



# Universidade Estadual do Norte do

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

**PROJETO DE PESQUISA NÚMERO:** 3620

**TÍTULO:**

LEVANTAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS VISANDO O CONTROLE DO COMPLEXO DE PRAGAS DE SOLO DO ESTADO DO PARANÁ

**ESTADO:** Em inclusão

**CAMPUS:** Cornélio Procópio

**CENTRO:** Ciências Humanas e da Educação(Cornélio)

**CURSO:** Ciências Biológicas (Cornélio)

**LINHA INEP:** Meio Ambiente

**ÁREA CNPQ:** Ciências Biológicas

**GRUPO:** Grupo de Pesquisa em Controle Microbiano

**COORDENADOR:** Viviane Sandra Alves

**PROGRAMA:** Programa de Mestrado em Agronomia

**INCLUSÃO:** 14/04/2015

**INÍCIO:** 01/05/2015

**TÉRMINO:** 30/04/2018

**REGISTRO:**

**INCLUSÃO DE RELATÓRIO FINAL:**

**REGISTRO RELATÓRIO FINAL:**

**RESUMO:**

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) são conhecidos a bastante tempo, e em muitos países, largamente empregados no controle de pragas de solo. No entanto, no Brasil, os estudos relacionados a este grupo de entomopatógenos são recentes, e o país ainda é totalmente carente de produtos a base de NEPs. Faltam estudos basais a respeito de levantamento e identificação das principais espécies que aqui ocorrem, bem como de avaliações sobre sua virulência sobre as pragas com potencial de controle por estes agentes. Assim, este projeto tem como objetivo, realizar levantamento, caracterização e identificação de isolados de nematoides de ocorrência no estado do Paraná, bem como a melhoria de técnicas de manutenção das coleções, com o intuito de avalia-los sobre algumas pragas de solo que ocorrem nas principais culturas do estado. Para tanto, será feito levantamento da ocorrência de isolados através do método de isca-viva, e posteriormente a caracterização e identificação destes isolados através de identificação molecular e morfológica. Serão também realizados testes de criopreservação em nitrogênio líquido, visando melhorar as condições de manutenção das coleções de isolados. A seguir, estes serão avaliados quanto a sua virulência sobre insetos pragas de importância econômica para o estado do Paraná.

## **INTRODUÇÃO:**

A constante ocorrência de insetos pragas é desde muito tempo, um grande, senão o principal desafio para a produção da maioria das culturas cultivadas pelo homem, que aliados a tendência de produção em sistemas de monocultura, trazem constantes perdas econômicas, nos mais variados setores da cadeia produtiva no Brasil e no mundo.

Todos os anos, nos deparamos com novos desafios e com a demanda cada vez maior para a busca de alternativas viáveis de produção e cultivo, compatíveis com o consumo de alimentos e matéria prima em geral. No que se refere aos insetos praga, aqueles que vivem abrigados em ambientes crípticos, são considerados de difícil controle, e em função da defasagem de estudos relacionados ao conhecimento da bioecologia e métodos de controle destes, seus danos em algumas culturas podem se tornar fatores limitantes para a produção. Além disso, poucos são os produtos que atuam com eficiência no controle destes insetos, e a ocorrência de inimigos naturais é rara, e difícil de ser estudada. Isto ocorre porque, insetos com hábitos crípticos, ficam mais protegidos do ataque de parasitoides, e até mesmo o controle químico é dificultado, pois a ação dos produtos é limitada e na maioria das vezes o resultado insatisfatório. No que se refere ao controle químico, o uso de produtos sistêmicos e de organofosforados não resultaram em eficiência satisfatória (OLIVEIRA et al., 2005). Mesmo diante de tantos desafios no que tange a ocorrência de pragas, o Brasil destaca-se como um dos principais produtores de alimentos, principalmente grãos, frutas e hortaliças (SCOLARI, 2014), pois o fato de possuir um grande território, aliado a condições climáticas que favorecem o cultivo de ampla diversidade vegetal, a agricultura tem importância econômica e social para o país.

O estado do Paraná, situado na região sul do Brasil, é um dos principais produtores de commodities, destacando-se como um importante pólo do setor orgânico, produzindo principalmente soja, milho, café, cana-de-açúcar, mandioca, frutas e hortaliças (HAMERSCHMIDT, 2006), além de ser responsável por quase um terço da produção de carne de frango no país.

A predominância de pequenas áreas, aliada à necessidade de uma produção diversificada, são de fundamental importância como alternativa de viabilizar o sustento e manutenção dessas propriedades, e culturas como a cana-de-açúcar, o amendoim e a mandioca podem ser citados como de grande importância econômica nestas regiões do estado do Paraná. Além disso, a produção de frangos de corte é importante fonte de renda para pequenos produtores, complementando o sustento nestas propriedades.

No entanto, como dito anteriormente, todos esses sistemas de produção são constantemente ameaçados pela ocorrência de pragas, cujo controle ainda é ineficaz devido o hábito críptico que estas apresentam, e que inviabiliza o uso de estratégias convencionais de controle.

Nos últimos anos é possível observar um aumento de estudos desenvolvidos no Brasil, visando o controle de insetos pragas com métodos ambientalmente menos impactantes, como a utilização de agentes biológicos e entomopatogênicos. Entretanto, são poucos os grupos de pesquisadores que tem se dedicado ao estudo através do controle biológico de pragas de solo. Isto deve-se em parte aos hábitos crípticos destes insetos, muitos passam parte ou todo o ciclo de vida subterrâneos, dificultam a realização de trabalhos de biologia, ecologia e controle principalmente pela dificuldade de manutenção de colônias em condições controladas.

Entre os organismos estudados para controle biológico, e que podem apresentar eficiência no controle de pragas crípticas, estão os nematoides entomopatogênicos (NEPs), que dentre as suas características, destacam-se pela elevada especificidade que possuem em atacar artrópodes, não são tóxicos a vertebrados e/ou plantas. Desta maneira, seu potencial como agentes de controle biológico destes insetos é promissor levando à necessidade de estudos de levantamento, multiplicação, conservação e uso de Nematoides Entomopatogênicos no controle de pragas de solo possibilitando novas alternativas de manejo destas pragas.

## **OBJETIVO(S):**

Objetivo Geral

- Realizar levantamento de isolados nativos, caracterização biológica e identificação, além de avaliar técnicas alternativas para a conservação e manutenção de criações de nematoides entomopatogênicos;

- Avaliar o potencial destes isolados no controle de pragas de solo em condições de laboratório e campo;

#### Objetivos Específicos

- Realizar levantamento de isolados de nematoides entomopatogênicos;
- Realizar caracterização biológica dos isolados;
- Realizar a identificação molecular e morfológica dos isolados que demonstrarem potencial para controle de insetos pragas de importância econômica;
- Avaliar a técnica de criopreservação na manutenção de nematoides entomopatogênicos;
- Avaliar a suscetibilidade de insetos pragas de ocorrência no estado do Paraná a nematoides entomopatogênicos;

#### FUNDAMENTAÇÃO:

O uso de nematoides entomopatogênicos como uma alternativa viável para o controle de insetos de solo pode ser comprovado por vários estudos e de acordo com VOSS et al. (2009) alguns insetos-pragas apresentam uma alta taxa de mortalidade em testes feito em laboratório, como observado para a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepdoptera: Noctuidae); cascudinho de aviário, *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae); mosca-das-frutas, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae); coro-das-pastagens, *Diloboderus abderus* (Sturm, 1826) (Coleoptera: Scarabaeidae); larva-alfinete, *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae); tamanduá-da-soja, *Sternechus subsignatus* (Boheman, 1836) (Coleoptera: Curculionidae); e cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro, *Dysmicoccus texensis* (Tinsley, 1900) (Hemiptera: Pseudococcidae), indicando o alto potencial destes agentes no controle de insetos das mais variadas ordens.

Entre os grupos NEPs com potencial para o controle de pragas, destacam-se as famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae (Rhabditida), onde se incluem os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, dos quais já se conhece aspectos relativos à bioecologia, produção em larga escala, formulação armazenamento e condições necessárias para aplicação (KAYA e GAUGLER, 1993).

Entre as vantagens destes patógenos, pode-se destacar a capacidade de resistência a defensivos agrícolas, a ação sinérgica com outros agentes entomopatogênicos, a capacidade de adaptação a novos ambientes, capacidade de difundir-se no ambiente, facilitando o encontro com o inseto praga, não causam danos as plantas cultivadas, podem reproduzir-se sem o concurso de machos, e ao fato de não serem nocivos a nenhum outro grupo de animais, incluindo o homem. Além disso, são adaptados ao solo, e por consequência, indicados para o controle de insetos com hábitos crípticos que passam pelo menos uma fase do seu ciclo de vida no solo como é o caso da cochonilha-da-raiz-da-mandioca, da broca-da-cana, do percevejo do amendoim e também do cascudinho-dos-aviários (CAPINERA e EPSKY, 1992; KAYA e GAUGLER, 1993; GAUGLER et al., 1997; FERRAZ, 1998; NISHIMATSU e JACKSON, 1998; HAYES et al., 1999; KOPPENHOFER et al., 2000; CAMPBELL e LEWIS, 2002).

Estudos realizados no Brasil e no mundo, evidenciam que estes agentes tem potencial para controle de insetos pragas de solo, e existem trabalhos relatando desde a ocorrência natural em *M. fryanus* (PIZANO et al., 1985) até a avaliação da suscetibilidade do inseto a diferentes isolados em laboratório (ARRIGONI et al., 1986a; PIZANO et al., 1987) e campo (MACHADO et al., 2005).

No que se refere ao uso de NEPs sobre *Cyrtomenus* sp., são poucos os trabalhos que visam o controle deste inseto com estes agentes. Entretanto, já foi constatada patogenicidade, de diferentes isolados, pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, inclusive com parasitismo a campo, em estudo realizado na Colômbia (CAICEDO e BELLOTI, 1996). Também foram avaliaram isolados comerciais (*H. bacteriophora* e *S. feltiae*) em diferentes concentrações e levantamento de isolados nativos de nematoides entomopatogênicos em plantações de amendoim da Colômbia, visando o controle do inseto (MELO et al., 2006; MELO et al., 2009). Com relação ao uso de nematoides para o controle de cochonilhas, há vários estudos que relatam a eficiência destes agentes sobre outras espécies próximas (STUART et al., 1997; ANDALÓ et al., 2004; ALVES et al., 2009a; NIEKERK & MALAN, 2012) em condições de laboratório e campo (ALVES et al., 2009b).

Quanto ao cascudinho de aviário, estudos em condições de laboratório (Geden et al. 1985; Sza?anski et al 2004; Alves et al. 2005b) e campo (Geden et al. 1987; Rodrigueiro et al. 2008) tem demonstrado que estes agentes tem possibilidade de controle contra *A. diaperinus*. No entanto, em estudo recente feito no Brasil (Alves et al., 2012) um

isolado exótico se mostrou como o mais promissor para o controle do inseto.

Os nematoides pertencentes aos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são os que tem se mostrado mais eficientes no controle microbiano. Tal sucesso se deve ao fato destes nematoides serem portadores de bactérias simbióticas que são agentes auxiliares responsáveis pela morte do hospedeiro (GAUGLER e KAYA, 1990). Essa relação simbiótica entre bactéria e nematoide tem papel importante, pois a bactéria auxilia a matar o inseto e proporciona um ambiente favorável para o nematoide se alimentar do cadáver do inseto em questão, reproduzindo-se com êxito. O nematoide por sua vez, garante abrigo e dispersão da bactéria, transportando-a de um hospedeiro para outro (CLARKE, 2008). Além disso, as bactérias do gênero *Photorhabdus* apresentam síntese de estilbenos, que são moléculas normalmente sintetizadas por plantas, e que possuem ação antibiótica (WILLIAMS et al., 2005), antiinflamatória (KIM et al., 2008), antitumorais (CAO et al., 2008) e também neuroprotetores (ORHAN et al., 2008). Estas substâncias mantêm o cadáver do hospedeiro livre de bactérias e de outros organismos saprofitos, e propicia a reprodução e multiplicação do nematoide no interior do inseto morto.

Durante seu ciclo de vida, os nematoides entomopatogênicos apresentam quatro estágios larvais (juvenis), uma fase adulta e a fase de ovo, sendo que os juvenis de terceiro estágio (J3), também chamados infectantes (JIs), são a forma infectante para novos hospedeiros e penetram nos insetos através de suas aberturas naturais (boca, ânus, espiráculos ou pela parede corpórea em alguns casos). Em seguida, migram para a hemocele, onde liberam as bactérias simbióticas (POINAR, 1966), levando o inseto a morte por septicemia (LI et al., 2009). Além disso, os nematoides entomopatogênicos apresentam estratégia de busca pelo hospedeiro através de sua movimentação, sendo assim classificados como “ambusher” quando promovem movimentação própria chamada de nictação, deixando a parte anterior do nematoide livre para esperar a passagem do hospedeiro num tipo de emboscada, e os nematoides “cruiser” que não esperam o hospedeiro passar e sim o buscam ativamente no solo, deslocando-se até localizá-los. Também podem existir nematoides de tipo intermediários, que apresentam os dois comportamentos, como o caso da espécie *S. arenarium* (GREWAL et al., 1994 apud DOLINSKI & MOINO Jr. 2006).

De acordo com Almenara et al. (2012) juvenis infectivos (JIs) de *Heterorhabditis* em geral, tem comportamento do tipo “cruiser”, procurando sempre por insetos hospedeiros, e em JIs do gênero *Steinernema* é comum o comportamento de emboscada (“ambusher”), porém, podem existir exceções em ambos os grupos. NEPs com diferentes estratégias de busca podem coexistir em uma mesma área, exibindo especificidade quanto ao grupo de hospedeiros, ocupando diferentes nichos ou tendo distribuição espacial em manchas. Entretanto, a introdução de isolados exóticos pode comprometer a ocorrência de isolados nativos (EHLERS et al., 1990).

Ainda, de acordo com Dolinski & Moino Jr. (2006), é preciso ter cuidado com a introdução de espécies exóticas, sendo a escolha do nematoide/linhagem, deve ser feita com critério. O uso de nematoides nativos deve ter prioridade sobre os exóticos, que devem ser aplicados em último caso, respeitando-se as condições impostas pela legislação vigente. No entanto, antes da aplicação a campo de isolados nativos, estes devem ser identificados quanto a espécie e ter sua biologia definida. Deve-se levar em consideração a avaliação de características como a temperatura ótima para migração, e reprodução desses nematoides, e a realização de testes de patogenicidade e virulência em laboratório para que se conheça a espécie ou linhagem que causaria maior mortalidade em menor tempo a uma determinada praga ou vetor.

Além disso, outros entomopatógenos podem ter efeito negativo sobre o desenvolvimento e estabelecimento de isolados de nematoides entomopatogênicos, e é importante conhecer bem a área onde se pretende fazer aplicação destes agentes.

Estudos de levantamento, identificação e manutenção de NEPs

Nesse sentido, vários estudos a respeito da taxonomia, biologia, genética, ecologia, hospedeiros, produção e tecnologias de aplicação, em laboratório e campo, vem sendo desenvolvidos nos últimos anos, principalmente fora do Brasil, visando dar embasamento para a comercialização destes agentes (AKHURST, 1996; KAYA e GAUGLER, 1993). NEPs vem sendo explorados em diferentes partes do mundo como agentes de controle de insetos pragas.

No entanto, ainda há muito a saber sobre este grupo de entomopatógenos, e no Brasil, os estudos são ainda mais basais que em outros países, não havendo até o momento, produtos comerciais a base destes agentes, para venda em nosso país, o que reflete a necessidade de mais pesquisas sobre este grupo de entomopatógenos.

O Brasil carece de estudos basais a respeito do grupo, como por exemplo o conhecimento das espécies nativas através do levantamento dos isolados que ocorrem

em solo brasileiro, bem como a sua taxonomia, biologia e espectro de ação sobre nossos insetos pragas.

Nesse sentido, a realização de estudos de levantamento e taxonomia, são de extrema importância.

Durante um longo período, a taxonomia dos NEPs foi confusa e inconclusiva, pois era baseada na taxonomia tradicional, baseada em caracteres morfológicos. Entretanto, diferentes isolados de uma mesma espécie, podem apresentar consideráveis diferenças e variações dependendo do hospedeiro, da nutrição, e temperatura (AKHURST, 1987).

Atualmente, em função da combinação dos métodos de taxonomia morfológica, bioquímica e biologia molecular, a taxonomia dos NEPs avançou bastante, e possui um sistema de classificação bem desenvolvido (Padmanaban, 2010) e visando o uso dos NEPs em programas de controle biológico, o isolamento e a identificação de isolados nativos, bem como da bactéria associada ao nematoide é primordial para o sucesso de pragas endêmicas.

No entanto, mesmo com a existência de elaboradas chaves de identificação, muitos foram os casos de insucesso de identificação ao longo dos anos, mas recentemente, graças aos avanços na área de biologia molecular e na teoria da evolução, tem auxiliado os nematologistas na árdua tarefa da taxonomia deste grupo de organismos (LIU et al., 2000), e recentemente vários trabalhos de descrição, integram dados morfológicos, com dados moleculares (GARDNER et al., 1994; LIU e Berry, 1996; STOCK et al., 1996; STOCK et al., 1997; STOCK et al., 1998; VAN LUC et al., 2000).

Assim, características moleculares, podem ser usadas para identificar, diagnosticar e definir espécies, da mesma forma que os caracteres morfológicos, ou ainda, podem-se usar ambas as técnicas, dando maior confiabilidade aos dados de identificação.

Além da taxonomia, outro importante ponto a se abordar sobre os NEPs, são as técnicas de manutenção e armazenamento destes agentes. Enquanto outros entomopatógenos como fungos, vírus e bactérias podem ser mantidos em freezer a -10°C, os nematoides não sobrevivem nestas condições, e sua manutenção normalmente é feita em meio aquoso, necessitando de constante manutenção.

Um dos entraves para o armazenamento desses organismos é a grande mortalidade ocorrida durante este período, pois fatores como sensibilidade a variações de temperatura, susceptibilidade a contaminantes microbianos, alterações nas propriedades químicas ou microbiológicas que compõem o meio de armazenamento, influenciam a qualidade de armazenamento e a viabilidade dos NEPs nesses substratos (KAYA & STOCK 1997; GREWAL 2000; GLAZER 2002; ANDALÓ et al., 2006, 2010).

Além disso, a constante perda de lipídeos, leva a perda da capacidade infectiva, pois as reservas lipídicas são as fontes de energia para esses organismos, e uma vez que essas reservas se esgotam durante o período de armazenamento, ocorre influência na infectividade e sobrevivência (ANDALÓ et al., 2011).

A dificuldade de armazenamento destes entomopatógenos é um dos principais obstáculos para ampliar seu uso no controle biológico de pragas (ANDALÓ et al., 2010). Por outro lado, Popiel & Vasquez (1991), Curran et al. (1992), e Nugent et al. (1996) relataram que a criopreservação em nitrogênio líquido pode ser um método viável para o armazenamento desses organismos em longo prazo.

A criopreservação consiste na diminuição da temperatura como forma de reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, possibilitando a retomada normal do desenvolvimento celular após o armazenamento em nitrogênio líquido à -196 °C (PEGG, 2007).

No entanto, o sucesso dessa técnica pode ser influenciado pelo tempo de exposição dos nematoides ao crioprotetor, pelo tipo e concentração do crioprotetor utilizado e pela velocidade de descongelamento dos isolados (CURRAN et al., 1992; NUGENT et al., 1996).

Com base no exposto acima, é pertinente afirmar que os nematoides entomopatogênicos apresentam potencial para o controle de pragas de solo no estado do Paraná, sendo entretanto, necessária, a realização de levantamento e identificação dos isolados nativos desta região, bem como a realização de testes para avaliação de isolados adequados como possíveis alternativas de controle no complexo de pragas de solo nesse estado.

Assim, este trabalho tem como objetivo, realizar levantamento de isolados nativos no Paraná, fazer sua caracterização e identificação molecular e morfológica, visando o uso destes agentes no controle de pragas de solo que atacam algumas das principais culturas do estado.

---

## **METODOLOGIA:**

#### Isolamento de Nematoides Entomopatogênicos

Serão realizadas coletas em diferentes áreas do estado do Paraná, preferencialmente em cultivos das culturas que são atacadas pelos insetos utilizados neste trabalho, e também em áreas de florestas (nativas ou reflorestadas) próximas a estas.

As amostras de solo serão extraídas a uma profundidade entre 0 a 10 cm, com auxílio de trado, num raio de 5 m, sendo cada ponto da amostra constituído de 5-10 sub-amostras de solo, de cerca de 100 gramas cada. As sub-amostras serão misturadas em baldes, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas ao laboratório (modificado de KAYA & STOCK, 1997 por Voss et al., 2010). Em seguida, o solo será acondicionado em sacos plásticos, devidamente identificados para permitir a recuperação do ponto de amostragem, e também permitir conotações com o habitat associado (altitude, temperatura predominante e tipo de vegetação).

As amostras serão transportadas até o Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano da UENP, onde o solo de cada amostra obtida no campo será umedecido com água destilada (quando necessário), para atingir umidade próxima e inferior à da capacidade de campo. O solo será então colocado em potes plásticos, e cada pote receberá 10 lagartas de *Galleria mellonella*. De acordo com a metodologia modificada de Bedding & Akhurst (1975) por Voss et al., 2010. Os potes serão mantidos em temperatura de  $25 \pm 3$  °C. Após cinco a sete dias, os insetos mortos e com sintomas de infecção por Neps serão desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio a 0,1%, colocados em câmara seca (placa de Petri de 9 cm de diâmetro com papel de filtro) e incubados em câmara climatizada a 23-25 °C. Após três dias, os cadáveres serão ser transferidos para armadilhas de White (WHITE, 1927) para a coleta dos JIs.

#### Identificação Morfológica de Nematoides Entomopatogênicos

Após o isolamento dos nematoides será feita a identificação dos mesmos. Tal procedimento será realizado através de técnicas de morfometria, microscópio óptico de luz, microscopia eletrônica de varredura e técnicas biomoleculares (Nguyen et al., 2004).

Para estudos morfológicos, dez larvas de *G. mellonella* serão expostas a cerca de 500 JI em placa de Petri (9 cm de diâmetro) com duas folhas de papel filtro umedecidas. As fêmeas de primeira geração (hermafroditas), as fêmeas de segunda geração e os machos serão obtidos através da dissecação dos insetos infectados após 3-4 dias para as fêmeas hermafroditas e 6-7 dias para os outros estágios, após a morte do inseto. Os JI de terceiro estágio serão obtidos durante os dois primeiros dias após a emergência destes dos cadáveres dos insetos (Nguyen & Smart, 1995a).

#### Microscópio óptico de luz

Para microscopia de luz, 20 machos e fêmeas (20 para cada estágio) e 25 JI serão examinados. Os nematoides serão mortos e fixados em TAF (trietanomalina e formalina) como sugerido por Courteny et al. (1955) e adicionais espécimes serão transferidos para lactofenol (Franklin & Goody, 1949), a fim de que estruturas morfológicas sejam melhor observadas. Os nematoides fixados em TAF serão colocados em glicerina utilizando o método de Seinhorst (Seinhorst, 1959). Espécies tipo serão montadas em glicerina, sendo utilizado suporte para lâminula em todos os casos para evitar achatamento das espécies.

#### Morfologia da bursa

Esta etapa será realizada apenas para espécies do gênero *Heterorhabditis*. Os nematoides serão multiplicados e coletados como citado anteriormente. Os machos serão transferidos para um disco com lactofenol em uma chapa aquecida a 65-70°C. Após 30 minutos, um macho será transferido para uma gota de lactofenol em uma lâmina. A parte anterior do macho será removida. Uma lamínula será colocada sobre a gota de lactofenol contendo a parte posterior do nematoide, assim, dez machos serão observados (Nguyen et al., 2004).

#### Microscopia eletrônica de varredura

Adultos e JI serão fixados em 3% glutaraldeído com 0,1 M de cacodilato de sódio em pH 7,2 por 24 horas em 80°C. Posteriormente, estes serão fixados em 2% de solução de tetróxido de ósmio por 12 horas a 25°C, desidratados em uma sequência de acetona, submetidos ao processo de ponto crítico seco com CO<sub>2</sub> líquido, montados em suportes para microscópio eletrônico e cobertos com ouro. Espícula e gubernáculo serão preparados de acordo com Nguyen & Smart (1995b).

#### Identificação Molecular de Isolados de Nematoides Entomopatogênicos

##### Caracterização biomolecular

Espécies consideradas próximas geneticamente e um grupo externo ao táxon serão

utilizados nesse estudo a fim de comparação molecular entre espécies. O DNA será extraído de uma fêmea hermafrodita e será feita a amplificação através de PCR da região ITS (Nguyen & Duncan, 2002; Nguyen et al., 2001).

Para a extração do DNA o nematoide será macerado em 20 $\mu$ L de suspensão que provoca lise, composta por 50 mM de KCl, 10 mM de Tris pH 8,3, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,45% de NP40, 0,45% de Tween 20, 0,01% de gelatina e 60  $\mu$ g/mL de proteinase K e transferidos 0,5 mL para microcentrífuga. Esses tubos serão congelados a -80°C por 10 minutos, depois incubados a 65°C por 1 hora e posteriormente incubados em 95°C por mais 10 minutos. Esses processos são necessários para completar a quebra das células, a digestão de proteínas e inativar a proteinase K, respectivamente. Em seguida, os tubos serão colocados em gelo e centrifugados em 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante contendo o DNA será coletado e mantido em 4°C para uso subsequente (Nguyen et al., 2001).

O próximo passo a ser seguido é a amplificação de PCR, onde a região ITS do DNA ribossomal será amplificada em uma reação usando 100  $\mu$ L do kit DNA polimerase (AMRESCO, Inc.). Para completar a reação serão usados 10  $\mu$ L de 10x suspensão de PCR (composta por 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), adicionado de 2  $\mu$ L de dNTP, 2  $\mu$ L do “primer” a frente, 2  $\mu$ L do “primer” oposto, 0,5  $\mu$ L de Termalase Thr, 74  $\mu$ L de água destilada e 10  $\mu$ L do extrato do DNA. Óleo mineral (10  $\mu$ L) será colocado no topo do tubo com a suspensão para minimizar a evaporação. As reações de PCR serão realizadas em um termociclador, sendo um ciclo de 94°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos em 94°C por 30 segundos, 45°C por 60 segundos e 72°C por 90 segundos.

Os produtos do PCR serão seqüenciados bi-direcionalmente. Os “primers” internos usados serão os 58P = 5'-ACGAATTGCAGACGCTTAG-3' (frente) e H58R = 5'-GTGCGTTCAAACTTCACC-3' (reverso). Os “primers” seqüenciadores foram desenhados com o “Prime program of the Genetic Computer Group” (GCG) Package, Madison, WI, USA. Seqüências completas da região ITS serão alinhadas com seqüências da região ITS1 já previamente publicadas (Adams et al., 1998) usando o Clustal X (Thompson et al., 1997), e então, otimizado manualmente utilizando MacClade 4.05 (Maddison & Maddison, 2002).

Análises filogenéticas serão feitas usando PAUP\* (Swofford, 2002). Para análise de parcimônia, árvores curtas serão obtidas. *Caenorhabditis elegans* (X03680) será usado como grupo externo ao táxon e raiz da árvore.

#### MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS PELO MÉTODO IN VIVO

Criação de *Galleria mellonella* e multiplicação dos Isolados de Nematoides entomopatogênicos

Para a multiplicação dos isolados pelo método in vivo, serão utilizadas lagartas de *G. mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), cuja criação será conduzida no laboratório em temperatura ambiente e a alimentação será feita com dieta artificial adaptada de Dolinski (2006). Os adultos do inseto serão mantidos em laboratório em potes de vidro e tampa plástica perfurada, contendo papel cartão de cor preta dobrados em forma de sanfona para as fêmeas realizarem a oviposição. Esses pedaços de papel serão colocados em potes plásticos forrados com folha sulfite contendo dieta artificial (tabela 2) e favos para servir de alimento para as larvas recém-eclodidas onde permanecerão até serem utilizadas para a multiplicação dos NEPs. E os adultos serão transferidos para potes de vidro para a manutenção da criação.

#### Tabela 02. Ingredientes para dieta de *Galleria mellonella*.

Ingredientes Quantidade

Farinha de trigo 200g

Farelo de trigo 200g

Leite em pó 400g

Levedo de cerveja 120g

Gérmen de trigo 200g

Mel 240g

Glicerina 130g

Água destilada 20ml

Fonte: Cláudia Dolinski (comunicação pessoal)

Para manutenção e replicação dos nematoides visando a realização de bioensaios, os isolados serão multiplicados pelo método in vivo, conforme descrito Molina e Lopes (2001).

Os isolados serão multiplicados pelo método in vivo, de acordo com a metodologia descrita por Molina e Lopes (2001) utilizando lagartas de último instar de *Galleria*

mellonella (Depois de confirmada a infecção das lagartas pelos nematoides, estas serão transferidas para câmara seca e mantidas em BOD a  $23\pm 1^\circ\text{C}$  e no escuro por cinco dias. Após este período, as lagartas serão colocadas em armadilhas de White (White, 1927) para coleta dos Juvenis Infectantes (JIs) ou J3 e mantidas sob as mesmas condições mencionadas acima.

Os JIs em suspensão aquosa (água destilada + Juvenis Infectantes) serão coletados diariamente, armazenados em Becker com aeração por um período máximo de sete dias após a produção para, posteriormente, serem utilizados nos bioensaios.

## CRIOPRESERVAÇÃO

### Testes de Criopreservação

Para os testes de criopreservação será utilizada a metodologia descrita por Popiel & Vasquez (1991), modificada por Nugent et al. (1996) e com adaptações às condições de trabalho do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina.

Os tratamentos serão: (A) imersão dos nematoides no crioprotetor glicerol em diferentes concentrações (15, 20, 25 e 30%); (B) diferentes tempos de exposição dos isolados ao glicerol (24, 48, 72 e 168 horas) (C) incubação dos isolados em nitrogênio líquido (NL) a  $-196^\circ\text{C}$  por 1, 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias.

Para tanto, os isolados serão quantificados e posteriormente vertidos com auxílio de micropipeta sobre disco de papel Whatman nº 42 em funil de Buchner submetido à sucção através de Kitasato conectado a bomba de vácuo para remoção do excesso de água. Em seguida o disco de papel será colocado em placa de Petri devidamente identificada com o nome do isolado e contendo glicerol nas concentrações de 15, 20, 25 e 30%. Os isolados ficarão expostos ao glicerol por períodos de 24, 48 e 72 horas e as placas de Petri serão armazenadas em câmara climatizada a  $23^\circ\text{C}$ . Após cada período de exposição, as suspensões (NEPs + glicerol) serão novamente vertidas sobre disco de papel Whatman nº42, e o procedimento será o mesmo citado acima. A deposição da suspensão sobre o papel será feita lentamente, de modo a evitar extravasamento pelas bordas do mesmo. Posteriormente, será aplicado Metanol 70% com auxílio de micropipeta, mantido a  $23^\circ\text{C}$ , sobre os NEPs retidos no papel, para remover o excesso de glicerol, utilizando também a sucção.

Em seguida o papel filtro contendo os nematoides será colocado em 20 mL de Metanol 70% à temperatura aproximada de  $5^\circ\text{C}$  em placa de Petri de 9cm de diâmetro, imersa parcialmente no gelo por 10 minutos. Terminado o período de tempo estipulado, o papel filtro será retirado de modo a deixar escorrer o Metanol do papel, para que a maior parte dos JIs permaneça na placa.

A suspensão (JIs + Metanol) será agitada e em seguida será colocado 1,5 mL sobre um disco de papel filtro de 2cm de diâmetro, sobre funil de Buchner, para retirar o excesso de Metanol por sucção. O disco de papel com JIs será transferido para criotubos de 2 mL com tampa provida de anel de silicone.

Durante o acondicionamento dos NEPs nos discos, os criotubos prontos e devidamente identificados ficarão mergulhados no gelo. Por último os criotubos serão colocados em perfil de alumínio e inseridos em um botijão criogênico de 20 litros contendo nitrogênio líquido.

Após cada período de incubação no nitrogênio líquido (1, 7, 15, 30, 60, 90 e 180 dias), será realizado o descongelamento para avaliação da sobrevivência e infectividade. Para tanto, será adicionado 2mL de solução salina na concentração de 0,7% de NaCl a  $23^\circ\text{C}$  em cada criotubo e em seguida o mesmo será colocado em uma placa de Petri contendo 15mL da mesma solução onde ficarão mantidos por 24 horas.

A avaliação da sobrevivência será feita contando-se os nematoides vivos e mortos após as 24 horas em solução salina através da observação com microscópio estereoscópio. Os dados serão submetidos à análise de variância e ao teste de média de Tukey pelo programa estatístico SISVAR.

A infectividade será avaliada por meio da inoculação dos NEPs descongelados sobre lagartas de *G. mellonella*, na qual se observará a mortalidade das lagartas e a capacidade de multiplicação dos isolados no interior das mesmas.

Todo o procedimento será realizado individualmente para cada isolado e cada tratamento consistirá de cinco repetições. O trabalho terá um fatorial de  $4\times 3\times 7$  (concentrações de glicerol x tempo de exposição ao glicerol x tempo de incubação em nitrogênio líquido).

### Avaliação de Patogenicidade sobre Insetos Pragas

Após isolamento, caracterização e identificação das estirpes, estas poderão ser utilizadas para testes de patogenicidade e virulência de pragas de importância econômica no estado do Paraná, bem como comparadas quanto a eficiência de controle com outras estirpes já conhecidas de isolados brasileiros de nematoides entomopatogênicos.

#### **JUSTIFICATIVA:**

Espera-se com esse projeto alavancar os estudos relacionados aos nematoides entomopatogênicos no estado do Paraná, tanto no que concerne ao levantamento e conhecimentos das principais espécies que ocorrem no estado, como do comportamento destas quanto a virulência sobre pragas de solo de importantes culturas da região.

Do ponto de vista econômico e/ou social, estes agentes podem ser alternativas para controle de pragas em importantes culturas de subsistência, como a mandioca, amendoim e avicultura, e a formulação de produtos, passa antes pelo conhecimento básico a respeito de espécies e isolados, bem como sua identificação e avaliação quanto a virulência sobre pragas, podendo no futuro, tornarem-se alternativas de controle, minimizando as perdas causadas pelas pragas citadas no projeto, além de agregar valor aos produtos, seja por certamente não apresentarem resíduos indesejáveis, bem como por serem produzidos com base em práticas conservacionistas e ambientalmente corretas.

#### **ATIVIDADES:**

**META 01** Descrição da Meta: Levantamento de isolados nativos de nematoides entomopatogênicos

Unidade de medida: amostras Quantidade: 350

ETAPA nº 01 – Coleta de solo e isolamento a partir de armadilhas com isca viva

Descrição da Etapa: Serão coletadas amostras de solo (aproximadamente 300 g) de várias localidades no estado do Paraná. No laboratório, estas amostras serão acondicionadas em potes plásticos, e serão usadas lagartas de *Galleria mellonella* como isca-viva, para o isolamento dos nematoides.

Período de realização: 01 a 36 meses

ETAPA nº 02 – Caracterização dos isolados

Descrição da Etapa: os isolados coletados serão caracterizados quanto ao gênero que pertencem, capacidade de multiplicação, temperatura ideal de dispersão e hábito de deslocamento.

Período de realização: 12 a 36 meses

Responsável: Viviane Sandra Alves

**META 02** Descrição da Meta: Identificação Molecular dos isolados

Unidade de medida: bioensaios Quantidade: 10

ETAPA nº 01 – Identificação Molecular dos isolados

Descrição da Etapa: os isolados de nematoides entomopatogênicos isolados a partir das amostras de solo serão identificados através de análise molecular pela metodologia de PCR.

Período de realização: 12 a 36 meses

Responsável: Bruno Ambrozio Galindo

**META 03** Descrição da Meta: Identificação Morfológica dos isolados

Unidade de medida: bioensaios Quantidade: 04

ETAPA nº 01 – Identificação Morfológica dos isolados

Descrição da Etapa: caso algum dos isolados selecionados para o controle de alguma das pragas avaliadas não pertença a espécies conhecidas, este será submetido a identificação morfológica.

Período de realização: 12 a 36 meses

Responsável: Vanessa Andaló

**META 04** Descrição da Meta: Manutenção dos isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) em meio aquoso

Unidade de medida: criação Quantidade: 50

ETAPA nº 01 – Manutenção dos isolados de nematoides entomopatogênicos

Descrição da Etapa: os isolados de nematoides entomopatogênicos serão mantidos em suspensão aquosa em BOD a 16°C sem fotoperíodo. Quando necessária será feita sua replicação pelo método *in vivo*, utilizando-se lagartas de *Galleria mellonella*, de acordo com a metodologia de Molina e Lopes (2001).

Período de realização: 01 a 36 meses

Responsável: Viviane Sandra Alves

META 05 Descrição da Meta: Manutenção de isolados usando a criopreservação como alternativa de conservação de nematoides entomopatogênicos

Unidade de medida: bioensaio Quantidade: 4

ETAPA nº 01 – Manutenção dos isolados de nematoides entomopatogênicos em criopreservação

Descrição da Etapa: Isolados de nematoides entomopatogênicos serão submetidos a criopreservação de acordo com a metodologia de Voss et al. (2010), avaliando diferentes concentrações de criopreservadores, tempo de manutenção e a sobrevivência dos isolados quanto a viabilidade e infectividade.

Período de realização: 01 a 24 meses

Responsável: Pedro Manuel Janeiro de Oliveira Neves

META 06 Descrição da Meta: Avaliação da suscetibilidade de insetos pragas de ocorrência no estado do Paraná quanto a suscetibilidade aos isolados de Nematoides Entomopatogênicos

Unidade de medida: bioensaios Quantidade: 10

ETAPA nº 01 – Avaliação da suscetibilidade de insetos pragas a isolados de nematoides entomopatogênicos em condições de laboratório e/ou campo.

Descrição da Etapa: a medida que forem isolados, caracterizados e identificados, as novas estirpes de nematoides poderão ser avaliadas quanto a patogenicidade e virulência a insetos pragas de solo de ocorrência em culturas de importância econômica para o estado do Paraná.

Período de realização: 12 a 36 meses

Responsável: Luis Francisco Angeli Alves e Vanda Pietrovski

### **RESULTADOS ESPERADOS:**

Quanto aos avanços científicos espera-se conhecer melhor as espécies/isolados de nematoides entomopatogênicos da região, e suas características quanto a virulência a alguns insetos pragas de importantes culturas do estado, e no futuro, quem sabe, alguns destes isolados se transformar em tecnologia a ser disponibilizada para o controle na forma de produtos industrializados, como alternativas de controle para o produtor.

### **INFRAESTRUTURA:**

UENP – No Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano (80m<sup>2</sup>) encontram-se equipamentos como câmaras climáticas para incubação dos bioensaios e manutenção dos isolados de nematoides entomopatogênicos, balanças, sistema de purificação de água, microscópio estereoscópio, estufa de secagem, câmara de fluxo horizontal, computadores e vidrarias.

UENP – No Laboratório de Genética Molecular (80m<sup>2</sup>) Laboratório equipado para realização de técnicas moleculares baseadas em PCR. Possui dentre outros equipamentos: Termocicladores, Freezers (-20°C) e Geladeiras, Cubas horizontais e verticais para eletroforese, Fontes para eletroforese, pHmetro, Balança analítica, Sistema de Fotodocumentação, Computadores, Centrífuga Refrigerada, Microondas, Capela de procedimentos, Fluxo laminar com luz UV, Estufa de secagem, Banho-maria, Transiluminador, Micropipetas, Espectrofotômetro (UV/VIS), Agitador tipo gangorra, Fluorímetro Qubit (Invitrogen).

A UENP fornecerá também automóvel para o deslocamento nas coletas e ensaios a campo durante o desenvolvimento do projeto.

UNIOESTE – Lab. de Biotecnologia Agrícola (200 m<sup>2</sup>) é dotado de salas para preparo de meio de cultura, sala de inoculação e de incubação e ainda salas climatizadas (controle de fotoperíodo, temperatura e umidade) para condução dos bioensaios. Como equipamentos, são encontrados agitadores magnéticos com aquecimento, autoclave, câmaras de incubação estacionárias e com agitação, com controle de temperatura e fotoperíodo, balanças semi-analítica e analítica, banho-maria, centrífugas, compressor de ar, cubas e fonte de eletroforese, desumidificador, pHmetros, estufas de secagem e de esterilização, fogão industrial, geladeiras e freezers, sistema de fotodocumentação de Géis- Filtro ETTBR, Hood e placas de conversão de luz, LTB 20X20 HE transiluminador, câmaras de fluxo laminar, destilador de água, forno de micro-ondas, microscópios de luz e estereomicroscópios, aplicadores de precisão (Torre de Potter e Micro aplicador automático).

UFU – Lab. de Entomologia conta com área física de 60,54 m<sup>2</sup> e é destinado, principalmente, para estudos na área de controle microbiano de insetos-pragas, além de local para criação de insetos e para manutenção de entomopatógenos (nematóides e fungos entomopatogênicos). Possui os seguintes equipamentos e materiais: balanças de precisão (semi-analítica e analítica), fogão industrial, geladeira, freezer, lupas estereoscópicas, microscópio binocular, microscópio trinocular, capturador de imagem, microscópio trinocular invertido, câmaras climatizadas tipo BOD, estufa de secagem e esterilização, agitador e aquecedor magnético, câmara de fluxo laminar, forno micro-ondas, autoclave, retroprojektor, vidrarias e reagentes diversos. Laboratório de Controle Biológico (100m<sup>2</sup>) conta com BODs, microscópios estereoscópicos e ópticos, bem como com amplo espaço para a condução de ensaios em condições controladas, ideais para a implementação de criação de insetos.

#### **ORÇAMENTO:**

Cabe ressaltar, que o projeto não necessita aquisição de equipamentos, pois conta com a infraestrutura dos dois laboratórios da UENP envolvidos no projeto, bem como com os demais laboratórios dos pesquisadores colaboradores de outras instituições.

No que se refere a material de consumo, o Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano, em parcerias firmadas com os demais pesquisadores, possui recursos para custear todo o material de consumo dos 12 meses iniciais do projeto. Para as etapas subsequentes, o projeto será submetido a editais de custeio de órgãos de fomento como o CNPq e Fundação Araucária.

Para condução do projeto, será necessária a concessão de carro da universidade para a realização de coletas de solo e realização de ensaios a campo.

#### **REFERÊNCIAS:**

- AKHURST, R. J. From then to now- A brief review of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria. Second International Symposium on Entomopathogenic Nematodes and Their Symbiotic Bacteria, pp. 3 - 8. 1996.
- AKHURST, R. J.. Use of starch gel electrophoresis in the taxonomy of the genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica*. 33: 1- 9. 1987.
- ALMENARA, D.P. ROSSI, C.; NEVES, M.R.C.; WINTER, E. Nematóides entomopatogênicos. In: Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. São Paulo: INCTEM, 2012. p. 01-40.
- ALVES, L. F. A.; ROHDE, C.; ALVES, V. S. 2005b. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology* 34: 139-141.
- ALVES, V.S.; MOINO JUNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; ANDALÓ, V.; SOUZA, G.C. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos à colchonilha da raiz do cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. *Arquivos Instituto Biológico*. São Paulo, v.76, p.67-73, 2009a.
- ALVES, V.S.; Moino Junior, A.; Santa-Cecilia, L.V.C.; Rohde, C.; Silva, M.A.T. Testes em condições para o controle de *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera, Pseudococcidae) em cafeeiro com nematóides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida, Heterorhabditidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 53(1): 139-143, 2009b.
- ALVES, V.S.; NEVES, P.M.O.; ALVES, L.F.A.; MOINO Jr., A.; HOLZ, N. Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) screening for lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) control. *Revista Colombiana de Entomología*. 38 (1): 76-80, 2012.
- ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTA-CECILIA, L.V.C.; SOUZA, G.C. Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos pra a colchonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). *Arquivos do Instituto Biológico*, v.71, n.2, p.181-187, 2004.
- ARRIGONI, E.B. Flutuação populacional de *Migdolus fryanus* Westwood, 1863 (Coleoptera: Cerambycidae). *Boletim Técnico Copersucar*, v.44, p.22-26, 1988.
- ARRIGONI, E.B., DINARDO, L.L., CONDE, A.J., TERÁN, F.O. Aplicação de *Neoplectana carpocapsae* Weiser, 1955 em condições de campo para o controle de *Migdolus* spp.(Coleoptera: Cerambycidae). *Nematol. Bras*, v.10, p.181-190, 1986.
- CAICEDO, A.M., BELLOTTI, A.C. Reconocimiento de nematodos entomopatogênicos nativos asociados a *Cyrtomenus bergi* Froeshner (Hemiptera:Cydnidae) en ocho localidades de Colombia. *Rev. Colom. Entomol.* v. 22, n.1, p.19-24, 1996.
- CAMPBELL, J. F. AND LEWIS, E. E. Entomopathogenic nematode host search strategies. In: Lewis, E. E., Campbell, J. F., Sukhdeo, M.V.K. (Eds.), *The Behavioural Ecology of*

Parasites. CABI Publishing., Wallingford, UK, pp. 13–38. 2002.

CAO, T.M.; DURRANTE, D.; TRIPATHI, A.; LIU, J.; TSAI, S.; KELLOG, G.E.; SIMONI, D.; LEE, R.M. Stilbene derivatives that are cochicine site microtubule inhibitors have antileukemic activity and minimal systemic toxicity. *American Journal of Hematology*, 83: 390-397, 2008.

CAPINERA, J. L. AND EPSKY, N. D. Potential for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes. *Fla. Entomol.* 75: 525–532. 1992. CHERNAKI-LEFFER, A. M.; KUTTEL, J.; MARTINS, L. M.; PEDROSO, A. C.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, F.; FERREIRA, A. J. P. Vectorial competence of larvae and adults of *Alphitobius diaperinus* in the transmission of *Salmonella enteritidis* in poultry. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v. 10, p. 481-487, 2010.

CLARKE, D.J. Photorhabdus: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cellular Microbiology*. v. 10, pag. 2159-2167. 2008.

COURTNEY, W. D., POLLEY, D. AND MILLER, V. L. TAF, an improved xative in nematode techniques. *Plant Disease Reporter, De Doucet.* M 39: 570–571. 1955. CURRAN, J. Influence of application method and pest population size on field efficacy of entomopathogenic nematodes. *J. Nematol.* 24: 631–636. 1992.

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

EHLERS, R-U., STOESSEL, S. AND WYSS, U. The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. And *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the *Heterorhabditis*. *Revue. Nematol.* 13: 417 - 424. 1990.

FERRAZ, L.C.C.B. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.16, p.541-569.

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

GARDENER, S. L., STOCK, S. P. AND KAYA, H. K. A new species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian islands. *J. Parasitol.* 80: 100-106. 1994. GAUGLER, R., LEWIS, E. AND STUART, R. J. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia.* 109: 483 - 489. 1997.

GAUGLER, R.; KAYA, H. K. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton, USA.1990, 365p.

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

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

GODINHO, R. P.; ALVES, L. F. A. Métodos de avaliação de população de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) PANZER em aviários de frango de corte. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 76, p. 107-110, 2009.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *Int. J. Parasitol.* 30: 995–1000. 2000. HAMERSCHMIDT, I. 2006. Panorama da agricultura orgânica no Paraná. Disponível em: <[http://www.planetaorganico.com.br/trab\\_iniberto06.htm](http://www.planetaorganico.com.br/trab_iniberto06.htm)>. Acesso em: jun. de 2014

HAYES, A. E., FITZPATRICK, S. M. AND WEBSTER, J. M. 1999. Infectivity, distribution, and persistence of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. All strain (Rhabditida: Steinernematidae) applied by sprinklers or boom sprayer to dry-pick cranberries. *J. Econ.Entomol.* 92: 539–546. HAZELEGER, W. C.; BOLDER, N. M.; BEUMER, R. R.; JACOBS-REITSMA, W. F. Darkling Beetles (*Alphitobius diaperinus*) and Their Larvae as Potential Vectors for the Transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi B Variant Java between Successive Broiler Flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 6887–6891, 2008.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Sistema IBGE de Recuperação Eletrônica (SIDRA). 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=11&i=P&c=1613>>. Acesso em: jun. de 2014.

KAYA, H. K. AND GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. *Ann. Reve. Entomol.* 38: 181 - 206. 1993.

KAYA, H. K. AND STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. ( In: Lacey, L. Ed.), San Diego California, Academic Press, pp. 281- 324. 1997.

KIM, Y.H.; KWON, H-S.; KIM, D.H.; CHO, H.S.; JUN, J-G.; PARK, J.H.Y.; KIM, J-K. Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *International Immunopharmacol*, 12: 1695-1702, 2008.

- KOPPENHOFER, A. M., GREWAL, P. S. AND FUZY, E. M. Virulence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Steinernema scarabaei* against five white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae) of economic importance in turfgrass in North America. *Biological Control*. 38: 397-404. 2006.
- LI, X.Y.; COWLES, E.A.; COWLES, R.S.; GAUGLER, R.; COX-FOSTER, D. L.; Characterization of immunosuppressive surface coat proteins from *Steinernema glaseri* that selectively kill blood cells in susceptible hosts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 165: 162-169, 2009.
- LIU, J. AND BERRY, R. E. *Steinernema oregonensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Oregon, USA. *Fundam. Appl. Nematol.* 19: 375-380. 1996.
- LIU, J., POINAR, G. O. AND BERRY, R. E. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: the impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 287-306. 2000.
- MACHADO, L.A. e HABIB, M. MIGDOLUS FRYANUS (WESTWOOD, 1863) (COLEOPTERA: VESPERIDAE): PRAGA DA CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.73, n.3, p.375-381, 2006.
- MACHADO, L.A., HABIB, M., LEITE, L.G., MENDES, J.M. Estudos ecológicos e comportamentais de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera, Vesperidae), em cultura de cana-de-açúcar em quatro municípios do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.73, n.2, p.227-233, 2006. MAPA, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>. Acesso em 14 de junho de 2014.
- MELO, M.; ORTEGA, C.A.; GAIGL A.; EHLERS, R.; BELLOTTI, A.C. Evaluación de dos cepas comerciales de entomonematodos como agentes de control de *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *Revista Colombiana de Entomología*, v.32, n.1, p.31-38, 2006.
- MELO, M.; ORTEGA, C.A.; SUSURLUK, A.; GAIGL, A.; BELLOTTI, A. C. Native entomopathogenic nematodes (Rhabditida) in four departments of Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, v.35, n.1, p.28-33, 2009.
- MOLINA, J.P.; LÓPEZ, N.J.C. Producción in vivo de três entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. *Revista Colombiana de Entomología*, v.27, n.1-2, p.73-78, 2001.
- NGUYEN, K. B. AND SMART, JR . G. C. Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). *J. Nematol.* 27: 206-212. 1995.
- NGUYEN, K. B., MARUNIAK, J. AND ADAMS, B. J. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *J. Nematol.* 33: 73-82. 2001. NGUYEN, K. B., SHAPIRO-ILAN, D. I., STUART, R.J., MCCOY, C. W., JAMES, R. R. AND ADAMS, B. J. *Heterorhabditis mexicana* sp. (Heterorhabditidae: Rhabditida) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematol.* 6: 231-244. 2004.
- NGUYEN, K.B. & SMART JR. G.C. *Neosteinernema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *Journal of Nematology*, 26: 162-174, 1994.
- NGUYEN, Khuong B.; HUNT, D. David J. (Ed.). *Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts*. Brill, 2007.
- NIEKERK, S. & MALAN, A.P. Potential of South African entomopathogenic nematodes *Heterorhabditidae* and *Steinernematidae* for control of the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Pseudococcidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 111 166-174, 2012.
- NISHIMATSU, T. AND JACKSON, J. J. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 91: 10-418. 1998.
- OLIVEIRA, C.M.; FIALHO, J.F.; FONTES, J.R.A. Bioecologia, disseminação e danos da cochonilha-das-raízes da mandioca *Protortonia navesi* Fonseca (Hemiptera: Margarodidae). *Planaltina: Embrapa Cerrados*, 2005. 29 p. (Embrapa Cerrados. Série Documentos, 142).
- ORHAN, I.; TOSUB, F.; SENNER, B. Coumarin, anthraquinone and stilbene derivatives with anticholinesterase activity. *Z Naturforsch*, 63: 366-370, 2008.
- PADMANABAN, K. Studies on the Distribution, Molecular Characterization and Evaluation of Entomopathogenic Nematodes in Bharathidasan University Campus, Tiruchirappalli, Tamil Nadu, India. Tese de doutorado apresentada a University Tiruchirappalli- Tamil Nadu, India. 2010.
- PIZANO, M.A.; AGUILLERA, M.M.; MONTEIRO, A.R.; FERRAZ, L.C.B. Incidence of *Neoplectana glaseri* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) parasitizing *Migdolus*

fryanus (Westwood, 1863) (Col.: Cerambycidae).

- RIIS, L., BELLOTTI, A., ARIAS, B. Bionomics and Population Growth Statistics of *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae) on Different Host Plants. *Florida Entomologist*. v.88, n.1, p.1-10, 2005. ROBERTO, C. Panorama Rural. Semente profissional e globalizada. p. 1-6. 2012. Disponível em: <http://www.panoramamarural.com.br/popimprime.aspx?id=2887>. Acesso em: jun. 2014.
- RODRIGUEIRO, T. S. C.; GINARETE, C. M. A.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; GOULART, R. M.; GIACOMETTI, F. H. C. 2008. Eficiência de *Heterorhabditis indica* IBCB-N05 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) sob comedouros de granja avícola. *Arquivos do Instituto Biológico* 75: 279-284.
- SCOLARI, D.D.G., 2005. Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil. Embrapa Roraima, 2005. Disponível em: [http://www.abifina.org.br/arquivos/abf\\_publicacoes/PRODUCAO\\_AGRICOLA\\_MUNDIAL.pdf](http://www.abifina.org.br/arquivos/abf_publicacoes/PRODUCAO_AGRICOLA_MUNDIAL.pdf). Acesso em jun. de 2014.
- SEINHORST, J. W. A rapid method for the transfer of nematodes from xative to anhydrous glycerin. *Nematologica*. 4: 67-69. 1959. SKOV, M. N.; SPENCER, A. G.; HALD, B.; NAUERBY, B.; CARSTENSEN, B.; MADSEN, M. The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* and thermophilic *Campylobacter* spp. between broiler floks. *Avian Diseases*, v. 48, p. 9-18, 2004.
- STOCK, P. S., PRYOR, B. M. AND KAYA, H. K. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA). *Biodiver. Conser.* 8: 535-549. 1999. STOCK, S. P., CHOO, H. Y. AND KAYA, H. K. An entomopathogenic nematode *Steinernema monticolum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species. *Nematologica*. 43: 15-29. 1997. STOCK, S. P., SOMSOOK, V. AND REID, A. *Steinernema siamkayai* n.sp. (Rhabditidae: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. *Syst. Parasitol.* 41: 105-113. 1998.
- STUART, R.J.; POLAVARAPU, E.; LEWIS, E.; GAUGLER, R. Differential susceptibility of *Dysmicoccus vacinni* (Homoptera: Pseudococcidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Journal of Economic Entomology*, v.90, n.4, p.925-932, 1997.
- SZALANSKI, A. L.; PALMER, T. W.; MCKAY, T.; STEELMAN, C. D. 2004. Infectivity of *Steinernema* spp. (Nematoda: Steinernematidae) to adult litter beetles, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in the laboratory. *Biocontrol Science Technology* 14: 81-85.
- UBABEF (União Brasileira de Aves). Relatório Anual: 2014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>. Acesso em : jun. 2014.
- VAN LUC, P., NGUYEN, K. B., REID, A. P. AND SPIRIDONOV, S. E. *Steinernema tami* sp.n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Cat Tien Forest, Vietnam. *Russian J. Nematol.* 8: 33-43. 2000.
- VITTORI, J.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; TROVÓ, K. P.; RIBEIRO, C. A. M.; BARBOSA, G. G.; SOUZA, L. M.; PIGATTO, C. P. *Alphitobius diaperinus* como veiculador de *Clostridium perfringens* em granjas avícolas do interior paulista – Brasil. *Ciência Rural*, v. 37, n. 3, p. 894-896, 2007.
- VOSS, M.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI JÚNIOR, A.S.; BARBOSA-NEGRISOLI, C.R. Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematóides entomopatogênicos. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/853176/1/pd0119.pdf> Acesso em: 23, setembro, 2013.
- WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*. 66: 302 - 303. 1927.
- WILLIAMS, J.S.; THOMAS, M.; CLARKE, D.J. The gene *stlA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photobacterium luminescens* TT01. *Microbiology*, 151: 2543-2550, 2005.

**ATIVIDADES REALIZADAS:**

**RESULTADOS ALCANÇADOS:**

**CONCLUSÃO:**

**RESUMO FINANCEIRO:**

**OBSERVAÇÕES:**

---

## Docentes

---

**Professor:** Bruno Ambrozio Galindo

**Carga horária semanal:** 1

**Carga horária total dedicada ao projeto:**

**Atividades previstas:**

Coordenação das Atividades referentes a identificação Molecular das estirpes isoladas;

**Atividades realizadas:**

**Professor:** Viviane Sandra Alves

**Carga horária semanal:** 8

**Carga horária total dedicada ao projeto:**

**Atividades previstas:**

Desde 2003 o coordenador da proposta, docente efetivo da Universidade Estadual do Norte do Paraná (Adjunto – C), vinculado ao Centro de Ciências Humanas e da Educação, dedica-se a estudos com nematoides entomopatogênicos. Inicialmente durante o doutoramento, e posteriormente como pesquisador, principalmente após ter vínculo definitivo com a referida universidade, onde atua desde 2009.

Durante esse período, vários foram os trabalhos desenvolvidos usando estes agentes no controle de insetos pragas, e muitos destes, com o apoio financeiro de órgãos de fomento, como CNPq e Fundação Araucária e de empresas privadas como a Solana Ltda., ambas de grande relevância regional e estadual, cujos recursos tornaram possível a implementação do Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano da UENP, onde o pesquisador desenvolve seus trabalhos atualmente e coordena o Grupo de Pesquisa em Entomologia e Controle Microbiano.

A produção científica vem crescendo nos últimos anos, sendo que a maior parte dos trabalhos publicados tem relação com a área de nematoides entomopatogênicos, tratando da busca de isolados para o controle de diversas pragas, tanto em condições de laboratório como de campo, evidenciando a experiência do pesquisador na execução de trabalhos com estes agentes.

A formação de recursos humanos na temática do projeto ocorre em vários níveis, com orientação de alunos de TCC, iniciação científica e mestrado, tanto na UENP, como em co-orientação na UEL.

O grupo apresentado neste projeto, resulta de parceria de longa data, onde o coordenador tem desenvolvido trabalhos relacionados ao uso de nematoides para as mais variadas pragas, principalmente visando o controle de pragas de solo da mandioca, e a consolidação tem se efetivado com a inserção de alunos de pós-graduação, vinculados ao Programa de Mestrado em Agronomia, criado em 2012, onde o coordenador atua como professor permanente e orientador.

Sendo assim, o coordenador desta proposta, apresenta plenas condições de desenvolver as atividades abaixo listadas:

- Coordenar a execução das atividades de coleta, caracterização e identificação de estirpes de Nematoides Entomopatogênicos no estado do Paraná;

- Orientar trabalhos de Iniciação Científica, TCC e Dissertações de mestrado junto a UENP vinculados aos trabalhos envolvidos neste projeto;

**Atividades realizadas:**

---

## Alunos

---

**Aluno:** 7189 - Elaine Aparecida Soares

**Curso:** Ciências Biológicas (Cornélio)

**Carga horária** 20

**Carga horária total dedicada ao projeto:** 0

**Atividades previstas:**

Bolsista PIBIC

**Atividades realizadas:**

**Aluno:** 7190 - Gabriela Doneze

**Curso:** Ciências Biológicas (Cornélio)

**Carga horária** 20

**Carga horária total dedicada ao projeto:** 0

**Atividades previstas:**

Bolsista PIBIC

**Atividades realizadas:**

**Aluno:** 7191 - Carolina Aguiar

**Curso:** Ciências Biológicas (Cornélio)

**Carga horária** 20

**Carga horária total dedicada ao projeto:** 0

**Atividades previstas:**

Bolsista PIBIC

**Atividades realizadas:**

---

## Colaboradores externos

---

**Colaborador** 1678 - Luis Francisco Angeli Alves

**Carga horária** 1

**Carga horária total dedicada ao** 1

**Atividades previstas:**

Coordenação das Atividades de avaliação de patogenicidade dos nematoides entomopatogênicos sobre insetos;

**Atividades realizadas:**

**Observações:**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

**Colaborador** 1679 - Vanda Pietrovski

**Carga horária** 1

**Carga horária total dedicada ao** 1

**Atividades previstas:**

Coordenação das Atividades de avaliação de patogenicidade dos nematoides entomopatogênicos sobre insetos;

**Atividades realizadas:**

**Observações:**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

**Colaborador** 1680 - Rudiney Ringenberg

**Carga horária** 1

**Carga horária total dedicada ao** 1

**Atividades previstas:**

Coordenação das Atividades de avaliação de patogenicidade dos nematoides entomopatogênicos sobre insetos;

**Atividades realizadas:**

**Observações:**

EMBRAPA

**Colaborador** 1681 - Vanessa Andaló

**Carga horária** 1

**Carga horária total dedicada ao** 1

**Atividades previstas:**

Coordenar as atividades referentes a identificação morfológica das estirpes de nematoides entomopatogênicos isoladas;

**Atividades realizadas:**

**Observações:**

Universidade Federal de Uberlândia - UFU

**Colaborador** 1682 - Pedro J. de O. Neves

**Carga horária** 1

**Carga horária total dedicada ao** 1

**Atividades previstas:**

Coordenar as atividades referentes aos testes de criopreservação de nematoides Entomopatogênicos;

**Atividades realizadas:**

**Observações:**

Universidade Estadual de Londrina - UEL

**Colaborador** 1683 - Bruna Aparecida Guide

**Carga horária** 4

**Carga horária total dedicada ao** 4

**Atividades previstas:**

Testes de Criopreservação

**Atividades realizadas:**

**Observações:**

Aluna de Mestrado - Coorientação no Programa de Mestrado em Agronomia da UEL

**Colaborador** 1684 - Marcelo Zart

**Carga horária** 4

**Carga horária total dedicada ao** 4

**Atividades previstas:**

Testes de Patogenicidade de Nematoides Entomopagenicos sobre *Dysmicoccus brevipes*;

**Atividades realizadas:**

**Observações:**

Aluno de Pos-Doc pelo programa de Mestrado em Agronomia da UENP;

**Colaborador** 1685 - Dhiego Gomes Ferreira

**Carga horária** 4

**Carga horária total dedicada ao** 4

**Atividades previstas:**

Coordenar atividades referentes a identificação molecular das estirpes isoladas;

**Atividades realizadas:**

**Observações:**

Professor Colaborador da UENP

---

Viviane Sandra Alves

**Coordenador**