e ácaros**. São Paulo: Instituto Biológico, 2006. p. 42-51. (Boletim Técnico, 15).

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; CONTRERAS-OCHOA, O. L.; GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M.; TRUJILLO DE LA LUZ, A.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O. Susceptibilidad de larvas de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) a diversos nemátodos entomopatógenos (Steinernematidae y Heterorhabditidae). **Vedalia**, v. 3, p. 31-33, 1996.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; PESCADOR-RUBIO, A.; GALINDO-VELASCO, E.; ÁNGEL-SAHAGÚN, C. A.; MOCHEL-ACEVES, A. C.; GONZÁLEZ-REYES, E. Efficacy of steinernematid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) on suppression of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae in

soil of differing textures:laboratory and field trials. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v 23, p. 41-49, 2006.

LEWIS, E. E. Behavioural ecology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 205-223.

LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 38, p. 66-79, 2006.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematode (Rhabdita: Steinernematidae) sex ratio relates to foraging strategy. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, p. 238-242, 1994.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. **Parasitology**, v. 105, p. 309-315, 1992.

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

LINDEGREN, J. E.; VAIL, P. V. Susceptibility of mediterranean fruit fly, melon fly, and oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in laboratory tests. **Environmental Entomology**, v. 15, p. 383-386, 1990.

LINDEGREN, J. E.; WONG, T. T.; McINNIS, D. O. Response of mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in field tests in Hawaii. **Environmental Entomology**, v. 19, p. 465-468, 1986.

LIQUIDO, N. J.; SHINODA, L. A.; CUNNINGHAM, R. T. Host plants of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world review. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 77, p. 1-52, 1991.

MAHMOUD, F. M.; OSMAN, M. A. E. M. Use of the nematode *Steinernema feltiae* Cross N 33 as a biological control agent against the peach fruit fly *Bactrocera zonata*. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 2, p. 109-115, 2007.

MALAN, A. P.; MANRAKHAN, A. Susceptibility of the mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and the natal fruit fly (*Ceratitis rosa*) to entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, p. 47-49, 2009.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S. Biologia de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae). II: Índices de infestação em diferentes hospedeiros e localidades. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 40, p. 17-24, 1980.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S.; ZUCCHI, R. A. Biologia de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae). I: Lista de hospedeiros e ocorrência. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 40, p. 9-16, 1980.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 93-98.

MARTENS, E. C.; GOODRICH-BLAIR, H. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcelular structure with which *Xenorhabdus nemathophila* associates during colonization initiation. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 1723-1735, 2005.

MARTENS, E. C.; HEUNGENS, K.; GOODRICH-BLAIR, H. Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 3147-3154, 2003.

MCALPINE, J. F. Phylogeny and classification of the Muscomorpha. In McALPINE, J. F. (Ed.) **Manual of neartic diptera**. Ottawa: Biosystema Research Centre, 1989. p. 1397-1518.

MEDINA, J. C. Cultura. In: MEDINA, J. C.; GARCIA, J. L. M.; KATO, K.; MARTIN, Z. J. de; VIEIRA, L. F.; RENESTO, O. V. (Eds.). **Goiaba: da cultura ao processamento e comercialização**. Campinas: ITAL, 1978. p. 5-45.

MEDINA, J. C. Goiaba. In: SÃO PAULO. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria da Agricultura. Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária. Instituto de Tecnologia de Alimentos. **Goiaba: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2 ed. Campinas: ITAL, 1991. p. 1-120. (Séries Frutas Tropicais 6).

MOLYNEUX, A. S.; BEDDING, R. A. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Nematologica**, v. 30, p. 358–365, 1984.

MORGANTE, J. S. **Moscas-das-frutas (Tephritidae):** características biológicas, detecção e controle. Brasília: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, SENIR, 1991. 19 p. (Boletim Técnico de Recomendações para os Perímetros Irrigados do Vale do São Francisco, 2).

NASCIMENTO, A. S.; ZUCCHI, R. A. Dinâmica populacional das moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* (Dip., Tephritidae) no Recôncavo Baiano: I – Levantamento das espécies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 16, p. 763-767, 1981.

NATALE, W. Adubação, nutrição e calagem na goiabeira. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Eds.). **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização**. Jabuticabal: UNESP, 2009. p. 257-279. (volume 1).

NEVES, M. F.; JANK, M. S. (Orgs.). **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015**. São Paulo: ICONE; MARKESTRAT; PENSA. 2006. 89 p. Disponível em : <http://www.fundoce.org.br/arquivo_diversos/agenda_estrtegia/Agenda_Citrus_2015_PENSAICONE. pdf>. Acesso em: 10 dez. 2010.

NISHIMATSU, T.; JACKSON, J. J. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 410-418, 1998.

NGUYEN, K. B. **Nematode identification: taxonomy of entomopathogenic nematodes**. Entomology and Nematology Department, University of Florida, 2010. Disponível em: <http://kbn:ifas.ufl.edu/gaster/identify.htm>. Acesso em: 30 ago 2010.

NORRBOM, A. L.; CARROLL, L. E.; FREIDBERG, A. Status of knowledge. In: THOMPSON, F. C. (Ed.) **Fruit fly expert identification system and systematic information database**. Leiden: North American Dipterists' Society; Bachuys, 1998. p. 9-47.

ORLANDO, A.; SAMPAIO, A. S.; CARVALHO, A. M.; SACARANARI, H. J.; ARRUDA, H. V. 1974. Notas sobre o gorgulho das goiabas *Conotrachelus psidii*, Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae) e experimentos de combate. **O Biológico**, v. 40, p. 251-269, 1974.

PEREIRA, T. **Goiaba vira commodity ambiental em campos e região**. 2008. Disponível em: <http://andreambiental.blogspot.com/2008/10/goiaba-vira-commodity-ambiental-em.html>. Acesso em: 19 jan. 2010.

PETERS, A. EHLERS, R.-U. Susceptibility of leather jackets (*Tipula paludosa* and *Tipula oleraceae*; Tipulidae: Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 63, p. 163-171, 1994.

PIEDADE NETO, A. Goiaba vermelha, fonte de riqueza à saúde, ao trabalho e ás nações. Disponível em: <http://www.nutricaodeplantas.agr.br/site/ensino/pos/Palestras_William/Livrogoiaba_pdf/7_goiabras.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2010.

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

POINAR, G. O., Jr. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K.(Eds.) **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 23-62.

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

PORTILLO-AGUILAR, C.; VILLANI, M. G.; TAUBER, M. J.; TAUBER, C. A.; NYROP, J. P. Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. **Environmental Entomology**, v. 28, p. 1021-1035, 1999.

RAGA, A.; PRESTES, D. A. O.; SOUZA FILHO, M. F.; SATO, M. E.; SILOTO, R. C.; GUIMARÃES, J. A.; ZUCCHI, R. A. Fruit fly (Diptera: Tephritoidea) infestation in citrus in the State of São Paulo, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 85-89, 2004.

ROHDE, C.; MOINO JR, A.; SILVA, M. A. T. DA; CARVALHO, F. D.; FERREIRA, C. S. Influence of soil temperature and moisture on the infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 1-4, 2010.

RONCHI-TELES, B. **Ocorrência e flutuação populacional de espécies de moscas-das-frutas e parasitóides com ênfase para o gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) na Amazônia brasileira**. 2000. 156 p. Tese (Doutorado) **-** Instituto de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal da Amazônia, Manaus.

RONCHI-TELES, B.; SILVA, N. M. Primeiro registro de ocorrência da mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) na Amazônia Brasileira. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, p. 569-570, 1996.

ROZANE, D. E.; OLIVEIRA, D. A.; LIRIO, V. S. **Importância econômica da cultura da goiabeira**. Disponível em: <http://www.nutricaodeplantas.agr.br/site/ensino/pos/ Palestras William/Livrogoiaba_pdf/13_importanciaeconomica.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2010.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. São Paulo: Roca, 2005. p. 884-899.
SANTOS, G. S.; PÁDUA, L. E. Flutuação populacional e espécies de moscas-das-frutas em citrus na cidade de Teresina – PI. **Caatinga**, v.17, p. 87-92, 2004.

SEAGRI - Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária. **Cultura da laranja**. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/Laranja.htm>. Acesso em: 10 dez. 2010.

SELIVON, D. Biologia e padrões de especiação. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 25-28.

SERWE-RODRIGUES, J.; SONNENBERG, K.; APPLEMAN, B.; BORNSTEIN-FORST, S. Effects of host desiccation on development, survival, and infectivity of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 175-181, 2004.

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

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GOUGE, D. H.; PIGGOTT, S. J.; FIFE, J. P. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematode in biological control. **Biological Control**, v. 38, p. 124-133, 2006.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; JACKSON, M.; REILLY, C. C.; HOTCHKISS, M. W. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, v. 30, p. 119-126, 2004a.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; MIZELL III, R. F.; CONTRELL, T. E.; HORTON, D. L. Measuring field efficacy of *Steinernema feltiae and Steinernema riobrave* for suppression of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, larvae. **Biological Control**, v. 30, p. 496-503, 2004b.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; TYLKA, G. L.; BERRY, E. C.; LEWIS, L. C. Effects of earthworms on the dispersal of *Steinernema* spp. **Journal of Nematology**, v. 27, p. 21-28, 1995.

SHIELDS, E. J.; TESTA, A.; MILLER, J. M.; FLANDERS, K. L. Field eYcacy and persistence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' and *H. bacteriophora* 'NC' on alfalfa snout beetle larvae (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, v. 28, p. 128–136, 1999.

SILVA, A. C.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; RAGA, A.; SCHMIDT, F. S. Efeito de nematoides entomopatogênicos na mortalidade da mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, e do gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii*. **Nematologia Brasileira**, v. 34, p. 31-40, 2010.

SILVA-FILHO, G.; BAILEZ, O. E.; VIANA-BAILEZ, A. M. Dimorfismo sexual do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 520-524, 2007.

SILVA, S. H. M. G.; NATALE, W.; SANTOS, E. M. H.; BENDINI, H. N. Fert-goiaba: software para recomendação de calagem e adubação para goiabeira cultivar Paluma, irrigada e manejada com poda drástica. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Eds.). **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização**. Jabuticabal: UNESP, 2009. p. 281-283. (volume 1).

SIRJANI, F. O.; LEWIS, E. E.; KAYA, H. K. Evaluation of entomopathogenic nematodes against the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, v. 48, p. 274-280, 2009.

SOBCZACK, A. As musas da lavoura. **Panorama Rural**, p. 47-55, 2009.

SOUZA, A. C. **Preços agrícolas frutas cítricas: singularidades do mercado**. maio/jun. p. 8-10, 2001.

SOUZA FILHO, M. F.;COSTA, V. A. Manejo integrado de pragas na goiaba. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Eds.). **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização**. Jabuticabal: UNESP, 2009. p. 327-348. (volume 2).

SOUZA FILHO, M. F.; RAGA, A.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas nos Estados brasileiros: São Paulo. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 277-283.

SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A.; ROZANE, D. E.; NATALE, W. Pesquisa com goiabeira (*Psidium guajava* L.) no Brasil: breve histórico e perspectivas futuras. In:

NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Eds.). **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização**. Jabuticabal: UNESP, 2009. p. 27-82. (volume 1).

SOUZA, J. C.; HAGA, A.; SOUZA, M. A. **Pragas da goiabeira**. Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 2003. 60 p. (Boletim Técnico, 71).

SOUZA, J. F.; SOUZA, S. A. S.; AGUIAR – MENEZES, E. L.; FERRARA, F. A. A.; NASCIMENTO, S. A.; RODRIGUES, W. C.; CASSINO, P. C. R. Diversidade de moscas-das-frutas em pomares de citros no município de Araruama, RJ. **Ciência Rural**, v.38, p.518-521, 2008.

STARK, J. E. P.; LACEY, L. A. Susceptibility of western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) to five species of entomopathogenic nematodes in laboratory studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 206-208, 1999.

STUART, R. J.; BARBERCHECK, M. E.; GREWAL, P. S.; TAYLOR, R. A. J.; HOY, C. W. Population biology of entomopathogenic nematodes: concepts, issues, and models. **Biological Control**, v. 38, p. 80-102, 2006.

STUART, R. J., LEWIS, E. E., GAUGLER, R. Selection alters the pattern of emergence from the host cadaver in the entomopathogenic nematode, *Steinernema glaseri*. **Parasitology**, v. 113, p. 183–189, 1996.

THURSTON, G. S.; KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Characterizing the enhanced susceptibility of milky disease-infected scarabaeid grubs to entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 4, p. 67-73, 1994.

TIMPER, P.; KAYA, H. K. Role of the second-stage cuticle of entomogenous nematodes in preventing infection by nematophagous fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 54, p. 314-321, 1989.

TODA FRUTA. **Goiaba**. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br>. Acesso em: 19 jan. 2010.

TOLEDO, J.; IBARRA, J. E.; LIEDO, P.; GÓMEZ, A.; RASGADO, M. A.; WILLIAMS, T. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 15, p. 627-634, 2005a.

TOLEDO, J.; GURGÚA, J. L.; LIEDO, P.; IBARRA, J. E.; OROPEZA, A. Parasitismo de larvas y pupas de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) por el nematodo *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae). **Vedalia**, v. 8, p. 27–36, 2001.

TOLEDO, J.; PÉREZ, C.; LIEDO, P.; IBARRA, J. E. Susceptibilidad de larvas de *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera:Tephritidae) a *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae) en condiciones de laboratorio. **Vedalia**, v. 12, p. 11–22, 2005b.

TOLEDO, J.; RASGADO, M. A.; IBARRA, J. E.; GÓMEZ, A.; LIEDO, P.; WILLIAMS, T. Infection of *Anastrepha ludens* following soil applications of *Heterorhabditis bacteriophora* in mango orchard. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 119, p. 155–162, 2006a.

TOLEDO, J.; ROJAS, R.; IBARRA, J. E. Efficiency of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) on *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae) larvae under laboratory conditions. **Florida Entomology**, v. 89, p. 524-526, 2006b.

TOLEDO, J.; WILLIAMS, T.; PÉREZ, C.; LIEDO, P.; VALLE, J. F.; IBARRA, J. E. Abiotic factors affecting the infectivity of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) on larvae *Anastrepha obliqua* (Diptera:Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 19, p. 887-898, 2009.

TORR, P.; HERITAGE, S.; WILSON, M. J. Vibrations as a novel signal for host location by parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 997-999, 2004.

TUPY, O.; MANCINELI, C.; COSTA, V. M. H. M. **Estratégias produtivas e sustentabilidade de pequenos produtores rurais**. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/13/419.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2010.

TURRA, C.; GHISI, F. **Laranja orgânica no Brasil: produção, mercado e tendências**. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/12/01P052.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2010.

UCHÔA-FERNANDES, M. A.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas nos Estados brasileiros: Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 241-245.

URAMOTO, K. **Diversidade de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae) em pomares comerciais de papaia e em áreas remanescentes da Mata Atlântica e suas plantas hospedeiras nativas, no município de Linhares, Espírito Santo**. 2007. 105 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

YEE, W. L.; LACEY, L. A. Stage-specific mortality of *Rhagoletis indifferens* (Diptera:Tephritidae) exposed to three species of *Steinernema* nematodes. **Biological Control**, v. 27, p. 349-356, 2003.

WANG, Y.; GAUGLER, R.; CUI, L. Variation in immune response of *Popillia japonica* and *Acheta domesticus* to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* species. **Journal of Nematology**, v. 26, p. 11-18, 1994.

WATANABE, H. S. Comercialização de goiaba no mercado nacional. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Eds.). **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização**. Jabuticabal: UNESP, 2009. p. 133-150. (volume 1).

WOMERSLEY, C. Z. Dehydration survival and anhydrobiotic potential. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Eds.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 117-137.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 13-24.

_____. Mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). In VILELA, A.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. (Eds.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil.** Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.15-41.

II CAPÍTULO – ARTIGO: AVALIAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Heterorhabditidae) NO CONTROLE DE MOSCA-DAS-FRUTAS (Diptera: Tephritidae)

RESUMO

Anastrepha fraterculus e *Ceratitis capitata* foram identificadas como as principais pragas que infestam a cultura de citros no estado de São Paulo. Esses insetos passam parte de seu ciclo de vida no solo, tornando-se alvo dos nematoides entomopatogênicos. Em laboratório, avaliou-se a virulência dos isolados *Heterorhabditis sp. IBCB n44, Heterorhabditis sp. IBCB n45, Heterorhabditis sp. IBCB n46, H. indica IBCB n5 e H. amazonensis* IBCB n24, na dose de 50 JIs/Inseto, contra pré-pupas de *A. fraterculus* e *C. capitata*, considerando-se seis tratamentos e sete repetições. Dez pré-pupas foram liberadas em potes, e os isolados foram aplicados na superfície. A avaliação foi realizada após 12 e 15 dias da aplicação dos tratamentos para *C. capitata* e *A. fraterculus*, respectivamente, com base no número de insetos adultos emergidos. Avaliou-se a suscetibilidade de diferentes fases de *C. capitata* ao *H. amazonensis* IBCB n24. Consideraram-se cinco tratamentos e dez repetições: *H. amazonensis* na dose de 200 JIs/Inseto aplicados contra *C. capitata* nas fases de pré-pupa e pupas com três, seis e nove dias de desenvolvimento e testemunha. Os insetos foram liberadas em potes, e o *H. amazonensis* foi aplicado na superfície da areia. A avaliação ocorreu após 12 dias com base no número de adultos emergidos e na verificação da mortalidade de pupas. Em campo de citros, avaliou-se o efeito de doses do *H. amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *A. fraterculus* e *C. capitata*. Consideraram-se quatro tratamentos: *H. amazonensis* nas doses de $1x10^8$, $3,5x10^8$ e $1x10^9$ JIs/ha e testemunha, aplicados na projeção da copa da planta, onde foram enterrados oito envelopes contendo 100g de solo e dez pré-pupas do inseto. A avaliação foi realizada após 16 dias da aplicação do nematoide para *C. capitata* e após 26 para *A. fraterculus,* com base no número de adultos emergidos. Determinou-se a persistência do *H. amazonensis* IBCB n24 em campo de citros e seu efeito na mortalidade de *C. capitata*. Consideraram-se três tratamentos e quatro repetições: *H. amazonensis* nas doses de $1x10^8$ JI/cm^2 e $1x10^9$ JIs/ cm^2 e testemunha, aplicados na projeção da copa da planta, onde foram enterrados parcialmente 10 envelopes com 100g de solo e dez pré-pupas do inseto. As avaliações sobre a persistência ocorreram anteriormente às aplicações e nos dias 6, 20, 33 e 49 das aplicações das doses do *H. amazonensis*. Em cada avaliação retirou-se três amostras de 500 g de solo das parcelas. Cinco larvas de *G. mellonella* foram liberadas nas amostras e avaliadas após cinco dias, segundo a mortalidade dos insetos por nematoides *Heterorhabditis* e *Steinernema*, fungos entomopatogênicos e por outras causas. As avaliações sobre o efeito de *H. amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *C. capitata* ocorreram nos dias 15, 30, 45 e 59 após as aplicações das doses do *H. amazonensis*, de acordo com o número de adultos emergidos nos envelopes. *H. amazonensis* IBCB n24 foi o mais virulento para *A. fraterculus*, proporcionando 70% de mortalidade corrigida. Os isolados *H. indica* IBCB n5*, Heterorhabditis* sp. IBCB n44 e *Heterorhabditis* sp. IBCB n45 foram os mais virulentos para *C. capitata*, proporcionando mortalidade corrigida de 35%, 24% e 32%, respectivamente. *H. amazonensis* proporcionou 40% de mortalidade para pré-pupas de *C. capitata*. Para *A. fraterculus, H. amazonensis* proporcionou níveis de mortalidade corrigida variando de 55% a 67%, enquanto que para *C. capitata* os níveis de mortalidade variaram de 46% a 71%. *H. amazonensis* proporcionou taxas de mortalidade para larvas de *G. mellonella* entre 7% a 68% na dosagem de $1x10^8$ JIs/cm^2 e de 17% a 87% na dosagem de $1x10^9$ JIs/cm^2, sendo

possível constatar a existência de períodos de persistência e de reciclagem do *H. amazonensis* em campo de citros. O elevado índice de mortalidade de insetos nas testemunhas prejudicou a análise dos resultados de avaliação do efeito do *H. amazonensis* na mortalidade de *C. capitata* em campo de citros.

Palavras-chave: *Anastrepha fraterculus*; *Ceratitis capitata*; *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24; persistência.

ABSTRACT

EVALUATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (Rhabditida: Heterorhabditidae) FOR CONTROLLING FRUIT FLY (Diptera: Tephritidae)

Anastrepha fraterculus e *Ceratitis capitata* were identified as the main pest in citrus culture in São Paulo State, Brazil. These insects, as they spend part of their lives cycle in the soil, become the target of entomopathogenic nematodes. In laboratory conditions was evaluated the virulence of *Heterorhabditis* sp. IBCB n44, *Heterorhabditis* sp. IBCB n45, *Heterorhabditis* sp. IBCB n46, *H. indica* IBCB n5 and *H. amazonensis* IBCB n24 isolates, at doses of 50 IJs/Insect against prepupae of *A. fraterculus* e *C. capitata*, considering six treatments and seven repetitions. Ten prepupae were released in pots and the isolates were applied in the surface. Evaluation was done 12 and 15 days after applying treatments for *C. capitata* and *A. fraterculus*, respectively, based on the number of emerged adult insects. It was evaluated the susceptibility of different stages of *C. capitata* to *H. amazonensis* IBCB n24. Five treatments and ten repetitions were considered: *H. amazonensis* at doses of 200 IJs/Insect applied against *C. capitata* in prepupae and pupa on 3, 6 and 9 days of development and control. Insects were released in cups and *H. amazonensis* was applied on sand surface. Evaluation was performed after 12 days based on the numbers of emerged adults and pupae mortality. At a citrus field was evaluated the doses effects of *H. amazonensis* IBCB n24 regarding to the mortality of *A. fraterculus* e *C. capitata.* Four treatments were considered: *H. amazonensis* at doses of $1x10^8$, $3.5x10^8$ and $1x10^9$ IJs/ha and control, applied on cup plant projection in which eight envelops were partially buried with 100g of soil and ten prepupae of the insect. Evaluation was done 16 days after nematode application for *C. capitata* and 26 days for *A. fraterculus* based on the number of emerged adults. It was determined the persistence of *H. amazonensis* IBCB n24 in citrus field and its effect for *C. capitata* mortality. Three treatments and four repetitions were considered: *H. amazonensis* at doses of $1x10^8$ IJs/ cm^2 and $1x10^9$ IJs/ cm^2 and control, applied on cup plant projection in which ten envelops were partially buried with 100g of soil and ten prepupae of the insect. Persistence evaluation occurred applications before and along the days 6, 20, 33 and 49 after applying the doses of *H. amazonensis*. It was taken three 500g of soil samples for each evaluation. Five *G. mellonella* larvae were released on the samples and evaluated five days later according to the insects mortality by *Heterorhabditis* and *Steinernema* nematodes, entomopathogenic fungi and by any other reason. *H. amazonensis* IBCB n24 effect evaluation in *C. capita* mortality was started on days 15, 30, 45 and 59 after the applications of *H. amazonensis* doses according to the numbers of emerged adults in the envelops. *H. amazonensis* IBCB n24 was the most virulent for *A. fraterculus*, providing 70% corrected mortality. For *C. capitata,* the most virulent isolates were *H. indica* IBCB n5*, Heterorhabditis* sp. IBCB n44 and *Heterorhabditis* sp. IBCB n45, with corrected mortality of 35%, 24% and 32%, respectively. *H. amazonensis* caused 40% of *C. capitata* prepupae mortality. For *A. fraterculus,* H. *amazonensis* caused levels of mortality ranged from 55 % to 67%. *C. capitata* levels of mortality ranged from 46% to 71%. *H.* amazonensis presents mortality rate for *G. mellonella* larvae from 7% to 68% at doses of $1x10^9$ IJs/cm^2 what was possible to identify the existence of persistence and recycling periods of *H. amazonensis* in citrus field. The high level of insect mortality in control damaged the analysis results evaluation for *H. amazonensis* effect in mortality of *C. capitata* at a citrus field.

Key-words: *Anastrepha fraterculus*; *Ceratitis capitata*; *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24; persistence.

I INTRODUÇÃO

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) contam com aproximadamente 4.448 espécies descritas em 484 gêneros (NORRBOM, 2010) e estão distribuídas nas regiões temperadas, tropicais e subtropicais (ALUJA, 1994).

O gênero *Anastrepha* Schiner, 1868, é composto por 212 espécies (URAMOTO, 2007) e é o mais importante, economicamente, nas Américas. O Brasil é um dos países com maior diversidade de *Anastrepha* (HERNÁNDEZ-ORTIZ e ALUJA, 1993), assinalando 95 espécies (ZUCCHI, 2000; RONCHI-TELES, 2000), das quais sete são importantes economicamente: *A. fraterculus* (Wiedemann), *A. grandis* (Macquart), *A. obliqua* (Macquart), *A. pseudoparallela* (Loew), *A. sororcula* Zucchi, *A. striata* Schiner e *A. zenilde* Zucchi (ZUCCHI, 2000).

Ceratitis capitata (Wiedemann, 1824), conhecida como mosca-do-mediterrâneo, é originária da Região Noroeste da África (NÚÑEZ-BUENO, 1987). Está amplamente distribuída nas regiões temperadas e tropicais de todo o mundo. Foi introduzida no Brasil no início do século XX, ocorre em 16 estados brasileiros e está associada a 58 espécies de frutíferas de 21 famílias (ZUCCHI, 2001). *A. fraterculus* e *C. capitata* foram identificadas como as principais pragas que infestam a cultura de citros no estado de São Paulo (MALAVASI e MORGANTE, 1980; MALAVASI et al., 1980; FERNANDES, 1987; SOUZA FILHO et al., 2000; RAGA et al., 2004; GRAVENA et al., 2010).

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas com aproximadamente 18 milhões de toneladas na produção da safra de 2008/2009. Os Estados Unidos aparecem em segundo lugar com 9.140.790 t e a Índia em terceiro com 4.396.700 t (FAO, 2011). O estado de São Paulo foi, em 2009, o maior produtor de laranja do Brasil com 566.652 ha de área plantada e produção de 13.642.165 t (IBGE, 2011).

Um dos fatores que vêm contribuindo para a redução dessa produção são, segundo Gravena et al. (2010), as moscas-das-frutas. Trabalho recente aponta para um potencial de dano variável de 1,2 a 4,1 t de frutos por hectare para a ocorrência, especificamente, de *C. capitata*.

O dano ocasionado pelas moscas-das-frutas pode ser indireto, provocado pelas fêmeas, ao introduzirem o acúleo no fruto para deposição dos ovos, o que leva à infecção por microrganismos e ao processo de podridão do fruto; pode ser direto, causado pela alimentação e desenvolvimento das larvas na polpa, o que torna o fruto

impróprio para consumo. Nos dois casos, os frutos antecipam o processo de maturação, com consequente queda prematura. O ataque de insetos pode resultar em destruição total dos frutos e propiciar primeira geração de adultos (GRAVENA et al., 2010).

As larvas de terceiro instar saem do fruto, penetram de 2 a 8 cm no perfil do solo ao redor da planta hospedeira e se empupam entre 2 a 12 horas. O adulto emerge da pupa em torno de 10 a 15 dias, rasteja próximo à vegetação até que o seu tegumento endureça. Após sete dias a reprodução tem início (LINDEGREN e VAIL, 1986; GREWAL et al., 2001).

O controle químico tem sido a principal ferramenta usada para a supressão de populações de moscas-das-frutas (ALUJA, 1994). Contudo, preocupações com segurança alimentar, contaminação ambiental, declínio da biodiversidade têm conduzido à busca de estratégias de controle ambientalmente seguras, com vistas a minimizar impactos negativos ao ambiente e a garantir agricultura sustentável. Tais estratégias incluem o uso de nematoides entomopatogenicos contra as moscas-das-frutas.

Os nematoides entomopatogênicos dos gêneros Steinernema e Heterorhabditis se relacionam mutualisticamente com bactérias dos gêneros Xenorhabdus e Photorhabdus, respectivamente, e têm se mostrado eficazes como agentes de controle biológico de diversas pragas, em diversas partes do mundo. Os juvenis infectivos constituem o único estágio de vida livre do ciclo vital dos nematoides. Carregam a bactéria em seu intestino, entram no hospedeiro, principalmente, pelas aberturas naturais, liberando a bactéria na hemocele, o que causa a morte do inseto entre 24 a 72 horas (FORST E CLARKE, 2002). Os nematoides se alimentam da bactéria e dos tecidos em decomposição, passam de uma a três gerações nos insetos. Em seguida, os juvenis passam ao estado infectivo e deixam o cadáver em busca de novos hospedeiros (BOEMARE, 2002).

A patogenicidade de várias espécies de esteinernematídeos e heterorhabditídeos para as moscas-das-frutas como *C. capitata* (LINDEGREN e VAIL, 1986; LINDEGREN et al., 1990; GAZIT et al., 2000; KARAGOZ et al., 2009; MALAN; MANRAKHAN, 2009; ROHDE et al., 2010 e SILVA et al., 2010), *Anastrepha suspensa* (Loew) (BEAVERS e CALKINS, 1984), *A. ludens* (Loew) (LEZAMA-GUTIERREZ et al., 1996; 2006; TOLEDO et al., 2001; 2005a; 2006a), *A. obliqua* Macquart (TOLEDO et al., 2005b; 2009), *A. serpentina* (Wiedemann) (TOLEDO et al., 2006b), *A. fraterculus* (Wiedemann) (BARBOSA-NEGRISOLI et al.,

2009), *Rhagoletis indifferens* Curran (STARK e LACEY, 1999; YEE e LACEY, 2003), *Bactrocera zonata* (Saunders) (MOHMOUD e OSMAN, 2007) e *B. oleae* (Rossi) (SIRJANI et al., 2009) indicam que os nematoides merecem ser analisados em razão do controle biológico para esses Tephritidae. A maioria dos trabalhos realizados sobre o assunto tem sido conduzida em laboratório, os experimentos de campo são escassos.

Para o estudo aqui desenvolvido buscou-se atender os seguintes objetivos: avaliar, em condições de laboratório, a virulência de isolados do gênero *Heterorhabditis* contra *A. fraterculus* e *C. capitata*, a suscetibilidade de diferentes fases de *C. capitata* ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24; avaliar, em condições de campo de citros, o efeito de doses do *H. amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *A. fraterculus* e *C. capitata*, e determinar a persistência do *H. amazonensis* IBCB n24 no solo e seu efeito contra *C. capitata*.

II MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Testes de laboratório

Os testes de laboratório foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, Campinas, SP. As espécies de nematoides entomopatogênicos usados foram obtidas da coleção de organismos entomopatogênicos "Coleção Oldemar Cardim Abreu" do Instituto Biológico.

Os nematoides *Heterorhabditis* sp. IBCB n44, *Heterorhabditis* sp. IBCB n45, *Heterorhabditis* sp. IBCB n46, *H. indica* IBCB n5 e *H. amazonensis* IBCB n24 foram multiplicados em larvas de último instar de *Galleria mellonella* (L.) (Pyralidae: Lepidoptera) criadas conforme metodologia adaptada por Machado (1988). Os juvenis infectivos foram colhidos em armadilha de White (WHITE, 1927), de acordo com os procedimentos descritos por Kaya e Stock (1997).

As larvas em fase de pré-pupas de *A. fraterculus* e *C. capitata* foram obtidas de colônias mantidas em dieta artificial no Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Esalq/USP, Campus Piracicaba.

2.1.1 Virulência de isolados do gênero *Heterorhabditis* contra *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

O teste de laboratório teve por objetivo avaliar a virulência de cinco isolados do gênero *Heterorhabditis* (*Heterorhabditis* sp. IBCB n44, *Heterorhabditis* sp. IBCB n45, *Heterorhabditis* sp. IBCB n46, *H. indica* IBCB n5 *e H. amazonensis* IBCB n24), nativos do estado de São Paulo, contra pré-pupas de *A. fraterculus* e *C. capitata*. Para cada espécie de inseto consideraram-se seis tratamentos constituídos pelos isolados na dose de 50 JIs/Inseto e pela testemunha (água destilada), e sete repetições.

Para cada espécie de inseto (*A. fraterculus* e *C. capitata*) preparam-se 42 potes de plástico de 9 cm de diâmetro por 4 cm de altura contendo aproximadamente 287 g de solo arenoso com 10% de umidade (peso/peso). Dez pré-pupas eclodidas da dieta foram liberadas em cada um dos potes e aguardou-se o tempo necessário para que elas se enterrassem. Em seguida, aplicaram-se os isolados de *Heterorhabditis* sobre a superfície do solo, com auxílio de pipeta, no volume de 1 mL/pote, considerando-se uma calda de 400 litros por hectare. Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas em cinco pontos, para a aeração, e acondicionados em câmara climatizada sob temperatura, umidade relativa e luminosidade controladas (T= 25 ± 1ºC, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Realizou-se a avaliação após 12 e 15 dias da aplicação dos tratamentos para *C. capitata* e *A. fraterculus*, respectivamente, com base no número de insetos adultos emergidos.

Os dados obtidos em relação à mortalidade de *A. fraterculus* e *C. capitata* foram transformados em arcsen $\sqrt{x/100}$, submetidos à análise de variância e, comparadas as médias pelo teste de Tukey (P<0,05). Ajustou-se a mortalidade pela fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925).

2.1.2 Suscetibilidade de diferentes fases de *Ceratitis capitata* ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24

Para avaliar a susceptibilidade de diferentes fases de *Ceratitis capitata* ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24, utilizou-se como unidades experimentais potes de plástico de 9 cm de diâmetro por 5,6 cm de altura com, aproximadamente, 215 g de areia lavada, esterilizada e ajustada a 10% de umidade (peso/peso). Consideraram-se cinco tratamentos, representados pelo isolado *H. amazonensis* na dose de 200 JIs/Inseto, aplicados contra *C. capitata* nas fases de pré-

pupa e pupas com três, seis e nove dias de desenvolvimento e pela testemunha, e dez repetições.

As larvas de *C. capitata* coletadas da dieta foram liberadas sobre o solo de cada pote (dez larvas/pote), e aguardou-se o tempo necessário para que elas se enterrassem. Aplicaram-se os juvenis infectivos do *H. amazonensis* (200 JIs/Inseto), de modo uniforme sobre a superfície da areia de cada pote, com auxílio de pipeta, no volume de 2 mL/pote, nas seguintes fases do desenvolvimento da *C. capitata*: pré-pupas, imediatamente após terem se enterrado e pupas com três, seis e nove dias de desenvolvimento. A testemunha recebeu apenas água.

Os tratamentos foram cobertos com tampa plástica, perfurada em vários pontos com aproximadamente 1 mm de diâmetro, e acondicionados em câmara climatizada sob temperatura, umidade relativa e luminosidade controladas (T= 25 ± 1ºC, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Avaliou-se o teste 12 dias após, com base no número de adultos emergidos e na verificação da mortalidade de pupas por nematoide pela dissecação sob microscópio estereoscópio.

Os dados obtidos relativos à mortalidade de *C. capitata* foram transformados em arcsen $\sqrt{x/100}$, submetidos à análise de variância e, comparadas as médias pelo teste de Tukey (P<0,05).

2.2 Testes de campo

Conduziram-se os testes em pomar de citros (variedade pêra), com oito anos de desenvolvimento, em área com aproximadamente 300 árvores por hectare, da empresa Citrovita Agro Pecuária LTDA (23°35’08’’S, 48°02’50’’W, altitude 656 m), localizada na Estrada Municipal, Km 1 S/N, em Itapetininga, SP. O solo do local é de classificação textural franco-argilo-arenosa (26% argila, 16,6% silte, 57,4% areia total).

O nematoide *H. amazonensis* IBCB n24 foi obtido de multiplicação *in vitro* pelo processo de esponja (BEDDING, 1984), colhido como JIs imediatamente após a extração. *A. fraterculus* e *C. capitata* foram procedentes do CENA/Esalq.

2.2.1 Efeito de doses do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

Instalou-se o teste durante os meses de novembro e dezembro de 2008 para se avaliar o efeito de doses do nematoide *H. amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *A. fraterculus* e *C. capitata*. Consideraram-se, para cada inseto, quatro tratamentos (organizados em blocos) representados pelo nematoide nas doses de $1x10^8$, $3,5x10^8$ e $1x10^9$ JIs/ha e pela testemunha. Cada tratamento foi representado por uma planta de citros e instalado na projeção da copa da planta. Foi separado entre si por uma planta não tratada. Utilizou-se uma linha de plantas de citros não tratadas para separar os blocos. Retirou-se do solo de cada tratamento a palhada e o mato com auxílio de enxada. Regou-se o solo com 4 L de água/planta. Em seguida oito envelopes, preparados com tela de plástico (12 fios/cm linear) de 20 x 20 cm, fechados com grampos em três dos quatro lados, foram distribuídos na área e enterrados parcialmente (Figura 1). A extremidade acima do nível do solo permaneceu aberta. Colocou-se, em cada envelope, cerca de 100g de solo do local, liberaram-se dez insetos na fase de pré-pupa. Aplicou-se o nematoide em solução aquosa, com auxílio de regador na vazão equivalente de 2 L/planta, procurando-se atingir o interior dos envelopes. Em seguida, os envelopes foram fechados. A avaliação foi realizada 16 e 26 dias após a aplicação do nematoide para *C. capitata* e *A. fraterculus*, respectivamente, com base no número de adultos emergidos nos envelopes.

Figura 1. Envelopes de tela de plástico (12 fios/cm linear) de 20 x 20 cm, contendo pré-pupas de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* distribuídos em área da Citrovita, Itapetininga, SP.

Os dados relacionados à mortalidade de insetos foram transformados em arcsen $\sqrt{x/100}$, submetidos à análise de variância e, comparadas as médias pelo teste de Duncan (P < 0,05). Corrigiu-se a mortalidade pela Fórmula de Abbott.

2.2.2 Persistência de *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 no solo e efeito contra *Ceratitis capitata*

No período de 22 de janeiro a 23 de março de 2009, instalou-se o teste para avaliar-se a persistência do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 no solo e seu efeito na mortalidade de *Ceratitis capitata*. No período do experimento a temperatura média flutuou entre 20,2°C e 27,7°C e a chuva acumulada foi de 454,6 mm.

Consideraram-se três tratamentos, representados pelo *H. amazonensis* nas doses de $1x10^8$ JIs/cm^2 e $1x10^9$ JIs/ cm^2 e pela testemunha (apenas água), instalados nas projeções das copas das plantas de citros. Estabeleceram-se, para cada tratamento, quatro repetições. Cada repetição constituiu-se de uma parcela com aproximadamente 2m de raio. O experimento foi instalado em blocos ao acaso, com uma planta de citros separando as parcelas/tratamentos, e uma linha de plantas separando os blocos.

Retirou-se do solo do local do teste a palhada e o mato com auxílio de enxada. Regou-se o solo com 4 L de água/planta. Em seguida dez envelopes, preparados com tela de plástico (12 fios/cm linear) de 20 x 20 cm, fechados com grampos em três dos quatro lados, foram distribuídos na área e enterrados parcialmente com a extremidade aberta acima do nível do solo. Colocou-se em cada envelope cerca de 100g do solo. Em seguida, liberaram-se dez pré-pupas de *C. capitata*. Aplicou-se o nematoide *H. amazonensis* em solução aquosa, com auxílio de regador na vazão equivalente de 2 L/planta, procurando-se atingir o interior dos envelopes. Em seguida, os envelopes foram fechados.

Realizou-se o monitoramento da persistência do *H. amazonensis* por meio de avaliações ocorridas nos seguintes períodos: anteriormente às aplicações e 6, 20, 33 e 49 dias após as aplicações das doses do nematoide. Para cada avaliação, retiraram-se aleatoriamente de cada parcela três amostras de solo com auxílio de enxadão. Cada amostra constituiu-se de cerca de 500 g de solo o qual foi obtido do perfil do solo de até 15 cm de profundidade. Foi colocada em saco plástico, etiquetada, transportada ao Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico em Campinas e transferida para pote plástico.

Utilizaram-se larvas de *G. mellonella*, obtidas de criação artificial, como iscas atrativas para o *H. amazonensis* (a persistência do nematoide é indicada pelo número de iscas infectadas). Para facilitar a localização dos insetos no momento da avaliação da mortalidade, cinco larvas de *G. mellonella* foram agrupadas em envelope de tela de metal (malha 30 fios/cm), com 10 x 6 cm, contendo 35 g de solo retirado da amostra do pote plástico. O envelope foi fechado nas laterais com grampos para se evitar a fuga dos insetos e enterrado a 5 cm de profundidade no pote plástico. Em cada pote adicionou-se cerca de 100 mL de água visando a garantir condições de pelo menos 15% de umidade no solo para a atuação dos entomopatógenos.

Os potes foram acondicionados por cinco dias em câmara climatizada sob temperatura, umidade relativa e luminosidade controladas (T= 25 ± 1ºC, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Após esse período, os envelopes foram retirados e abertos com vista a se avaliar a mortalidade dos insetos por nematoides dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, por fungos entomopatogênicos e por outras causas.

Consideraram-se insetos mortos por nematoides aqueles que apresentaram corpo flácido, com vermes emergindo do cadáver. Entre esses foram identificados os resultantes de mortes provocadas por *Heterorhabditis* que tinham coloração avermelhada. Consideraram-se mortes por fungos os cadáveres mumificados. As larvas mortas com corpo flácido foram transferidas para armadilhas de White adaptadas, com vistas a se confirmar a morte por nematoides entomopatogênicos e a se isolar esses agentes.

Realizaram-se as avaliações relacionadas ao efeito de *H. amazonensis* na mortalidade de *C. capitata* nos dias 15, 30, 45 e 59 após a aplicação das doses do *H. amazonensis*, removendo-se os envelopes do solo que eram substituídos por outros similares, seguindo-se a metodologia descrita anteriormente, contudo, sem a aplicação do nematoide. Os envelopes foram levados ao Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico e foram abertos para avaliação quanto ao número de adultos emergidos. As pupas encontradas foram dessecadas sob microscópio estereoscópio para verificação da presença de nematoides. As pupas sem nematoides foram consideradas não infectadas.

Os dados relacionados à mortalidade de insetos foram transformados em arcsen $\sqrt{x/100}$, submetidos à análise de variância e, comparadas as médias pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Corrigiu-se a mortalidade pela Fórmula de Abbott.

III RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados

3.1.1 Virulência de isolados do gênero *Heterorhabditis* contra *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

No estudo demonstrou-se que o inseto *Anastrepha fraterculus* é mais suscetível aos nematoides testados, quando comparado com *Ceratitis capitata*. Para *A. fraterculus*, o nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 foi o mais virulento, com 70% de mortalidade corrigida (Figura 2), apesar de não ter diferido significativamente do isolado *H. indica* IBCB n5 (63% de mortalidade corrigida) quanto à mortalidade real (Figura 2). Para *C. capitata*, os isolados mais virulentos foram *H. indica* IBCB n5, *Heterorhabditis* sp. IBCB n44 e *Heterorhabditis* sp. IBCB n45, os quais proporcionaram mortalidade corrigida de 35%, 24% e 32%, respectivamente (Figura 3), não diferindo significativamente entre si, mas apresentando diferença estatística em relação à testemunha quanto à mortalidade real (Figura 2). Os demais isolados não apresentaram resultados satisfatórios quanto ao efeito sobre os insetos.

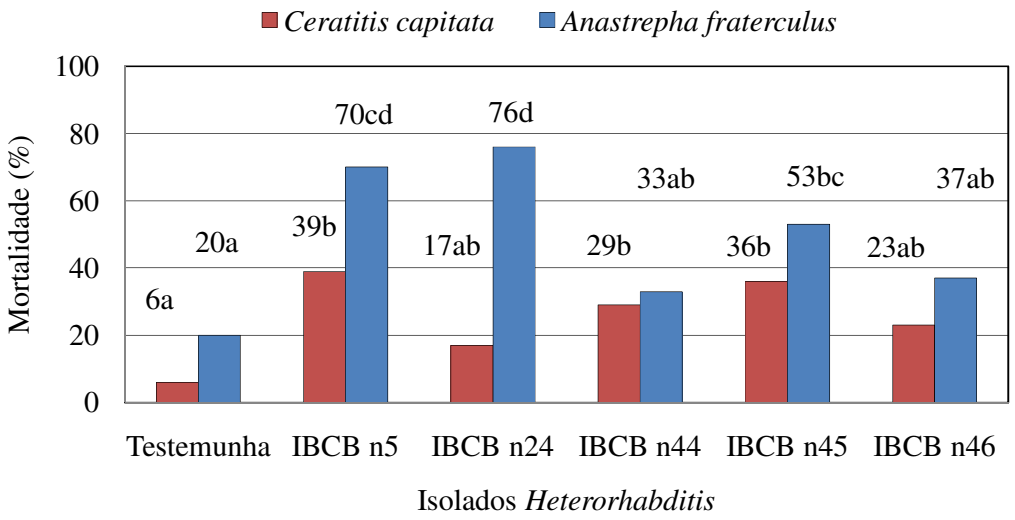

Figura 2. Mortalidade observada de pré-pupas de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus* expostas aos isolados *Heterorhabditis indica* IBCB n5 (IBCB n5), *H. amazonensis* IBCB n24 (IBCB n24), *Heterorhabditis* sp. IBCB n44 (IBCB n 44), *Heterorhabditis* sp. IBCB n45 (IBCB n45) e *Heterorhabditis* sp. IBCB n46 (IBCB n46), na dose de 50 JIs/Inseto, em laboratório (T= 25 ± 1ºC, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

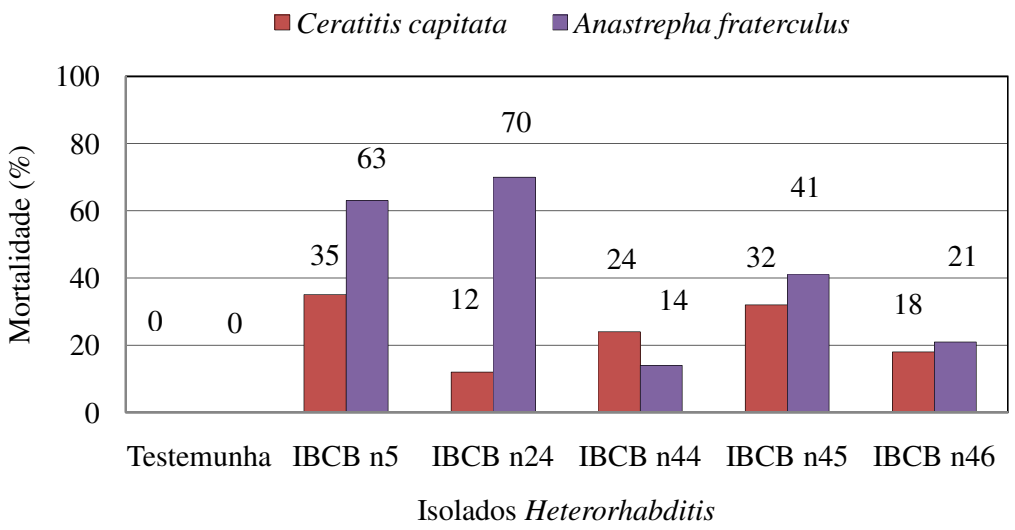

Figura 3. Mortalidade corrigida (formula de Abbott) de pré-pupas de *Ceratitis capitata* e *Anastrepha fraterculus* expostas aos isolados *Heterorhabditis indica* IBCB n5 (IBCB n5), *H. amazonensis* IBCB n24 (IBCB n24), *Heterorhabditis* sp. IBCB n44 (IBCB n 44), *Heterorhabditis* sp. IBCB n45 (IBCB n45) e *Heterorhabditis* sp. IBCB n46 (IBCB n46), na dose de 50 JIs/Inseto, em laboratório (T= 25 ± 1ºC, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas).

3.1.2 Suscetibilidade de diferentes fases de *Ceratitis capitata* ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24

Heterorhabditis amazonensis IBCB n24 proporcionou níveis significativamente diferentes de mortalidade ($F = 12,22$ $P < 0,01$) entre pré-pupas (40%) e pupas de três dias (14%), seis dias (22%) e nove dias (8%) de desenvolvimento e a testemunha. A mortalidade na testemunha foi de 5% e nenhuma infecção foi observada (Figura 4).

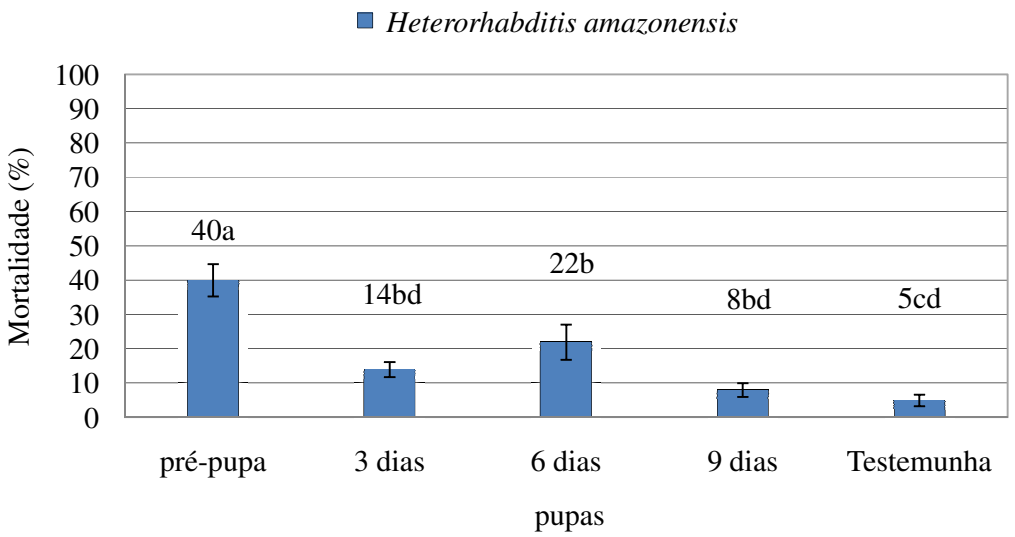

Figura 4. Mortalidade de pré-pupas de *Ceratitis capitata* expostas a *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24, na dose de 200 JIs/Inseto, em laboratório (T= 25 ± 1ºC, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas), (F = 12,22 P < 0,01). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.1.3 Efeito de doses do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

Para *Ceratitis capitata, Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 proporcionou níveis de mortalidade corrigida que variaram de 46% a 71% (Figura 5), para *Anastrepha fraterculus*, proporcionou níveis de mortalidade que variaram de 55% a 67% (Figura 6). Ocorreu diferença significativa entre os diferentes tratamentos, quando comparados às testemunhas, no que se refere à mortalidade observada. Isso indica que *H. amazonensis* causou mortalidade dos insetos nas três doses testadas, não havendo diferença significativa entre elas.

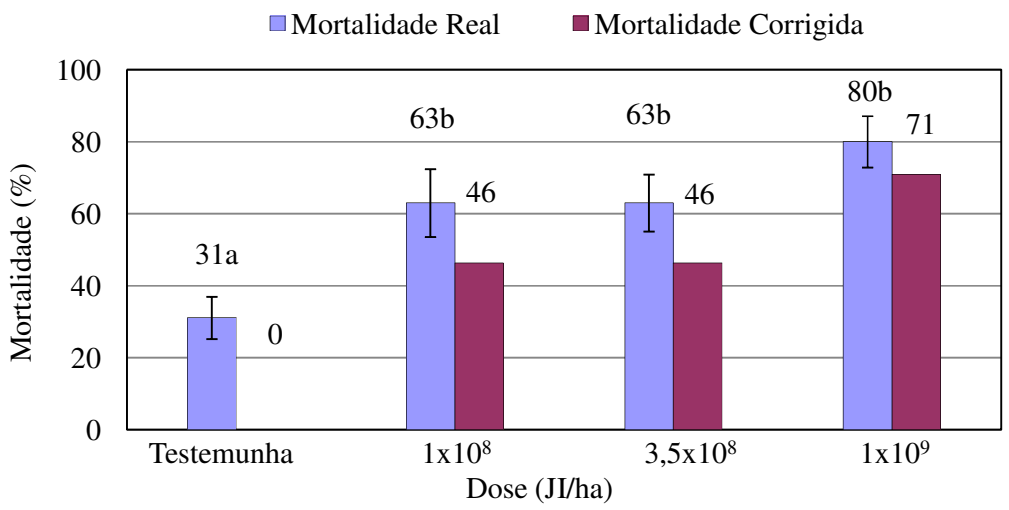

Figura 5. Mortalidade real e corrigida (fórmula de Abbott) de *Ceratitis capitata* exposto, na fase de pupa, a diferentes doses do isolado *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24, em campo de citros, área da Citrovita, Itapetininga, SP. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

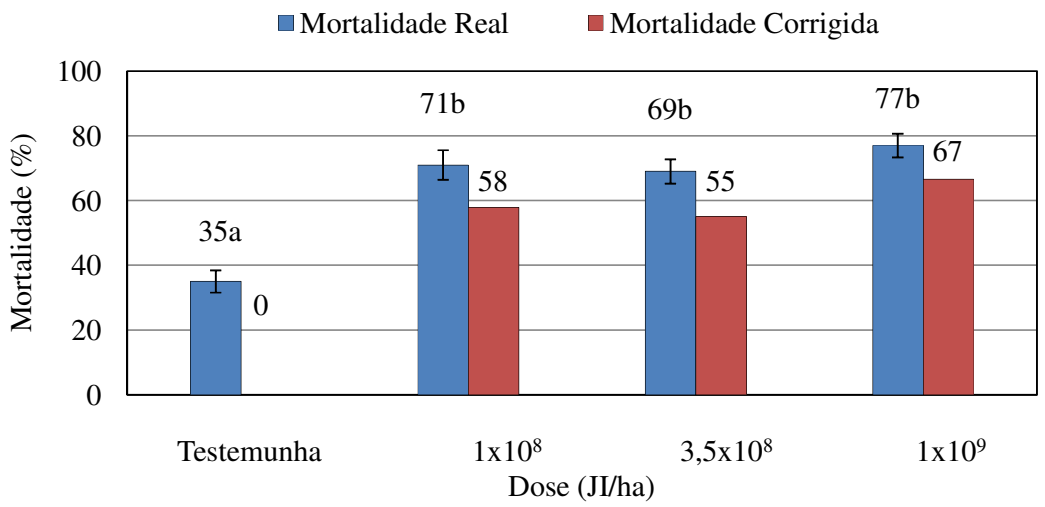

Figura 6. Mortalidade real e corrigida (fórmula de Abbott) do inseto *Anastrepha fraterculus* exposto, na fase de pupa, a diferentes doses do isolado *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24, em campo de citros, área da Citrovita, Itapetininga, SP. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

3.1.4 Persistência de *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 no solo e efeito contra *Ceratitis capitata*

Amostragem anterior à aplicação do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 no solo de campo de citros, em que se utilizaram larvas de *G. mellonella* como iscas atrativas, não detectou presença de nenhuma espécie de nematoide entomopatogênico nas parcelas do experimento. Na amostragem correspondente a seis dias após a aplicação do nematoide, *H. amazonensis* causou mortalidade de 68% e 87% de larvas de *G. mellonella* nas doses de $1x10^8$ e $1x10^9$ JIs/cm^2, respectivamente, o que indica sucesso no estabelecimento desse agente na área experimental (Figura 7).

Nas três avaliações seguintes *H. amazonensis* persistiu, causando mortalidade nas larvas de *G. mellonella* de 18% a 35% aos 20 dias, de 17% a 38% aos 33 dias, de 33% a 77% aos 49 dias após a aplicação do nematoide (Figura 7).

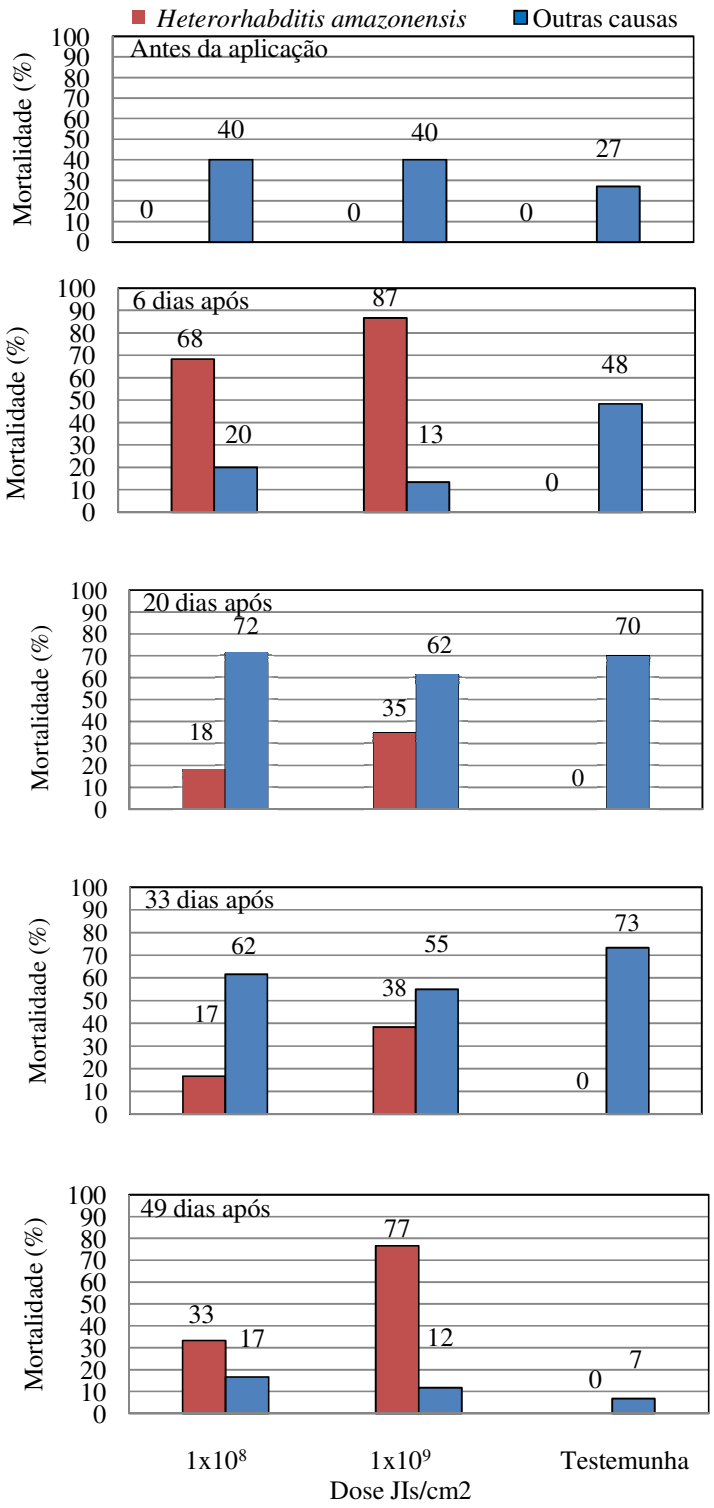

Figura 7. Mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* pelo nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24, expostas ao solo de campo de citros, coletado anteriormente e, em diferentes dias, após a aplicação do *H. amazonensis*.

Na primeira avaliação (15 dias após a aplicação das doses de nematoide) relacionada ao efeito do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 contra *Ceratitis capitata*, o nematoide proporcionou 22% e 65% de mortalidade de *C. capitata* nas doses de $1x10^8$ e $1x10^9$ JIs/cm^2, respectivamente, segundo dados transformados pela fórmula de Abbott (Figura 7). Não houve diferença significativa entre as taxas de mortalidade real proporcionada pelos tratamentos ao nível de 5% de probabilidade (F = 4,053 P = 0,0555).

Nas duas avaliações seguintes ocorreu elevado índice de mortalidade de *C. capitata* nas testemunhas (30 e 45 dias após a aplicação das doses de nematoide), o que prejudicou a análise real dos dados e a transformada pela fórmula de Abbott. Na última avaliação, aos 59 dias da aplicação, observou-se queda na taxa de mortalidade na testemunha para 44%, e não ocorrência de maiores taxas de mortalidade nos grupos tratados (Figura 8).

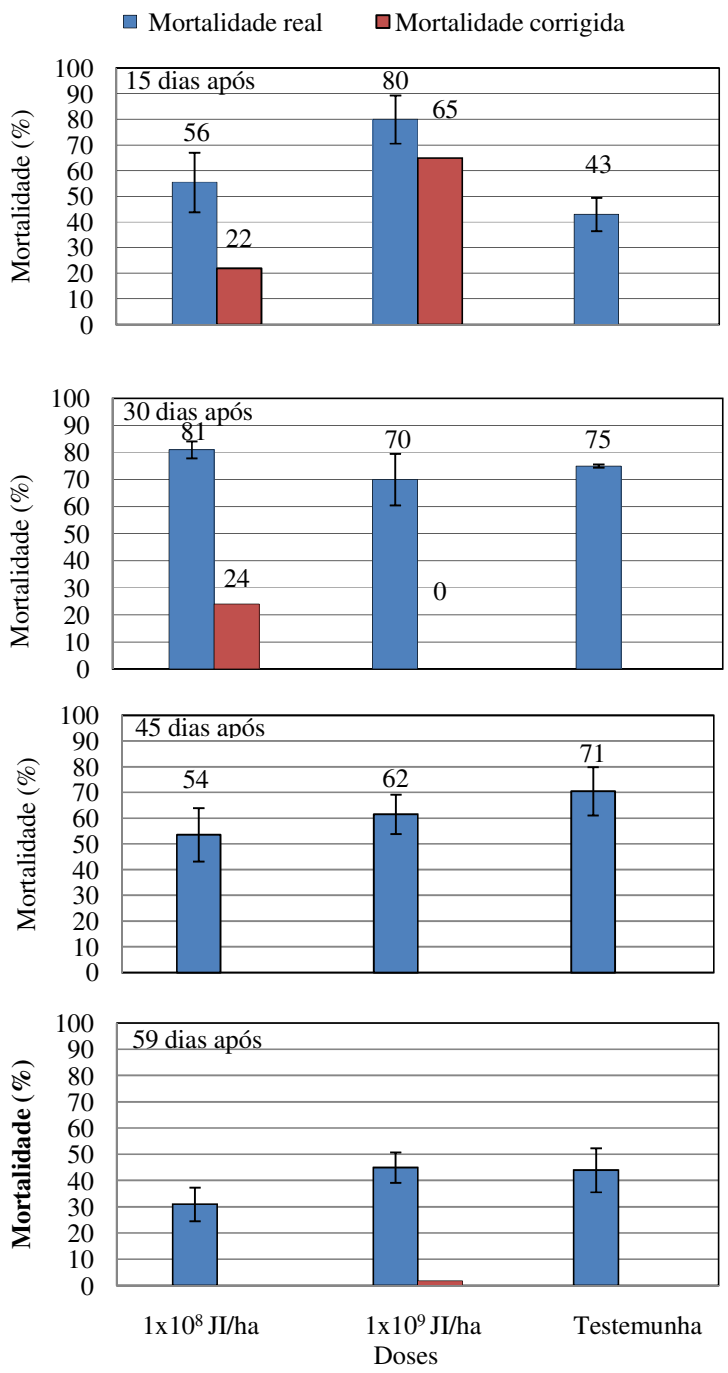

Figura 8. Mortalidade real (observada) e corrigida (fórmula de Abbott) de *Ceratitis capitata* expostos na fase de pré-pupa ao *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24.

3.2 DISCUSSÃO

3.2.1 Virulência de isolados do gênero *Heterorhabditis* contra *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

A maior suscetibilidade de *Anastrepha fraterculus* em relação a *Ceratitis capitata* pode estar relacionada aos seguintes fatores: 1) menor reação das células de defesa; 2) maior tamanho do inseto e, consequentemente, maiores aberturas naturais, o que pode facilitar a penetração do nematoide no hospedeiro; 3) maior longevidade da fase pupal, o que possibilita maior tempo de exposição ao nematoide no solo.

Lezama-Gutierrez et al. (1996), ao avaliarem a suscetibilidade do terceiro instar de *A. ludens* a vários isolados, constataram elevada mortalidade larval e pupal (90%), quando as larvas foram expostas ao *S. riobrave* e *S.carpocapsae*. Hernández (2003) observou a mortalidade de 23%, 18%, 17%, 17% e 16% de larvas de *A. ludens* quando submetidas à dose de 100 JIs/larva de *H. indica*, *S. carpocapsae* All*, H. bacteriophora* HP88, *S. riobrave e S. carpocapsae*, respectivamente.

Barbosa-Negrisoli et al. (2009), observaram taxas de mortalidade de 55% e 58% de pré-pupas de *A. fraterculus*, proporcionadas por *H. bacteriophora* RS88 e *S. riobrave* RS59, na dose 100 JIs/larva, respectivamente, isolados esses, nativos do Rio Grande do Sul.

3.2.2 Suscetibilidade de diferentes fases de *Ceratitis capitata* ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24

Pré-pupas de *Ceratitis capitata* demonstraram serem suscetíveis ao *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24. A concentração de 200 JIs/Inseto foi suficiente para proporcionar o encontro entre o nematoide e o hospedeiro.

A maior suscetibilidade de pré-pupas ao nematoide é atribuída, por Yee e Lacey (2003), a uma combinação de fatores como a emissão de CO2, tempo de permanência como pré-pupa e elevada atividade da pré-pupa no solo. Shapiro-Ilan et al. (2005) constataram que a mortalidade do inseto por nematoide está relacionada à habilidade do nematoide produzir doença e à sua virulência contra o inseto.

Estudos anteriores demonstraram a suscetibilidade de larvas de *C. capitata* a nematoides. Gazit et al. (2000), verificaram que *S. riobrave* Texas e *Heterorhabditis* sp. IS-5 proporcionaram aproximadamente 90% e 80% de mortalidade de pré-pupas com

2h após eclosão, respectivamente. Karagoz et al. (2009) constataram que de *S. feltiae* nas doses de 200 e 400 JIs/cm^2 propiciaram mortalidade acima de 90% de larvas de *C. capitata*. Malan e Manrakhan (2009) observaram que *H. bacteriophora* (SF 286), na dose de 200 JI/Inseto, proporcionaram aproximadamente 70% de mortalidade de larvas de *C. capitata*. Barbosa-Negrisoli et al. (2009), verificaram que *H. bacteriophora* RS88 e *S. riobrave* RS59 proporcionaram 55% e 92% de mortalidade de pré-pupas de *A. fraterculus*. *H. indica* IBCB n5, nas doses de 50 e 100 JIs/pré-pupa, proporcionou 62% e 93%, respectivamente, de mortalidade para *C. capitata* em fase de pré-pupa; em testes de campo, *H. indica* IBCB n5, nas doses de 1 e 10 JIs/cm^2, proporcionou mortalidade de 67% e 93%, respectivamente (SILVA et al., 2010).

Outros trabalhos, em laboratório, demonstraram a suscetibilidade de larvas de terceiro instar de moscas-das-frutas a nematoides, enfatizando a importância da idade do hospedeiro. *H. bacteriophora*, CL50 de 115 JI/cm^2, proporcionou índices mais elevados de mortalidade para larvas de terceiro instar inicial (seis dias de idade) de *A. ludens* (TOLEDO et al., 2005a). *S. carpocapsae*, CL50 de 102 JI/cm^2, propiciou os índices mais elevados de mortalidade de larvas (seis dias de idade) de *A. obliqua* (TOLEDO et al., 2009). *S. feltiae* (isolados All, Mexican e Breton), *H. heliothidis* e *H. bacteriophora*, na dose de 1000 JIs/25 insetos, causaram mortalidade em larvas (quatro a cinco dias de idade) da mosca-do-caribe *A. suspensa* (Loew) em níveis que variaram entre 78,7% a 90,7% (BEAVERS e CALKINS, 1984).

Pupas apresentaram baixa suscetibilidade ao *H. amazonensis* IBCB n24. Yee e Lacey (2003) constataram que a redução da mortalidade na fase de pupa está relacionada ao fato de que a pré-pupas, em processo de pupação, quando expostos aos nematoides apresentam o tegumento mais duro que as pré-pupas mais jovens – caracterísitca de alguns insetos dípteros. Toledo et al. (2001; 2005b) afirmam que as pupas são mais resistentes aos nematoides e provavelmente os espiráculos pupais atuam como barreira que impedem a entrada dos nematoides.

Os resultados desse estudo em relação à mortalidade da pupa são confirmados por Lindegren e Vail (1986) e por Karagoz, et al. (2009) que não observaram mortalidade pupal de *C. capitata* por *S. carpocapsae* e por *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *H. bacteriophora*, respectivamente. Beavers e Calkins (1984) verificaram baixa suscetibilidade de pupas de *A. suspensa* por *S. feltiae* com taxas de infecção que variaram de 0% a 1,1%. Yee e Lacey (2003) observaram que *S. feltiae* e *S. carpocapsae*

não infectaram pupas de *Rhagoletis indifferens*. Toledo et al. (2001) verificaram que pupas de 5 e 12 dias de idade de *A. ludens* não foram suscetíveis ao *S. feltiae*.

Trabalhos anteriores contradizem os resultados obtidos nesse trabalho onde larvas de tefritídeos expostas a nematoides morreram após a formação da pupa. Isto ocorreu com *C. capitata*, *Dacus dorsalis* e *D. cucurbitae* expostas como larvas ao *S. feltiae* por período de 2 a 12 horas antes da pupação (LINDEGREN e VAIL, 1986); Larvas de terceiro instar de *R. indifferens* expostas ao *S. feltiae* e *S. carpocapsae* (STARK e LACEY, 1999; YEE e LACEY, 2003); *Bactrocera oleae* exposta ao *S. carpocapsae* All, *S. riobrave*, *S. glaseri* NC, *H. bacteriophora* e H. marelatus na dose de 25 JIs/cm^2.

Barbosa-Negrisoli et al. (2009), verificaram que *H. bacteriophora* RS88 e *S. riobrave* RS59 proporcionaram 58% e 94,5% de mortalidade de pupas de *A. fraterculus*. Em condições de casa de vegetação *S. riobrave* e *H. bacteriophora* RS88 na dose 250 JIs/cm^2 propiciaram aproximadamente 60% e 70% de mortalidade de pupas de *A. fraterculus*, respectivamente. Em experimento de laboratório, *Steinernema* sp. IBCB n35, *S. brazilense* IBCB n6, *Heterorhabditis* sp. IBCB n10, *Steinernema* sp. IBCB n25 e *H. indica* IBCB n5, na dose de 50 JIs/pupa foram os mais virulentos para pupas de *C. capitata*, proporcionando taxas de mortalidade variáveis de 33,8% a 53,8%. Em casa de vegetação, na dose de 50, 100 e 200 JIs/pupa, *H. indica* IBCB n5 proporcionou os melhores resultados para *C. capitata* em fase de pupa (59%, 84% e 87% de mortalidade) (SILVA et al., 2010).

3.2.3 Efeito de doses do *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*

H. amazonensis causou mortalidade dos insetos nas três doses testadas. Contudo, essas doses não apresentaram diferença significativa entre si, o que sugere ser a menor dose mais adequada contra *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata*, tendo em vista o efeito de impacto em condições semelhantes ao do experimento.

3.2.4 Persistência de *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 no solo e efeito contra *Ceratitis capitata*

Após a entrada no solo, o nematoide entomopatogenico passa, imediatamente, a estar sujeito aos fatores bióticos e abióticos que influenciam a vida dos

nematoides de vida livre e dos fitoparasitas (MOLYNEUX e BEDDING, 1984, MOLYNEUX, 1985; KAYA, 1990, KUNG et al., 1991). Fatores extrínsecos tais como patógenos e predadores podem matar uma proporção de juvenis infectivos no solo, assim como condições extremas de temperatura, de umidade, pH e tipo de solo podem influenciar a persistência e a infectividade (KAYA, 1990; CURRAN, 1992).

Seis dias após a aplicação na superfície do solo, *H. amazonensis* causou elevada mortalidade das larvas de *G.mellonella:* 68% e 87% nas doses de $1x10^8$ e $1x10^9$ JIs/cm^2, respectivamente. Num período de aproximadamente duas semanas (20 e 33 dias após a aplicação de *H. amazonensis*), registraram-se as mais baixas taxas de mortalidade das larvas de *G. mellonella*: 18% e 17% na dose de $1x10^8$ JIs/cm^2 e 35% e 38% na dose de $1x10^9$ JIs/cm^2. Essas baixas na mortalidade de *G. mellonella* podem estar relacionadas, dentre outros fatores, ao aumento expressivo na incidência de nematoides de vida livre os quais foram responsáveis pela alta taxa de mortalidade nas parcelas testemunhas nesses períodos. Tal fato foi comprovado quando as larvas mortas, obtidas das testemunhas, foram colocadas em armadilha de White. Os nematoides de vida livre, em altas populações, podem causar a morte de insetos suscetíveis quando expostos a situações de estresse como o ocorrido com as larvas de *G. mellonella* enterradas no solo. Nessa situação, o nematoide de vida livre provavelmente competiu com o nematoide entomopatogênico e inibiu sua atuação durante a colonização do inseto (Figura 7). Nematoides de vida livre – predadores, bacterívoros, fungívoros e onívoros – constituim-se em componentes importante de decomposição e ciclagem de nutrientes das teias alimentares no solo (STUART, et al., 2006). Duncan et al. (2003) relataram que a presença de *S. riobrave* levou ao aumento do número de nematoide bacterívoro de vida livre *Pellioditis* sp., que se desenvolveu em cadáveres de larvas de *D. abbreviatus* em citros, e observaram também a diminuição do potencial reprodutivo de *S. riobrave*.

Antagonistas de nematoides podem interferir na persistência de nematoides entomopatogenicos. Wilson e Gaugler (2004) em seu experimento correlacionaram a baixa persistência dos nematoides com a presença de ácaros e colêmbolos.

Bohan e Hominick (1996) afirmaram que somente uma fração da população do infectivo juvenil está, ao mesmo tempo, apta a causar infecção, fenômeno conhecido como fase de infectividade (CAMPBELL et al., 1999). Os juvenis infectivos ativos da maioria dos nematoides sobrevivem poucos dias ou poucas semanas no ambiente. Eles apresentam estoque limitado de reservas lipídicas, quando essas reservas não são

utilizadas adequadamente, a taxa de infectividade do juvenil infectivo entra em declínio (CURRAN, 1992).

As diferentes espécies de nematoides são afetadas em diferentes níveis de persistência quando há impossibilidade de realização da reciclagem por meio de um hospedeiro. Cada espécie de nematoide tem seu grau de persistência característica (CURRAN, 1992). Assim, *S. carpocapsae* DD136 é menos persistente que *S. glaseri* (MOLYNEUX, 1985), e este o mais persistente dos nematoides (KAYA, 1990).

Os esteinernematídeos e heterorhabditídeos são orientados a procurar seu hospedeiro em resposta ao dióxido de carbono liberado pelo inseto (LEWIS et al., 2006). Muitos insetos quiescentes, especialmente as pupas, liberam o dióxido de carbono em intervalos de sete horas, aproximadamente (CHAPMAN, 1982). Isso parece ser uma resposta estratégica desses hospedeiros para escaparem do reconhecimento por parte do nematoide e evitarem o parasitismo. Os espiráculos das pupas ficam quase totalmente fechados entre os intervalos da liberação do dióxido de carbono, o que dificulta o acesso de entrada dos nematoides. Essa resposta coevolucionária cria um equilíbrio que impede a superexploração dos hospedeiros pelos nematoides entomopatogênicos. A quebra desse equilíbrio consiste na liberação de uma dose elevada de juvenis infectivos na superfície do solo (GAUGLER, 1988).

Lindegren et al. (1990), em teste de persistência do *S. feltiae* (500 JIs/cm^2), demonstraram a existência de decréscimo na mortalidade de *C. capitata* de 89,2% (dia 1) para 42,6% (dia 7) e a inexistência de mortalidade no dia 14. Gazit et al.(2000), em solo de textura franco-argilosa, testaram a virulência do *S. riobrave* Texas (100 JIs/cm^2) contra o terceiro instar larval de *C. capitata* e verificaram que *S. riobrave* perdeu 50% de sua atividade após cinco dias da aplicação e que não houve nenhuma atividade após 14 dias da aplicação.

Outros estudos enfatizaram o sucesso da persistência de nematoides. Fergunson et al. (1995) encontraram *G. mellonella* infectada por *Heterorhabditis* e Steinernematidae, seis meses após a liberação do nematoide. Parkman et al. (1994) verificaram que, no controle de grilos *Scapteriscus* spp. em campo de golfe, a infecção por *S. scapterisci* variou entre 0% a 100% por 12 semanas. Duncan e McCoy (1996) verificaram que a formulação comercial por grânulos de *S. riobrave* proporcionou 90% de controle do gorgulho da raiz de citros em solo arenoso, após nove semanas da aplicação.

Aos 49 dias após a aplicação do *H. amazonensis*, verificou-se aumento na mortalidade das larvas de *G. mellonella*: 33% e 77% para as doses de $1x10^8$ e $1x10^9$ JIs/cm^2, respectivamente. Isso significa que, no campo de citros, o *H. amazonensis* produziu prole em hospedeiros suscetíveis. A população de nematoide reciclou-se e houve liberação de juvenis infectivos no solo com habilidade para buscar novos hospedeiros e causar infecção.

No que diz respeito ao efeito do *H. amazonensis* na mortalidade de *C. capitata* em campo de citros, esperava-se que *H. amazonensis* proporcionasse índices de mortalidade maiores nos grupos tratados. Isso ocorreu na primeira avaliação, 15 dias após a aplicação, e na segunda avaliação, 30 dias após a aplicação, na dose de $1x10^8$ JI/ha. Esta apresentando pequena diferença em relação à mortalidade real da testemunha, o que indica provavelmente pouco ou nenhum efeito do nematoide na população de *C. capitata*.

Tendo em vista que o nematoide apresentou elevada densidade aos 49 dias após a aplicação, indicado pelo número de *G. mellonella* (iscas) infectadas, a justificativa para a ausência ou para o pouco efeito do agente na população de *C. capitata,* nas avaliações realizadas, após 30 dias da aplicação, está provavelmente relacionada ao fato de o *H. amazonensis* ter se espalhado nas parcelas, levando mais tempo para alcançar os insetos liberados na fase de pré-pupa. Algumas horas após a sua liberação, os insetos alcançaram a fase de pupa, tornando-se mais resistentes aos nematoides.

Na avaliação, 15 dias após a aplicação, os maiores índices de mortalidade podem ser explicados pelo fato de o *H. amazonensis* ter sido aplicado logo após a liberação dos insetos na superfície do solo, o que permitiu a permanência do *H. amazonensis* mais próxima do inseto durante a fase mais suscetível de pré-pupa e de início de pupa.

Sob condições de campo, o contato entre o *H. amazonensis* e as larvas de *C. capitata* foi dificultado provavelmente pelo inseto ter sido capaz de escapar da infecção por *H. amazonensis*, alcançando, rapidamente, maior profundidade no solo para se empupar. Tal observação fundamenta-se no teste que avaliou a susceptibilidade de diferentes fases de *C. capitata* ao *H. amazonensis*, em que se verificou que as pré-pupas alcançavam rapidamente o fundo do pote para se empupar. Há que se levar em conta que as texturas de solo, nas quais os testes em questão foram conduzidos, eram diferentes. A textura do experimento relacionado susceptibilidade de diferentes fases *C.*

capitata ao *H. amazonensis* era arenosa e a do experimento relacionado à persistência de *H. amazonensis* em campo de citros e seu efeito contra *C. capitata* franco-argiloso-arenosa. A eficiência do *H. amazonensis*, no que diz respeito ao seu movimento de busca pela mosca-das-frutas, pode estar relacionada à profundidade do solo na qual a larva se refugiou.

A profundidade em que a larva se empupa está diretamente relacionada com o volume do solo no qual os juvenis infectivos estão distribuídos: a migração de larvas para maiores profundidades pode ocasionar grande diluição de juvenis infectivos. O efeito do *S. carpocapsae* sobre *A. obliqua* foi afetado pela interação entre o tipo de solo e a profundidade em que se encontravam as larvas no solo. Em experimento com tubos PVC de altura que variaram entre 2, 5 e 8 cm, as maiores porcentagens (60% a 82%) de infecção para larvas com seis dias de idade ocorreu em tubos de 2 cm de altura, contendo solo de textura argilo-arenosa. Esse resultado provavelmente relaciona-se às propriedades de retenção de umidade do tipo de textura do solo, o que facilita o deslocamento do nematoide (TOLEDO et al., 2009).

No que se refere às larvas das moscas-das-frutas no campo, elas estão sujeitas à mortalidade natural e à decomposição, situações menos frequentes em laboratório. Assim como os nematoides entomopatogênicos, essas larvas são influenciadas por fatores do solo tais como textura, pH, umidade, temperatura (ESKAFI e FERNÁNDEZ, 1990; JACKSON et al., 1998; ALYOKHIN et al., 2001), compactação do solo (ALUJA, 1994). O comportamento das moscas-das-frutas frente a esses fatores influencia a infectividade do nematoide entomopatogênico.

Gazit et al. (2000) enfatizaram que o controle biológico de larvas de *C. capitata* com o uso de nematoides entomopatogênicos requer isolados de nematoides preparados para encontrar e matar a pré-pupa e para manter a infectividade no solo sob as condições ambientais em que a praga habita. As condições de campo provavelmente reduziram a infectividade do *H. amazonensis*, uma vez que ele proporcionou 40% de mortalidade de pré-pupas de *C. capitata* em experimento de laboratório relacionado à susceptibilidade de diferentes fases de *C. capitata* ao *H. amazonensis*.

No experimento analisado, as doses de nematoide usadas estão de acordo com a margem aceita para as liberações inundativas: 2,5 x 10^9 JIs/ha (GREWAL et al., 1994). Contudo, muitos estudos têm mencionado a dificuldade de se conseguir níveis elevados de infecção para larvas de moscas-das-frutas. Lindegren et al. (1990) afirmaram que o estabelecimento da epizootia nematoide-mosca-do-mediterrâneo

depende da densidade do nematoide. Os autores demonstraram que *S. feltie* (Mexican) na dose de 500 JIs/cm^{2,} que equivale a 5x10^{10} JIs/ha – muitas vezes maior que a da margem proposta para as aplicações inundativas – proporcionou taxa de 87% de mortalidade de *C. capitata*.

Em outro experimento, realizado em pomar de manga, as doses testadas de nematoide também foram elevadas. A taxa de infecção para *A. ludens* atingiu 74% e 52%, quando o efeito do *H. bacteriophora* foi testado em dose de 250 e 500 JIs/cm^2, respectivamente (TOLEDO et al., 2006a). Em condições de campo, *S. carpocapsae* (dose de 250 JIs/cm^2) reduziu a emergência do adulto de *A. ludens* em 64,1% e *S. riobrave* em 14%, quando comparados com o controle (LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2006). Em pomar de pêssego, *S. riobrave* e *H. bacteriophora* (250 JIs/cm^2) aplicados em suspensão aquosa sobre pré-pupas de *A. fraterculus* proporcionaram taxas de mortalidade de 24,3% e 28,12%, respectivamente (BARBOSA-NEGRISOLI et al., 2009).

O sucesso de aplicações de nematoides entomopatogênicos como agentes de controle para determinada praga de insetos depende de fatores como, por exemplo, virulência e agressividade do nematoide ao hospedeiro, comportamento de busca e localização do hospedeiro, boa persistência do nematoide em condições de campo (LEITE, 2006). As condições ambientais devem ser compatíveis com as características exigidas pelo nematoide para que ele proporcione elevados níveis de infecção. Não se pode afirmar que o *H. amazonensis* IBCB n24 não tenha potencial para persistir no campo de citros estudado. Novos estudos são necessários para se compreender o como fatores bióticos e abióticos interferem na persistência e na capacidade de infectibilidade do *H. amazonensis* IBCB n24.

CONCLUSÕES

Heterorhabditis amazonensis IBCB n24 é o mais virulento para *Anastrepha fraterculus*. *H. indica* IBCB n5, *Heterorhabditis* IBCB n44 e *Heterorhabditis* IBCB n45 são os mais virulentos para *Ceratitis capitata*.

A fase de pré-pupa é a mais suscetível para o nematoide *H. amazonensis* IBCB n24.

H. amazonensis IBCB n24 persiste no campo de citros por pelo menos 77 dias, mas resulta em baixa ou nenhuma mortalidade de *C. capitata* após 6 dias da aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-266, 1925.

ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.155-178, 1994.

ALYOKHIN, A. V.; MILLE, C.; MESSING, R. H.; DUAN, J. J. Selection of pupation habitats by oriental fruit fly larvae in the laboratory. **Journal of Insect Behavior**, v. 14, p. 57-67, 2001.

BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. C.; GARCIA, M. S.; DOLINSKI, C.; NEGRISOLI JR., A.; BERNARDI, D.; NAVA, D. E. Efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p. 6-13, 2009.

BEAVERS, J. B.; CALKINS, C. O. Susceptibility of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to Steinernematid and Heterorhahditid nematodes in laboratory studies. **Environmental Entomology**, v. 13, p. 137-139, 1984.

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

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

BOHAN, D. A.; HOMINICK, W. M. Investigations on the presence of an infections proportion amongst a population of *Steinernema feltiae* (Site 76 strain) infective stages. **Parasitology**, v. 112, p. 113-118, 1996.

CAMPBEL, J. F.; KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K.; CHINNASRI, B. Are there temporarily non-infectious dauer stages in entomopathogenic nematode populations: attest of the phased infectivity hypothesis. **Parasitology**, v. 118, p. 499-508, 1999.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. Cambridge: Harvard University Press. 1982.

CURRAN, J. Post-application biology of of entomopathogenic nematodes in soil. In: BEDDING, R. A., AKHURST, R.; KAYA, H. (Eds.) **Nematode and the biological control of insects pests**. East Melbourne, Australia: CSIRO, 1992. p. 67-77.

DUNCAN, L. W.; DUNN, D. C.; BAGUE, G. NGUYEN, K. Competition between entomopathogenic and free-living bactivorous nematodes in larvae of the weevil *Diaprepes abbreviatus*. **Journal of Nematology**, v. 35, p. 187-193, 2003.

DUNCAN, L. W.; McCOY, C. W. Vertical distribution in soil, persistence, and efficacy against citrus root weevil (Coleoptera: Curculionidae) of two species of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae). **Biological Control**, v. 25, p. 174-178, 1996.

ESKAFI, F. M.; FERNANDEZ, A. Larval-pupal mortality of mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) from interaction of soil, moisture, and temperature. **Environmental Entomology**, v. 19, p. 1668-1670, 1990.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATTION OF THE UNITED NATIONS. **Production**. 2011. Disponível em: <http://faostat.org/default.aspx>. Acesso em: 20 fev. 2011.

FERGUSON, C. S.; SCHROEDER, P. C.; SHIELDS, E. J. Vertical-distribution, persistence, and activity of entomopathogenic nematodes (Nematoda, Heterorhabditidae and Steinernematidae) in alfafa snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) infested fields. **Environmental Entomology**, v. 24, p. 149-158, 1995.

FERNANDES, O. A. **Estudos bioecológicos e avaliação de danos causados por moscas-das-frutas (Diptera:Tephritidae) em *Citros sinensis* Osbeck var. 'Pera'**. 1987, 79 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 57-78.

GAUGLER, R. Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 24, p. 351-360, 1988.

GAZIT, Y.; RÖSSLER, Y.; GLAZER, I. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, p. 157-164, 2000.

GRAVENA, S.; BENVENGA, S. R.; SILVA, J. L. Manejo ecológico das moscas-das-frutas. **Portal AGROFIT**, 2010. Disponível em: <http://www.agrofit.com.br/portal/citros/54-citros/112-manejo-ecologico-das-moscas-das-frutas>. Acesso em: 20 jan. 2011.

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

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

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; ALUJA, M. Listado de especies del genero neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribucion y plantas hospederas. **Folia Entomologica Mexicana,** v. 88, p. 89-105, 1993.

HERNÁNDEZ, M. A. R. **Patogenicidad de nematodos entomopatógenos (Nemata: Steinernematidae, Heterorhabditidae) em larvas y pupas de mosca de la fruta *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae)**. 129p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Colima, México. 2003.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal.** Banco de Dados Agregados do IBGE, Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. 2011. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo2.asp?e=v&p=PA&z=t&o=10>. Acesso em: 20 fev. 2011.

JACKSON, C. G.; LONG, J. P. KLUNGNESS, L. M. Depth of pupation in four species of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in sand with and without moisture. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 138-142, 1998.

KARAGOZ, M.; GULCU, B.; HAZIR, C.; KAYA, H. K.; HAZIR, S. Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. **Phytoparasitica**, v. 37, p. 153-159, 2009.

KAYA, H. K. Soil ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Eds.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 93-115.

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

KUNG, S.; GAUGLER, R.; KAYA, H. K. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 57, p. 242-249, 1991.

LEITE, L. G. Nematóides entomopatogênicos. In: BATISTA FILHO, A. (Ed.). **Controle biológico de insetos e ácaros**. São Paulo: Instituto Biológico, 2006. p. 42-51. (Instituto Biológico. Boletim Técnico, 15).

LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 38, p. 66-79, 2006.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; CONTRERAS-OCHOA, O. L.; GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M.; TRUJILLO DE LA LUZ, A.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O. Susceptibilidad de larvas de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) a diversos nemátodos entomopatógenos (Steinernematidae y Heterorhabditidae). **Vedalia**, v. 3, p. 31-33, 1996.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; MOLINA-OCHOA, J.; PESCADOR-RUBIO, A.; GALINDO-VELASCO, E.; ÁNGEL-SAHAGÚN, C. A.; MOCHEL-ACEVES, A. C.; GONZÁLEZ-REYES, E. Efficacy of steinernematid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) on suppression of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae in soil of differing textures:laboratory and field trials. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v 23, p. 41-49, 2006.

LINDEGREN, J. E.; VAIL, P. V. Susceptibility of mediterranean fruit fly, melon fly, and oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in laboratory tests. **Environmental Entomology**, v. 15, p. 383-386, 1986.

LINDEGREN, J. E.; WONG, T. T.; McINNIS, D. O. Response of mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in field tests in Hawaii. **Environmental Entomology**, v. 19, p. 465-468, 1990.

MAHMOUD, F. M.; OSMAN, M. A. E. M. Use of the nematode *Steinernema feltiae* Cross N 33 as a biological control agent against the peach fruit fly *Bactrocera zonata*. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 2, p. 109-115, 2007.

MACHADO, L. A. Criação de insetos em laboratório para utilização em pesquisas de controle biológico. In: CRUZ, B. B. (Ed.). **Pragas das Culturas e Controle Biológico**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 8-35.

MALAN, A. P.; MANRAKHAN, A. Susceptibility of the mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and the natal fruit fly (*Ceratitis rosa*) to entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, p. 47-49, 2009.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S. Biologia de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae). II: Índices de infestação em diferentes hospedeiros e localidades. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 40, n. 1, p. 17-24, 1980.

MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S.; ZUCCHI, R. A. Biologia de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae). I: Lista de hospedeiros e ocorrência. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 40, n. 1, p. 9-16, 1980.

MOLYNEUX, A. S. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. **Revue de Nématologie**, v. 8, p. 165-170, 1985.

MOLYNEUX, A. S.; BEDDING, R. A. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Nematologica**, v. 30, p. 358–365, 1984.

NORRBOM, A. L. **Fruit fly (Diptera: Tephritidae) classification and diversity**. Disponível em: <http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera/tephriti/ClasDivT.htm>. Acesso em: 9 mar. 2010.

NÚÑEZ-BUENO, L. La mosca del mediterráneo. **Revista ICA**, v. 21, p.1-8, 1987.

PARKMAN, J. P.; FRANK, J. H.; NGUYEN, K. B.; SMART, G. C. Inoculative release of *Steinernema scapterisci* (Rhabditidae: Steinernematidae) to suppress pest mole crickets (Orthoptera, Gryllothalpidae) on golf courses. **Environmental Entomology**, v. 23, p. 1331-1337, 1994.

RAGA, A.; PRESTES, D. A. O.; SOUZA FILHO, M. F.; SATO, M. E.; SILOTO, R. C.; GUIMARÃES, J. A.; ZUCCHI, R. A. Fruit fly (Diptera: Tephritoidea) infestation in citrus in the State of São Paulo, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 85-89, 2004.

ROHDE, C.; MOINO JR, A.; SILVA, M. A. T. DA; CARVALHO, F. D.; FERREIRA, C. S. Influence of soil temperature and moisture on the infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) against larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 1-4, 2010.

RONCHI-TELES, B. **Ocorrência e flutuação populacional de espécies de moscas-das-frutas e parasitóides com ênfase para o gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) na Amazônia brasileira**. 2000. 156 p. Tese (Doutorado) **-** Instituto de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal da Amazônia, Manaus.

SHAPIRO-ILAN, D. I; FUXA, J. R.; LACEY, L.A.; ONSTAD, D. W.; KAYA, H. K. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 1-7, 2005.

SILVA, A. C.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; RAGA, A.; SCHMIDT, F. S. Efeito de nematoides entomopatogênicos na mortalidade da mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, e do gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii*. **Nematologia Brasileira**, v. 34, p. 31-40, 2010.

SIRJANI, F. O.; LEWIS, E. E.; KAYA, H. K. Evaluation of entomopathogenic nematodes against the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, v. 48, p. 274-280, 2009.

SOUZA FILHO, M. F.; RAGA, A.; ZUCCHI, R. A. Moscas-das-frutas nos Estados brasileiros: São Paulo. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil:** conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 277-283.

STARK, J. E. P.; LACEY, L. A. Susceptibility of western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae) to five species of entomopathogenic nematodes in laboratory studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 74, p. 206-208, 1999.

STUART, R. J.; BARBERCHECK, M. E.; GREWAL, P. S.; TAYLOR, R. A. J.; HOY, C. W. Population biology of entomopathogenic nematodes: concepts, issues, and models. **Biological Control**, v. 38, p. 80-102, 2006.

TOLEDO, J.; GURGÚA, J. L.; LIEDO, P.; IBARRA, J. E.; OROPEZA, A. Parasitismo de larvas y pupas de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) por el nematodo *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae). **Vedalia**, v. 8, p. 27–36, 2001.

TOLEDO, J.; IBARRA, J. E.; LIEDO, P.; GÓMEZ, A.; RASGADO, M. A.; WILLIAMS, T. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 15, p. 627-634, 2005a.

TOLEDO, J.; PÉREZ, C.; LIEDO, P.; IBARRA, J. E. Susceptibilidad de larvas de *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera:Tephritidae) a *Heterorhabditis bacteriophora*

(Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae) en condiciones de laboratorio. **Vedalia**, v. 12, p. 11–22, 2005b.

TOLEDO, J.; RASGADO, M. A.; IBARRA, J. E.; GÓMEZ, A.; LIEDO, P.; WILLIAMS, T. Infection of *Anastrepha ludens* following soil applications of *Heterorhabditis bacteriophora* in mango orchard. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 119, p. 155–162, 2006a.

TOLEDO, J.; ROJAS, R.; IBARRA, J. E. Efficiency of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) on *Anastrepha serpentina* (Diptera: Tephritidae) larvae under laboratory conditions. **Florida Entomology**, v. 89, p. 524-526, 2006b.

TOLEDO, J.; WILLIAMS, T.; PÉREZ, C.; LIEDO, P.; VALLE, J. F.; IBARRA, J. E. Abiotic factors affecting the infectivity of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) on larvae *Anastrepha obliqua* (Diptera:Tephritidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 19, p. 887-898, 2009.

URAMOTO, K. **Diversidade de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae) em pomares comerciais de papaia e em áreas remanescentes da Mata Atlântica e suas plantas hospedeiras nativas, no município de Linhares, Espírito Santo**. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.

YEE, W. L.; LACEY, L. A. Stage-specific mortality of *Rhagoletis indifferens* (Diptera:Tephritidae) exposed to three species of *Steinernema* nematodes. **Biological Control**, v. 27, p. 349-356, 2003.

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

WILSON, M.; GAUGLER, R. Factors limiting short-term persistence of entomopathogenic nematodes. **Blackwell Verlag**, v. 128, p2 50-253, 2004.

ZUCCHI, R.A. Taxonomia das moscas-das-frutas. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.13-24.

ZUCCHI, R. A. Mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. (Eds.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil.** Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 15-22.

III CAPÍTULO – ARTIGO: EFEITO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) NA MORTALIDADE DE PRÉ-PUPAS DO GORGULHO-DA-GOIABA *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae)

RESUMO

Foi avaliada a virulência do *Steinernema brazilense* IBCB n6*, Heterorhabditis indica* IBCB n5 e *H. amazonensis* IBCB n24 contra pré-pupas do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii*, em testes de laboratório, e o efeito de *H. amazonensis* IBCB n24 na mortalidade do inseto em teste de campo. No primeiro teste de laboratório foram avaliadas as doses de 50, 175 e 612 JIs/inseto, sendo que no segundo foram avaliadas as doses de 2000, 4000 e 6000 JIs/inseto. No teste de campo, realizado em pomar de goiaba, *H.* a*mazonensis* foi avaliado em duas doses: $1x10^9$ e $5x10^9$ JIs/ha. Os insetos foram avaliados quanto à mortalidade 15 e 12 dias após a instalação do ensaio para os testes de laboratório e de campo, respectivamente. *H. amazonensis* e *S. brazilense* mostraram-se mais virulentos nos testes de laboratório, apresentando níveis de infecção entre 22,4% a 31,4% e 11,0% a 17,8%, respectivamente, nas menores doses, e entre 76,7% a 83,3% e 60,0% a 73,3%, respectivamente, nas maiores doses. No teste de campo, *H. amazonensis* proporcionou 53,8% e 66,0% de infecção nas doses de $1x10^9$ e $5x10^9$ JIs/ha, respectivamente.

Palavras-chave: *Heterorhabditis*; *Steinernema*; praga da goiabeira.

ABSTRACT

EFFECT OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) IN PREPUPAE MORTALITY OF GUAVA WEEVIL *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae)

It was evaluated the virulence of *Steinernema brazilense*, *Heterorhabditis indica* IBCB n5 and *H. amazonensis* IBCB n24 against prepupae of guava weevil in laboratory trials and the effect of *H. amazonensis* IBCB n24 for insect mortality in a field test. In the first laboratory test doses of 50, 175 and 612 IJs/insect were evaluated, and the second one evaluated doses of 2000, 4000 and 6000 IJs/ insect. Field test, performed in a guava orchard, *H. amazonensis* was evaluated at two doses: $1x10^9$ and $5x10^9$ IJs/ha. Insects mortality were evaluated 15 and 12 days after installing the facilities for the laboratory and field tests, respectively. *H. amazonensis* and *S. brazilense* were more virulent in laboratory tests, with levels of infection from 22.4% to 31.4% and from 11.0% to 17.8%, respectively, at lower doses, and 76.7% to 83.3% and 60.0% to 73.3%, respectively, at higher doses. In the field test, *H. amazonensis* caused infection in 53.8% and 60% at doses of $1x10^9$ and $5x10^9$ IJs/ha, respectively.

Key-words: *Heterorhabditis*; pest of guava; *Steinernema*.

I INTRODUÇÃO

A goiabeira *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) é nativa da América tropical (MEDINA, 1991) e é cultivada mundialmente nas regiões tropicais e sub-tropicais (TODA FRUTA, 2010). O Brasil é considerado um dos maiores produtores de goiaba (NATALE, 2009). Em 2008, goiabeiras foram cultivadas em uma área de 15.641 ha, produziram 312.348 toneladas, o que levou a um valor de produção de 206.262 milhões de reais (IBGE, 2010).

O gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall é considerado uma das principais pragas dos pomares de goiaba do Brasil. Ocorre no Estado de São Paulo (ARRUDA NETO, 1972; ORLANDO et al., 1974; SOUZA FILHO e COSTA, 2009), no Submédio do São Francisco (BARBOSA et al., 2001), na região Sul de Minas Gerais (SOUZA et al., 2003) e no Estado do Rio de Janeiro (DEL VALLE et al., 2008). Além do Brasil, na América do Sul, observou-se a ocorrência do gorgulho-da-goiaba na Venezuela (BOSCAN de MARTÍNEZ e CASARES, 1980; 1982).

Os adultos do gorgulho atacam o pomar em períodos quentes e chuvosos, alimentam-se de botões florais, frutos pequenos (BOSCAN de MARTÍNEZ e CASARES, 1980), pecíolos e pedúnculos (SILVA FILHO et al., 2007). A fêmea adulta perfura o fruto verde, quando esse atinge diâmetro de 1,5 cm a 3 cm, colocando um ovo em cada orifício. O local da postura fica endurecido, nele aparece uma depressão na casca que apresenta área circular necrótica central, enegrecida, com um orifício – sintomas que caracterizam o ataque da praga. Os frutos atacados desenvolvem-se de maneira deformada, entram em maturação anormal, forçada, e são inaceitáveis para a comercialização. As larvas alimentam-se da polpa e da semente até o quarto instar, quando abandonam o fruto e se aprofundam no solo, atingindo o período pré-pupal. Esse é considerado o mais longo período do ciclo de vida do gorgulho: compreende o tempo em que a larva abandona o fruto e se enterra no solo até a pupação. Dependendo das condições climáticas, a pré-pupa pode permanecer no solo por quatro a oito meses. Após o período de pupação e, de acordo com as condições favoráveis de umidade no solo, o adulto emerge, dando origem a uma nova geração de gorgulho (MEDINA, 1978; BOSCAN de MARTÍNEZ e CASARES, 1982; SOUZA et al., 2003; SOUZA FILHO e COSTA, 2009).

O controle do *C. psidii* consiste, geralmente, na aplicação de inseticida químico que visa a suprimir a população de adultos. Contudo, o uso abusivo de

agrotóxico ocasionando resistência nos insetos, impactando a biodiversidade, e deixando resíduos químicos no ambiente, vem preocupando cada vez os consumidores e tornando-os cada vez mais exigentes por alimentos livres de agrotóxicos. Países produtores de goiaba vêm buscando novas alternativas para o manejo integrado de pragas, por meio do uso de agentes naturais como, por exemplo, os nematoides entomopatogênicos.

Steinernema e *Heterorhabditis* são nematoides que infectam e matam uma grande diversidade de insetos. Diferem de outros entomopatógenos por estabelecerem uma associação mutualística com as bactérias do gênero *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp., respectivamente. Esses nematoides apresentam estágio imaturo de vida livre, conhecido como juvenil infectivo o qual vive no solo, penetram no hospedeiro por meio das aberturas naturais: boca, ânus e espiráculos, e, no caso dos heterorhabditídeos, também pela cutícula. Na hemocele do hospedeiro, liberam a bactéria simbiôntica causando doença e morte por septicemia entre 24 e 72 horas. Após completar duas ou três gerações no interior do inseto, o nematoide emerge e busca um novo inseto para infectar (KAYA e GAUGLER, 1993; CAMPBEL e KAYA, 2000; DOWDS e PETERS, 2002).

Nematoides entomopatogênicos vêm sendo usados contra diversas espécies de curculionídeos e bons resultados têm sido obtidos no controle do gorgulho da raiz *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) (SIMONS, 1981); gorgulho da maçã, cereja e pêssego, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst) (OLTHOF e HAGLEY, 1993; SHAPIRO-ILAN et al., 2002b; 2004; ALSTON et al., 2005); gorgulho da raiz dos citros, *Diaprepes abbreviatus* (L.) (DUNCAN et al., 1996; SHAPIRO e McCOY, 2000; SHAPIRO-ILAN et al., 2002a); gorgulho da pecan, *Curculio caryae* (Horn) (SHAPIRO-ILAN, 2001ab; SHAPIRO-ILAN et al., 2003); e gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (TAVARES et al., 2009; 2007).

No Brasil, nematoides vêm sendo avaliados contra larvas do quarto instar do gorgulho-da-goiaba, tendo as espécies *H. baujardi* LPP7(28) (DEL VALLE et al., 2005); e *H. baujardi* LPP7 (DOLINSKI et al., 2006; DEL VALLE et al., 2008) apresentado maior virulência e potencial de uso. Em teste de campo realizado por Silva et al. (2010), o nematoide *H. indica* IBCB n5, nas doses de 1 e 10JI/cm^2, causou 33% e 50%, respectivamente, de mortalidade de pré-pupa do gorgulho da goiaba.

Os objetivos dessa pesquisa foram: 1) avaliar a virulência de *Steinernema brazilense* Nguyen, Ambrós Ginarte, Leite, Santos & Harakava, 2010 IBCB n6,

Heterorhabditis indica Poinar, Karunaka & David, 1992 IBCB n5 e *H. amazonensis* Andaló, Nguyen & Moino, 2006 IBCB n24 contra pré-pupas do *Conotrachelus psidii*, sob condições de laboratório; 2) avaliar o efeito do *H. amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de pré-pupas do gorgulho-da-goiaba, sob condições de campo.

II MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois testes de laboratório com o objetivo de avaliar a virulência de nematoides entomopatogênicos contra o gorgulho-da-goiaba na fase de pré-pupa, e um teste de campo em pomar de goiaba para avaliar o efeito do mais virulento contra o inseto também nessa fase.

Para os testes de laboratório e de campo, foram usadas larvas em fase de pré-pupa de *C. psidii* coletadas manualmente de frutos de goiaba atacados em pomar orgânico do Sítio Roncáglia, situado no município de Valinhos, SP. As pré-pupas do gorgulho-da-goiaba foram transferidas para dentro de bandejas contendo solo arenoso umedecido a 10% de umidade (peso/peso), e mantidas sob temperatura de 20°C, por sessenta a noventa dias, até a realização dos experimentos.

2.1 Testes de virulência

O estudo foi realizado no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico de Campinas, SP com o objetivo de avaliar a virulência dos nematoides entomopatogênicos *Steinernema brazilense* IBCB n6*, Heterorhabditis indica* IBCB n5 e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 contra o gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* na fase de pré-pupa. Os nematóides foram obtidos da coleção de entomopatógenos "Coleção Oldemar Cardim Abreu" do Instituto Biológico (Tabela 1), e multiplicados em larvas de terceiro a quinto instar de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) (DUTKY, 1964). Os juvenis infectivos foram coletados em armadilha de White (WHITE, 1927) e armazenados a 12°C por quinze a trinta dias até sua utilização.

Para esse estudo, foram realizados dois experimentos sendo que no primeiro os nematoides foram testados em doses variando de 50 a 612 JIs/Inseto, e no segundo, de 2000 a 6000 JIs/Inseto.

Tabela 1 Espécies de *Steinernema* e *Heterorhabditis* utilizados no estudo de virulência.

Espécies/Isolados	Origem	Município
H. indica IBCB n5	Solo (citros)	Itapetininga, SP
H. amazonensis IBCB n24	Solo (cana-de-açúcar)	Piracicaba, SP
S. brazilense IBCB n6	Solo (margem Rio Apa)	Porto Murtinho, MS

Teste 1

O experimento constituiu de dez tratamentos representados pelos três nematoides testados em três doses cada, de 50, 175 e 612 JIs/inseto, e pela testemunha (apenas água). Para cada tratamento foram consideradas cinco repetições sendo cada repetição representada por um pote plástico (13 x 9 cm) contendo 500 g de solo arenoso com 10% de umidade (peso/peso) e dez pré-pupas do inseto enterradas. Os nematoides foram aplicados em suspensão aquosa sobre o solo, mediante a distribuição, com o auxílio de pipetas, de 1 a 3 mL das suspensões/pote, dependendo da dose. Em seguida, os potes foram fechados com tampas furadas em três pontos para permitir aeração, e acondicionados em câmara climatizada sob temperatura de 25°C e fotofase de 12h.

A avaliação foi realizada após 15 dias da instalação do ensaio, mediante a contagem do número de insetos vivos e mortos. Os insetos mortos foram transferidos para armadilha de White tendo vista confirmar a infecção pelos nematoides.

Teste 2

No segundo teste foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente, exceto que em cada pote (repetição) foram liberados seis insetos, e que os nematoides foram testados nas doses de 2000, 4000 e 6000 JIs/Inseto.

2.2 Teste de campo

O experimento foi realizado em pomar de goiaba, variedade Kumagai, conduzido sob poda total, no sítio pertencente ao Sr. Massao Kumagai, localizado no município de Campinas, SP, com o objetivo de avaliar o efeito do nematoide *H. amazonensis* IBCB n24 na mortalidade de pré-pupas do gorgulho-da-goiaba. O solo da

área experimental foi classificado como franco-argiloso (argila: 31,3%, silte: 27,3%, areia total: 41,4%).

O experimento foi instalado em 14 de abril de 2009 e, durante a sua condução, a temperatura máxima e mínima variou entre 24,5°C a 28,4°C e 12,9°C a 18,4°C, respectivamente, tendo a precipitação pluvial atingido 21,2 mm. Esses dados foram obtidos do posto meteorológico do Instituto Agronômico de Campinas, setor de Climatologia, localizado na Fazenda Santa Elisa.

O nematoide foi obtido pela produção *in vitro* usando o processo de esponja (BEDDING, 1984). Os juvenis infectivos foram separados do substrato por peneiramento (peneira 500 (ABNT)), lavados com água de torneira e utilizados imediatamente após a extração, apresentando 90% de viabilidade. A quantificação dos nematoides foi realizada com o auxílio da câmara de Peter, sob microscópio estereoscópio.

Foram considerados três tratamentos representados pelo nematoide em duas doses de $1x10^9$ e $5x10^9$ JIs/ha, e pela testemunha (apenas água). Para cada tratamento foram estabelecidas três repetições, sendo cada repetição representada por uma parcela de 2 m x 2 m disposta lateralmente a uma planta de goiaba, embaixo da sua copa. As parcelas foram distribuídas em blocos ao acaso, com duas plantas de goiaba separando as parcelas/tratamentos em cada bloco, e uma linha de plantas separando os blocos.

As parcelas foram rasteladas e capinadas e, antes da aplicação do nematoide, pré-pupas de *C. psidii* foram enterradas nas áreas delimitadas procurando simular o mesmo comportamento natural do inseto e expô-los ao solo a ser tratado. Para isso, foram usados 50 insetos por repetição (parcela), sendo cada dez insetos agrupados dentro de um envelope (10 x 15 cm) preparado com tela de plástico (12 fios/cm linear), juntamente com cerca de 200 g de solo da parcela. Os envelopes foram grampeados nas laterais para evitar a entrada de outros insetos, e enterrados a 5 cm de profundidade dentro de cada parcela, em distribuição aleatória e distanciados equidistantemente um do outro.

O nematoide foi então aplicado em suspensão aquosa sobre a área delimitada, com o auxílio de um regador e usando 2 L de calda/parcela. A avaliação foi feita 12 dias após a aplicação, quando então os envelopes foram retirados e levados ao Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico onde foram abertos e os insetos avaliados quanto a mortalidade. Os insetos mortos foram transferidos para armadilha de White tendo em vista confirmar a mortalidade por nematoides.

2.3 Análise estatística

Os dados dos experimentos foram transformados em arcsen $\sqrt{x/100}$ para que se procedesse a Análise de Variância. As diferenças entre os tratamentos foram estimados mediante a prova de comparação de médias do teste de Tukey a 5%.

III RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Resultados

O nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 apresentou-se como o mais virulento nos dois testes de laboratório, com níveis de infecção variando de 22,4% a 31,4% nas menores doses, e 76,7% e 83,3% nas maiores (Figura 1). Entretanto, esse nematoide não diferiu do *S. brazilense* que apresentou níveis de infecção variando de 11,0% a 17,8% nas menores doses (F=1,48 P=0,18), e 60,0% a 73,3% nas maiores (F=5,35 P<0,306).

No teste de campo, *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 causou níveis de infecção de 53,8% e 66,0% nas doses de $1x10^9$ e $5x10^9$ JIs/ha, respectivamente, não havendo diferença significativa entre as doses (F=123,9, P<0,001) (Figura 2), mas todas diferenciando da testemunha.

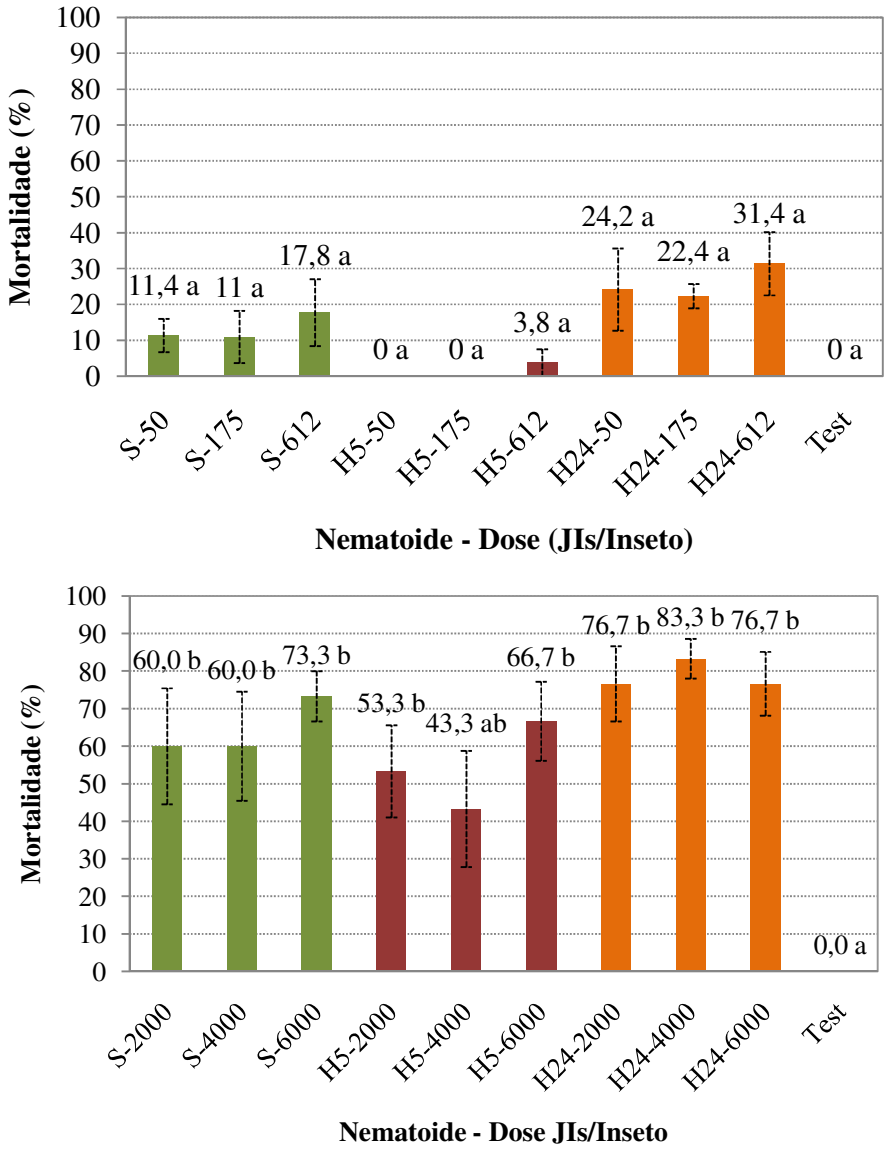

Figura 1. Porcentagem de pré-pupas de *Conotrachelus psidii* infectadas pelos nematoides *Steinernema brazilense* IBCB n6 (S), *Heterorhabditis indica* IBCB n5 (H5) e *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 (H24) testados nas doses de 50, 175 e 612 JIs/Inseto no Teste 1, e 2000, 4000, e 6000 JIs/Inseto no Teste 2. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

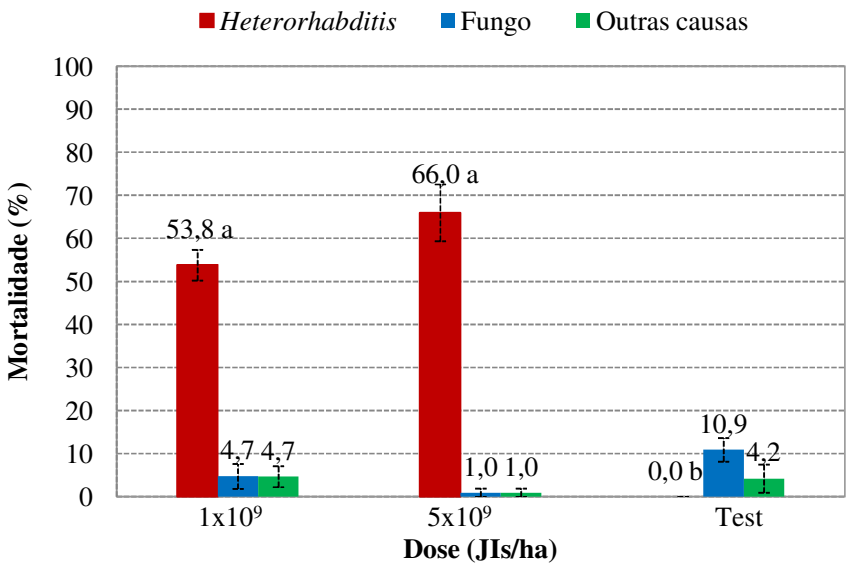

Figura 2. Mortalidade de pré-pupas de *Conotrachelus psidii* em pomar de goiaba tratado com o nematoide *Heterorhabditis amazonensis* IBCB n24 nas doses de $1x10^9$ e $5x\ 0^9$ JIs/ha. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.2 Discussão

3.2.1 Testes de virulência

Os resultados obtidos em laboratório sugerem que os nematoides *H. amazonensis*, *S. brazilense* e *H. indica* são pouco virulentos para pré-pupa do *C. psidii*, nas doses de 50, 175 e 612 JIs/Inseto. Em outros estudos, nematoides apresentaram-se mais virulentos para o *C. psidii,* porém quando o inseto foi exposto no quarto instar, em fase anterior àquela usada do presente trabalho, de pré-pupa. O nematoide *H. baujardi* LPP7 foi testado por Del Valle et al. (2005) na dose de 100JIs/Inseto em placas Costar 24-well, e na dose de 500 JIs/Inseto em coluna de areia, proporcionando 68,74% e 85% de mortalidade, respectivamente. Em teste de coluna de areia, Dolinski et al. (2006) verificaram que os heterorhabditídeos foram mais virulentos que os steinernematídeos. *H. indica* Hom1 e *H. baujardi* LPP7 foram mais virulentos que *S. riobrave* 355 na concentração de 500 JIs, causando 68,3% e 62,7% de mortalidade, respectivamente.

O gorgulho-da-goiaba, na fase de pré-pupa, vem apresentando maior resistência à nematoides também quando comparado a outras espécies de curculionídeos. Os nematoides *H. indica* Hom1 e *S. riobrave* 355 foram testados por Shapiro-Ilan (2001a) contra larvas do gorgulho de pecan *Curculio caryae,* na dose de 500 JIs/Inseto, proporcionando 55% e 53% de mortalidade, respectivamente. Com relação ao *H. bacteriophora* Tur-H2, foi testado por Kepenekci et al. (2004) contra larvas de último instar da espécie *Curculio elephas* Mill., na dose de 500 JIs/Inseto e proporcionou 96,5% de mortalidade. Alston et al. (2005) verificaram que *H. bacteriophora* e *S. feltiae*, nas doses de 0,125 $x10^5$ a $4,0x10^6$ JIs m^{-2}, foram virulentos a larvas de *C. nenuphar*, causando taxas de mortalidade entre 21% a 89%, respectivamente.

Os insetos de *C. psidii* na fase de pré-pupa, apesar de morfologicamente semelhantes àqueles de quarto estágio larval, são menores e o tegumento apresenta aspecto mais ressecado e endurecido, consistindo provavelmente em uma barreira mecânica que determina maior resistência à penetração dos juvenis infectivos. Shapiro-Ilan (2001b) avaliou nematoides contra algumas espécies de insetos, tendo obtido diferentes níveis de mortalidade dependendo dos estágios avaliados dos hospedeiros. Para *Curculio caryae* (gorgulho da pecan), as larvas mais velhas apresentaram menor suscetibilidade aos nematoides comparadas às larvas mais jovens. Lewis et al. (2006) afirmam que o estado fisiológico do inseto pode afetar a habilidade de penetração do juvenil infectivo.

No presente estudo, a maior resistência de *C. psidii* na fase de pré-pupa pode ser uma estratégia conquistada pelo inseto e que garantiu a sua sobrevivência ao longo da evolução, uma vez que o inseto, nessa fase, permanece por seis meses no solo antes de empupar, tornando-se alvo bastante fácil para os nematoides. O solo é um substrato complexo que varia na composição mineral, textural e estrutural. É um ambiente onde a competição é acentuada pela elevada incidência de fungos, bactérias, actinomicetos, algas, vírus e nematoides de diferentes gêneros e espécies, com os patógenos de insetos representando uma pequena proporção da microbiota total do solo (JACKSON, 1999). Assim, as pragas de solo ou insetos que, em determinados estágios de vida, permanecem em contato direto com o solo, estão mais expostos aos entomopatógenos e podem facilitar a atuação e penetração desses agentes. Essa maior exposição dos insetos ao solo acarreta, por outro lado, uma pressão de seleção tornando esses insetos, na sua evolução, mais resistentes aos entomopatógeno (JACKSON, 1996).

Encontrar entomopatógenos eficientes para o controle de insetos no ambiente do solo pode ser uma tarefa um tanto difícil. As espécies e isolados de nematoides com maior amplitude de hospedeiros parecem gerar resultados mais variáveis no controle de pragas de solo. Melhores resultados têm sido obtidos com nematoides que apresentam estreita relação com seus hospedeiros tal como ocorre para *S. scapterisci* que ataca paquinhas, para *S. feltiae* que ataca dípteros, e para isolados de heterorhabditídeos no controle de larvas de curculionídeos e de escarabeídeos. Isso sugere que as relações entre insetos e entomopatógenos são parte de longo processo de coevolução, no qual o aumento da virulência vem acompanhado pelo desenvolvimento de resistência. Entomopatógenos mais específicos e menos generalistas tendem a ser mais virulentos para seus hospedeiros, sendo capazes de explorar alguma susceptibilidade fisiológica ou comportamental dos insetos-alvo (JACKSON, 1999).

Em outro estudo, larvas do bicudo da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) se apresentaram bem mais suscetíveis a à ação de nematoides entomopatogênicos, tendo as espécies *H. indica* IBCB n5 e *S. brazilense* IBCB n6 proporcionado níveis de mortalidade corrigida (Abbott) de 95% e 42%, respectivamente, na dose de 60 JIs/cm^2 (TAVARES et al., 2009). Larvas e pupas do bicudo da cana permanecem dentro do rizoma da cana, em ambiente protegido do ataque de nematoides, não tendo sido necessário adquirirem, durante a evolução do inseto, uma alta resistência para nematoides como verificado para a fase de pré-pupa do gorgulho-da-goiaba.

3.2.2 Teste de campo

As altas taxas de mortalidade de *C. psidii* (> 50%) obtidas no teste de campo são devidas às altas doses utilizadas do nematóide *H. amazonensis* e às condições favoráveis do experimento, especialmente no que se refere à umidade proporcionada por chuvas ocorridas logo após a aplicação do agente. Segundo Georgis e Gaugler (1991), a umidade do solo contribui para a movimentação, persistência e infectividade do nematoide.

Heterorhabditis indica IBCB n5 foi avaliado em campo contra pré-pupas de *C. psidii* nas doses de 1 e 10 JIs/cm^2, tendo proporcionado 33% e 50% de mortalidade, respectivamente (SILVA et al., 2010). Em casa de vegetação, Del Valle et al. (2008) avaliaram o efeito de *H. baujardi* na mortalidade de *C. psidii* mediante o enterrio de

larvas de *G. mellonella* infectadas com o nematoide em potes de 1,5 L contendo quatro larvas do gorgulho. Os autores obtiveram até 51% de mortalidade na dose de seis larvas infectadas/pote. Em teste de campo, os autores obtiveram diferenças significativas na mortalidade do *C. psidii* em relação à testemunha, somente quando o *H. baujardi* foi aplicado em uma dose muito elevada, de seis larvas infectadas por parcela de 0,25 m^2 contendo 50 larvas do gorgulho, o que representava 24.000 larvas infectadas de *G. mellonella*/ha.

Ainda, *Heterorhabditis baujardi* testado de casa de vegetação contra larvas de quarto instar de *C. psidii* nas doses de 100 e 200 JIs/Inseto, proporcionou 30% e 58% de mortalidade, respectivamente (DOLINSKI et al., 2006). Também em casa de vegetação, *H. indica* IBCB n5 e *S. brazilense* IBCB n6 testados contra larvas do bicudo da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* na dose de 60 JIs/cm^2, proporcionaram 85% e 73% de mortalidade corrigida (Abbott), respectivamente (TAVARES et al., 2009).

No presente estudo, a maioria das pré-pupas de *C. psidii* infectadas por *H.* amazonensis foi encontrada envolvida por câmara de terra, o que sugere que os juvenis infectivos podem vencer essa barreira, a qual foi citada por Silva et al. (2010) como uma das causas de proteção contra nematoides durante a fase de pré-pupa.

O nematoide *H. amazonensis* se mostrou bastante virulento para *C. psidii* nas doses de $1x10^9$ e $5x10^9$ JIs/ha, cujo intervalo abrange a dose frequentemente recomendada em outros países, de 2,5 a $5x10^9$ JIs/ha (GEORGIS e HAGUE, 1991; GEORGIS et al., 1995). Em teste de campo com *S. carpocapsae* contra larvas de *C. nenuphar*, foi obtido 73% de mortalidade na dose de $10x10^9$ JIs/ha (OLTHOF e HAGLEY, 1993). Bélair et al. (1998) testaram *S. carpocapsae* contra adultos de *C. nenuphar* em pomar de maçã, na dose de $8x10^9$JIs/ha, e obtiveram 75% de controle. Shapiro-Ilan et al. (2004) avaliaram a dose de 100 JIs/cm^2 de *S. riobravis* contra *C. nenuphar* em pomares de pêssego, nos anos de 2002 e 2003, e obtiveram 100% e 99,5% de mortalidade, respectivamente.

Esse estudo destaca os nematoides entomopatogênicos como agentes potenciais para o controle do gorgulho-da-goiaba, especialmente se considerar que o inseto permanece exposto aos agentes por vários meses no solo, portanto por período bem superior ao considerado na avaliação (12 dias), o que pode resultar em níveis de infecção ainda maiores que os obtidos. Os nematóides *H. amazonensis* IBCB n24 e *S. brazilense* IBCB n6 merecem ser comparados em condições de laboratório e campo contra pré-pupas e também contra pupas do inseto.

CONCLUSÕES

Heterorhabditis amazonensis IBCB n24 é mais virulento para pré-pupas de *Conotrachelus psidii*, seguido de *Steinernema brasiliensis* e *H. indica.*

Pré-pupas de *Conotrachelus psidii* são pouco suscetíveis a nematoides em doses abaixo de 1000 JIs/Inseto.

Heterorhabditis amazonensis IBCB n24 causa mortalidade satisfatória do inseto em condições de campo, nas doses de $1x10^5$ e $5x10^5$ JIs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSTON, D. G.; RANGEL, D. E. N.; LACEY, L. A.; GOLEZ, H. G.; KIM, J. J; ROBERTS, D. W. Evaluation of novel fungal and nematode isolates for control of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Biological Control**, v. 35, p. 163-171, 2005.

ARRUDA NETO, J. S. de. Principais problemas fitossanitários da goiabeira. **Divulgação Agronômica**, v. 32, p. 9-15, 1972.

BARBOSA, F. R.; NASCIMENTO, A. S.; OLIVEIRA, J. V.; ALENCAR, J. A.; HAJI, F. N. P. Pragas. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Semi-Árido (Petrolina, PE). **Goiaba: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, 2001. p. 29-54. (Frutas do Brasil, 18).

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

BELAIR, G., VINCENT, C.; CHOUINARD, G.. Foliar sprays with *Steinernema carpocapsae* against early-season apple pests. **Supplement to the Journal of Nematology**, v. 30, p. 599– 606, 1998.

BOSCAN de MARTÍNEZ, N.; CASARES, R. El gorgojo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae). I. evaluacion de daños. **Agronomía Tropical**, v. 30, p. 77-83, 1980.

BOSCAN de MARTÍNEZ, N.; CASARES, R. Distribucion en el tiempo de las fases del gorgojo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) en el campo. **Agronomía Tropical**, v. 31, p. 123-130, 1982.

CAMPBEL, J. F.; KAYA, H. K. Influence of insect associated cues on the jumping behavior of entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. **Behaviour**, v. 137, p. 591-609, 2000.

DEL VALLE, E. E.; DOLINSKI, C.; SOUZA, R. M.; SAMMUELS, R. I. Performance de *Heterorhabditis baujardi* LPP7(28) (Nematoda: Rhabditida), selecionada para

tolerância a elevadas temperaturas, no controle de *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). **Nematologia Brasileira**, v. 29, p. 199-205, 2005.

DEL VALLE, E. E.; DOLINSKI, C.; BARRETO, E. L. S.; SOUZA, R. M.; SAMMUELS, R. I. Efficacy of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Nematoda: Rhabditida) applied in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) insect cadavers to *Conotrachelus psidii*, (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, p. 33-41, 2008.

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

DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. Virulence mechanisms. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 79-98.

DUNCAN, L. W.; McCOY, C. W.; TERRANOVA, A. C. Estimating sample size and persistence of entomogenous nematodes in sandy and their efficacy against the larvae of *Diaprepes abbreviatus* in Florida. **Journal of Nematology**, v. 28, p. 56-67, 1996.

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

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

GEORGIS, R.; GAUGLE, R. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. **Journal of Economic Entomology**, v. 84, p. 713-20, 1991.

GEORGIS, R.; HAGUE, N. G. M. Nematodes as biological insecticides. **Pesticide Outlook**, v. 20, p. 91-95, 1991.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal.** Banco de Dados Agregados do IBGE, Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bd a/ acervo/acervo2.asp?e=v&p=PA&z=t &o=10>. Acesso em: 19 jan. 2010.

JACKSON, T. A. Factors in the success and failure of microbial control agents for soil dwelling pests. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 4, p. 281-285, 1999.

_____. Soil dwelling pests – is specificity the key to successful microbial control? In T.A. JACKSON, T. A.; GLARE, T. R. (eds.) **Proceedings of the 3rd International Workshop on Microbial Control of Soil Dwelling Pests**, AgResearch. Lincoln, New Zealand, 1996. p. 1–6.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v. 38, p. 181-206, 1993.

KEPENEKCI, I.; GOKCE, A.; GAUGLER, R. Virulence of three species of entomopathogenic nematodes to the chestnut weevil, *Curculio elephans* (Coleoptera: Curculionidae). **Nematropica**, v. 34, p. 199-204, 2004.

LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 38, p. 66-79, 2006.

MEDINA, J. C. Cultura. In: MEDINA, J. C.; GARCIA, J. L. M.; KATO, K.; MARTIN, Z. J. de; VIEIRA, L. F.; RENESTO, O. V. (Eds.). **Goiaba: da cultura ao processamento e comercialização**. Campinas: ITAL, 1978. p. 5-45.

MEDINA, J. C. Cultura. In: MEDINA, J. C.; CASTRO, J. V.; SIGRIST, J. M. M.; MARTIN, Z. J.; KATO, K.; MAIA, M. L.; GARCIA, A. E. B.; LEITE, R. S. S. F. (Eds.). **Goiaba.** . Campinas: ITAL, ICEA, 1991. p. 1-121.

NATALE, W. Adubação, nutrição e calagem na goiabeira. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Eds.). **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização**. Jabuticabal: UNESP, 2009. p. 257-279. (volume 1).

OLTHOF, T. H. A.; HAGLEY, E. A. C. Laboratory studies of the efficacy of steinernematid nematodes against the plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 1078–1082, 1993.

ORLANDO, A.; SAMPAIO, A. S.; CARVALHO, A. M.; SACARANARI, H. J.; ARRUDA, H. V. 1974. Notas sobre o gorgulho das goiabas *Conotrachelus psidii*, Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae) e experimentos de combate. **O Biológico**, v. 40, p. 251-269, 1974.

SHAPIRO-ILAN, D. I. Virulence of entomopathogenic nematodes to pecan weevil larvae *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae), in the laboratory. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 7–13, 2001a.

SHAPIRO-ILAN, D. I. Virulence of entomopathogenic nematodes to pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae) adults. **Journal of Entomology Science**, v. 36, p. 325–328, 2001b.

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

SHAPIRO, D. I.; McCOY, C. W. Virulence of entomopathogenic nematodes to *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 1091–1095, 2000.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; MIZELL III, R. F.; CAMPBELL, J. F. Susceptibility of the plum curculio *Conotrachelus nenuphar*, to entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 34, p. 246–249, 2002b.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; MIZELL III, R. F.; CONTRELL, T. E.; HORTON, D. L. Measuring field efficacy of *Steinernema feltiae and Steinernema riobrave* for suppression of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*, larvae. **Biological Control**, v. 30, p. 496-503, 2004.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; STUART, R.; McCOY, C. W. Comparison of beneficial traits among strains of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, for control of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, v. 28, p. 129-136, 2003.

SILVA, A. C.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; RAGA, A.; SCHMIDT, F. S. Efeito de nematoides entomopatogênicos na mortalidade da mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, e do gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii*. **Nematologia Brasileira**, v. 34, p. 31-40, 2010.

SILVA-FILHO, G.; BAILEZ, O. E.; VIANA-BAILEZ, A. M. Dimorfismo sexual do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 520-524, 2007.

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

SOUZA FILHO, M. F.;COSTA, V. A. Manejo integrado de pragas na goiaba. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Eds.). **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização**. Jabuticabal: UNESP, 2009. p. 327-348. (volume 2).

SOUZA, J. C.; HAGA, A.; SOUZA, M. A. **Pragas da goiabeira**. Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 2003. 60 p. (Boletim Técnico, 71).

TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, L. C.; GOULART, T. M. Efeito sinérgico de combinações entre nematóides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) e inseticidas químicos na mortalidade de *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculinidae). **BioAssay**, v. 4, p. 1-10, 2009.

TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, L. C.; SILVA, A. C. DA; AMBRÓS, C. M. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana de açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em laboratório e casa de vegetação. **Nematologia Brasileira**, v. 31, p. 12-19, 2007.

TODA FRUTA. **Goiaba**. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br>. Acesso em: 19 jan. 2010.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por produtos de qualidade tem exigido tanto de mercados internos quanto de externo a produção de frutas frescas com níveis reduzidos de resíduos agrotóxicos. Isso tem determinado o uso de alternativas que equacionem o problema. Por exemplo, o controle biológico que vem se tornando parte fundamental em programas de manejo integrado de pragas.

Nematoides entomopatogênicos Steinernematidae e Heterorhabditidae são inimigos naturais de insetos em solos de todo o mundo e podem desempenhar papel importante na regulação de populações de insetos pragas em diferentes circunstâncias. Em vista do baixo impacto ambiental e da seletividade dos nematoides entomopatogênicos, eles têm potencial para serem integrados a programs de manejo de pragas. O uso de nematoides para o controle de insetos é uma das possibilidades de implementer a agricultura sustentável brasileira, por exemplo. Questões econômicas e sociais envovendo a realidade da agricultura sustentável, a degradação ambiental são alguns dos fatores que sustentam o uso de nematoides entomopatogêncios.

Contudo, para se alcançar sucesso na utilização de nematoides entomopatogêncios com agentes do controle biológico, há necessidade de se compreender a complexidade do ambiente onde vivem como as várias interações que ocorrem entre os fatores bióticos e abióticos, a distribuição, a abundância e dinâmica de suas populações; há necessidade de se aperfeiçoar conhecimentos sobre a biologia, a ecologia, o comportamento e a genética desses nematoides, assim como entender o como essas características variam entre as espécies, isolados e habitats.

Desse modo, para o êxito de programas com nematoides no controle de pragas no Brasil, é imprescindível que se encontre o nematoide para cada inseto alvo que reúna aspectos como virulência e agressividade ao hospedeiro, comportamento de busca ao hospedeiro, boa persistência em condições de campo.

O mercado, no Brasil, para o uso de nematoides entomopatogênicos é amplo e exige o desenvolvimento de técnicas alternativas aos inseticidas químicos, assim como melhorias do agente por meio da engenharia genética, combinações com outros agentes de controle, interação entre os diversos segmentos envolvidos com a utilização dos nematoides como, por exemplo, produtores, instituições de pesquisa, órgãos públicos, cooperativas, conscientização do produtor sobre os benefícios que oferece o

controle microbiano, implantação de biofábricas para a produção comercial e disponibilização desses agentes no mercado brasileiro.