

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO DA ECOLOGIA DE INFECÇÃO DOS NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema*
***carpocapsae* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE,**
STEINERNEMATIDAE) EM *Alphitobius diaperinus*
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Júlio César Rocha Costa

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Juiz de Fora, Minas Gerais

Fevereiro de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO DA ECOLOGIA DE INFECÇÃO DOS NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema*
***carpocapsae* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE,**
STEINERNEMATIDAE) EM *Alphitobius diaperinus*
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Júlio César Rocha Costa

Orientador: Pesq. Dr. John Furlong

Co – Orientadora: Pesq. Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Juiz de Fora, Minas Gerais

Fevereiro de 2006

**ESTUDO DA ECOLOGIA DE INFECCÃO DOS NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema
carpocapsae* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE,
STEINERNEMATIDAE) EM *Alphitobius diaperinus*
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

Júlio César Rocha Costa

Orientador: Pesq. Dr. John Furlong

Co – Orientadora: Pesq. Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Aprovada em 22 de fevereiro de 2006

.....
Prof^ª. Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

.....
Prof^ª. Dra. Márcia de Senna Nunes Sales
Universidade Iguazu

.....
Prof. Dr. John Furlong (Orientador)
Embrapa Gado de Leite

Costa, Júlio

Estudo da ecologia de infecção dos nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapse* (Rhabditida: Heterorhabditidae) em *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) / Júlio Costa ; orientador: John Furlong, co-orientadora: Márcia Cristina de Azevedo Prata. – 2006.
109 f .

Dissertação (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal)-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2006.

1. Nematóides. 2. Besouros – Crescimento & desenvolvimento. 3. Pupa – Crescimento & desenvolvimento. I. Furlong, John. II. Prata, Márcia Cristina de Azevedo. III. Título.

CDU: 595.132

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3- TRABALHOS	
3.1- CAPÍTULO 1.....	19
3.1.1- RESUMO.....	19
3.1.2- ABSTRACT.....	20
3.1.3- INTRODUÇÃO.....	21
3.1.4- MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.1.6- CONCLUSÕES.....	38
3.1.7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
3.2- CAPÍTULO 2.....	41
3.2.1- RESUMO.....	41

3.2.2- ABSTRACT.....	42
3.2.3- INTRODUÇÃO.....	43
3.2.4- MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.2.5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.2.6- CONCLUSÕES.....	62
3.2.7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
3.3- CAPÍTULO 3.....	65
3.3.1- RESUMO.....	65
3.3.2- ABSTRACT.....	66
3.3.3- INTRODUÇÃO.....	67
3.3.4- MATERIAL E MÉTODOS.....	69
3.3.5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3.3.6- CONCLUSÕES.....	81
3.3.7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
4- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

6- APÊNDICE – A.....96

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Percentuais totais de mortalidades dos estádios de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) causados pelos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), nas dosagens comuns utilizadas (0, 400, 800 e 1.600 J Is) independentes do substrato; e nos três tipos de substratos, considerando apenas os indivíduos expostos às três dosagens comumente utilizadas (400, 800 e 1.600 J Is).....31

Tabela 2 – Percentuais totais de mortalidades médias em cada tipo de substrato independente das três dosagens comuns utilizadas (400, 800 e 1.600 J Is) dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e de *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae); e do estágio de desenvolvimento de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).....34

Tabela 3 - Dosagens letais de juvenis infectivos dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) para atingirem 50%(DL₅₀) e 90%(DL₉₀) de mortalidade dos estádios de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) a partir das três dosagens comuns (400, 800 e 1.600 J Is), em cada tipo de substrato.....36

CAPÍTULO 2

Tabela 1a – Períodos letais para os juvenis infectivos da espécie *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) atingirem 50% e 90% de mortalidade das larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), a partir de cada dosagem aplicada, em cada tipo de substrato.....53

Tabela 1b – Períodos letais para os juvenis infectivos da espécie *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) atingirem 50% e 90% de mortalidade das pupas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), a partir de cada dosagem aplicada, em cada tipo de substrato.....54

Tabela 1c – Períodos letais para os juvenis infectivos da espécie *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) atingirem 50% e 90% de mortalidade dos adultos de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), a partir de cada dosagem aplicada, em cada tipo de substrato.....55

Tabela 2 - Períodos letais para os juvenis infectivos da espécie *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) causarem 50%(TL₅₀) e 90%(TL₉₀) de mortalidade dos estádios de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), a partir de cada dosagem aplicada, em cada tipo de substrato.....57

Tabela 3 - Períodos letais para os juvenis infectivos das espécies de nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) causarem 50%(TL₅₀) e 90%(TL₉₀) de mortalidade sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), em cada tipo de substrato, independente das três dosagens comuns (400, 800 e 1.600 J Is) e do estágio de desenvolvimento do inseto.....60

CAPÍTULO 3

Tabela 1a - Médias de juvenis infectivos dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) multiplicados em larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).....73

Tabela 1b - Análise do número de larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) necessárias para alcançar as médias de produção de juvenis infectivos, dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), obtidos a partir de larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).....76

Tabela 2 - Médias do comprimento corporal e da largura corporal total dos juvenis infectivos dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), multiplicados em larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).....80

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

Figura 1- Vista parcial interna do galpão de criação de aves domésticas do Departamento de Zootecnia da Universidade federal de Viçosa – MG, onde foi coletada a população inicial de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).....25

Figura 2 - Estádios de desenvolvimento da espécie *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) nos diferentes tipos de substratos testados.....27

Figura 3 - Pupas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) mortas por *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) (círculo vermelho) e pupas vivas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) (círculo azul) sobre papel de filtro.....27

Figura 4 - Representações gráficas dos ritmos de mortalidade absoluta das formas evolutivas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) nas diferentes dosagens de juvenis infectivos de *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) nos substratos cepilho + ração, papel de filtro e terra.....29

Figura 5 - Pupas e adultos jovens de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) recém emergidos do pupário.....32

Figura 6 - Representação gráfica, a partir das três dosagens comuns, das curvas das dosagens letais 50% (DL₅₀) e 90% (DL₉₀) com *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).....38

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Representações gráficas do período de mortalidade das larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) após infecção por juvenis infectivos de *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) nos substratos cepilho + ração, papel de filtro e terra.....47

Figura 2 – Representações gráficas do período de mortalidade das pupas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) após infecção por juvenis infectivos de *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida, Heterorhabditidae) nos substratos cepilho + ração, papel de filtro e terra.....49

Figura 3 - Representações gráficas do período de mortalidade dos adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) após infecção por juvenis infectivos de <i>Heterorhabditis riobravus</i> e <i>Steinernema carpocapsae</i> (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) nos substratos cepilho + ração, papel de filtro e terra.....	50
Figura 4 - Representação gráfica das curvas dos tempos letais 50% (TL ₅₀) e 90% (TL ₉₀) de <i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) em cada tratamento, após infecção por <i>Heterorhabditis riobravus</i> (Rhabditida: Heterorhabditidae).....	56
Figura 5 - Representação gráfica das curvas dos tempos letais 50% (TL ₅₀) e 90% (TL ₉₀) de <i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) em cada tratamento, após infecção por <i>Steinernema carpocapsae</i> (Rhabditida: Steinernematidae).....	58
Figura 6 – Fotografias em seqüência do canibalismo exercido por adultos sobre pupas de <i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae).....	61
CAPÍTULO 3	
Figura 1 – Mini armadilha de White contendo larvas de <i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) e de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae).....	69
Figura 2 – Frascos de 25cm ² contendo os juvenis infectivos dos nematóides <i>Heterorhabditis riobravus</i> e <i>Steinernema carpocapsae</i> (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) multiplicados nas larvas de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) e de <i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae).....	70
Figura 3 – Fotomicrografias dos nematóides entomopatogênicos multiplicados em larvas de <i>Alphitobius diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) e de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae).....	71
Figura 4 – Armadilha de White contendo larvas e pupas de <i>Musca domestica</i> (Diptera: Muscidae) mortas por <i>Steinernema carpocapsae</i> (Rhabditida: Steinernematidae).....	74
Figura 5 - Adulto de <i>Steinernema carpocapsae</i> (Rhabditida: Steinernematidae) com juvenis infectivos no seu interior.....	74
Figura 6 - Comportamento gregário intra-específico dos juvenis infectivos de <i>Heterorhabditis riobravus</i> (Rhabditida: Heterorhabditidae) multiplicados após infecção nos diferentes hospedeiros, quando acondicionados em água destilada.....	78
Apêndice A - Tabela 1 - Patógenos transmitidos e carreados por <i>Alphitobios diaperinus</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) e suas respectivas doenças provocadas sobre as aves.....	96

DEDICATÓRIA & REFLEXÃO

Tenho a grande satisfação de expressar por meio destas palavras todo o meu respeito e admiração com aqueles que de alguma forma ou de outra, acompanharam toda ou parte da minha trajetória para conseguir chegar até aqui. São estas pessoas, seja através de comportamentos adequados ou não, que contribuíram para a escolha do caminho a ser tomado. Se por um lado na caminhada encontrava palavras de força, esperança e sonhos, pelo outro, encontrava obstáculos, atitudes desagradáveis que me faziam desanimar. Contudo, mesmo parecendo que a luta era em vão, sempre existiu em mim a perseverança de continuar, de expressar as pessoas àquilo que realmente acreditava, de que poderia dar certo. Diante das dificuldades aprendi que tentar entender o mundo, responder questões, às quais não conhecemos as respostas, não pela nossa incapacidade, mas talvez por que realmente não haja respostas para tais indagações, não é nossa missão. Parei então de indagar, pois compreendi que estamos sempre sendo colocados a prova por uma força maior do que qualquer mente inteligente, por mais brilhante que ela possa ser.

Nesta minha caminhada, sempre procurei fazer o que considerava correto, seguia meus instintos, meus pensamentos e reflexões. A cada dia aprendia que o “verdadeiro pesquisar” não é isolar-se do mundo, das pessoas “comuns” e das outras ciências, mas sim interagir com aqueles que pensam de forma diferente, que vivenciam mundos e atitudes diferentes das nossas. Acredito que quando cada um de nós conseguir compreender isto, e passar a colocar em práticas estas atitudes, certamente a Ciência irá agradecer, pois não só ela ganhará com isto, mas também todos aqueles que de alguma forma acreditam na sua essência.

As quedas nos deixam cicatrizes, marcam a nossa mente e alma, mas sempre aprendemos com cada uma delas. O segredo é assimilarmos seus efeitos e os de cada vitória que ostentamos durante a nossa jornada aqui na Terra, utilizando-os como experiência. É assim que o ser humano evolui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS; pela humildade, força, coragem e confiança concedida.

Aos meus pais, Ana Mary Rocha da Costa e Pedro Paulo Barbosa Costa pela compreensão nos momentos de ausência e pelas palavras de consolo nos momentos de tristeza.

Ao meu irmão Carlos pela eterna luta conjunta na busca dos nossos ideais.

As minhas irmãs Regina e Adriana por todo apoio oferecido.

A Punk pelos 14 anos de companheirismo e fidelidade.

A todos os funcionários, professores, técnicos e alunos da Universidade Federal de Juiz de Fora, através dos quais tive a oportunidade de acumular conhecimentos.

A todos os profissionais e estagiários da Embrapa Gado de leite pelos 40 meses de convivência.

Aos orientadores Dr. John Furlong e Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata.

A CAPES pelo apoio financeiro, para a execução da presente pesquisa.

Aos verdadeiros amigos,

Toda conquista alcançada, seja em qualquer fase da vida é sempre bem recebida. É sinônimo de luta, perseverança, confiança e dedicação.

Mas a verdadeira conquista, sendo a mais importante de todas ao meu ver, é poder contar com as pessoas que estão à nossa volta, e assim compreender que somos importantes para elas.

Por isto, quero que saibam que sempre poderão contar comigo.

1- INTRODUÇÃO

O Brasil é consolidado pela alta produtividade da atividade agropecuária, dentro da qual a avicultura vem se destacando no cenário internacional. Qualidade e baixos custos são fatores que colocam o Brasil como o 3º maior produtor e 2º maior exportador de frangos do mundo (CHERNAKI *et al.*, 2002).

Este crescimento na produtividade tem estimulado práticas de manejo como o aumento do número de lotes de aves sobre a mesma cama (devido à escassez da maravalha) e intervalos entre lotes algumas vezes reduzidos (5 a 10 dias). Estes fatores parecem contribuir para o aumento populacional de *Alphitobius diaperinus* Panzer, 1797 (Coleoptera: Tenebrionidae), vulgarmente conhecido no Brasil como cascudinho. Este inseto é uma praga de ampla distribuição mundial, comumente encontrada em esterco de galinhas poedeiras assim como em cama de frangos de corte. Segundo CHERNAKI & ALMEIDA (2001), o ciclo total de *A. diaperinus* à temperatura constante de 28°C é de 42,5 dias, o que indica que a cada lote introduzido na granja (o que ocorre a cada 50 dias, aproximadamente) pode ocorrer uma nova geração de insetos, podendo cada fêmea produzir acima de 2 mil ovos (STEELMAN, 1996).

Conforme HARRIS (1966), os estádios mais comumente encontrados nos aviários, larvas e adultos, alimentam-se de carne e órgãos internos de aves mortas. Esse hábito, somado ao contato direto do inseto com a cama das aves (rica em excrementos e restos de ração), faz desse coleóptero um possível veiculador de diversos patógenos causadores de doenças (**Apêndice A**). Adicionalmente, quando atingem populações muito altas nas criações domésticas, determinam

sérios problemas aos produtores como a diminuição no ganho de peso, pelo fato de se tornarem fonte alternativa de alimento para as aves.

As camas das aves oferecem facilidades para as larvas do besouro viverem em seus detritos, construindo túneis ou galerias nos materiais de isolamento térmica, necessitando posteriormente de uma custosa substituição destes materiais (ICHINOSE *et al.* 1980; SAFRIT & AXTELL, 1984), o que gera mais prejuízos econômicos aos produtores. A ação de tunelamento é iniciada pelas larvas quando altas densidades populacionais levam à competição por locais onde será realizado o processo de pupariação no solo abaixo dos detritos.

Assim sendo, o controle do cascudinho é fundamental para a sanidade das aves e inclui medidas como o manejo da cama dos frangos e principalmente a utilização de produtos químicos. A limpeza e o tratamento das instalações com substâncias químicas por ocasião do descarte das aves são métodos eficazes que ajudam a prevenir a reinfestação dos galpões. Contudo as aplicações destes inseticidas nos detritos freqüentemente falham, por não providenciar o controle satisfatório desta praga, presumivelmente devido à inacessibilidade do produto às larvas, pupas e adultos localizados debaixo dos detritos e frestas de galpões (EDWARDS & ABRAHAM, 1985).

Se por um lado existe esta resistência adaptativa do inseto aos produtos químicos, por outro, existe a demanda mundial crescente por alimentos sem resíduos para o consumo humano, bem como a diminuição dos resíduos químicos deixados no ambiente. Diante dessa situação, o controle biológico deixou de ser, em muitos casos, um método alternativo de controle, se tornando hoje uma realidade em muitos agroecossistemas.

Muitos estudos surgiram apontando os nematóides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* (Steinernematidae) e *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae) parasitando uma ampla gama de insetos, tornando-os objeto de consideráveis pesquisas de controle biológico (GAUGLER, 1981; POINAR, 1975, 1979). Contudo, a alta tecnologia hoje envolvida na produção dos nematóides entomopatogênicos (NEPs) apesar de certamente contribuir para aumentar a sua eficiência na busca do controle de pragas, não consegue resolver sozinha todas as limitações existentes no processo. Assim sendo, a real chave para o uso efetivo dos nematóides será a integração desta tecnologia com o conhecimento da ecologia dos Steinernematídeos e Heterorhabditídeos. Os progressos na aplicação da tecnologia, por exemplo, são inadequados, sem informações detalhadas sobre o momento ótimo dos métodos de aplicação e pós-tratamento, os quais são importantes para determinar a persistência e a motilidade dos nematóides (GAUGLER, 1988).

Para *A. diaperinus*, já foram realizados trabalhos em laboratório, objetivando o seu controle, através da utilização de NEPs (GEDEN *et al.* 1985). Os resultados obtidos mostraram-se promissores para futura aplicação a campo, já que a estrutura das instalações de criações de aves domésticas, aliada à biologia comportamental deste coleóptero podem favorecer em muito o efetivo controle a longo prazo, de populações da espécie alvo.

Assim sendo, a realização do presente trabalho é principalmente justificada pela busca do controle biológico das populações de *Alphitobius diaperinus* nos aviários de criação, de forma efetiva, consciente e equilibrada, evitando desta forma o surgimento de novos problemas, como, por exemplo, o desequilíbrio ecológico no ambiente.

Tendo em vista que as pesquisas envolvendo o cascudinho em infecções com nematóides entomopatogênicos ainda estão no início em nosso país, mas com resultados promissores; e que conseqüentemente pouco se sabe sobre esta interação; o presente trabalho teve então os seguintes objetivos: determinar em condições de laboratório a virulência dos NEPs à larvas, pupas e adultos de *A. diaperinus* em três diferentes tipos de substrato; avaliar a infecção e conseqüente morte dos hospedeiros, relacionando-a com as suas respectivas dosagens e períodos letais; determinar a produção média das espécies de NEPs no interior das larvas de *A. diaperinus* e de *G. mellonella*, e por fim, evidenciar possíveis mudanças de alguns parâmetros morfométricos dos juvenis infectivos emergentes de cada espécie hospedeira.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Utilizando os nematóides entomopatogênicos

Dentro da ordem Rhabditida as duas maiores famílias de nematóides entomopatogênicos são Steinernematidae (Chitwood & Chitwood, 1937) e Heterorhabditidae (Poinar, 1976) (POINAR, 1990). Atualmente são conhecidos três gêneros de nematóides entomopatogênicos: *Steinernema* (25), *Heterorhabditis* (8) e *Neosteinernema* (1); sendo parasitos letais obrigatórios de uma vasta extensão de insetos. A manutenção de cepas desses nematóides em laboratório, para serem usados em experimentos relacionados a controle biológico, tem sido obtida através do emprego de lagartas da mariposa *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1.758), apesar da mesma não ser seu hospedeiro natural.

2.2. O interesse pelo seu uso

Esses nematóides possuem uma impressionante lista de atributos para controlar biologicamente insetos pragas residentes do solo (GAUGLER & KAYA, 1990). Apresentam uma ampla ordem de hospedeiros, podendo ser produzido em massa tanto em substratos sólidos (BEEDING, 1984) como também em meio líquido (FRIEDMAN, 1990), são de fácil manipulação, baixo custo de produção, longo tempo de estocagem, compatibilidade com produtos químicos, resistência às variações ambientais, e são isentos dos requerimentos de registro de pesticida nos EUA. Fatores estes que quando somados, têm estimulado interesse no seu desenvolvimento como inseticidas biológicos.

2.3. A mariposa da cera utilizada *in vitro*

A mariposa *G. mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), conhecida como a grande traça da cera, apresenta ampla distribuição geográfica e, provavelmente, sua origem é asiática.

Sua distribuição pode estar relacionada com a movimentação das colméias de abelhas *Apis* spp. (RIBEIRO, 1994), visto que as larvas são as responsáveis pelos prejuízos causados em apiários enfraquecidos, alimentando-se dos favos, cera, mel e pólen.

Como os demais lepidópteros, *G. mellonella* apresenta metamorfose completa (holometabolía) passando por quatro estágios sucessivos: ovo, larva, pupa e adulto.

De acordo com NGUYEN & SMART (1990), o número de nematóides entomopatogênicos criados sobre apenas uma larva desta mariposa pode alcançar cerca de 350.000 juvenis infectivos. Utiliza-se para manutenção de cepas, de 5 a 10 larvas de último ínstar nas armadilhas de White (GLAZER & LEWIS, 2000).

2.4. A Biologia dos nematóides

O juvenil infectivo (L₃), único ínstar de vida livre, ocorre no solo em filmes de água; onde, dispondo de adaptados e variados atos comportamentais ligados à atividade de forrageio, consegue encontrar o hospedeiro, penetrando pelas suas aberturas corporais naturais (boca, espiráculo e poros anal e genital), ou pela sua delgada cutícula (principalmente *Heterorhabditis* spp.), alcançando a hemocele. Os nematóides carregam uma bactéria simbiótica (*Xenorhabdus* spp. ou *Photorhabdus* spp.) em seu intestino, as quais são liberadas dentro do hospedeiro. Estas bactérias multiplicam-se rapidamente, ocasionando a sua morte dentro de 24 a 48h pós - infecção. Antes de produzir uma nova geração de juvenis infectivos, os nematóides dentro do hospedeiro

alimentam-se, desenvolvem-se em adultos maduros sexualmente, acasalam, e se reproduzem freqüentemente por duas ou três gerações (KAYA & GAUGLER, 1993).

Duas ou três gerações de nematóides adultos podem ocorrer no inseto hospedeiro (O'LEARY *et al.*, 1998). O aumento na densidade populacional de nematóides no cadáver somado com as condições limitantes de nutrientes, resulta no desenvolvimento das formas resistentes; os J Is. Estes emergem para o interior ou superfície do solo carregando a bactéria em seu intestino, indo à procura de um novo hospedeiro para infectar.

O ciclo de vida de *Heterorhabditis* spp. é similar ao de *Steinernema* spp., porém as fêmeas da primeira geração são hermafroditas e a progênie destes hermafroditas é composta de machos e fêmeas (ADAMS & NGUYEN, 2002). Estas similaridades entre os ciclos de vida de ambas as espécies são consideradas não um resultado de um fechado relacionamento filogenético, mas sim de uma evolução convergente (POINAR, 1993).

A duração do ciclo depende da temperatura e da espécie de hospedeiro, que em geral, poderá durar de 6 a 18 dias, com temperaturas de 18 a 28 °C em *G. mellonella* (NGUYEN & SMART, 1990; MARTIN, 1997).

2.5. Seu padrão de emergência

A emergência dos J Is do hospedeiro morto, freqüentemente inicia-se abruptamente, apresentando picos durante os primeiros poucos dias, envolvendo dezenas ou centenas de milhares deles. O padrão de emergência da nova geração de J Is que se forma possui um componente genético, e a variabilidade genética para este padrão, ocorre nas populações naturais (STUART *et al.*, 1996). Em parte, ele pode refletir a dinâmica populacional dos nematóides e de suas bactérias associadas dentro do hospedeiro, a disponibilidade e utilização dos recursos no cadáver, e as várias condições e sinais que desencadeiam a formação e liberação dos juvenis infectivos. Além do mais, este também estabelece o período para dispersão, o encontro do hospedeiro, e sua colonização pelos J Is podendo ter um importante impacto sobre o potencial de cooperação e competição que ocorre durante o processo de infecção. Dessa forma, a variação no padrão de emergência pode representar adaptação aos diferentes hospedeiros e seus ambientes.

2.6. Sua distribuição no ambiente

As diferenças na distribuição dos nematóides entomopatogênicos de um modo geral, possivelmente refletem as diferenças na distribuição dos seus hospedeiros insetos suscetíveis,

embora influências ambientais tais como o tipo de solo e a estação do ano possam também determinar a distribuição das espécies (AKHURST & BROOKS, 1984).

2.7. Fatores que afetam a sobrevivência dos nematóides

A limitada “vida de prateleira” dos juvenis infectivos, é o maior obstáculo na realização do pleno potencial destes nematóides entomopatogênicos no controle biológico. Isto ocorre, pelo fato de existirem parâmetros fisiológicos que afetam a estabilidade de armazenagem. Em estudo realizado para se avaliar a sobrevivência *in vitro* de três espécies de nematóides entomopatogênicos (*S. glaseri*, *Steinernema carpocapsae* e *H. bacteriophora*), verificou-se a sobrevivência de 36, 16 e 7 semanas, respectivamente para as espécies citadas (SELVAN *et al.*, 1993).

A estabilidade de armazenamento dos J Is é dependente da temperatura (KLINGER, 1990), das espécies (FAN & HOMINICK, 1991), e da densidade de nematóides estocados (GEORGIS, 1992).

A situação no campo não é diferente fazendo-se necessário conhecer alguns fatores que são importantes para a sobrevivência dos nematóides entomopatogênicos em seu habitat natural, o solo, a fim de se obter sucesso em seu uso como agentes no controle biológico.

Segundo KAYA (1990) a temperatura, umidade, aeração e tipo de solo são alguns dos fatores que afetam a permanência dos juvenis infectivos no seu hábitat. Além destes fatores, os inimigos naturais também podem restringir o uso destes nematóides no controle biológico.

A temperatura é um dos fatores mais importantes que podem limitar a sobrevivência destes nematóides. O limiar de temperatura no qual os nematóides podem sobreviver, infectar e se reproduzir pode variar entre isolados (“*strains*”) e espécies, e pode estar provavelmente relacionado com suas condições climáticas de origem (MOLYNEUX, 1986).

Quando no solo, os nematóides Steinernematideos podem perder água gradualmente por evaporação, entrando em anidrobiose (GLAZER, 2002). Esse termo refere-se à capacidade de um organismo resistir a uma lenta ou rápida perda de água, ficando o metabolismo completamente estagnado. Nesse estado, os nematóides enrolam-se sobre si mesmos para reduzir a superfície cuticular exposta à desidratação.

Diferenças na adaptação térmica podem resultar em uma especialização entre os nematóides. Por exemplo, espécies que são adaptadas a climas mais frios como *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) e *Heterorhabditis megidis*, podem ser mais efetivas contra hospedeiros que são mais ativos durante o inverno. Já espécies que são adaptadas a climas mais quentes como, *Steinernema*

riobravus (CABANILLA *et al.*, 1994), *Steinernema scapterisci* (NGUYEN & SMART, 1990) e *S. rarum* (DOUCET, 1986), podem parasitar hospedeiros prevalentes durante o verão (GREWAL *et al.*, 1993, 1994).

Apesar da influência das condições ambientais na sobrevivência dos nematóides em campo, os juvenis infectivos são bastante resistentes por reter a cutícula do segundo estágio como bainha e, ainda, por não se alimentarem e terem a boca e o ânus cobertos pela cutícula (GLAZER, 1996).

Os inimigos naturais também possuem um importante papel na ecologia populacional de todos os organismos. Os nematóides no solo são expostos a uma variedade de inimigos naturais como bactérias, fungos nematófagos, ácaros, tardígrados, e outros artrópodos que podem causar um grande impacto na dinâmica populacional dos nematóides entomopatogênicos (SMART, 1995).

2.8. A ecologia e comportamento dos juvenis infectivos

LEWIS (2002) dividiu o comportamento dos nematóides entomopatogênicos em quatro categorias: dispersão do juvenil infectivo e localização no solo, estratégias de forrageamento, discriminação do hospedeiro, e dinâmica de infecção.

As estratégias dos J Is em buscar seus hospedeiros é variável entre as distintas espécies de NEPs e essas podem ser classificadas como “ambushers” ou “cruisers”. Os NEPs com estratégia “ambusher” esperam seu hospedeiro realizando nictação, isto é, ficam eretos apoiados em suas caudas aguardando para “pular” no hospedeiro quando ele se aproximar. Por outro lado, os NEPs com estratégia “cruiser”, procuram ativamente seus hospedeiros se movimentando pelo solo, provavelmente atraídos por dióxido de carbono e emissões produzidas pelos hospedeiros. Os NEPs com estratégia “cruiser” são mais efetivos contra insetos de pouca mobilidade no solo, enquanto que os com estratégia “ambusher” são mais efetivos contra alvos móveis.

Steinernematidae e Heterorhabditidae são capazes de se dispersar por curtas e longas distâncias. Segundo DOWNES & GRIFFIN (1996) eles se dispersam ativamente à procura de microambiente adequado e hospedeiro susceptível, que por sua vez atrai os nematóides através de seus materiais fecais e gradientes térmicos. *Steinernema carpocapsae* é um emboscador que nicta (KONDO & ISHIBASHI, 1986), permanece próximo à superfície e não se dispersa para longe (MOYLE & KAYA, 1981), é irresponsivo para hospedeiros sinalizadores (LEWIS *et al.*, 1992), e está adaptado para infectar hospedeiros que se movimentam sob a superfície do solo (CAMPBELL & GAUGLER, 1993). Os crusadores como *S. glaseri* movem-se ativamente no

solo (SCHROEDER & BEAVERS, 1987), respondendo fortemente a hospedeiros sinalizadores (LEWIS *et al.*, 1992), e são especializados na infecção de hospedeiros sedentários. Existem também, várias espécies com comportamento intermediário aos descritos acima, realizando nictação por algum tempo e também se movimentando no solo (CAMPBELL & GAUGLER, 1993, 1997; GREWAL *et al.*, 1994).

De acordo com a estratégia adotada, aumenta-se a probabilidade de encontro e reconhecimento do hospedeiro susceptível (CAMPBELL & KAYA, 2002).

Sendo o hospedeiro susceptível, a entrada se dá pelas aberturas naturais, o que vai depender do estágio de desenvolvimento do hospedeiro, larva, pupa ou adulto.

Quanto à migração por longas distâncias ou dispersão passiva, os insetos hospedeiros atuam como dispersores, pois eles podem sobreviver por alguns dias após a infecção e voar por regiões distantes.

Como o solo possui pelo menos três dimensões, existem diferentes preferências de acordo com a profundidade (HOMINICK, 2002). A colocação do hospedeiro em diferentes profundidades do solo provoca um claro efeito sob a penetração do nematóide, produção da prole, e dinâmica da população. Segundo as revisões de LEWIS (2002), nematóides da espécie *S. carpocapse* geralmente encontram-se na superfície do solo (1 - 2 cm), enquanto *S. glaseri* habita camadas mais inferiores. Além disso, a distribuição espacial pode ser desigual, com muitos indivíduos agregados em certas porções do solo. Ainda, de acordo com ISHIBASHI & KONDO (1986), a população de juvenis liberada no solo declina rapidamente, sendo a redução maior em solos não férteis devido ao impacto biótico.

As diferentes estratégias de forrageamento são importantes, pois podem permitir a coexistência entre as espécies de nematóides (KOPPENHÖFER & KAYA, 1995), entretanto, se somente uma espécie - tipo de hospedeiro está presente, uma competição interespecífica poderá ocorrer.

Todavia, caso a co-infecção de um hospedeiro por diferentes espécies de nematóides entomopatogênicos ocorra (KONDO, 1989; KOPPENHÖFER *et al.*, 1995), somente uma espécie de bactéria simbiótica colonizará o hospedeiro, permitindo a reprodução somente de seu nematóide associado (AKHURST, 1983; ALATORRE-ROSAS & KAYA, 1990,1991). Entretanto, alguns Steinernematídeos, ex. *S. carpocapsae* e *S. glaseri*, podem se reproduzir dentro de um mesmo hospedeiro (KONDO, 1989; KOPPENHÖFER *et al.*, 1995), porque podem se

alimentar a partir da bactéria simbiótica de outras espécies de Steinernematídeos (DUMPHY *et al.*, 1985).

Segundo NICHOLAS (1984), diferentes espécies de nematóides variam na sua habilidade para sobreviver em água através da adoção de diferentes estratégias fisiológicas, comportamentais e bioquímicas que podem por sua vez, também explicar as diferenças na taxa de embebição. Durante a estocagem *in vitro*, por exemplo, os J Is de *H. bacteriophora* movem-se ativamente na água (GAUGLER & CAMPBELL, 1991), enquanto que quase todos os J Is de *S. carpocapsae* assumem um aspecto estacionário em “J” (HARA & KAYA, 1983).

A manutenção de um certo nível de pressão hidrostática é essencial para o movimento do nematóide ou de outras atividades comportamentais (HARRIS & CROFTON; 1957). O aumento no conteúdo água dos J Is aumenta a pressão de turgor, afetando desse modo o movimento e a nictação do nematóide. Isto pode afetar adversalmente a sua infectividade, reduzindo seu potencial de controle biológico.

2.9. As bactérias simbióticas e seu mecanismo de virulência

As bactérias simbiontes *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp., pertencem à família Enterobacteriaceae, são anaeróbicas facultativas, gram-negativas e estão presentes no intestino dos nematóides entomopatogênicos das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. Estas bactérias podem ocorrer em duas formas; na primária e na secundária. A primeira é a usualmente encontrada no estágio infectivo do nematóide e mostra-se instável *in vitro*, produzindo ocasionalmente *in vivo*, a forma secundária (AKHURST, 1980). A forma primária produz substâncias antimicrobianas que reduzem a competição por outros microrganismos (AKHURST, 1982) e promove maior reprodução dos nematóides *in vivo* e *in vitro* do que a forma secundária (AKHURST, 1980).

A relação entre a bactéria e o nematóide é simbiótica porque a bactéria faz a bioconversão do tecido do inseto como fonte de alimento ao nematóide, além da própria biomassa bacteriana lhe servir de alimento; e por outro lado, o nematóide fornece abrigo à bactéria, uma vez que ela não é encontrada sozinha na natureza (WOODRING & KAYA, 1988).

Apesar de o processo patogênico ser o resultado da interação inseto-nematóide-bactéria, HAN & EHLERS (2000) demonstraram que *Steinernema* sp. pode matar *G. mellonella* quando aplicado axenicamente, sem o simbiote. Porém, o tempo necessário para a morte foi mais lento, sugerindo que o nematóide passou a sintetizar entomotoxinas. Igualmente, quando somente a

bactéria é, inoculada no inseto, também ocorre à morte do mesmo, contudo sendo constatada a necessidade de grande número desses microrganismos.

GREWAL et al., (1997) revelaram que a interação entre as bactérias simbióticas e os nematóides não é tão específica como se pensava. Em seus estudos, eles observaram que juvenis de *S. scapterisci* contendo a espécie bacteriana de outro nematóide, *X. nematophilus*, foram mais patogênicos à *G. mellonella* do que carregando seu simbionte natural *Xenorhabdus sp.*

2.10. Produção, estocagem, aplicação e aceitação dos juvenis infectivos

Como já mencionado anteriormente, os nematóides entomopatogênicos podem ser multiplicados *in vivo* utilizando lagartas do último ínstar de *G. mellonella*. Nesse caso, por ser um método financeiramente custoso, ele é utilizado apenas para produção em pequena escala. Já para produção massiva, os métodos de cultura sólida ou líquida, axenicamente, monoxenicamente ou polixenicamente são mais viáveis por serem rápidos e econômicos (BATISTA - FILHO, 1996). Os métodos de multiplicação *in vitro* necessitam de fatores de crescimento e da presença da bactéria simbiótica. De acordo com GAUGLER & HAN (2002), 95% dos nematóides hoje comercializados são produzidos em sistemas de cultura líquida por companhias estrangeiras como MicroBio, E-Nema e SDS Biotech. O produto pode ser formulado utilizando como matriz o gel - alginato, gel - poliacrilamida, argila, carvão aditivado ou esponjas de poliuretano.

Os juvenis infectivos podem ser liberados juntamente com pesticidas químicos através de equipamentos usuais de pulverização, podendo resistir à pressão de até 300 IB/in. Outros métodos incluem irrigação por liberação inundativa, jatos que liberam uma névoa de nematóides e, até mesmo, helicópteros. Steinernematídeos podem ser armazenados em água destilada a 4 – 10°C por 6 – 12 meses (GEORGIS, 1990).

Nematóides produzidos artificialmente podem ter sua qualidade aceita somente se estas forem de encontro com as dos produtos padrões utilizados *in vivo*. Testes de rotina para confirmar a qualidade dos nematóides produzidos comercialmente podem ser feitos, se forem fáceis, rápidos, e se produzirem resultados confiáveis. Embora as análises de lípidios dos nematóides produzidos em massa possam prever suas qualidades como controladores biológicos, isto é muito laborioso (HATAB et al., 1998).

2.11. Problemas a considerar para sua possível aplicação no campo

Os nematóides entomopatogênicos podem utilizar uma gama de hospedeiros para completar seu ciclo de vida, desenvolvendo-se em pragas das ordens Anoplura, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera e Lepidoptera (POINAR, 1989; GEORGIS & GAUGLER, 1991; RAHAMAN *et al.*, 2000). Assim sendo, muitos pesquisadores entendem que o uso de nematóides como bioinseticidas seja ecologicamente correto, já que são inofensivos à maioria dos vertebrados. No entanto, POINAR (1989) demonstrou que eles podem ser patogênicos a anfíbios, moluscos, crustáceos e diplópodos. Isto demonstra a grande necessidade no crescimento das pesquisas, tanto no campo quanto no laboratório, na busca de informações seguras para a correta utilização destes organismos a fim de se evitar a ocorrência, no futuro, de possíveis desequilíbrios ecológicos nas áreas de sua aplicação.

A respeito do manejo dos nematóides, SMITS (1996) recordou três momentos associados à mortalidade dos nematóides: o período de pré-aplicação que se refere à produção, estoque e condições de transporte, fase de aplicação devido à pressão do equipamento e os períodos mais críticos, que são as primeiras horas após a aplicação. A morte de 40 a 80% dos juvenis ocorre nessa última fase, devido à radiação solar e desidratação, em associação com a predação, infecção por antagonistas e depleção de energia.

2.12. O uso dos cascudinhos como hospedeiros

GEDEN *et al.*, (1985) foram os pioneiros nas pesquisas envolvendo exposições de cascudinhos a nematóides entomopatogênicos. Segundo estes autores, a susceptibilidade dos cascudinhos aos nematóides rabditídeos difere entre as espécies e linhagens de nematóides, tipos de substratos e entre os estádios de desenvolvimento deste coleóptero.

2.2 - *Alphitobius diaperinus* (Cascudinho)

2.2.1 - Origem & Taxonomia

A. diaperinus é originário do leste africano onde ocorre naturalmente em ninhos de pássaros e nas cavernas em guano de morcegos (VAUGHAN *et al.*, 1984), onde se alimenta de fragmentos de detritos (MCFARLANE, 1971).

A espécie foi descrita por Panzer em 1797 e pertence à família Tenebrionidae, subfamília Tenebrioninae, tribo Alphitobiini (Reitter, 1917), gênero *Alphitobius* Stephens, segundo definição de Doyen, 1989.

2.2.2 - Caracterização dos estádios de desenvolvimento

Ovos:

Medem de 1,3mm de comprimento por 0,7mm de largura. O vitelo tem aparência branca leitosa. Quando no período de incubação, há uma diferenciação entre o embrião e uma outra área mais clara, enquanto a primeira é bem mais opaca. O pigmento dos olhos é bem evidente no último dia de incubação (WILSON & MINER, 1969).

Larvas:

As larvas recém eclodidas apresentam uma coloração leitosa quando nos primeiros estádios, após o terceiro estágio apresentam uma cor de tom marrom que vai escurecendo à medida que a larva se desenvolve. O tom de cor (pálida) volta ao mesmo tom da primeira larva a cada ecdise realizada, porém no mesmo dia desta, volta à cor anterior. A largura da cápsula cefálica, parâmetro utilizado para a determinação dos diferentes ínstares larvais, pode chegar a medir de 0,20mm (1° ínstar) a 1,41mm (8° ínstar) (FRANCISCO & PRADO, 2001).

As larvas em temperatura de 15,5°C podem atingir 11 ínstares, sendo que em temperaturas de 32,2°C e 37,7°C chegam a atingir apenas oito (WILSON & MINER, 1969).

Este estágio evolutivo também pode ser caracterizado pela presença de “sensorium” no segundo segmento, próximo à base do terceiro segmento, mandíbulas com processo molar apresentando proeminências diferentes, protorax sem pré-esterno distinto, nono tergito abdominal terminando em um segmento simples e urogonfo curto (DOYEN, 1989).

Pupas:

No início da pupariação, são geralmente pálidas, completamente brancas tornando-se posteriormente algumas partes do corpo marrom avermelhado. Pupas fêmeas são geralmente maiores no comprimento (6,24mm a 7,5mm) que as pupas machos (5,0mm a 6,25mm), porém somente o tamanho não constitui um critério seguro na sexagem. A porção posterior apresenta um marcado dimorfismo sexual, mostrando um apêndice genital nas fêmeas, ausente nos machos (BARKÉ & DAVIS, 1967).

Adultos:

Possuem cor marrom avermelhado com um tom bem escuro, dando aparência de negro (WILSON & MINER, 1969).

Possuem cutícula brilhante, pronoto com margem sub-basal notavelmente interrompido medialmente com extremidade prolongada. Possuem comprimento variando de 5,5mm a 7mm, largura de 2,5mm a 3,2mm, olhos ventralmente separados por mais que duas larguras de um olho ao outro (2,2mm a 2,7mm: 1mm). Antenas menores que o pronoto com os segmentos de 5 a 10 expandidos lateralmente.

A distinção entre os sexos nos adultos pode ser feita pela observação dos dois esporões apicais da mesotibia, sendo ambos retos nas fêmeas, enquanto nos machos um dos esporões apresenta-se curvo (GREEN, 1980).

2.2.3 – Hábitos alimentares

Quando associado com galinhas poedeiras, *A. diaperinus* é descrito como onívoro, podendo se alimentar em locais pouco úmidos, em grãos de ração mofados e em carcaças de galinhas mortas ou incapacitadas, em ovos quebrados, sendo também notificado o hábito de canibalismo (LEWIS, 1958; HARDING & BISSEL, 1958; BACK & COTON, 1962; HARRIS, 1966; LANCASTER & SIMCO, 1967; BARKÉ & DAVIS, 1969; SAXENA & SARIN, 1974).

A. diaperinus é considerado por LEGNER & OLTON (1968) uma valiosa espécie predadora de outros artrópodes e responsável pela aeração do esterco através do hábito de tunelagem. LEGNER *et al* (1975) relataram a presença de *A. diaperinus* e outros coleópteros saprófagos em esterco de aves em granjas da Califórnia (USA), considerando-os responsáveis pela decomposição do esterco. Este inseto é também considerado um micófago cosmopolita (ELOWNI & ELBIHARI; 1979) e o saprófago melhor adaptado de granjas de galinhas (PFEIFFER & AXTELL; 1980).

HULLEY & PFLEIDERER (1988), através de testes de preferência alimentar realizados na África do Sul, consideraram *A. diaperinus* como saprófago, apesar de também considera - lo como predador facultativo, podendo se alimentar de ovos e larvas pequenas de *Musca domestica* L (Díptera: Muscidae).

As mandíbulas de larvas de *A. diaperinus* são maciças (robustas) e adaptadas para cortar e compactar. Em condições de criadouros de aves, os incisivos apicais assumem a função de remoção de partículas de ração, material fecal e também material isolante dos viveiros de criações. A mandíbula é inespecífica e altamente indicativa de um hábito alimentar generalizado (LESCHEN & STEELMAN, 1988).

Ao estudar a mortalidade de ovos e larvas de primeiro instar de *M. domestica* em esterco de aves, PROP & MORGAN (1985) observaram que *A. diaperinus* foi muito abundante, embora

estes insetos provavelmente não sendo potentes predadores, em condições naturais, e concluíram que suas atividades no esterco têm um efeito supressor muito significativo nas populações de moscas. Foi observado no decorrer do experimento que onde havia proliferações de *A. diaperinus*, não existia, ou ocorria poucas moscas domésticas.

A não ocorrência de moscas na presença de *A. diaperinus* também foi observada por ARMITAGE (1986) e NEVES *et al.* (1987). Foi ainda observado pelos últimos autores, que as larvas deste besouro são potentes predadoras de ovos de *M. domestica*.

Por outro lado, DASS *et al.* (1984) observaram *A. diaperinus* predando gregariamente larvas de *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae) de culturas de laboratório.

2.2.4 – *Alphitobius diaperinus* como vetor de patógenos:

2.2.4.1 - Vírus

Doença de Marek: durante a alimentação em carcaças o besouro pode ser contaminado com o vírus da leucose (doença de Marek). O vírus é transmitido aos frangos saudáveis quando estes comem os besouros infectados. Pintos “White Rock” (de um dia de idade) e comprovadamente susceptíveis, foram mantidos em isolamento e alimentados com besouros adultos não infectados (controle). Outro grupo foi inoculado com suspensões de *A. diaperinus* infectados, e apresentou o desenvolvimento de tumores (leucose) dentro de um período de quatro semanas (EIDSON *et al.*, 1965), enquanto que o grupo controle não desenvolveu oncogênese.

O tratamento de superfícies externas do besouro com bicloreto de mercúrio não inativou as propriedades oncogênicas, indicando que o agente ativo (vírus) está dentro do besouro (EIDSON *et al.*, 1966). Ainda no mesmo trabalho, estes autores observaram um aumento na abundância de *A. diaperinus*. Tal fato foi concomitante com o aumento da leucose.

Em outro experimento, uma suspensão preparada a partir de larvas e adultos de *A. diaperinus* coletados no esterco foi administrada em frangos de um dia, via oral ou intra-abdominal, e resultou em desenvolvimento de leucose em 25 a 83% dos frangos com quatro semanas de vida. O controle não inoculado foi negativo. Frangos colocados em esterco com *A. diaperinus* também desenvolveram tumores (EIDSON *et al.*, 1966).

A infecção bursal é uma doença viral aguda, altamente contagiosa que acomete frangos jovens e que vem ocorrendo mundialmente em regiões produtoras de frango de corte. MCALLISTER *et al.*, (1995) isolaram o vírus IBVD (Infectious Bursal Disease Vírus) de adultos

de *A. diaperinus* 24 horas após terem ingerido alimento inoculado. O vírus foi encontrado tanto nas peças bucais, intestinos anterior, médio e posterior, como também na hemolinfa do inseto.

2.2.4.2 - Bactérias

Segundo DE CASAS *et al.*, (1968) o esterco não muito quente e a sua composição em granjas de criação é um ótimo ambiente para a cultura de várias bactérias entéricas, especialmente *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* além de outros microrganismos, e parece ser evidente a capacidade de *A. diaperinus* vivo ou morto veicular *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Os autores concluem seu trabalho afirmando que o inseto deve ser considerado como uma fonte destes e outros microrganismos em alimentos para animal e humanos.

2.2.4.3 - Protozoários

A coccidiose das aves, uma das mais importantes doenças que acometem galinhas, causada pelos protozoários do gênero *Eimeria*, os quais sobrevivem pouco tempo em esterco de galinha, porém sobrevivem como oocistos quando ingeridos por besouros; os quais podem ser eventualmente ingeridos pelas aves, transmitindo desta forma os agentes da parasitose (REYNS *et al.*, 1983).

2.2.4.4 - Cestóides e nematóides

Cisticercóides de *Choanotaenia infundibulum* (Bloch, 1779) Railliet, 1896 foram encontrados naturalmente em 78 de um total de 542 adultos de *A. diaperinus* (14, 4%) coletados de duas fazendas de criação de aves no Sudão. Já as larvas do coleóptero apresentaram uma taxa pouco significativa (0,75%) de infecção (ELOWNI & ELBIHARI, 1979).

A. diaperinus ocorre muito comumente em granjas de galinhas poedeiras na região de Namakkal (Índia) e tem sido observado como vetor natural de *Suburula brumpti*. Larvas deste nematóide foram encontradas em 40,63% dos besouros dissecados. O segundo estágio larval foi observado no oitavo dia após a infecção experimental enquanto que o terceiro estágio infectante encistado da larva foi observado entre doze e dezesseis dias após a infecção (KARUNAMOORTHY *et al.*, 1994).

2.2.5 - *A. diaperinus* como praga estrutural

A espécie infesta principalmente ração de aves de corte e poedeiras, e tem sido considerada como uma das maiores pragas estruturais em países de clima temperado devido aos danos

causados pelo hábito de pupariação, perfurando placas de poliuretano e polietileno utilizados nas paredes dos galpões para isolamento térmico (SPILMAN, 1968; ICHINOSE *et al.* 1980; LÊ TORC'H *et al.*, 1983; VAUGHAN *et al.* 1984; TURNER, 1986; DESPINS *et al.*, 1987 e 1989; ARENDS, 1987).

Perdas estimadas na produção de ovos foram atribuídas aos danos causados por *A. diaperinus*, que podem ser maiores que 1,35 dúzias ovos ao ano (GROOVER & CRAUN *apud* VAUGHAN *et al.*, 1984). Segundo VAUGHAN *et al.* (1984), além da perda do material, outros prejuízos podem decorrer devido à presença de *A. diaperinus*, dentre os quais estão incluídos: perda de eficiência alimentar (principalmente em meses frios) devida à perda gradual do isolamento térmico; perda acentuada enquanto o galpão está fora de produção devido aos reparos; gastos de manutenção do isolamento; perda de energia e depreciação da construção.

2.2.6 - Medidas de controle:

Através de inimigos naturais

GEDEN *et al.*, (1985) testaram a infectividade de três nematóides entomopatogênicos: *Steinernema feltiae* e *Steinernema glaseri* (Steinernematidae) e *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). Quando confinados em placas de Petri com papel de filtro tratado com estes nematóides, todos os estádios do besouro foram altamente susceptíveis ao parasitismo de *S. feltiae*, com DL₅₀ de 9 a 56 nematóides por hospedeiro. Para *H. heliothidis*, larvas jovens (DL₅₀=26) e pupas (DL₅₀=36) foram mais susceptíveis que larvas de últimos estádios (DL₅₀=1791) e adultos (DL₅₀=724). Somente besouros adultos foram susceptíveis à *S. glaseri* (DL₅₀=714). As pupas tiveram maior mortalidade em solo arenoso (*S. feltiae* DL₅₀=46; *H. heliothidis* DL₅₀=444), que em solo argiloso (*S. feltiae* DL₅₀=95, *H. heliothidis* DL₅₀=5796).

Larvas de *A. diaperinus* mostraram-se susceptíveis ao tratamento com conídios de *Beauveria bassiana* Balsamo (Moniliales: Moniliaceae) em suspensão aquosa ou em pó (STEINKRAUS *et al.*, 1991). Os testes mostraram taxas de mortalidade larval de 98% e 60% respectivamente, em ensaios de duas semanas de exposição à suspensões de 50 milhões de conídios por ml de suspensão aquosa ou 250 milhões de conídios por grama de pó, respectivamente. Entretanto a mortalidade dos besouros adultos foi baixa (<27%) em todos os ensaios.

Através de Inseticidas

Medidas de controle contra infestações de *A. diaperinus* em criação de animais freqüentemente envolvem tratamentos com inseticidas organofosforados, através de pulverização das edificações (ANON, 1980).

MILLER & REDFERN (1988) em testes de laboratório, alimentaram larvas com ração contendo compostos de “benzoilfeniluréia, *Bacillus thuringiensis*, cyromazine e ivermectina. Dos seis compostos de benzoilfeniluréia (Penfluron: 0,25ppm; AI3-63764 0,5 ppm; AI3-29785 1 ppm; Diflubenzuron 5 ppm; AI3 – 29832 2 ppm e triflumuron 2 ppm) todos, com exceção de diflubenzuron, causaram mortalidade maior que 90% em larvas em concentrações < ou = a 2 ppm na alimentação. Entre *Bacillus thuringiensis* (> 5 ppm), cyromazine (> 5ppm) e ivermectina (2ppm), somente a ivermectina teve atividade comparável aos compostos de benzoilfeniluréia.

Testes com análogos de hormônios juvenis (methoprene e fenoxycarb) contra *A. diaperinus* realizados por EDWARDS & ABRAHAM (1985) mostraram eficiência no controle do desenvolvimento larval, com má formação de pupas, inviabilizando assim o estágio adulto. Entretanto, “fenoxycarb” foi aproximadamente 100 vezes mais eficiente que “methoprene” na prevenção da emergência de besouros. A completa supressão da emergência de adultos foi determinada de 5 a 10 ppm de “methoprene”, porém o mesmo efeito foi obtido com somente 0,05 ppm de “fenoxycarb”.

O uso de inseticidas deve ser feito cuidadosamente. Aplicações sucessivas de um mesmo inseticida podem provocar resistência nos insetos devido à pressão de seleção.

2.3 - Mecanismos de defesas apresentados pelos insetos

As reações de defesa celular dos insetos contra infecções microbianas consistem de fagócitos e formação de nódulo ao redor da bactéria, conídios e hifa de fungo, enquanto os ovos dos parasitos e os parasitos são encapsulados (SALT, 1970; POINAR, 1974; RATCLIFFE, 1982). A defesa celular por meio de hemócitos toma o local imediatamente após o contato com a bactéria, mas a indução da defesa humoral segue depois de um curto atraso, porque este tempo é necessário para a síntese das proteínas antibacterianas. Se microrganismos invasores não podem ser rapidamente fagocitados ou nodulados pelas células sanguíneas circulantes, elas induzem uma resposta humoral imune (célula – livre). A imunidade da célula livre do inseto depende da produção de um número de peptídios antibacterianos e de proteínas, e é atribuível a compostos inatos tais como, as lisozimas (JAROSZ & SPIEWAK, 1979), lecitinas (OLAFSEN,1996), e a proteínas imunes induzíveis ausentes nos insetos não imunizados (JAROSZ, 1998).

NELSON *et al.* (1975), afirmaram que a defesa comportamental é complementar aos modos de resistências imunológicas e fisiológicas, e deve reduzir a demanda sob os recursos

imunológicos. Esta concepção deu ascensão para a caracterização da defesa comportamental anti – parasitos como “a primeira linha de defesa”.

Os espiráculos são a principal via de ingresso dos J Is nos insetos (GEORGIS & HAGUE, 1981). Contudo, alguns insetos possuem “*sieve plates*” recobrimdo seus espiráculos, o que impede a penetração dos nematóides (FORSCHLER & GARDNER, 1991). As vias naturais alternativas são a boca e o ânus, mas também pode haver resistências à infecção, pois os nematóides podem ser mastigados no processo de limpeza corporal comum a alguns insetos (e.x. Curculionidae) ou pelo hábito de defecação constante que pode impedir a entrada pelo ânus (e.x. lagartas de lepidópteros) (DOWDS & PETERS, 2002).

GAUGLER (1988) sugere que a tendência de muitos insetos “quiescentes” no solo, especialmente pupas, em liberar dióxido de carbono em explosões ao invés de continuamente, com um período superior a 7 horas entre cada uma delas (CHAPMAN, 1982), possa ser em parte uma resposta co-evolucionária para escapar da detecção e, portanto, evitar o parasitismo pelo nematóide. Os espiráculos são quase fechados durante o período entre as liberações, negando o acesso através da principal porta de entrada dos nematóides. Outros insetos se movimentam quase que constantemente através do solo, aumentando a dificuldade de orientação dos potenciais hospedeiros. Insetos estacionários devem ser alvos fáceis, mas muitas espécies, incluindo Scarabeídeos comedores de raiz, constroem células pupais densamente empacotadas de partículas do solo, que apresentam uma formidável barreira física à infecção (GAUGLER 1988).

CAPÍTULO 1

DETERMINAÇÃO DAS DOSAGENS LETAIS DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE) PARA OS ESTÁDIOS DE VIDA DE *Aphitobius diaperinus* (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EM DIFERENTES TIPOS DE SUBSTRATOS

RESUMO

Aphitobius diaperinus (Panzer), conhecido como o cascudinho ou "lesser mealworm" coloniza o substrato encontrado em granjas, criando-se em altas populações, causando problemas sanitários e econômicos. Eles afetam a saúde e o desempenho das aves, sendo também transmissores de agentes de doenças. Seu controle baseia-se em aplicações de inseticidas, que aumentam os custos de produção e são prejudiciais aos animais. Assim sendo, as infectividades de *Heterorhabditis riobravus* e de *Steinernema carpocapsae* diante dos estádios de larva, pupa e

adulto deste inseto para a primeira espécie de nematóide citada, e de larva e adulto para a segunda espécie, foram avaliadas em laboratório, utilizando os seguintes tipos de substratos: cepilho + ração, papel de filtro e terra. O objetivo foi determinar o grau de virulência dos juvenis infectivos (J Is) destes nematóides em cada tratamento. Os resultados indicaram que tanto *H. riobravus*, quanto *S. carpocapsae* apresentam potencial para infectar todos os estádios de desenvolvimento da espécie *A. diaperinus* analisados; e que os J Is de *S. carpocapsae* mostraram-se mais eficientes contra larvas e adultos de *A. diaperinus*, do que os J Is de *H. riobravus*, em todos os tipos de substratos testados. Como já observado em outro estudo, os estágios imaturos se mostraram mais susceptíveis aos nematóides do que os adultos. Quando comparou - se os tratamentos com as duas espécies de nematóides sobre indivíduos adultos no substrato cepilho + ração, ambiente natural da espécie a ser controlada, verificou - se que as DL₅₀ e DL₉₀ de J Is de *S. carpocapsae*, corresponderam respectivamente a apenas 54,18% da DL₅₀ e a 40,34% da DL₉₀, encontradas para o tratamento envolvendo o nematóide da espécie *H. riobravus*.

Palavras chave: *Alphitobius diaperinus*, controle biológico, nematóides entomopatogênicos, substratos, dosagens letais.

DETERMINATION OF THE LETHAL DOSAGES OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES *Heterorhabditis riobravus* AND *Steinernema carpocapsae* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE) TO THE LIFE STAGES OF *Alphitobius diaperinus* (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) IN DIFFERENT TYPES OF SUBSTRATE.

ABSTRACT

Alphitobius diaperinus (Panzer), known as cascudinho or "lesser mealworm" colonizes the substrate found at farms, developing itself in high populations, causing sanitary and economical problems. They affect the health and performance of the birds, being also transmitters of diseases. Their control is based on the application of insecticides, which increase the production costs and are harmful to the animals. Therefore, the infectivity of *Heterorhabditis riobravus* and of *Steinernema carpocapsae* in front the life stages of larvae, pupae and adult of

this insect - for the first mentioned species of nematode - and of larva and adult for the second species, were evaluated in laboratory, using the following types of substrate: small plane + ration, filter paper and earth. The objective was to determine the degree of virulence of the J Is of these nematodes in each treatment. The results indicated that so much *H. riobravus*, as well as *S. carpocapsae* presented potential to infect all of the life stages of development of the species *A. diaperinus* analyzed; and that the infective juvenile of *S. carpocapsae* were shown more efficient against larvae and adults of *A. diaperinus*, that the infective juvenile of *H. riobravus*, in all of the types of tested substrate. As already observed in another study, the immature life stages were shown to be more susceptible to the nematodes than the adult life stage. When we compared the treatments with the two species of adult individuals constituted by the nematodes in the substrate of small plane + ration, natural environment for the species to be controlled, we verified that DL_{50} and DL_{90} of J Is of *S. carpocapsae*, corresponded respectively only 54.18% of DL_{50} and to 40.34% of DL_{90} , found for the treatment involving the nematode of the species *H. riobravus*.

Words key: *Alphitobius diaperinus*, biological control, entomopathogenic nematodes, substrate, lethal dosages.

INTRODUÇÃO

O cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) é um inseto da família Tenebrionidae originário do leste africano comumente encontrado em grãos armazenados em galpões de criação de frangos de corte, matrizes e perus. É uma das maiores pragas da indústria aviária em diversos países do mundo (PFEIFFER & AXTELL, 1980).

A expansão da avicultura industrial nas últimas décadas propiciou a este inseto um habitat ideal para seu desenvolvimento se alimentando de fezes, carcaças e restos de ração. Devido a este hábito de vida é também conhecido como um importante vetor de patógenos causadores de doenças aviárias.

O controle químico é o principal método utilizado contra estes insetos, contudo ele nem sempre é empregado com cautela para retardar ao máximo o desenvolvimento da resistência da praga aos inseticidas empregados, e para reduzir a deposição de resíduos na carne e nos ovos das aves, dos produtos químicos utilizados.

A necessidade do surgimento de novas alternativas para o controle deste inseto no Brasil se faz então necessária, principalmente pelo fato da indústria avícola estar em contínua expansão no País, conquistando espaços cada vez maiores no mercado externo.

GEDEN *et al.*, (1985), utilizando três diferentes espécies de nematóides entomopatogênicos (NEPs) e obtendo bons resultados de infecção e morte de larvas, pupas e adultos de *A. diaperinus*, em diferentes tipos de substratos concluíram que a espécie *S. feltiae* apresentada nos testes como a mais virulenta, pode ser uma ótima ferramenta para o controle destes insetos em seu ambiente natural. Contudo são raros os trabalhos envolvendo os nematóides da Ordem Rhabditida com esta espécie de coleóptero.

A maior parte das pesquisas realizadas com Steinernematídeos e Heterorhabditídeos tem focado sua atenção na tentativa de controlar biologicamente, principalmente insetos considerados como pragas agrícolas, onde se admite um grande número de coleópteros. Porém, muitos resultados obtidos em laboratório não são satisfatórios quando aplicados no campo. Isto é devido principalmente à carência de informações sobre a influência dos fatores abióticos e bióticos, que juntos interagem atuando sobre o comportamento que envolve a ecologia de infecção.

A eficiência dos NEPs pode estar restrita pelas reações comportamentais ou humorais de suas espécies de hospedeiros. Algumas larvas de insetos (ex. lagartas brancas de lepidópteros), rejeitam os NEPs sob sua cutícula através dos atos de coçar e morder (GAUGLER *et al.*, 1994). Outros insetos desenvolvem potentes mecanismos de defesa celular e ou humoral, os quais podem capacitá-los a se defender contra um ataque por J Is. Por exemplo, as jaquetas de couro, *Tipula* spp. conseguem sobreviver a uma infecção de nematóides encapsulando os juvenis invasores (PETERS & EHLERS, 1994).

A alta tecnologia hoje envolvida na produção dos NEPs certamente tem contribuído para aumentar a sua eficiência na busca do controle de pragas. Porém, esta não consegue resolver sozinha todas as limitações existentes no processo. Assim sendo, a real chave para o uso efetivo dos nematóides será a integração desta tecnologia com o conhecimento da ecologia dos Steinernematídeos e Heterorhabditídeos. Os progressos na aplicação da tecnologia, por exemplo, são inadequados sem informações detalhadas sob o momento ótimo dos métodos de aplicação e pós-tratamento, os quais são importantes para determinar a persistência e a motilidade dos nematóides. Em síntese, necessitamos então de uma compreensão plena das interações com os fatores ambientais, neste caso relativo ao fator substrato, que podem determinar as conseqüências do encontro entre nematóide e hospedeiro (GAUGLER, 1988). Além disso, os resultados obtidos

nos ajudarão a evitar o uso excessivo de J Is de NEPs durante as aplicações no ambiente de natural ocorrência de *Alphitobius diaperinus*.

Com este intuito, o presente trabalho teve como objetivo geral determinar ainda que, em condições de laboratório, a virulência dos NEPs *Heterohabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* dispostos em diferentes e comuns dosagens de J Is a larvas, pupas e adultos de *A. diaperinus* em três diferentes tipos de substratos. Já como objetivo específico, o estudo visou determinar as dosagens de J Is de ambas as espécies de NEPs necessárias para causar a infecção e conseqüente morte de 50% e 90% da população de *A. diaperinus* em diferentes tipos de substratos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, situado na cidade de Juiz de Fora, Região Sudeste de Minas Gerais, durante o período de Maio a Dezembro de 2005.

Obtenção e manejo das lagartas - Lagartas das traças de favos de abelha, *G. mellonella*, foram criadas em laboratório para serem utilizadas na multiplicação dos nematóides (LINDEGREN *et al.*, 1993). A produção dessas lagartas foi realizada a partir de adultos recém eclodidos de pupas de *G. mellonella*, os quais eram mantidos em câmaras de acasalamento que consistem de recipientes plásticos de 24 x 25 cm de diâmetro. Papéis dobrados em forma de sanfona foram liberados dentro das câmaras para que os adultos pudessem fazer a postura sobre eles. Posteriormente, esses papéis já com as posturas foram transferidos para fôrmas de pizza de alumínio de 30cm de diâmetro, com tampa telada de ferro galvanizado com o objetivo de facilitar a ventilação. Nessas fôrmas eram adicionadas dietas artificiais para nutrir as lagartas que porventura iam eclodindo. A composição da dieta oferecida era constituída de: 120g de mel, 120g de glicerol, 200g de leite, 60g de levedo ou levedura de cerveja, 100g de gérmen de trigo, 100g de farinha de trigo e 120g de farelo de trigo. O material foi mantido em estufa à temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ UR > 80%.

Obtenção das linhagens de NEPs a partir das lagartas - As lagartas do 7º instar, pesando aproximadamente 0,26g foram retiradas das fôrmas e usadas para o desenvolvimento das duas espécies de nematóides utilizadas neste experimento. Dois ml de água destilada acrescida de juvenis infectivos (J Is) foram espalhados sobre placas de Petri de nove cm de diâmetro, contendo

previamente duas folhas esterilizadas de papel de filtro do mesmo tamanho. Sobre essas placas, 10 lagartas de *G. mellonella* foram liberadas e, em seguida, essas placas contendo as lagartas e os nematóides foram envolvidas em filme plástico, a fim de evitar a evaporação e a entrada de outros organismos. O material foi mantido em estufa a 28°C por 48 horas.

Passado esse tempo, as lagartas mortas e infectadas foram transferidas para as “armadilhas de White” (KAYA & STOCK, 1997) para posterior coleta dos nematóides. Aproximadamente dentro de 8 a 10 dias após a exposição, os J Is migraram para a água das armadilhas. Os nematóides à medida que emergiam eram coletados diariamente por duas semanas consecutivas. Depois de lavada e decantada em funil de Baerman, a suspensão foi armazenada em recipientes plásticos de 50ml e acondicionados em B.O.D. a $14 \pm 1^\circ\text{C}$.

Obtenção e manejo dos cascudinhos - A colônia de *A. diaperinus* utilizada no presente experimento foi inicialmente obtida de instalações avícolas, situadas no setor de Avicultura da Universidade Federal de Viçosa – MG (**FIG. 1**). Posteriormente os exemplares foram conduzidos até o Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora – MG, onde se iniciou a criação da espécie em estufas climatizadas, com temperatura e umidade controladas. A população de coleópteros teve como substrato de criação material colhido de cama de frango, ou seja: cepilho, fezes, penas e ração para aves. Para a alimentação dos insetos além da ração para aves oferecida periodicamente, também eram adicionadas nos substratos de criação cascas de bananas.

À medida que se observava a presença de pupas e larvas na população, estes eram coletados e criados isoladamente dos adultos, objetivando buscar uma sincronia entre a disponibilidade dos indivíduos pertencentes a cada estágio, e a sua necessidade para a realização de cada fase do experimento. Foram selecionadas para os bioensaios apenas as pupas que não apresentavam mais do que três (72h) dias neste estágio. A seleção das larvas e dos adultos foi baseada, sobretudo em seus pesos correspondentes.



Figura 1 – Vista parcial interna do galpão de criação de aves domésticas do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa - MG, onde foi coletada a população inicial de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Obtenção das linhagens de NEPs a partir dos cascudinhos – Larvas, pupas e adultos de *A. diaperinus* foram inicialmente infectadas, separadamente com os juvenis infectivos de *H. riobravus* e de *S. carpocapsae*, obtidos a partir de larvas de último ínstar de *G. mellonella* como já descrito anteriormente. O procedimento metodológico para a obtenção das novas linhagens de J Is foi, portanto semelhante ao realizado para larvas de *G. mellonella*.

A partir dos novos juvenis infectivos emergentes dos cascudinhos, realizou-se várias infecções seguidas nesta mesma espécie hospedeira, para a obtenção e estoque desta nova linhagem, para a posterior realização dos testes de bioensaios em diferentes substratos.

Teste de exposição para determinação das dosagens letais – Como o objetivo futuro é o controle da população de *A. diaperinus* no seu ambiente natural, não faria sentido trabalhar apenas com indivíduos de mesmo tamanho ou mesmo instar. Por isto, não foi realizada a determinação dos instares larvais utilizados no presente experimento; o qual pode ser obtido pela largura das cápsulas cefálicas (FRANCISCO & PRADO, 2000).

Um total de 48 larvas, pupas e adultos de *A. diaperinus* foram pesados em balança analítica em cada fase do experimento. Posteriormente, foram distribuídos individualmente em seis grupos homogêneos de acordo com a soma de seus pesos por tratamento e tipo de substrato, e tratados isoladamente, em todas as suas fases evolutivas, com *H. riobravus* e *S. carpocapsae* (exceto pupa para esta espécie) nas dosagens de 100, 200, 400, 800 e 1.600 J Is p/ larva; 200, 400, 800, 1.600 e 3.200 J Is p/ pupa; e 400, 800, 1.600, 3.200 e 6.400 J Is p/ adulto. As inoculações foram realizadas em placas de Petri de 5cm de diâmetro devidamente esterelizadas, contendo em cada uma delas apenas uma forma evolutiva do coleóptero e tendo como substrato os seguintes meios, também todos esterelizados: a - papel de filtro (2 unidades), b – terra (8,0 gramas) e c – cepilho + ração (duas partes de serragem/ uma parte de ração para frangos). Para cada tratamento foram realizadas oito repetições, totalizando a utilização de 144 (larvas, pupas e adultos) para cada fase evolutiva em cada tipo de substrato (**FIG. 2**).

As placas foram mantidas em câmaras climatizadas B.O.D reguladas à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A mortalidade dos cascudinhos foi registrada diariamente por um período máximo de 4 dias, através de observações como: ausência de locomoção, reflexo das patas, antenas e mudança de coloração; neste último caso especialmente para infecções com *H. riobravus* (**FIG. 3**). Durante este período também foram registradas as temperaturas e umidades máximas e mínimas dentro das câmaras climatizadas. Após a confirmação das mortes, os hospedeiros infectados foram transferidos para as “armadilhas de White” (KAYA & STOCK, 1997), objetivando a posterior coleta dos nematóides seguindo a mesma metodologia anteriormente descrita para *G. mellonella*.

Na avaliação da virulência dos nematóides foram observados os seguintes parâmetros: mortalidade absoluta das larvas, mortalidade absoluta das pupas, mortalidade absoluta dos adultos e a multiplicação dos J Is nos cadáveres coletados.

Para a determinação das DL_{50} e DL_{90} obtidas em cada tipo de substrato, para cada estágio de desenvolvimento de *A. diaperinus*, envolvendo as duas espécies de NEPs, foi utilizado o procedimento Probit, implantado no software SAEG (UFV, 2000). Para avaliar uma possível interferência do tipo de substrato em relação a mortalidade total obtida nas três dosagens comuns a todos os tratamentos, foi utilizado delineamento em blocos casualizados (sub-blocos), onde cada sub-bloco era composto pela interação dos fatores dosagem e estágio. As médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados foram interpretados por meio do software SAEG (UFV, 2000).

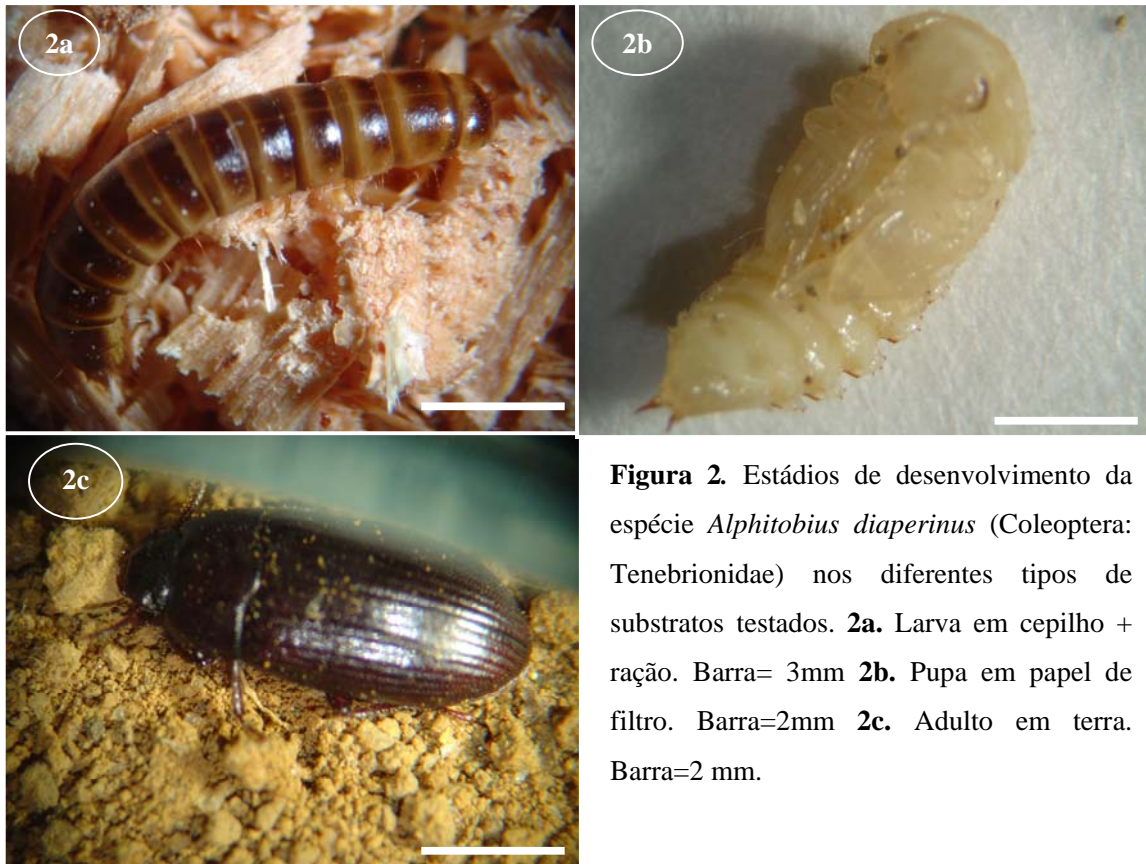


Figura 2. Estádios de desenvolvimento da espécie *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) nos diferentes tipos de substratos testados. **2a.** Larva em cepilho + ração. Barra= 3mm **2b.** Pupa em papel de filtro. Barra=2mm **2c.** Adulto em terra. Barra=2 mm.

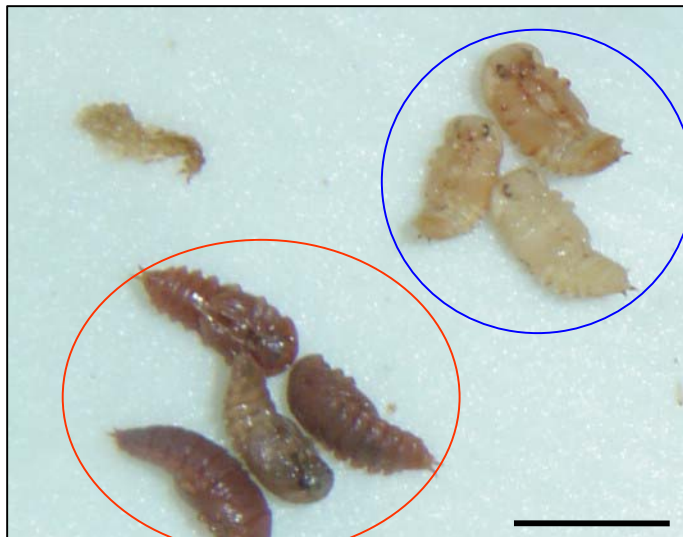


Figura 3 – Pupas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae) mortas por *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) (círculo vermelho) e pupas vivas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) (círculo azul) sobre papel de filtro. Barra = 7mm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises gráficas (FIG. 4)

1- Mortalidade absoluta das larvas de *A. diaperinus* por *H. riobravus* nos três tipos de substratos:

Na dosagem de 1.600 J Is a mortalidade de larvas foi máxima nos três tipos de substratos. Esta também foi registrada no substrato terra na dosagem de 800 J Is.

2- Mortalidade absoluta das pupas de *A. diaperinus* por *H. riobravus* nos três tipos de substratos:

Os maiores números de mortes para pupas em todas as dosagens (200 a 3.200 J Is) foram evidenciados no substrato terra. As mortalidades das pupas em papel de filtro e no substrato terra foram aumentando à medida que se aumentavam também as dosagens de J Is.

3- Mortalidade absoluta dos adultos de *A. diaperinus* por *H. riobravus* nos três tipos de substratos:

A mortalidade dos adultos em cepilho + ração aumentou com o aumento das dosagens, assim como também a mortalidade deste estágio em terra. Já em papel de filtro o número de mortes não apresentou uma distribuição regular, sendo às vezes inversamente proporcional com o aumento das dosagens.

O maior número de mortes de adultos foi verificado em cepilho na dosagem de 3.200 J Is, e em cepilho e na terra na dosagem de 6.400 J Is, todos representados por sete mortes.

4- Mortalidade absoluta das larvas de *A. diaperinus* por *S. carpocapsae* nos três tipos de substratos:

Em todas as dosagens (100 a 1.600 J Is) a mortalidade foi máxima nos substratos cepilho e terra. Adicionalmente a partir da dosagem de 400 J Is, a mortalidade em papel de filtro também passou a ter valor máximo.

5- Mortalidade absoluta dos adultos de *A. diaperinus* por *S. carpocapsae* nos três tipos de substratos:

O substrato terra se destacou em relação aos demais por apresentar em todas as dosagens, exceto o grupo controle e 400 J Is, mortalidades máximas de adultos. Na dosagem de 3.200 J Is a mortalidade dos adultos foi máxima em todos os três tipos de substratos. Esta também foi registrada nas dosagens de 1.600 J Is para o substrato papel de filtro, e de 6.400 J Is para o substrato cepilho.

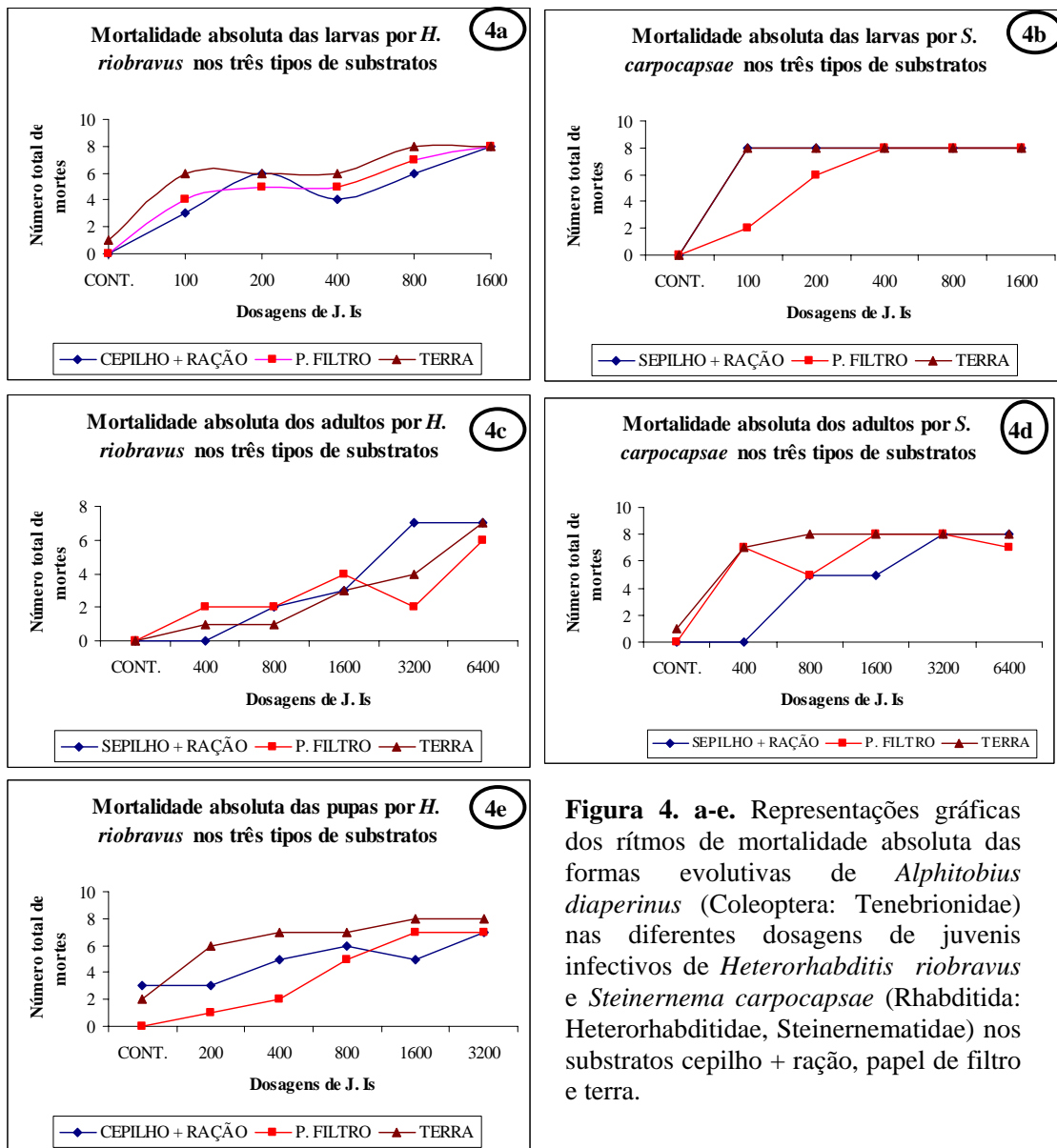


Figura 4. a-e. Representações gráficas dos ritmos de mortalidade absoluta das formas evolutivas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) nas diferentes dosagens de juvenis infectivos de *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) nos substratos cepilho + ração, papel de filtro e terra.

1- Percentuais totais de mortes de larvas, pupas e adultos de *A. diaperinus* nas quatro dosagens comuns utilizadas (0, 400, 800 e 1.600) independente do substrato (TAB. 1):

***H. riobravus*:**

Todas as larvas que foram expostas à dosagem de 1.600 J Is morreram.

Os maiores percentuais de mortalidades registrados para todos os estádios de *A. diaperinus* ocorreram na maior dosagem comum utilizada (1.600 J Is).

O percentual de mortalidade para todos os três estádios de desenvolvimento esteve diretamente proporcional ao aumento das dosagens inoculadas.

Em todas as dosagens comumente utilizadas contendo J Is de *H. riobravus*, as larvas se mostraram mais susceptíveis, seguidas dos estádios de pupa e adulto.

***S. carpocapsae* (TAB. 1):**

Todas as larvas que foram expostas às dosagens de 400, 800 e 1.600 J Is morreram.

A maior mortalidade registrada para o estágio adulto (87,5%) ocorreu na maior dosagem comum utilizada (1.600 J Is).

Para o estágio adulto da espécie, o percentual de mortalidade foi diretamente proporcional ao aumento das dosagens.

Em todas as três dosagens utilizadas contendo J Is de *S. carpocapsae* as larvas mostraram ser mais susceptíveis do que o estágio adulto.

Os nematóides entomopatogênicos já haviam sido relatados como sendo mais virulentos para os estádios imaturos do que para os adultos em outras espécies de insetos e também para o tenebrionídeo utilizado no presente experimento (GEDEN *et al.* 1985).

KAYA (1985) atribui este diferencial de susceptibilidade dos estágios de vida dos insetos ao número de portas de entrada viáveis para a invasão dos nematóides. Em seu estudo pode observar que a pupa de um Lepidóptero foi o estágio menos susceptível tendo somente os espiráculos como portas de entrada para os nematóides. Enquanto que os adultos e larvas por apresentarem também como aberturas naturais, além dos espiráculos, a boca e o ânus, foram os estádios mais susceptíveis.

BEDDING & MOLYNEUX (1982) relatam que algumas larvas de Scarabeídeos podem impulsionar ativamente os nematóides para longe de suas cavidades bucais com o auxílio de suas pernas anteriores, e que a taxa de defecação realizada por elas, pode seguramente impedir o parasitismo pela rota anal.

Tabela 1 - Percentuais totais de mortalidades dos estádios de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) causados pelos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) nas dosagens comuns utilizadas (0, 400, 800 e 1.600 J Is) independentes do substrato; e nos três tipos de substratos, considerando apenas os indivíduos expostos às três dosagens comumente utilizadas (400, 800 e 1.600 J Is).

Espécies	Tipo de forrageio	Estádios	Comportamentos típicos	n	Percentual total de mortes				n	Percentual total de mortes (400, 800 e 1.600 J Is)		
					0	400	800	1600		Cepilho + ração	Papel de filtro	Terra
<i>H. riobravus</i>	Crusador ?											
		Larvas	Relativa movimentação	24	1(4,1%)	15(62,5%)	21(87,5%)	24(100%)	24	18(75%)	20(83,3%)	22(91,6%)
		Pupas	Raras contrações	24	5(20,8%)	14(58,3%)	18(75%)	20(83,3%)	24	16(66,6%)	14(58,3%)	22(91,6%)
	Adultos	Ativa movimentação	24	0	3(12,5%)	5(20,8%)	10(41,6%)	24	5(20,8%)	8(33,3%)	5(20,8%)	
<i>S. carpocapsae</i>	Emboscador											
		Larvas	Relativa movimentação	24	0	24(100%)	24(100%)	24(100%)	24	24(100%)	24(100%)	24(100%)
		Adultos	Ativa movimentação	24	1(4,1%)	14(58,3%)	18(75%)	21(87,5%)	24	10(41,6%)	20(83,3%)	23(95,8%)

n - Número de espécimes amostrados. J Is – Juvenis infectivos.

FORSCHLER & GARDNER (1991) examinando a distribuição dos nematóides sob larvas de *P. hirticula*, encontraram a presença destes sob todos os apêndices da cápsula cefálica.

Em outros estudos também observamos que os adultos recém – formados foram mais vulneráveis à infecção pelos nematóides entomopatogênicos do que os adultos mais velhos, os quais apresentam um exoesqueleto bem mais rígido e quitinizado (**FIG. 5**). Isto também pode ser estendido às larvas, as quais durante o processo de mudança para o próximo instar, cessam os movimentos e passam a realizar apenas algumas contrações corporais; o que pode aumentar a probabilidade de sua localização pelos J Is, principalmente das espécies que apresentam estratégia crusadora de forrageio.



Figura 5 - Pupas e adultos jovens de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) recém emergidos do pupário. Barra = 7mm.

1.1- Percentuais totais de mortes de larvas, pupas e adultos de *A. diaperinus*, nos três tipos de substratos, considerando apenas os indivíduos expostos às três dosagens de J Is comumente utilizadas (400, 800 e 1.600) (TAB. 2):

***H. riobravus*:**

As larvas foram as formas evolutivas que apresentaram em todos os tipos de substrato percentuais totais de mortalidade acima de 70%. O maior deles registrado para este estágio ocorreu no substrato terra, que atingiu o valor de 91, 6%. Este fato também foi evidenciado para o estágio pupal, que chegou a atingir este mesmo percentual para o mesmo tipo de substrato.

Os indivíduos adultos de *A. diaperinus* foram os que apresentaram os percentuais de mortalidades mais baixos registrados entre os demais estádios evolutivos, em todos os três substratos utilizados no experimento.

S. carpocapsae:

Os adultos que foram expostos às três dosagens (400, 800 e 1.600 J Is) em papel filtro e em terra, apresentaram percentuais totais de mortalidade acima de 80%. O maior percentual total de mortalidade registrado para o estágio adulto (95,8%) ocorreu no substrato terra. Os indivíduos adultos de *A. diaperinus* expostos a J Is de *S. carpocapsae* (400, 800 e 1.600) em cepilho + ração foram os que apresentaram o menor percentual de mortalidade registrado (**TAB. 2**). Em todos os três tipos de substratos, nas dosagens comumente utilizadas entre os estádios, verificamos a mortalidade larval atingindo valores máximos (100%).

As verdadeiras razões que explicam porque uma espécie de nematóide é mais patogênica do que outra, contra um inseto em particular, permanecem incertas, mas certamente estão relacionadas, pelo menos em parte, aos diferentes comportamentos apresentados por cada uma delas.

Os nematóides *S. carpocapsae*, quando situados em substratos que favorecem a realização do comportamento de nictação, apresentam maior contato com os hospedeiros móveis do que quando situados em substratos que limitam à realização deste tipo de comportamento. O ato de nictar é uma tática efetiva de emboscada apresentada pelos J Is de *S. carpocapsae*, que aumenta a área de superfície, pondo-os mais facilmente em contato com o hospedeiro em movimento, por reduzir as forças de tensão de superfície e prender o nematóide ao substrato (CAMPBELL & GAUGLER, 1993).

A taxa inferior de encontro de hospedeiros móveis pelos nematóides não nictantes, como parece ser o caso de *H. riobravus*, pode ser devido em parte, às forças adesivas que prendem o nematóide ao substrato úmido, segundo CAMPBELL & GAUGLER (1993).

Analisando os percentuais totais de mortalidades médias em cada tipo de substrato independente das três dosagens comuns utilizadas, 400, 800 e 1.600 J Is de *H. riobravus*, e do estágio de desenvolvimento de *A. diaperinus*, observar-se na **TAB. 2** que não houve diferenças significativas nos números de mortes dos espécimes tratados entre os três tipos de substratos, com $p = 0,13779$. O mesmo ocorreu para o número de mortes provocadas por *S. carpocapsae* entre os tipos de substratos, com $p = 0,11986$. Porém, os dados parecem demonstrar que há uma tendência desta espécie de coleóptero ser menos susceptível aos NEPs de ambas as espécies no substrato

Tabela 2 - Percentuais totais de mortalidades médias em cada tipo de substrato independente das três dosagens comuns utilizadas (400, 800 e 1.600 J Is) dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e de *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae); e do estágio de desenvolvimento de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Espécies	Estádios	n	Mortalidade total média (%) SD			E.P	E.P	E.P
			Cepilho + ração (1)	Papel de filtro (2)	Terra (3)	(1)	(2)	(3)
<i>H. riobravus</i>	Larvas + Pupas + Adultos	72	54,16±29,97a	58,33±29,31a	68,05±37,03a	9.99	9.77	12.34
<i>S. carpocapsae</i>	Larvas + Adultos	48	70,83±39,26a	91,66±15,13a	97,91±5,10a	16.02	6.18	2.08

n: Número total de espécimes de *A. diaperinus* infectados; SD: Desvio Padrão; E.P: Erro Padrão; (1)(2)(3): Substratos utilizados e respectivos erros padrões.

Médias seguidas das mesmas letras nas linhas para cada espécie de nematóide não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 3 - Dosagens letais de juvenis infectivos dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) para atingirem 50%(DL₅₀) e 90%(DL₉₀) de mortalidade dos estádios de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) a partir das três dosagens comuns (400, 800 e 1.600 J Is), em cada tipo de substrato.

Tratamentos	DL ₅₀	Limite inferior	Limite superior	DL ₉₀	Limite inferior	Limite superior
LHCR	157.79	114.31	200.75	1,497.53	1,061.99	2,500.81
LHPF	128.82	93.06	163.59	962.77	727.22	1,438.45
LHT	48.92	23.3	75.61	461.25	352	673.95
PHCR	290.1	175.12	403.69	6,598.80	3,736.08	17,952.61
PHPF	666.78	580.78	762.28	2,551.23	2,068.05	3,347.67
PHT	79.72	34.92	125.82	540.02	421.74	729.3
AHCR	1,773.07	1,578.73	1,993.86	5,267.39	4,409.89	6,594.81
AHPF	3,202.91	2,351.04	4,963.12	86,547.76	33,333.36	**
AHT	2,376.30	2,043.72	2,800.95	11,126.74	8,303.14	16,563.19
LSCR	**	**	**	**	**	**
LSPF	139.64	127.38	152.07	250.9	223.59	293.48
LST	**	**	**	**	**	**
ASCR	960.65	869.45	1,058.90	2,124.89	1,856.91	2,520.30
ASPF	18.99	0.08	91.32	2,236.54	1,310.33	6,423.05
AST	**	**	**	**	**	**

** Não pode ser obtido pelo Probit. **L** – Larva; **P** – Pupa; **A** – Adulto; **H** – *Heterorhabditis riobravus*;

S – *Steinernema carpocapsae*; **CR** – Cepilho + ração; **PF** – Papel de filtro; **T** – Terra. J Is – Juvenis infectivos.

A maior DL₅₀ (3.202,91 J Is) e DL₉₀ (86.547,76 J Is) registradas pertenceram ao tratamento com *H. riobravus*, que envolveu indivíduos adultos no substrato papel de filtro. As DL₅₀ e DL₉₀ de *S. carpocapsae* não puderam ser determinadas para os tratamentos larvas em cepilho + ração, larvas em terra e adulto em terra, devido à alta e rápida taxa de mortalidade ocorrida.

O tratamento que expôs larvas de cascudinhos a *S. carpocapsae* em papel de filtro apresentou uma DL₅₀ (139,64 J Is) maior do que a DL₅₀ (18,99 J Is) registrada para o estágio adulto no mesmo tipo de substrato. Contudo, esta situação se inverteu nos valores encontrados de DLs₉₀

para os dois diferentes estádios no mesmo substrato, onde para as larvas, este foi de apenas 250,9 J Is, e para os adultos, 2.236,54 J Is.

Quando comparamos os tratamentos com as duas espécies de nematóides, constituídos de indivíduos adultos no substrato cepilho + ração pode-se observar que as DL₅₀ e DL₉₀ de J Is de *S. carpocapsae* correspondem respectivamente a apenas 54,18% da DL₅₀ e a 40,34% da DL₉₀, encontradas para o tratamento envolvendo o nematóide da espécie *H. riobravus*.

Notáveis diferenças na eficácia existem entre as várias espécies e linhagens dos nematóides Steinernematídeos e Heterorhabditídeos. *Heterorhabditis heliothidis*, por exemplo, é efetivo nas tentativas de campo contra larvas do besouro japonês, mas provê resultados extremamente ineficientes quando grilos toupeira são desafiados (COBB & GEORGIS, 1987), ao passo que *S. feltiae* é efetivo contra grilos toupeira e proporciona modesto controle sobre larvas do besouro japonês.

Análise gráfica

Pela representação gráfica das curvas de DL₅₀ e DL₉₀ fica clara a menor susceptibilidade do estádio adulto de *A. diaperinus* ao nematóide da espécie *H. riobravus* entre todos os demais tratamentos listados, com exceção apenas da DL₉₀ de *H. riobravus* encontrada no tratamento pupa, substrato cepilho + ração (**FIG. 6**).

A indústria avícola brasileira gera mais de 2.000 empregos por ano nos frigoríficos. O Brasil em 2005 exportou cerca de três milhões de dólares em carne de frango. Este número foi três vezes superior aos últimos cinco anos, devido principalmente ao surgimento da gripe aviária que acabou abrindo novos mercados consumidores, como por exemplo, China e Coréia do Sul.

Diante da grande importância no controle de *Alphitobius diaperinus* nas produções avícolas, principalmente aquelas ligadas à produção industrial, por meio de processos biológicos naturais, as informações obtidas neste estudo, são fundamentais para se começar a pensar no controle biológico utilizando nematóides entomopatogênicos nos substratos dos galpões de criações.

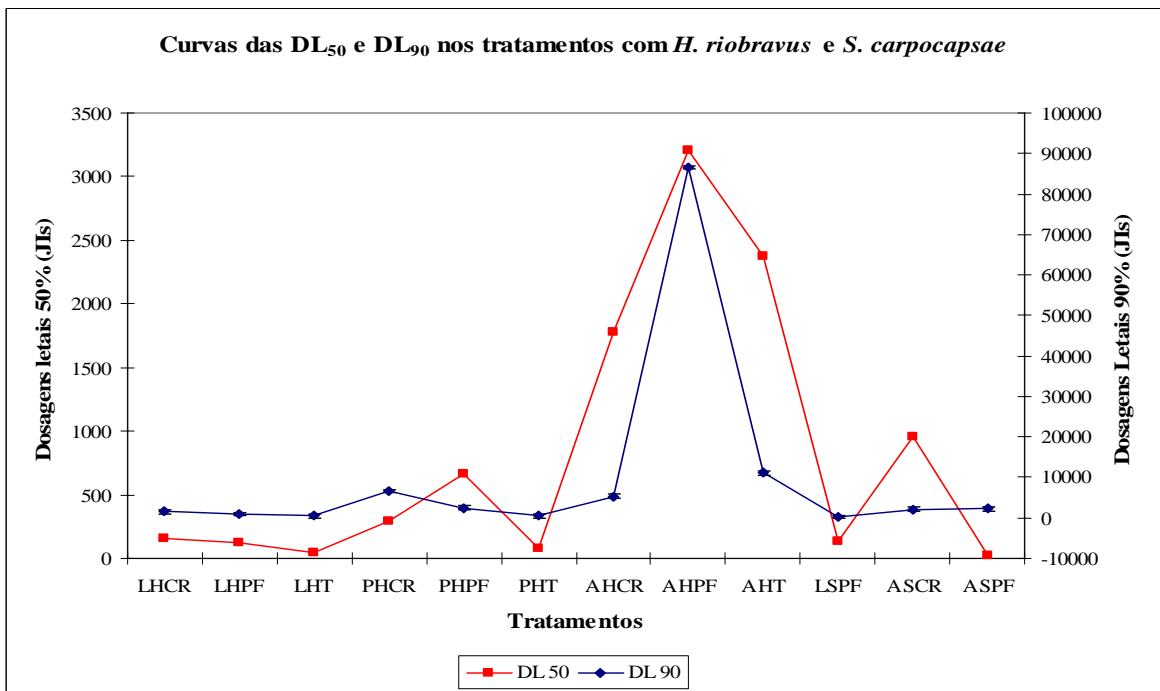


Figura 6. Representação gráfica, a partir das três dosagens comuns, das curvas das dosagens letais 50% (DL₅₀) e 90% (DL₉₀) com *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **L** – Larva; **P** – Pupa; **A** – Adulto; **H** – *Heterorhabditidis riobravus*; **S** – *Steinernema carpocapsae*; **CR** – Cepilho + ração; **PF** – Papel de filtro; **T** – Terra. **JIs** – Juvenis infectivos.

CONCLUSÕES

- Nas nossas condições de experimento os dados indicaram que tanto *H. riobravus*, quanto *S. carpocapsae* apresentaram potencial para infectar todos os estádios de desenvolvimento da espécie *A. diaperinus* analisados.
- O estágio larval, seguido respectivamente pelas pupas e adultos de *A. diaperinus*, representou o estágio de desenvolvimento mais susceptível para os JIs de *H. riobravus*.
- A ação dos JIs de *S. carpocapsae* foi mais eficiente contra as larvas do que contra os adultos de *A. diaperinus*.
- O tipo de substrato não influenciou os percentuais de mortalidade de larvas, pupas e adultos por *H. riobravus*. O mesmo foi verificado para os percentuais de larvas e adultos por *S.*

carpocapsae. Contudo, pareceu existir uma tendência desta espécie de coleóptero, ser menos susceptível aos NEPs de ambas as espécies, no substrato cepilho + ração.

➤ Juvenis infectivos de *S. carpocapsae* mostraram-se mais eficientes do que os juvenis infectivos de *H. riobravus*, em todos os tipos de substratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CAMPBELL, J. F. & GAUGLER, R. 1993. Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). **Behaviour**, **126**: 155 – 169.

COBB, P. & GEORGIS, R. 1987. Mole cricket damage control on Bermudagrass turf with entomogenous nematodes. (**Unpublished manuscript**), 6p.

FORSCHLER, B. T. & GARDNER, W. A. 1991. Concentration-mortality response of *Phyllophaga hirticula* (Knoch) (Coleoptera: Scarabeidae) to three entomogenous nematodes. **J. Econ. Entomol.**, **84**: 841-843.

FRANCISCO, O. & PRADO, A. P. 2000. Characterization of the larval stages of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) using head capsule width. **Revista Brasileira de Biologia**, **61**(1):125 – 131.

GAUGLER, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil – inhabiting insects pests with entomopathogenic nematodes. **Agricultural Ecosystem Environment**, **24** (1-3): 351-360.

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

GEDEN, C. J.; AXTELL, R. C. & BROOKS, W. M. 1985. Susceptibility of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* to the entomogenous nematodes *Steinemema feltiae*, *S. glaseri*.(Steinemematidae) and *Heterorhabditis he/iothidis* (Heterorhabditidae). **J. Ent. Sci.**, **20** (3): 331 - 339.

- KAYA, H. K. 1985. Susceptibility of early larval stages of *Pseudaletia unipuncta* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). **J. Invertebr. Pathol.**, **46**: 58-62.
- KAYA, H. K. & STOCK, P. 1997. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. Biological techniques. Academic Press, p. 281-324.
- LINDEGREN, J. E.; VALERO, K. A. & MACKEY, B. E. 1993. Simple “in vivo” Production and Storage Methods for *Steinernema carpocapsae* Infective Juveniles. **Jour. Nematol.**, **25** (2): 193-197.
- PETERS, A. & EHLERS, R. U. 1994. Susceptibility of leatherjackets (*Tipula paludosa* and *Tipula oleracea*; Tipulidae: Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **63**: 163 - 171.
- PFEIFFER, D. G. & AXTELL, R. C. 1980. Coleoptera of poultry manure in caged layer houses in North Carolina. **Environ. Entomol.**, **9**: 21-28.
- SAEG (*Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas*) versão 8.0 - manual de instruções. CPD/UFV, Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Viçosa, MG, 142 p., 2000.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DOS PERÍODOS LETAIS PARA OS ESTÁDIOS DE VIDA DE *Alphitobius diaperinus* (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) AOS NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE) EM DIFERENTES TIPOS DE SUBSTRATOS

RESUMO

O sistema de confinamento de aves soluciona muitos problemas, entretanto, cria outros, como por exemplo, a propagação de doenças e o acúmulo de matéria orgânica (fezes). *Alphitobius diaperinus* (Panzer) é uma das pragas mais comuns nas granjas de corte provocando grandes perdas econômicas. Este estudo tem por objetivo avaliar sob três diferentes substratos, o tempo de sobrevivência (TL) de larvas, pupas e adultos de *A. diaperinus* expostos a diferentes e comuns dosagens dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (exceto pupas), multiplicados *in vitro* a partir de espécimes da própria espécie alvo. As inoculações foram

realizadas em placas de Petri tendo como substratos, papel de filtro, terra e cepilho + ração. A mortalidade foi avaliada diariamente durante um período de quatro dias (96h) após o tratamento. Entre todos os tratamentos envolvendo larvas e *H. riobravus*, os menores TL₅₀ (1,1598 dia) e TL₉₀ (1,9782 dia) foram observados no substrato terra, tendo como inóculo a maior dosagem aplicada sobre este estágio (1.600 J Is). Isto também ocorreu nos tratamentos que envolveram pupas, a mesma espécie de nematóide e o mesmo inóculo de J Is anteriormente citado, com os respectivos períodos letais, 1,0238 dia (TL₅₀) e 1,9219 dia (TL₉₀). Os maiores TL₅₀ (6,2044 dias) e TL₉₀ (18,9089 dias), registrados entre todos os tratamentos com *S. carpocapsae* estiveram presentes no tratamento que expôs larvas à dosagem de 100 J Is no substrato papel de filtro. Entre todos os tratamentos envolvendo larvas e *S. carpocapsae*, os menores TL₅₀ e TL₉₀ registrados, foram observados no substrato terra, no inóculo de 200 J Is, com os respectivos períodos, 1,1598 e 1,9782 dia. Isto também aconteceu nos tratamentos que envolveram indivíduos adultos expostos a 800 J Is de *S. carpocapsae*, no mesmo tipo de substrato, com os seguintes tempos letais: (1,1598 dia) TL₅₀ e (1,9782 dia) TL₉₀.

Palavras chave: *Alphitobius diaperinus*, controle biológico, nematóides entomopatogênicos, substratos, períodos letais.

**DETERMINATION OF THE LETHAL PERIODS TO THE LIFE STAGES OF
Alphitobius diaperinus (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) TO
NEMATODES ENTOMOPATHOGENIC *Heterorhabditis riobravus* AND *Steinernema
carpocapsae* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE) IN
DIFFERENT TYPES OF SUBSTRATE.**

ABSTRACT

The system of confinement of birds solves many problems; however, it creates other, as, for instance, the propagation of diseases and the accumulation of organic matter (feces). *Alphitobius diaperinus* (Panzer) it is one of the most common plagues in the farms causing great economical losses. The experiment evaluated under three different substrate, the time of survival of larvae, pupaes and adults of *A. diaperinus* exposed to different and common dosages of the nematodes

Heterorhabditis riobravus and *Steinernema carpocapsae* (except pupaes), multiplied in vitro starting from specimens of the own target species. The inoculations were accomplished in petri plates having as different substrate, filter paper, earth and small plane + ration. The mortality was evaluated daily during a period of 4 days (96 hours) after the treatment. Among all of the treatments involving larvae and *H. riobravus*, the smallest TL₅₀ (1.1598 days) and the smallest TL₉₀ (1.9782 days) were observed in the substrate earth, having as dosage the largest dosage applied on this stadium (1.600 J Is). This also happened in the treatments that involved pupaes, the same nematode species and the same dosage of J Is previously mentioned; with the respective lethal periods: 1.0238 day (TL₅₀) and 1.9219 day (TL₉₀). The largest TL₅₀ (6.2044 days) and the largest TL₉₀ (18.9089 days), registered between all of the treatments with *S. carpocapsae* were present in the treatment that exposed larvae the dosage of 100 J Is in the filter paper substrate. Among all of the treatments involving larvae and *S. carpocapsae*, the smallest TL₅₀ and the smallest TL₉₀ registered were observed in the earth substrate, in dosage of 200 J Is, with the respective periods, 1.1598 and 1.9782 days. This also happened in the treatments that involved exposed adult individuals to 800 J Is of *S. carpocapsae*, in the same type of substrate, with the following lethal times: (1.1598 days) TL₅₀ and (1.9782 days) TL₉₀.

Words key: *Alphitobius diaperinus*, biological control, entomopathogenic nematodes, substrate, lethal periods.

INTRODUÇÃO

Alphitobius diaperinus é uma das pragas mais comuns nas granjas de corte. Esse coleóptero coloniza a serragem nas granjas avícolas causando sérios problemas no ganho de peso, crescimento e saúde das aves, além da possibilidade da veiculação de diversas espécies de microrganismos patogênicos, gerando como consequência grandes perdas econômicas (GOODWIN & WALTMAN, 1996; SILVA et al. 2005).

Entre as tentativas brasileiras de controle de insetos pragas, citam-se as experiências feitas por ARRIGON *et al.* (1986) com *S. carpocapsae* no controle do besouro *Migdolus* sp., uma praga de solo na cultura da cana de açúcar. Mais recentemente, SCHMITT *et al.* (1992), conseguiram razoáveis níveis de controle de *Cosmopolites sordidus*, o “moleque da bananeira”, mediante a aplicação do também *S. carpocapsae*.

PASSOS JR. *et al.* (1995), estudaram os efeitos das aplicações de *S. carpocapsae* sobre a saúva-limão, *Atta sexdens rubropilosa*, e PASSOS & ALVES (1995), estudaram a patogenicidade de *S. carpocapsae* contra o cupim *Heterotermes tenuis*, sendo que estes dois últimos não apresentaram resultados animadores.

Muitos resultados de fracassos obtidos como estes na tentativa de controle biológico, são explicados pela falta de informações que envolvem a relação parasito – hospedeiro. Na maioria das vezes pouco se sabe sobre os mecanismos comportamentais e principalmente fisiológicos e bioquímicos que envolvem ou antecipam esta interação.

Todos os animais móveis exibem uma série de buscas quando carecem de informação sobre a localização de um recurso (JANDER, 1975). As estratégias de procura realizadas pelos nematóides entomopatogênicos podem ser divididas em duas categorias, emboscada (senta e espera) e crusadora (amplamente forrageador), baseadas na motilidade do explorador (PIANKA, 1966; GERRITSEN & STRICKLER, 1977).

Os indivíduos emboscadores apresentam menor motilidade e são mais efetivos em encontrar presas móveis do que presas sedentárias. Já os crusadores são altamente móveis e, portanto, mais eficientes em encontrar este tipo de presa (HUEY & PIANKA, 1981). Contudo, a distribuição e o comportamento do hospedeiro também devem influenciar a estratégia de busca utilizada pelos juvenis infectivos de nematóides entomopatogênicos (CAMPBELL & GAUGLER, 1993).

As espécies de Rhabditídeos diferenciam-se em suas atividades locomotoras (MOYLE & KAYA, 1981; GEORGIS & POINAR, 1983; ALATORRE - ROSAS & KAYA 1990; GAUGLER & CAMPBELL, 1991), em suas habilidades de dispersão (MOYLE & KAYA 1981; GEORGIS & POINAR, 1983), em suas respostas aos sinais de seus hospedeiros associados (GAUGLER *et al.*, 1989; LEWIS *et al.*, 1992), e na localização dos distantes hospedeiros sedentários (CHOO *et al.*, 1989; GAUGLER *et al.*, 1989; ALATORRE - ROSAS & KAYA, 1990; GREWAL *et al.*, 1993).

Algumas espécies, incluindo *Steinernema glaseri* e *Heterorhabditis bacteriophora*, exibem características associadas com crusadores. Outras espécies como *S. carpocapsae* e *S. scapterisci*, exibem características associadas com emboscadores (GAUGLER *et al.*, 1989; GREWAL *et al.*, 1993).

CAMPBELL & GAUGLER (1993) sugeriram que o comportamento de nictação, realizado nas trajetórias de busca, seja adaptativo para as espécies de estratégia emboscadora, tais como *S. carpocapsae* e *S. scapterisci*.

Nenhum estudo até então, foi antes realizado com o intuito de determinar os períodos letais dos nematóides entomopatogênicos sobre os diferentes estádios de *A. diaperinus*. Informações

como estas são necessárias para o efetivo controle, pois muitos processos, principalmente a proporção de reservas alimentares (lipídios, proteínas e carboidratos) que são utilizadas pelos nematóides para sua sobrevivência, motilidade, infectividade, desenvolvimento e reprodução (DUNPHY & WEBSTER, 1986; KAYA, 1990), podem ser alteradas ao longo do tempo de busca pelo hospedeiro e até mesmo pelo tipo de substrato, que certamente também deve exercer forte influência sobre a locomoção dos nematóides.

A partir do que foi discutido, o presente estudo teve por objetivo determinar no laboratório, os períodos letais de J Is dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae*, multiplicados *in vitro* a partir de espécimes da própria espécie alvo, necessários para causar a infecção e conseqüente morte de 50% e 90% de larvas, pupas e adultos sob três diferentes tipos de substratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 48 adultos, pupas e larvas de *A. diaperinus* foi pesado em balança analítica em cada fase do experimento. Posteriormente, foram distribuídos individualmente em seis grupos homogêneos de acordo com a soma de seus pesos por tratamento e tipo de substrato, e tratados isoladamente, em todas as suas fases evolutivas, com *H. riobravus* e *S. carpocapsae* (exceto pupa para esta espécie) nas dosagens de 100, 200, 400, 800 e 1.600 J Is p/ larva; 200, 400, 800, 1.600 e 3.200 J Is p/ pupa; e 400, 800, 1.600, 3.200 e 6.400 J Is p/ adulto. As inoculações foram realizadas em placas de Petri de 5cm de diâmetro devidamente esterelizadas, contendo em cada uma delas apenas um coleóptero e tendo como substrato os seguintes meios, também todos esterelizados: a - papel de filtro (2 unidades), b - terra (8,0 gramas) e c - cepilho + ração (duas partes de serragem/ uma parte de ração para frangos). Para cada tratamento foram realizadas oito repetições, totalizando a utilização de 144 larvas, pupas e adultos em cada tipo de substrato.

As placas foram mantidas em câmaras climatizadas reguladas à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A mortalidade dos cascudinhos foi registrada diariamente por um período máximo de 4 dias, através de observações como: ausência de locomoção, reflexo das patas, antenas e mudança de coloração; neste último caso especialmente para infecções com *H. riobravus*. Durante este período também foram registradas as temperaturas e umidades máximas e mínimas dentro das câmaras climatizadas.

Na avaliação da virulência dos nematóides foram observados os seguintes parâmetros: período de mortalidade das larvas, período de mortalidade das pupas e o período de mortalidade dos adultos.

Para a determinação dos TL₅₀ e TL₉₀ em cada tratamento, e dos TL₅₀ e TL₉₀ nas três dosagens comuns em cada substrato, para cada estágio de desenvolvimento de *A. diaperinus* envolvendo as duas espécies de NEPs; foi utilizado o procedimento Probit, implantado no software SAEG (UFV, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises gráficas – (FIG. 1)

1a - Período de mortalidade das larvas de *A. diaperinus* por *H. riobravus* no substrato cepilho + ração:

Em todas as dosagens, exceto na de 800 J Is, os maiores índices de mortalidade registrados neste substrato ocorreram entre 24 - 48 horas após a aplicação dos inóculos.

1b - Período de mortalidade das larvas de *A. diaperinus* por *H. riobravus* no substrato papel de filtro:

Em todas as dosagens, exceto na de 400 J Is, os maiores índices de mortalidade registrados neste substrato ocorreram entre 24 – 48 horas após a aplicação dos inóculos.

1c - Período de mortalidade das larvas de *A. diaperinus* por *H. riobravus* no substrato terra:

Em todas as dosagens, os maiores índices de mortalidade registrados ocorreram entre 24 – 48 horas após a aplicação dos inóculos.

1d - Período de mortalidade das larvas de *A. diaperinus* por *S. carpocapsae* no substrato cepilho + ração:

Nas dosagens de 100 e 200 J Is, as maiores mortalidades ocorreram entre 24 – 48 horas, contudo a partir da dosagem de 400 J Is o maior número de mortes passou a prevalecer durante as primeiras 24 horas após a aplicação dos inóculos. Assim sendo, todas as mortes registradas neste substrato ocorreram dentro das primeiras 48 horas após a inoculação dos J Is.

1e - Período de mortalidade das larvas de *A. diaperinus* por *S. carpocapsae* no substrato papel de filtro:

As maiores mortalidades observadas neste substrato ocorreram nas primeiras 48 horas após a inoculação em quase todas as dosagens aplicadas.

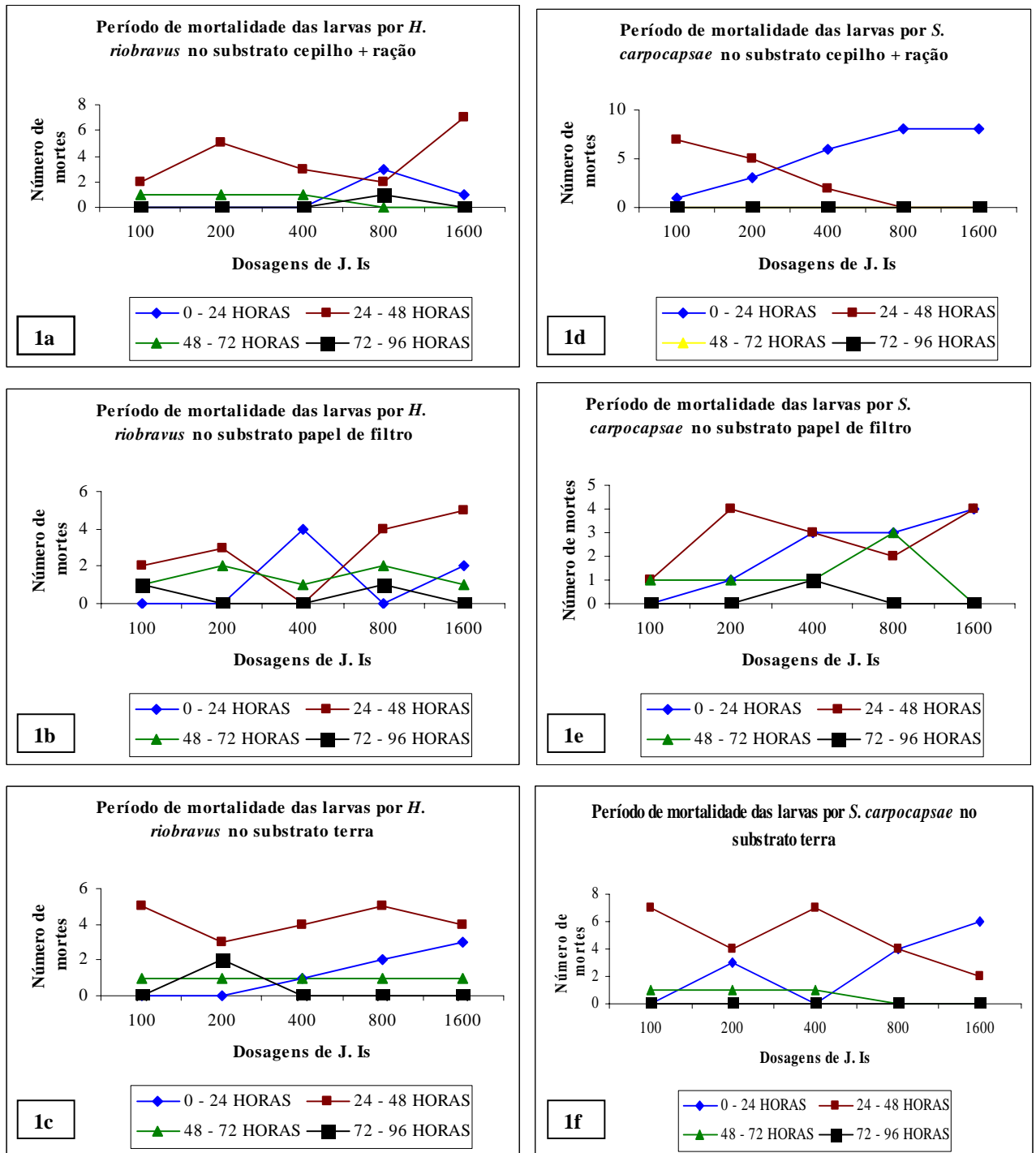


Figura 1. a-f. Representações gráficas dos períodos de mortalidade das larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) após infecção por juvenis infectivos de *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) nos substratos cepilho + ração, papel de filtro e terra.

1f - Período de mortalidade das larvas de *A. diaperinus* por *S. carpocapsae* no substrato terra:

As maiores mortalidades observadas neste substrato foram registradas nas primeiras 48, após a inoculação, em todas as dosagens aplicadas.

Análises gráficas – (FIG. 2)

2a - Período de mortalidade das pupas de *A. diaperinus* por *H. riobravus* no substrato cepilho + ração:

Neste substrato os maiores números de mortes variaram entre todos os períodos a cada dosagem de J Is aplicada.

2b - Período de mortalidade das pupas de *A. diaperinus* por *H. riobravus* no substrato papel de filtro:

Com o aumento das dosagens de J Is neste substrato, os maiores números de mortes passaram a ser registrados durante as primeiras 48 horas após a inoculação.

2c - Período de mortalidade das pupas de *A. diaperinus* por *H. riobravus* no substrato terra:

Com o aumento das dosagens de J Is neste substrato, os maiores números de mortes passaram a ser registrados durante as primeiras 48 horas após a inoculação.

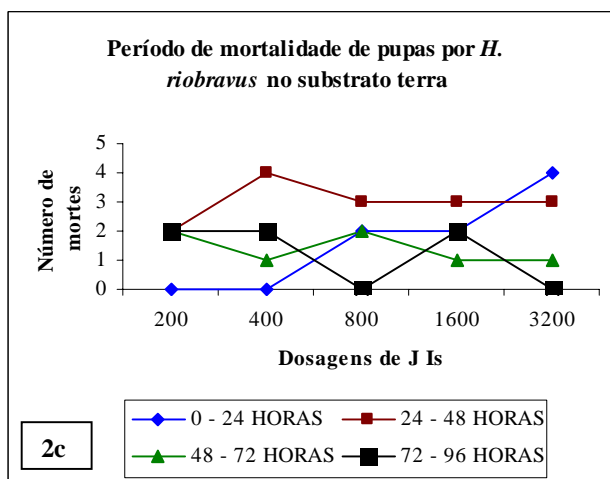
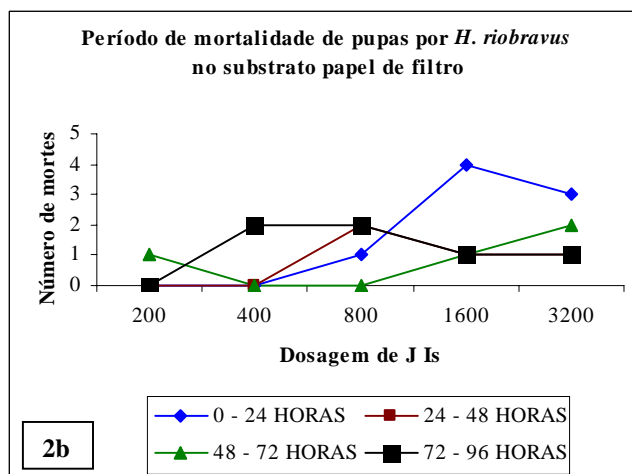
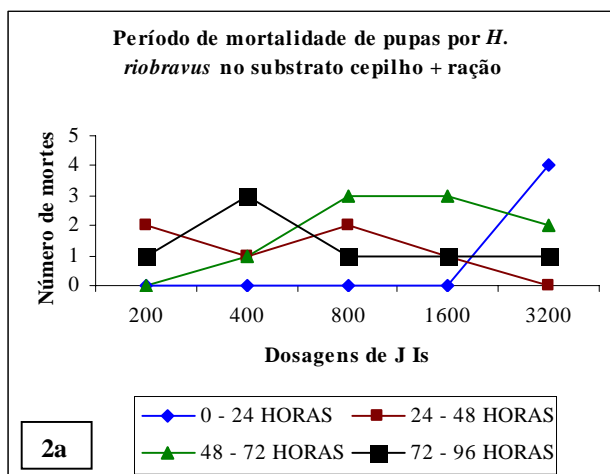


Figura 2. a-c. Representações gráficas dos períodos de mortalidade das pupas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) após infecção por juvenis infectivos de *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida, Heterorhabditidae) nos substratos cepilho + ração, papel de filtro e terra.

Análises gráficas – (FIG. 3)

3a - Período de mortalidade dos adultos de *A. diaperinus* por *H. riobravus* no substrato cepilho + ração:

As maiores mortalidades registradas neste substrato ocorreram entre 24 – 48 horas após a inoculação dos J Is.

3b - Período de mortalidade dos adultos de *A. diaperinus* por *H. riobravus* no substrato papel de filtro:

A distribuição das mortalidades entre os períodos a cada dosagem utilizada não seguiu uma seqüência lógica.

3c - Período de mortalidade dos adultos de *A. diaperinus* por *H. riobravus* no substrato terra:

Na maior dosagem utilizada (6.400 J Is) o maior número de mortes ocorreu no período de 48 – 72 horas após a inoculação.

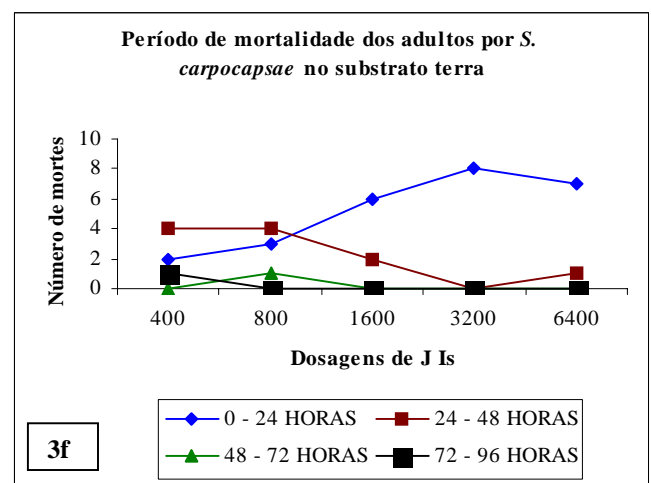
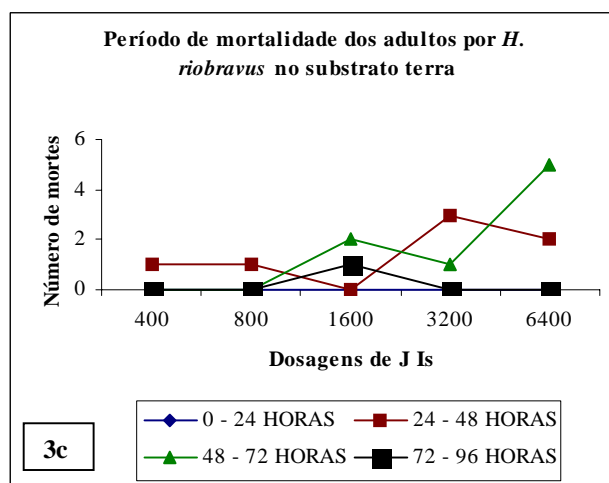
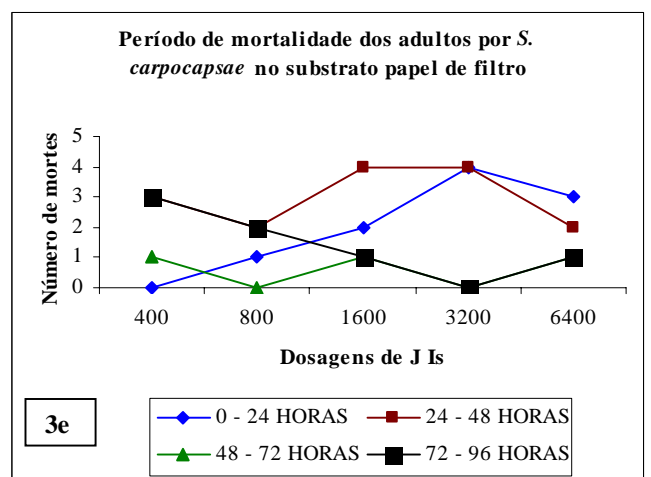
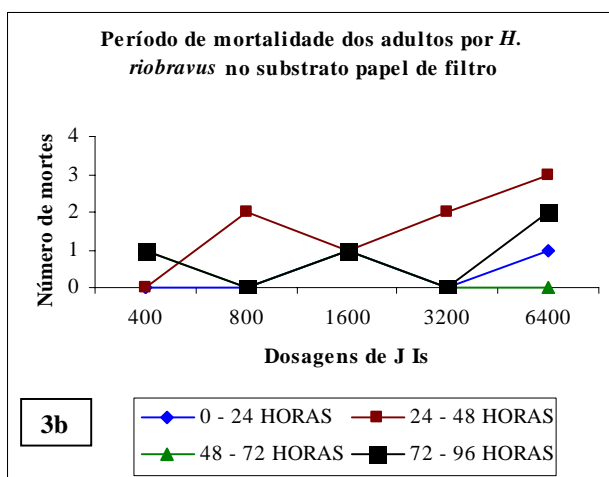
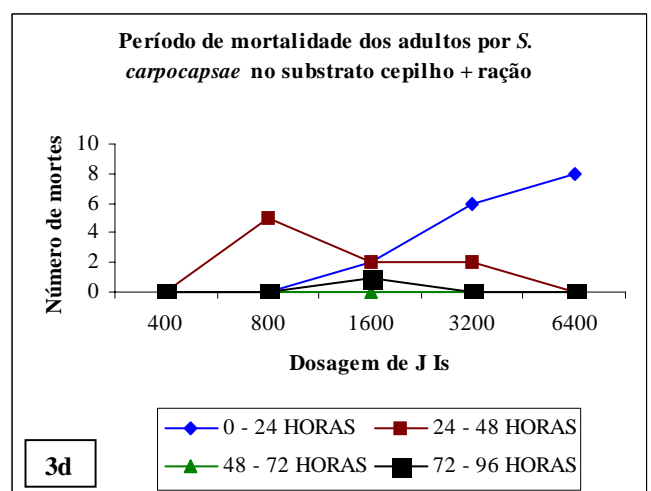
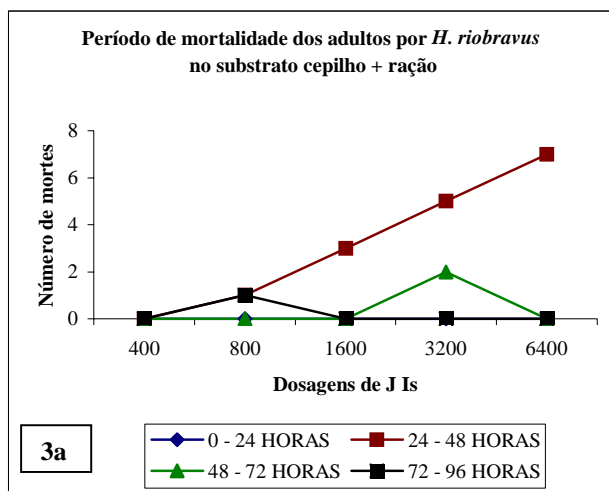


Figura – 3. a-f. Representações gráficas dos períodos de mortalidade dos adultos de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) após infecção por juvenis infectivos de *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) nos substratos cepilho + ração, papel de filtro e terra.

3d - Período de mortalidade dos adultos de *A. diaperinus* por *S. carpocapsae* no substrato cepilho + ração:

Com o aumento das dosagens, a partir de 1.600 J Is, percebeu-se que as mortes ocorridas neste substrato deixaram de acontecer no período de 24 – 48 horas, passando a ocorrer nas primeiras 24 horas após a inoculação. Todos os indivíduos adultos que foram expostos à dosagem de 6.400 J Is morreram nas primeiras 24 horas após a inoculação.

3e - Período de mortalidade dos adultos de *A. diaperinus* por *S. carpocapsae* no substrato papel de filtro:

A partir da dosagem de 800 J Is o número de adultos mortos passou a prevalecer principalmente nas primeiras 48 horas após a inoculação; contudo as mortes tardias não deixaram de ocorrer neste substrato.

3f - Período de mortalidade dos adultos de *A. diaperinus* por *S. carpocapsae* no substrato terra:

Com o aumento das dosagens a partir de 800 J Is percebeu-se que as mortes neste substrato passaram a prevalecer nas primeiras 24 horas após a inoculação.

Todos os indivíduos adultos que foram expostos à dosagem de 3.200 J Is morreram nas primeiras 24 horas após a inoculação.

Como se pode observar, vários fatores podem influenciar o período de morte dos insetos pelos NEPs, incluindo o inóculo aplicado, o comportamento do hospedeiro e do parasito, e também o tipo de substrato. KONDO (1989) verificou que sob papel de filtro, *S. carpocapsae* penetra mais rapidamente no interior da larva de *G. mellonella* do que *S. glaseri*, mas isto é compensado pelo desenvolvimento mais rápido da segunda espécie, resultando na produção de descendência misturada (KOPPENHÖFER *et al.*, 1995).

CAMPBELL & GAUGLER (1993) mostraram que a espécie nictante *S. carpocapsae* foi mais efetiva em encontrar insetos móveis (larvas de *G. mellonella* e adultos de *Tenebrio molitor*) a partir de um curto período de exposição do que a espécie de hábito crusador *H. bacteriophora*. Assim sendo, os dados obtidos no presente experimento estão em comum acordo com os autores anteriormente citados.

CAMPBELL & GAUGLER (1993) ao imobilizarem o também tenebrionídeo *T. molitor*, observaram uma redução significativa das taxas de encontro de ambas as espécies de nematóides. Contudo, esta diferença significativa foi bem maior para a espécie *S. carpocapsae* do que para a espécie *H. bacteriophora*.

1- Determinação dos TL₅₀ e TL₉₀ pela ação de *H. riobravus* em cada tratamento (TABs. 1a; 1b; 1c; FIG. 4):

Entre todos os tratamentos envolvendo larvas e *H. riobravus*, os menores TL₅₀ (1,1598 dia) e TL₉₀ (1,9782 dia) foram observados no substrato terra, tendo como inóculo 1.600 J Is (TAB. 1a). Este fato também foi evidenciado nos tratamentos que envolveram pupas, a mesma espécie de nematóide e o mesmo inóculo de J Is anteriormente citado, com os respectivos períodos letais: 1,0238 dia (TL₅₀) e 1,9219 dia (TL₉₀) (TAB. 1b). Contudo, dentre os tratamentos com o estágio adulto do inseto, aqueles que foram expostos ao mesmo inóculo de J Is (1.600) no substrato cepilho + ração foram os que mostraram ser mais susceptíveis, detendo os seguintes tempos letais: 1,7548 dia (TL₅₀) e 3,1478 dias (TL₉₀) (TAB. 1c).

O maior TL₅₀ (16,0924 dias) registrado entre os tratamentos com *H. riobravus* foi característico para os adultos no substrato terra, nas duas menores dosagens de J Is aplicadas (400 e 800). Em se tratando do maior TL₉₀ (158,5644 dias) registrado para a atuação de *H. riobravus*, pode-se observar que este ocorreu no tratamento que expôs o estágio larval a 400 J Is no substrato papel de filtro. Este fato pode ser devido ao comportamento de tunelamento, característico deste estágio de desenvolvimento, podendo dificultar assim a ação dos nematóides neste substrato. Se desconsiderarmos este valor, os maiores registros de TL₉₀ seguintes, direcionam-se para o mesmo caminho dos TL₅₀ anteriormente citados; ou seja, ao tratamento que expôs indivíduos adultos às duas menores dosagens de J Is no substrato terra.

Tabela 1a – Períodos letais para os juvenis infectivos da espécie *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) atingirem 50% e 90% de mortalidade das larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), a partir de cada dosagem aplicada, em cada tipo de substrato.

Tratamentos	Tl₅₀	Limite inferior	Limite superior	Tl₉₀	Limite inferior	Limite superior
LH1CR	4.3643	3.7493	5.5295	12.6107	8.8223	23.6071
LH2CR	2.1889	2.0125	2.3701	4.4909	3.9738	5.2914
LH3CR	3.2910	2.9549	3.7724	8.5874	6.7011	12.6907
LH4CR	1.5198	1.1106	1.8575	10.5932	6.6867	27.8353
LH1PF	3.7347	3.3470	4.3391	8.9294	6.9518	13.3839
LH2PF	2.7905	2.5658	3.0547	6.0156	5.1201	7.5894
LH3PF	1.2093	0.0033	1.9601	158.5644	20.1863	**
LH4PF	2.2244	2.0708	2.3775	3.8821	3.5425	4.3702
LH5PF	1.2823	1.1871	1.3768	2.0163	1.8488	2.2528
LH1T	2.1889	2.0125	2.3701	4.4909	3.9738	5.2914
LH2T	2.7654	2.5616	2.9963	5.4713	4.7665	6.6500
LH3T	1.9646	1.7575	2.1731	5.1343	4.3309	6.5510
LH4T	1.2823	1.1871	1.3768	2.0163	1.8488	2.2528
LH5T	1.1598	1.0527	1.2596	1.9782	1.7989	2.2374

** Não pode ser obtido pelo Probit. **L** – Larva; **H** – *Heterorhabditis riobravus*; **CR** – Cepilho + ração; **PF** – Papel de filtro; **T** – Terra. **OBS:** Os números apresentados nos tratamentos representam as dosagens de juvenis infectivos aplicados: **1** – 100; **2** – 200; **3** – 400; **4** – 800; **5** – 1.600.

Tabela 1b – Períodos letais para os juvenis infectivos da espécie *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) atingirem 50% e 90% de mortalidade das pupas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), a partir de cada dosagem aplicada, em cada tipo de substrato.

Tratamentos	Tl ₅₀	Limite inferior	Limite superior	Tl ₉₀	Limite inferior	Limite superior
PH1CR	4.9593	4.1287	6.7651	15.2892	10.0121	33.5752
PH2CR	3.6508	3.3869	4.0267	6.4957	5.5247	8.4154
PH3CR	2.7642	2.5835	2.9597	4.9004	4.3806	5.7310
PH4CR	3.2624	3.0457	3.5324	5.7981	5.0522	7.1327
PH5CR	1.2580	0.9131	1.5343	6.6611	4.8359	12.0646
PH1PF	7.2797	5.4575	16.9151	15.8082	9.2150	81.2798
PH3PF	3.2538	2.8150	3.9691	12.5410	8.5145	24.8125
PH4PF	1.1053	0.7558	1.3799	6.0136	4.4208	10.6914
PH5PF	1.5570	1.3030	1.7848	5.4756	4.3743	7.7997
PH1T	2.9144	2.7203	3.1341	5.2737	4.6599	6.2938
PH2T	2.3363	2.1720	2.5035	4.2407	3.8309	4.8503
PH3T	1.5755	1.3933	1.7457	3.8481	3.3520	4.6450
PH4T	1.6045	1.4396	1.7609	3.5517	3.1477	4.1643
PH5T	1.0238	0.8949	1.1355	1.9219	1.7318	2.2017

P – Pupa; **H** – *Heterorhabditis riobravus*; **CR** – Cepilho + ração; **PF** – Papel de filtro; **T** – Terra. **OBS:** Os números apresentados nos tratamentos representam as dosagens de juvenis infectivos aplicados: **1** – 200; **2** – 400; **3** – 800; **4** – 1.600; **5** – 3.200.

Tabela 1c – Períodos letais para os juvenis infectivos da espécie *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida: Heterorhabditidae) atingirem 50% e 90% de mortalidade dos adultos de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), a partir de cada dosagem aplicada, em cada tipo de substrato.

Tratamentos	Tl ₅₀	Limite inferior	Limite superior	Tl ₉₀	Limite inferior	Limite superior
AH2CR	7.4318	5.4914	14.4544	23.9847	12.8915	100.0486
AH3CR	4.2710	3.6079	5.5831	14.8664	9.7678	31.8062
AH4CR	1.9936	1.8515	2.1331	3.4404	3.1559	3.8350
AH5CR	1.7548	1.6185	1.8881	3.1478	2.8755	3.5236
AH1PF	5.0981	4.4745	6.6985	8.5111	6.5370	15.3900
AH2PF	6.8274	5.0419	12.8528	29.7163	14.9329	136.3459
AH3PF	4.2336	3.4712	5.9301	19.7795	11.5015	57.5720
AH4PF	6.8274	5.0419	12.8528	29.7163	14.9329	136.3459
AH5PF	2.4357	2.1759	2.7390	7.2323	5.7194	10.3856
AH1T	16.0924	8.1381	181.5735	98.3814	26.1365	12285.9395
AH2T	16.0924	8.1381	181.5735	98.3814	26.1365	12285.9395
AH3T	4.3022	3.9492	4.9349	7.0333	5.8531	9.8201
AH4T	3.2910	2.9549	3.7724	8.5874	6.7011	12.6907
AH5T	2.4023	2.2616	2.5378	3.6616	3.4048	4.0282

A – Adulto; **H** – *Heterorhabditis riobravus*; **CR** – Cepilho + ração; **PF** – Papel de filtro; **T** – Terra. **OBS:** Os números apresentados nos tratamentos representam as dosagens de juvenis infectivos aplicados: **1** – 400; **2** – 800; **3** – 1.600; **4** – 3.200; **5** – 6.400.

VALLE (2004) observou uma maior frequência das mortes das larvas de *Conotrachelus psidii*, o Gorgulho-da-goiaba, entre o terceiro e o nono dia nos testes realizados com três diferentes linhagens de nematóides em placas de Petri. Esta lenta mortalidade foi atribuída à baixa quantidade de J Is aplicados. Com testes realizados em colunas de areia, o mesmo autor relatou que os períodos necessários para *H. baujardi* LPP7 causar mortalidade de 50 e 90% das larvas de *C. psidii* foram respectivamente, 0,54 (0,29-0,88) e 2,41 (2,03-2,75) dias.

Curvas dos TL₅₀ e TL₉₀ nos tratamentos com *Heterorhabditis riobravus*

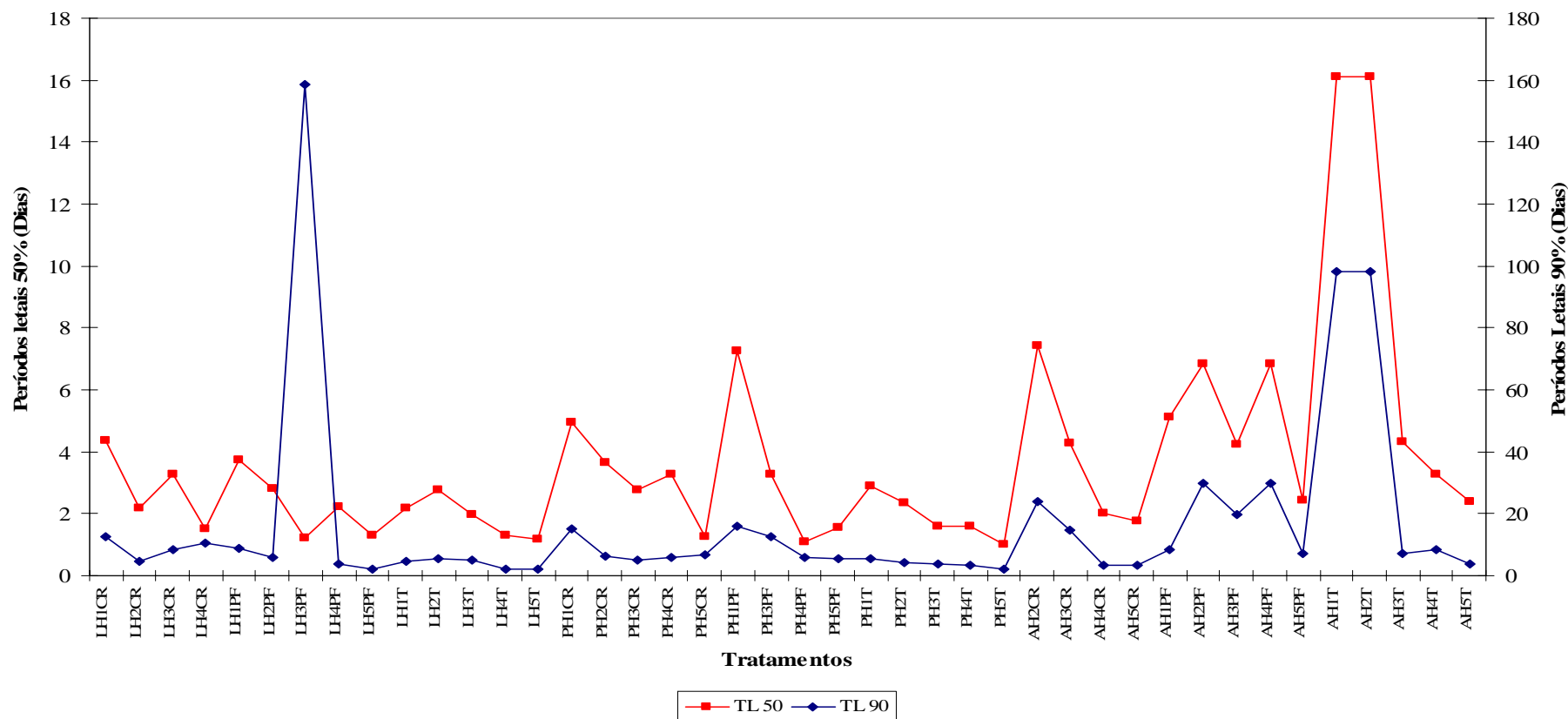


Figura 4. Representação gráfica das curvas dos tempos letais 50% (TL₅₀) e 90% (TL₉₀) de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em cada tratamento, após infecção por *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida, Heterorhabditidae). **L** – Larva; **P** – Pupa; **A** – Adulto; **H** – *Heterorhabditis riobravus*; **CR** – Cepilho + ração; **PF** – Papel de filtro; **T** – Terra. **OBS:** Os números apresentados nos tratamentos representam as dosagens de juvenis infectivos aplicados: **L:** 1 – 100; 2 – 200; 3 – 400; 4 – 800; 5 – 1.600. / **P:** 1 – 200; 2 – 400; 3 – 800; 4 – 1.600; 5 – 3.200. / **A:** 1 – 400; 2 – 800; 3 – 1.600; 4 – 3.200; 5 – 6.400.

2- Determinação dos TL₅₀ e TL₉₀ pela ação de *S. carpocapsae* em cada tratamento (TAB. 2; FIG. 5):

Entre todos os tratamentos envolvendo larvas e *S. carpocapsae*, os menores TL₅₀ e TL₉₀ registrados, foram observados no substrato terra, no inóculo de 200 J Is, com os respectivos períodos, 1,1598 e 1,9782 dia. Isto também aconteceu nos tratamentos que envolveram indivíduos adultos expostos a 800 J Is de *S. carpocapsae*, no mesmo tipo de substrato, com os seguintes tempos letais: (1,1598 dia) TL₅₀ e (1,9782 dia) TL₉₀.

Os maiores TL₅₀ (6,2044 dias) e TL₉₀ (18,9089 dias), registrados entre todos os tratamentos com *S. carpocapsae* estiveram presentes no tratamento que expôs larvas à dosagem de 100 J Is no substrato papel de filtro.

Tabela 2 - Períodos letais para os juvenis infectivos da espécie *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) causarem 50%(TL₅₀) e 90%(TL₉₀) de mortalidade dos estádios de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), a partir de cada dosagem aplicada, em cada tipo de substrato.

Tratamentos	TL ₅₀	Limite inferior	Limite superior	TL ₉₀	Limite inferior	Limite superior
LS1PF	6.2044	4.8874	9.8753	18.9089	11.3357	54.4851
LS2PF	1.9646	1.7575	2.1731	5.1343	4.3309	6.5510
LS3PF	1.2626	1.1022	1.4070	2.8317	2.5181	3.2999
LS4PF	1.3098	1.1740	1.4359	2.5762	2.3252	2.9330
LS2T	1.1598	1.0527	1.2596	1.9782	1.7989	2.2374
AS2CR	2.4647	2.2370	2.7224	6.1347	5.1072	8.0121
AS3CR	2.5240	2.0822	3.1705	17.4859	9.7950	60.5868
AS1PF	2.6047	2.4323	2.7854	4.6089	4.1481	5.3214
AS2PF	3.2538	2.8150	3.9691	12.5410	8.5145	24.8125
AS3PF	1.4351	1.2971	1.5655	2.8091	2.5383	3.1926
AS5PF	1.4141	1.1571	1.6369	5.0628	4.0707	7.1416
AS1T	1.5296	1.3249	1.7169	4.2240	3.5934	5.3198
AS2T	1.1598	1.0527	1.2596	1.9782	1.7989	2.2374

L – Larva; A – Adulto; S – *Steinernema carpocapsae*; CR – Cepilho + ração; PF – Papel de filtro; T – Terra.

OBS: Os números apresentados nos tratamentos representam na ordem crescente por cada estágio de desenvolvimento de *Alphitobius diaperinus* as dosagens de juvenis infectivos aplicados. **L:** 1 – 100; 2 – 200; 3 – 400; 4 – 800; 5 – 1.600. / **A:** 1 – 400; 2 – 800; 3 – 1.600; 4 – 3.200; 5 – 6.400.

Curvas dos TL₅₀ e TL₉₀ nos tratamentos com *Steinernema carpocapsae*

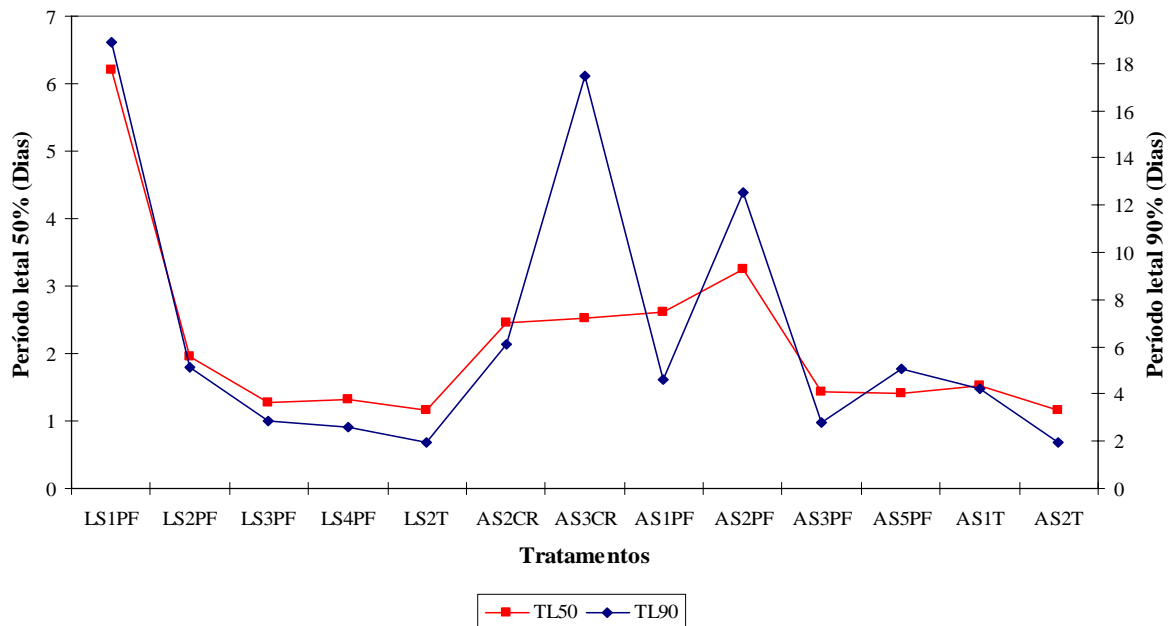


Figura 5. Representação gráfica das curvas dos tempos letais 50% (TL₅₀) e 90% (TL₉₀) de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em cada tratamento, após infecção por *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida, Steinernematidae). L – Larva; A – Adulto; S – *Steinernema carpocapsae*; CR – Cepilho + ração; PF – Papel de filtro; T – Terra. **OBS:** Os números apresentados nos tratamentos representam na ordem crescente por cada estágio de desenvolvimento de *Alphitobius diaperinus* as dosagens de juvenis infectivos aplicados: L: 1 – 100; 2 – 200; 3 – 400; 4 – 800; 5 – 1.600. / A: 1 – 400; 2 – 800; 3 – 1.600; 4 – 3.200; 5 – 6.400.

3- Determinação dos TL₅₀ e TL₉₀ pela ação de *H. riobravus* e *S. carpocapsae*, em cada tipo de substrato, independente das três dosagens comuns (400, 800 e 1.600 J Is) e do estágio de desenvolvimento de *A. diaperinus* (TAB. 3):

O substrato que mais favoreceu a ação infectiva dos nematóides entomopatogênicos da espécie *H. riobravus*, diante da população de *A. diaperinus*, foi a terra. Além disso, este mesmo tipo de substrato mostrou-se também adequado à ação de busca e infecção dos J Is de *S. carpocapsae*, diante dos estádios de larva e adulto do inseto.

O cepilho + ração foi o tipo de substrato no qual ocorreu o menor TL₅₀ (0,8457 dia) de ação infectiva por *S. carpocapsae* sobre as formas evolutivas de *A. diaperinus*. Por outro lado, neste tipo de substrato, os J Is de *S. carpocapsae* apresentaram o maior TL₉₀ (21,4034 dias) registrado, diante dos estádios de larva e adulto do inseto. Isto talvez possa ser explicado pelo

maior gasto de energia que necessita ser despendido pelo nematóide ao longo do tempo na procura de seus hospedeiros (estádios móveis), neste tipo de substrato, quando comparado aos outros dois substratos, considerados estes de certa forma mais regulares para a locomoção. Também é importante salientar que o volume deste substrato se sobressai em relação aos demais e desta forma pode propiciar “locais de esconderijo” para os adultos e larvas, dificultando a ação de *S. carpocapsae* que, devido à sua estratégia de emboscada, procura situar-se mais próximo da superfície. Contudo, somente após a complementação deste estudo, que depende somente dos testes envolvendo esta espécie de nematóide e o estágio não-locomotor (pupas) de *A. diaperinus* nos substratos propostos, é que será possível a confirmação de muitas hipóteses como estas.

No substrato papel de filtro ocorreu o maior TL₅₀ para *S. carpocapsae*, contudo esta situação se inverteu para o TL₉₀ obtido; o qual indicou um menor número de dias em relação ao TL₉₀ obtido para o substrato cepilho + ração.

CAMPBELL & GAUGLER (1993) verificaram que *S. carpocapsae* induziu significativamente maior mortalidade de hospedeiros na superfície do papel filtro no qual eles foram aplicados, do que no lado oposto, e que a mortalidade de hospedeiros induzida por *H. bacteriophora* não diferiu entre as duas superfícies. Isto indica que os nematóides da espécie *S. carpocapsae* apresentam uma maior dificuldade em ultrapassar este tipo de substrato para tentar chegar ao hospedeiro.

Tabela 3 - Períodos letais para os juvenis infectivos das espécies de nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) causarem 50%(TL₅₀) e 90%(TL₉₀) de mortalidade sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), em cada tipo de substrato, independente das três dosagens comuns (400, 800 e 1.600 J Is) e do estágio de desenvolvimento do inseto.

Espécies	Substratos	TL₅₀ (Dias)	Limite inferior	Limite superior	TL₉₀ (Dias)	Limite inferior	Limite superior
<i>H. riobravus</i>	Cepilho + ração	3.3964	3.2468	3.5689	10.4025	9.2384	11.9639
	Papel de filtro	3.1217	2.9491	3.3253	14.6147	12.2042	18.2267
	Terra	2.3783	2.2869	2.4742	7.5475	6.8605	8.4310
<i>S. carpocapsae</i>	Cepilho + ração	0.8457	0,5983	1.0552	21.4034	13.3290	46.6565
	Papel de filtro	1.5703	1.4945	1.6439	4.0517	3.7932	4.3687
	Terra	1.0544	0.9976	1.1082	2.1901	2.0881	2.3087

Apesar da aplicação dos inóculos no presente experimento ter ocorrido apenas na superfície voltada para o exterior da placa de Petri (acima do papel de filtro), é necessário lembrar do possível hábito de tunelagem realizado pelas larvas, seguidas pelos adultos, a fim de realizarem o canibalismo sobre as pupas a serem formadas (**FIG. 6**). Isto ocorre principalmente quando o recurso de alimento é escasso no ambiente, fato este observado nos presentes substratos testados.

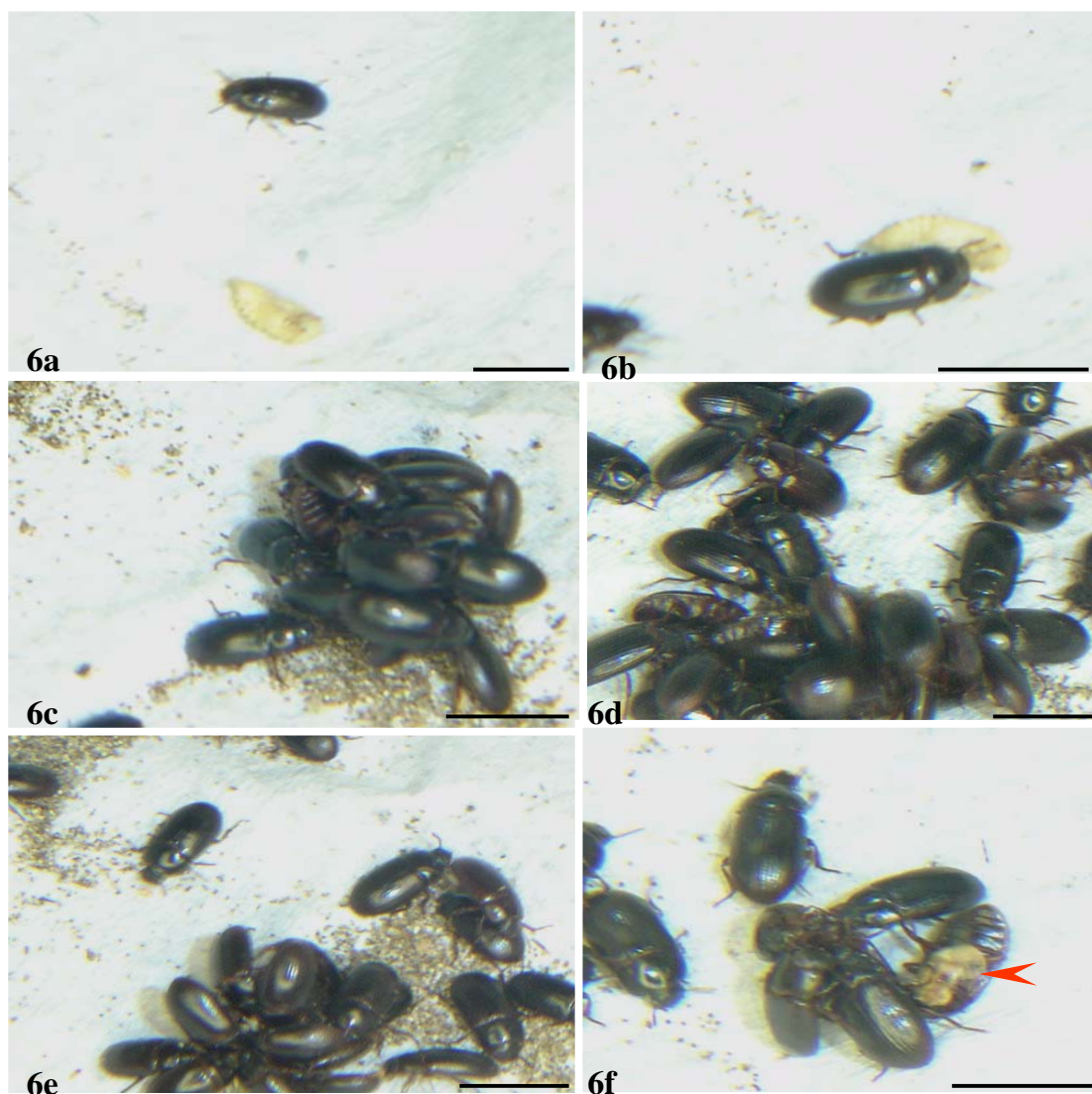


Figura - 6. a-f. Fotografias em seqüência do canibalismo exercido por adultos sobre pupas de *Alphetobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae). **a.** Aproximação do adulto; **b.** início do canibalismo; **c.** aglomeração sobre a pupa; **d.** aproximação de mais indivíduos adultos; **e.** início da dispersão dos adultos; **f.** adulto com o restante da pupa (a seta indica a pupa). Barras = 5mm.

Desta forma, estes dois estádios foram muitas vezes observados situados abaixo do papel de filtro, o que pode explicar este maior tempo letal para *S. carpocapsae*.

É importante salientar, que, aliado às tentativas de explicações para os resultados obtidos acima, sempre deve estar presente em mente a imunidade desenvolvida pelo inseto, a partir de uma dada infecção. Como os parasitos sobrevivem, ou escapam, ou como atua o controle imunológico de um inseto, são assuntos complexos ainda não completamente compreendidos. Em geral, a resistência passiva à imunidade resulta de uma forte pressão evolucionária sobre os patógenos a respeito dos mecanismos em desenvolvimento, que possibilitam escapar da resposta imune do inseto ou minimizar sua eficiência através de mudanças adaptativas ocorrentes no próprio patógeno.

CONCLUSÕES

- De maneira geral a ação dos J Is de *H. riobravus* com relação à infecção ao longo do tempo, é, na ordem, mais eficiente sobre os estádios de larva, pupa e adulto de *A. diaperinus*.
- De maneira geral a ação dos J Is de *S. carpocapsae* com relação à infecção ao longo do tempo, é mais eficiente sobre as larvas do que sobre os adultos de *A. diaperinus*, principalmente quando os últimos não estão situados na terra.
- O tipo de substrato sobre o qual ocorre o comportamento da ecologia de infecção entre os nematóides entomopatogênicos e o seu potencial hospedeiro; pode influenciar no período desta interação.
- A terra foi o tipo de substrato que mais favoreceu o comportamento de infecção dos J Is de *H. riobravus* sobre a população de *A. diaperinus*. O mesmo também ocorreu para os J Is de *S. carpocapsae* diante da população amostral, representada apenas por larvas e adultos de *A. diaperinus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

- ARRIGONI, E. B.; DINARDO, L. L.; CONDE, A J. & TERÁN, F. O. 1986. Aplicação de *Neoaplectana carpocapsae* em condições de campo ao controle de *Migdolus spp.* **Nematologia Brasileira**, **10**: 181-190.
- CAMPBELL, J. F. & GAUGLER, R. 1993. Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). **Behaviour**, **126**, 155 – 169.
- CHOO, H. Y.; KAYA, H.K.; BURLANDO, T. M. & GAUGLER, R. 1989. Entomopathogenic nematodes: host-finding ability in the presence of plant roots. – **Environ. Entomology**, **18**, 1136-1140.
- DUNPHY, G. B. & WEBSTER, J. M. 1986. Temperature effects on the growth and virulence of *Steinemema fe/tiae* strains and *Heterorhabditis heliothidis*. **Journal of Nematology**, **18**: 270-27.
- GAUGLER, R. ; McGUIRE, T. & CAMPBELL, J. F. 1989. Genetic variability among strains of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **J. Nematology**, **21**, 247-253.
- GAUGLER, R. & CAMPBELL, J. F. 1991. Behavioral response of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* to oxamyl. **Annals of Applied Biology**, **119**: 131-138.
- GEORGIS, R. & POINAR, G.O. Jr. 1983. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). **J. Nematology**, **15**: 308 -311.
- GERRITSEN, J. & STRICKLER, J. R. 1977. Encounter probabilities and community structure in zooplankton: a mathematical model. **J. Fish. Res. Board Can.**, **34**: 73-82.
- GOODWIN M.A. & WALTMAN W.D. 1996. Transmission of *Eimeria*, viruses and bacteria to chicks: darkling beetles *Alphitobius diaperinus* as vector of pathogens. **Journal of Applied Poultry Research**, **5**: 51-55.
- GREWAL, P. S.; GAUGLER, R.; KAYA, H. K. & WUSATY, M. 1993. Infectivity of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scapterisci* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, **62**: 22-28.
- HUEY, R. B. & PIANKA, E. R. 1981. Ecological consequences of foraging mode. **Ecology**, **52**: 991-999.
- JANDER, R. 1975. Ecological aspects of spatial orientation. **A Rev. Syst. Ecol.**, **6**: 171-188.
- KAYA, H. K. 1990. Soil Ecology. In.: GAUGLER, R. & KAYA, H.K. (eds), **Entomopathogenic nematodes in biological control**. CRC Press, Boca Raton, Flórida, p. 93-111.

- KONDO, E. 1989. Studies on the infectivity and propagation of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp. (Rhabditida: Steinernematidae), in common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of the Faculty of Agriculture, Saga University**, **67**: 1 – 88.
- KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K.; SHANMUGAM, S. & WOOD, G. L. 1995. Interspecific competition between steinernematid nematodes within an insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, **66**: 99-103.
- LEWIS, E. E.; GAUGLER, R. & HARRISON, R. 1992. Entomopathogenic nematode host finding: Response to host contact cues by cruise and ambush foragers. **Parasitology**, **105**: 109-115.
- MOYLE, P. & KAYA, H. K. 1981. Dispersal and infectivity of the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae), in sand. **Journal of Nematology**, **13**: 295-300.
- PASSOS Jr., N. C. & ALVES, S. B. 1995. Controle de *Heterotermes tenuis*, cupim subterrâneo da cana de açúcar, com *Steinernema carpocapsae*. **Resumos Simpósio Iniciação Científica USP**, 3. Piracicaba. p. 380.
- PASSOS Jr., N. C., ALVES, S. B. & NETO, S. 1995. Patogenicidade de *Steinernema carpocapsae*, formulação Exhibit, sobre diferentes castas de saúvas-limão, *Atta sexdens rubropilosa*. **Resumos Congresso Brasileiro de Entomologia**, 15. Caxambu, p. 342.
- PIANKA, E.R. (1966). Convexity, desert lizards, and spatial heterogeneity. **Ecology**, **47**: 1055 - 1059.
- SAEG (*Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas*) versão 8.0 - manual de instruções. CPD/UFV, Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Viçosa, MG, 142 p., 2000.
- SCHMITT, A. T.; GOWEN, S. R. & HAGUE, N. G. M. 1992. Baiting technique for the control of *Cosmopolites sordidus* Germar by *Steinemema carpocapsae*. **Nematropica**, **22**: 159-163.
- SILVA, A. S.; HOFF, G.; DOYLE, R. L.; SANTURIO, J. M. & MONTEIRO, S. G. 2005. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Acta Scientiae Veterinariae**, **33**(2): 177-181.
- VALLE, E.E.D. 2004. Avaliação e pressão de seleção de nematóides entomopatogênicos tolerantes a altas temperaturas visando o controle do Gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii*). Campos dos Goytacazes – RJ. 63 p. (**Dissertação de mestrado em Produção vegetal - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias**). UENF.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE MULTIPLICAÇÃO DOS NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE) EM LARVAS DE *Alphitobius diaperinus* (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) E DE *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE).

RESUMO

São vários os fatores que podem influenciar o potencial de multiplicação dos NEPs no interior de seus hospedeiros. Além disso, a morfometria dos juvenis infectivos de Steinernematídeos e de Heterorhabditídeos é importante para a descrição e identificação das suas espécies e linhagens. Inóculos de J Is de *H. riobravus* e *S. carpocapsae* foram adicionados sobre 20 larvas de *G. mellonella* e de *A. diaperinus* situadas individualmente em placas de Petri. Após a morte estas eram individualmente transferidas para “armadilhas de White”. Logo observada a emergência dos J Is, a água de cada “armadilha” era isoladamente coletada em tubos de

Eppendorf, e realizavam - se as contagens em microscópio óptico dos juvenis infectivos que emergiam de cada cadáver, chegando-se assim à produção média de J Is para as duas espécies hospedeiras. Alguns tubos de Eppendorf, relativos a cada espécie de nematóide e hospedeiro, foram aleatoriamente selecionados, e tiveram seus conteúdos misturados. Posteriormente, 50 J Is de cada tubo espécie/ hospedeiro, foram aleatoriamente selecionados para a realização de estudos morfométricos. Os parâmetros analisados foram apenas o comprimento e a largura corporal total dos J Is produzidos. Este trabalho teve como objetivos: determinar a produção média das espécies de NEPs no interior das larvas de *A. diaperinus* e de *G. mellonella*, e evidenciar possíveis mudanças de alguns aspectos morfométricos dos juvenis infectivos emergentes de cada espécie hospedeira. Houve diferença significativa entre as médias de produção de J Is das duas espécies de NEPs, obtidas das larvas de *G. mellonella*, com $p = 0,0048$. Com relação às médias de produção registradas para as duas espécies de nematóides, utilizando como hospedeiros larvas de *A. diaperinus*, não foram constatadas diferenças significativas entre elas, com $p = 0,8883$. A partir das médias de comprimento corporal total (CCT) e de largura corporal total (LCT) dos J Is de *H. riobravus* e *S. carpocapsae*, multiplicados nas duas espécies hospedeiras, foi observada diferença significativa entre elas, com $p = 0,0002$.

Palavras chave: *Alphitobius diaperinus*, *Galleria mellonella*, larvas, multiplicação, juvenis infectivos, nematóides entomopatogênicos, morfometria.

IN VITRO DETERMINATION OF THE POTENTIAL OF MULTIPLICATION OF NEMATODES ENTOMOPATHOGENICS *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE) IN LARVAS OF *Alphitobius diaperinus* (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) AND OF *Galleria mellonella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE).

ABSTRACT

There are several the factors that can influence the potential of multiplication of NEPs inside their hosts. Besides, the morfometry of the infective juvenile of *Steinernematídeos* and of *Heterorhabditídeos* are important for the description and identification of the species and

lineages. J I of *H. riobravus* and *S. carpocapsae* were added on 20 larvae of *G. mellonella* and of *A. diaperinus* placed individually in petri plates. After their death these were transferred individually for "White traps". As soon as it was observed the J Is emergence, the water of each "trap" was collected separately in Eppendorf tubes, and were accomplished the counting in optical microscope of the juvenile infective that emerged of each corpse, obtaining by this way the average rate of production of juvenile for the two host species. Some Eppendorf tubes, relatively to each nematode species and host, were selected aleatory, and they had their contents mixed. Later, 50 J Is each tube of species / host, were aleatory selected for the accomplishment of morph metric studies. The analyzed parameters were just the length and the total corporal width of the produced J Is. This experiment had as objectives: to determine the medium production of the species of NEPs inside the larvae of *A. diaperinus* and of *G. mellonella*, and to evidence possible changes of some morphometric aspects of the juvenile emerging infective of each host species. There was significant difference between the production means of J Is of the two species of NEPs, obtained of the larvae of *G. mellonella*, with $p = 0.0048$. Regarding to the production means registered for the two nematodes species, using as hosts larvae of *A. diaperinus*, significant differences were not verified among them, with $p = 0.8883$. Starting from the means of CCT and of LCT of J I of *H. riobravus* and *S. carpocapsae*, multiplied in the two host species, was observed significant differences among them, with $p = 0.0002$.

Words key: *A. diaperinus*, *G. mellonella*, larvae, multiplication, infective juvenile, morphometry.

INTRODUÇÃO

Galleria mellonella Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae), conhecida como grande traça da cera é um hospedeiro altamente susceptível a nematóides entomopatogênicos das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, sendo por isso amplamente empregada experimentalmente (MARTIN, 1997).

A maior parte dos experimentos utilizando diversas linhagens de NEPs, consegue manter seus estoques através da utilização de larvas de último instar da *G. mellonella* no processo de infecção. Contudo a criação deste Lepidóptero em laboratório além de ser custosa, exige também um intenso manejo sobre sua população.

São vários os fatores que podem influenciar o potencial de multiplicação dos NEPs no interior de seus hospedeiros, tais como a virulência das bactérias simbióticas, a infecção concomitante com outro microrganismo, a espécie de hospedeiro utilizado e o número de J Is penetrantes. De acordo com KAYA & KOPPENHÖFER (1996) quando este número no interior do hospedeiro excede um nível ótimo, uma competição espoliativa intra-específica pode ocorrer entre os nematóides em desenvolvimento, a qual pode reduzir o número total da progênie emergente do cadáver. Se o número de J Is que se estabelecem no hospedeiro excede a sua capacidade de suporte, nenhuma progênie é obtida. Assim, a competição resultante no hospedeiro pode ser antagonística para a sobrevivência das populações ocorrentes naturalmente ou para o estabelecimento dos nematóides aplicados.

Contudo, este tipo de competição é mais provável de ocorrer quando a penetração dos J Is no hospedeiro susceptível ocorre numa área próxima do cadáver de onde eles estão emergindo, ou quando eles são aplicados inundativamente como inseticidas biológicos numa dada área.

GEDEN *et al.* (1985), utilizando como hospedeiros de nematóides entomopatogênicos larvas, pupas e adultos de *Alphitobius diaperinus*, também vulgarmente conhecido no Brasil como cascudinho, salientam a reprodução bem sucedida nos cadáveres do besouro, do nematóide *S. feltiae*. Desta forma, partindo-se do princípio que o restabelecimento de uma nova população de J Is, após a morte dos hospedeiros infectados, pode realmente ocorrer nos locais de aplicação, faz-se de fundamental importância avaliar a real taxa de multiplicação destas formas diante de determinada dosagem inicialmente aplicada. Além disso, esta espécie hospedeira devido ao seu fácil e barato manejo de criação, pode se tornar uma nova alternativa no que diz respeito à multiplicação de NEPs *in vitro*.

O potencial de produção de novas formas de juvenis infectivos de *Steinernema carpocapsae* e de *Heterorhabditis riobravus* em larvas de *A. diaperinus* e de *G. mellonella*, foram determinados a partir de um único inóculo constituído por cerca de 1.600 J Is de ambas as espécies de NEPs. Assim, o presente trabalho tem por objetivo determinar a produção média das espécies de NEPs no interior das larvas de *A. diaperinus* e de *G. mellonella*, e evidenciar possíveis mudanças de alguns aspectos morfométricos dos juvenis infectivos emergentes de cada espécie hospedeira. Pouco se sabe sobre as características morfométricas dos J Is das espécies de nematóides, após multiplicarem - se em hospedeiros de diferentes espécies e até mesmo de diferentes Ordens de Insetos.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foram coletadas das populações de criações, e pesadas, 310 larvas de *A. diaperinus* e 167 larvas de *G. mellonella*. A partir dos pesos obtidos chegou-se aos pesos médios das larvas criadas *in vitro*, de ambas as espécies de hospedeiros. Utilizando-se dos valores médios obtidos, foram selecionadas 20 larvas de cascudinhos e de mariposas apresentando pesos correspondentes ou aproximados a estes valores.

Cada larva foi isoladamente colocada em placas de Petri de 5cm de diâmetro esterelizadas, tendo como substrato duas folhas de papel de filtro, também esterelizadas. Um mesmo inóculo contendo por volta de 1.600 J Is de ambas as espécies de NEPs em solução aquosa, foi adicionado a cada placa. Estas posteriormente foram acondicionadas em câmaras climatizadas reguladas à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. À medida que as larvas iam morrendo, eram individualmente transferidas para mini “armadilhas de White” adaptadas (KAYA & STOCK, 1997) e novamente mantidas em câmaras climatizadas por um período de 20 dias (**FIG. 1**).



Figura – 1. Mini armadilha de White contendo larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) e de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).

As temperaturas e umidades máximas e mínimas foram registradas durante este período. Logo observada a emergência dos J Is, a água de cada mini “armadilha de White” era isoladamente coletada em frascos de 25cm², tipicamente utilizados para cultura de tecidos, e posteriormente um mesmo observador realizava as contagens em microscópio óptico dos juvenis infectivos que emergiam de cada cadáver. (**FIG. 2**).



Figura – 2. Frascos de 25cm² contendo os juvenis infectivos dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) multiplicados nas larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).

A partir dos valores individuais de produção obtidos, chegou-se à produção média de juvenis infectivos em larvas, para as espécies hospedeiras, determinando os seus potenciais de multiplicação. Terminadas as contagens, alguns frascos, relativos a cada espécie de nematóide e hospedeiro, foram aleatoriamente selecionados, e em seguida tiveram seus conteúdos misturados. Os quatro frascos (A – J Is de *H. riobravus*/ *G. mellonella*; B – J Is de *H. riobravus*/ Cascudinho; C – J Is de *S. carpocapsae*/ *G. mellonella* e D – J Is de *S. carpocapsae*/ Cascudinho) foram primeiramente analisados para determinação do número total médio populacional presente em cada um deles. Em seguida, 50 J Is de cada tubo espécie/ hospedeiro, correspondendo a 0,037%(A), 0,14%(B), 0,037%(C) e 0,17%(D) das populações analisadas, foram aleatoriamente selecionados para a realização de estudos morfométricos em microscópio óptico Olympus BX 41, com o auxílio de ocular micrométrica (aumento 400x). A substância utilizada para provocar a estagnação dos movimentos dos J Is com o objetivo de facilitar a análise morfométrica, foi uma pequena gota de lugol.

Os parâmetros anatômicos escolhidos para a análise, foram apenas o comprimento e a largura corporal total (CCT e LCT) dos J Is produzidos (**FIG. 3**).

Análise estatística – As médias dos potenciais de produção de NEPs nas duas espécies hospedeiras, assim como as médias dos parâmetros de morfometria analisados dos nematóides

emergentes, foram comparadas utilizando o teste “T” de Student a 5% de probabilidade. Os resultados foram interpretados por meio do software SAEG (UFV, 2000)

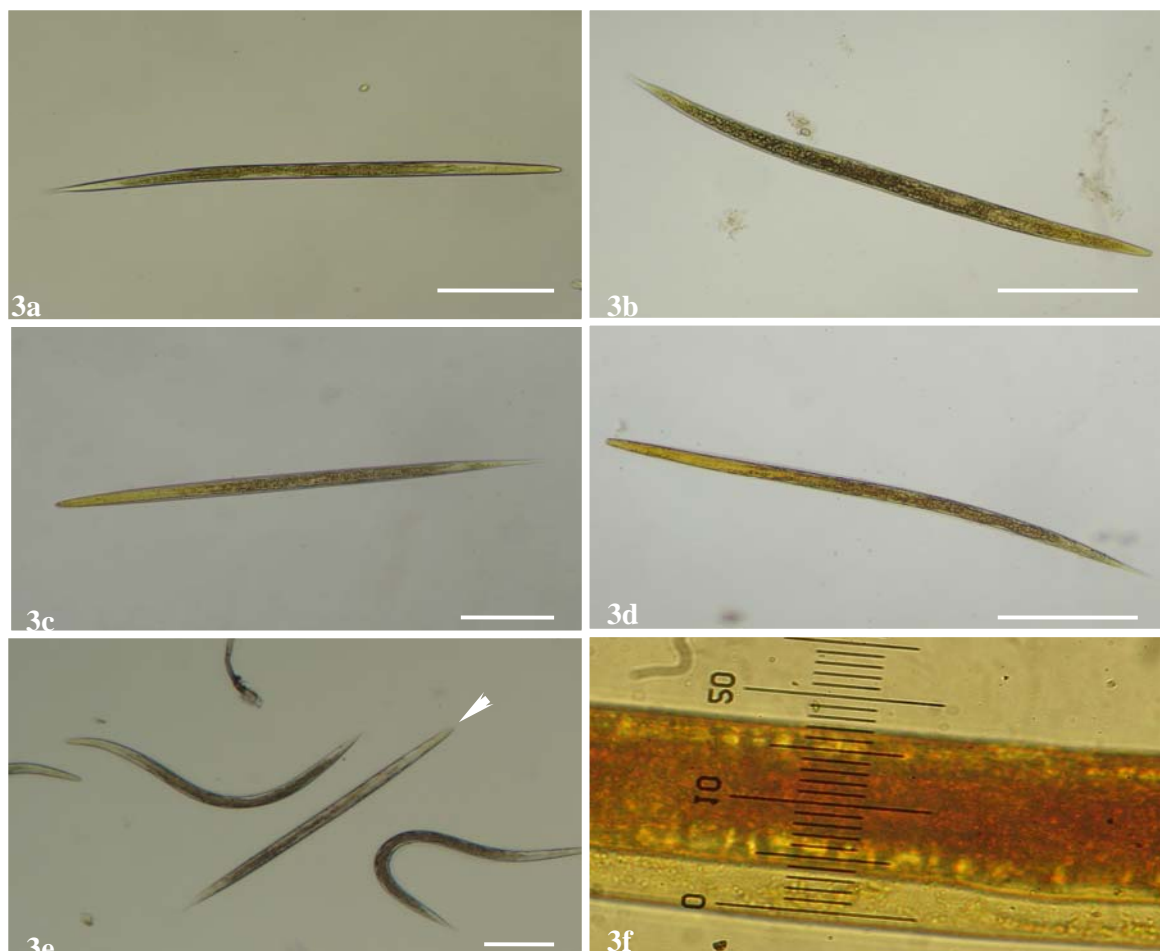


Figura – 3. a-f. Fotomicrografias dos nematóides entomopatogênicos multiplicados em larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) e de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). **a.** *Steinernema carpocapsae* multiplicados em *Alphitobius diaperinus*; **b.** *Steinernema carpocapsae* multiplicados em *Galleria mellonella*. **c.** *Heterorhabditis riobravis* multiplicados em *Alphitobius diaperinus*; **d.** *Heterorhabditis riobravis* multiplicados em *Galleria mellonella*; **e-f.** Metodologia da morfometria; **e.** Foram medidos somente os nematóides em posição linear; **f.** Largura do nematóide aferida com auxílio de uma ocular micrométrica no aumento de 400x. Barras=100µm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Potencial de multiplicação

A espécie *H. riobravis* mostrou-se 2,5 vezes mais efetiva em seu potencial de multiplicação no lepidóptero, que é o hospedeiro tradicionalmente utilizado com esta finalidade, do que a

espécie *S. carpocapsae*. A explicação para isto pode estar ligada ao hospedeiro natural evolutivo de cada espécie, ao efeito de densidade dependente, anteriormente citado, como também ao tipo de comportamento de busca e infecção dos J Is no substrato papel de filtro.

Houve diferença significativa entre as médias de produção de J Is das duas espécies de NEPs, obtidas das larvas do lepidóptero *G. mellonella*, com $p = 0,0048$. Com relação às médias de produção registradas para as duas espécies de nematóides, utilizando como hospedeiros larvas do coleóptero *A. diaperinus*, não foram constatadas diferenças significativa entre elas, com $p = 0,8883$ (**TAB. 1a**). A diferença no número de larvas de *A. diaperinus* obtidas para a produção de NEPs entre as espécies de Nematoda, pareceu não influenciar nos valores de produção média alcançados neste hospedeiro.

Quando o hospedeiro é colonizado por nematóides entomopatogênicos, um número seguro de J Is é necessário para superar as defesas do hospedeiro (GAUGLER *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1994) e para garantir o acasalamento (para Steinernematideos). Todavia, a invasão por muitos nematóides, pode impedir seriamente o desenvolvimento, a sobrevivência, e a reprodução nos hospedeiros individuais (SELVAN *et al.*, 1993). Tal efeito de densidade dependente tem sido observado com *S. carpocapsae* (SANDER & STANUSZEK, 1971; SELVAN *et al.*, 1993), *S. glaseri* (ZERVOS *et al.*, 1991; KOPPENHOFFER & KAYA, 1995) e *Heterorhabditis* spp. (MOLYNEUX *et al.*, 1983; SELVAN *et al.*, 1993). Entretanto, *H. bacteriophora* parece ser bem menos susceptível a competição intra-específica do que *S. carpocapsae* e *S. glaseri* (SELVAN *et al.*, 1993; KOPPENHOFFER & KAYA, 1995).

Tabela 1a - Médias de juvenis infectivos dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) multiplicados em larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Hospedeiros	Espécies	<i>n</i> (Larvas)	Peso médio (Hospedeiro) ± <i>SD</i> g	<i>n</i> (mortas)	<i>n</i> (produtoras)	Produção média ± <i>SD</i> J Is	<i>E.P</i>	<i>C.V</i>
<i>G. mellonella</i>	<i>H. riobravus</i>	20	0,172275±0,006198886	20	16	109.474±77.363 a	19,340.63	70,6675
	<i>S. carpocapsae</i>	20	0,17274±0,00790512	20	14	42.734±32.410 b	8,661.88	75,8409
<i>A. diaperinus</i>	<i>H. riobravus</i>	20	0,016305±0,00045	20	14	7.421±4.293 a	1,147.44	57,851
	<i>S. carpocapsae</i>	20	0,016495±0,00073447	20	9	7.706±5.244 a	1,748.05	68,0569

n (Larvas): Número de larvas infectadas; *SD*: Desvio padrão; g: unidade grama; *n* (mortas): Número de larvas mortas; *n* (produtoras): Número de larvas em que houve produção de juvenis infectivos; (J Is): Juvenis infectivos; *E.P*: Erro padrão; *C.V*: Coeficiente de variação.

Médias seguidas das mesmas letras na coluna dentro de cada hospedeiro, não diferem estatisticamente entre si pelo teste “T” de Student ($P>0,05$).

Em estudos pilotos, realizados paralelos a este, a mesma linhagem de *S. carpocapsae* utilizada no presente experimento também revelou bons resultados relativos à infecção e conseqüente morte de ninfas de quinto instar do hemíptero *Manaharva liturata*, a conhecida cigarrinha - das – pastagens, e sobre também larvas e pupas do díptera *Musca domestica* (**FIG. 4**) Contudo, somente a espécie de hemíptero foi efetiva no estabelecimento e multiplicação dos J Is. Quando realizada infecção sobre ninfas de menores instares, a multiplicação não foi efetiva, resultando em muitos indivíduos adultos “grávidos” e juvenis de primeiro instar recém liberados (**FIG. 5**). Este fato não foi observado nos testes sobre as ninfas de último instar, o que nos leva a crer que o recurso disponível aos J Is nestas ninfas não foi suficiente para que a espécie pudesse desenvolver novas gerações.



Figura – 4. Armadilha de White contendo larvas e pupas de *Musca domestica* (Díptera: Muscidae) mortas por *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). Barra = 4 mm.



Figura – 5. Adulto de *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida, Steinernematidae) com juvenis infectivos no seu interior. Barra = 50 μ m.

Segundo PETERS (1996), *S. carpocapsae* já foi naturalmente isolado a partir de insetos pertencentes as seguintes Ordens: Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e Lepidoptera. Com relação à outra espécie de nematóide estudada não conseguimos encontrar nenhum relato sobre seus hospedeiros naturais. É importante salientar que a maioria das espécies hoje produzidas em laboratório apresenta diferentes linhagens devido às várias passagens por diferentes tipos de hospedeiros. Aparentemente, esta condição pode interferir nas tentativas de controle biológico sobre as pragas de ocorrência natural e até mesmo sobre aquelas classificadas como exóticas. Porém, é importante ressaltar as contribuições das importantes informações provenientes destes estudos, às quais podem prever alguns consideráveis aspectos futuros envolvendo as espécies não alvo, diante das aplicações no campo.

Devido ao menor tamanho da larva de *A. diaperinus*, cerca de 10,8 vezes menor, comparado com o da larva da mariposa, os resultados obtidos em termos de produção para ambas as espécies de nematóides, em cada hospedeiro, não foi surpreendente. Contudo, se ignorarmos essas evidentes diferenças anatômicas e fisiológicas entre as duas espécies hospedeiras e passarmos a considerá-las como um “mesmo recurso” em massa corporal para o parasito, é possível inferir da **TAB. 1b**, que a produção comparativa de J Is de *S. carpocapsae* e de *H. riobravus* em larvas de *A. diaperinus* seja respectivamente de 1,9 e 0,71 em relação à produção obtida em larvas de *G. mellonella*. Ou seja, a larva do coleóptero quase duplica o número de J Is de *S. carpocapsae* e reduz em aproximadamente 30% o número de J Is de *H. riobravus*, em relação à larva do lepidóptero. Contudo, os números de larvas de *A. diaperinus* necessários para atingirem as produções de J Is de *H. riobravus* e de *S. carpocapsae* obtidas nas larvas de *G. mellonella*, seriam respectivamente, 236 e 77.

Pelo motivo da espécie *A. diaperinus* utilizada neste experimento não representar o hospedeiro natural de *H. riobravus* e de *S. carpocapsae*, e também pelo fato de nunca antes ter sido utilizada para a multiplicação das espécies e linhagens de NEPs citadas, ela acabou surpreendendo com os seus bons resultados.

Nematóides da espécie *H. bacteriophora* criados *in vitro* (meios de cultura) foram menores em tamanho e produziram poucos ovos quando comparados com aqueles que cresceram previamente *in vivo* (ZIONI *et al.*, 1992).

Tabela 1b - Análise do número de larvas de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) necessárias para alcançar as médias de produção de juvenis infectivos, dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), obtidos a partir de larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).

Hospedeiros	Espécies	<i>n</i> (mortas)	<i>n</i> (produtoras)	Recurso (massa corporal) g	Produção média ± SD J Is	Número de larvas de <i>A. diaperinus</i> necessárias
<i>G. mellonella</i>	<i>H. riobravus</i>	20	16	2,7564	1.751.584	236
	<i>S. carpocapsae</i>	20	14	2,41836	598.276	77
<i>A. diaperinus</i>	<i>H. riobravus</i>	20	14	0,22827	103.894	14
	<i>S. carpocapsae</i>	20	9	0,148455	69.354	9

SD: Desvio padrão; *n* (mortas): Número de larvas mortas; *n* (produtoras): Número de larvas em que houve produção de juvenis infectivos; (J Is): Juvenis infectivos.

HATAB *et al.*, (1998) estudando nematóides da espécie *S. glaseri*, também verificaram que o número de J Is produzidos por mg de peso seco realmente pode variar de acordo com o método de cultura utilizado. Segundo estes mesmos autores, o número de J Is produzidos a partir de larvas do coleóptero *P. japonica* e do lepidóptero *G. mellonella*, foram respectivamente, 1.267 ± 67 e 1.346 ± 47 por mg hospedeiro. Em contraste, a criação a partir da cultura líquida e da cultura sólida produziu os respectivos números de juvenis infectivos: 409 ± 41 e 350 ± 37 por mg de cultura seca.

Os parasitos considerados obrigatórios dependem de seus hospedeiros para obter seus nutrientes. HATAB *et al.*, (1998), afirmam que a composição lipídica, em termos de quantidade e qualidade, dos nematóides entomopatogênicos é fortemente influenciada pelo hospedeiro ou pelo meio de cultura sobre o qual eles são criados.

O grande conteúdo lipídico dos J Is é um reflexo de sua dependência sobre os lípidios, como a principal fonte de energia e de reserva de alimento. Semelhante aos outros insetos predadores, os nematóides entomopatogênicos dependem de sua presa para obter uma fonte de colesterol ou de esteróis utilizáveis (SVOBODA *et al.*, 1978; MORRISON & RITTER, 1986).

Análise morfométrica

A morfometria dos juvenis infectivos de Steinernematídeos e de Heterorhabditídeos são importantes para a descrição e identificação das espécies. Contudo, de acordo com NGUYEN & SMART (1995), os resultados de morfometria obtidos de culturas *in vitro* não devem ser usados com objetivo taxonômico ou de identificação. Segundo eles, além do meio de cultura, os parâmetros morfométricos dos J Is de Steinernematídeos, especialmente o comprimento corporal total, também podem variar entre os indivíduos que emergem em diferentes períodos do cadáver do inseto. Sabendo disto, todo cuidado foi tomado no presente experimento, quando todos os juvenis infectivos emergentes de cada espécie/ hospedeiro foram misturados, formando assim quatro populações a serem amostradas.

A partir das médias obtidas de comprimento corporal total (CCT) e de largura corporal total (LCT) dos 50 espécimes analisados de cada linhagem (população), foram realizados quatro testes estatísticos para comparação destas. Como se pode observar na **TAB. 2** ocorreram diferenças significativas em todos eles, com $p = 0,0002$. Quanto maior o “recurso” (hospedeiro) oferecido, também maior foi o comprimento e a largura corporal total dos J Is emergentes para ambas as espécies de nematóides analisadas. Conseqüentemente, obedecendo esta direta proporcionalidade,

quanto menor foi o “recurso” (hospedeiro), também menor foram o comprimento e a largura corporal total dos J Is emergentes.

Durante o acondicionamento em água destilada, uma alteração comportamental foi observada nos J Is de *H. riobravus*, multiplicados no coleóptero *A. diaperinus*, em relação ao comportamento típico dos seus J Is, quando multiplicados no lepidóptero *G. mellonella*. Os J Is obtidos a partir das larvas de *A. diaperinus* não demonstraram a forte tendência de agregação intra-específica em água destilada, observada nos J Is obtidos a partir das larvas de *G. mellonella* (FIG. 6).

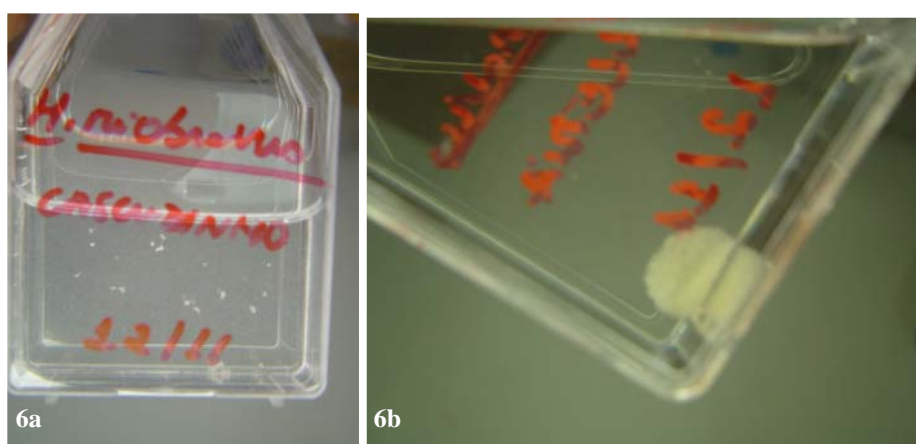


Figura – 6. a-b. Comportamento gregário intra-específico dos juvenis infectivos de *Heterorhabditis riobravus* (Rhabditida: Heterorhabditidae), multiplicados após infecção nos diferentes hospedeiros, quando acondicionados em água destilada.

a. Nematóides oriundos do besouro (*Alphitobius diaperinus*); **b.** Nematóides oriundos da mariposa (*Galleria mellonella*).

Os J Is de *H. riobravus* provenientes de *A. diaperinus* apresentaram maior CCT ($516 \pm 21,18 \mu\text{m}$) em relação aos J Is de *S. carpocapsae* emergidos do mesmo hospedeiro ($510,2 \pm 32,54 \mu\text{m}$). Contudo ao analisarmos o parâmetro LCT, foi observado que os J Is de *S. carpocapsae* emergidos de *A. diaperinus* apresentaram maiores LCTs ($27,6 \pm 2,76 \mu\text{m}$), quando comparados aos J Is de *H. riobravus* emergidos do mesmo hospedeiro ($17,85 \pm 1,89 \mu\text{m}$).

POINAR (1990) relata que em espécies maiores tais como *Steinernema glaseri* (Steiner) {juvenis infectivos = $864 - 1.448 \mu\text{m}$ de comprimento} ocorre a produção de cerca de 30.000 J Is para a larva de *G. mellonella* (massa=0,25g), entretanto em espécies menores tais como *Heterorhabditidis bacteriophora* (Poinar) {juvenis infectivos = $512 - 671 \mu\text{m}$ de comprimento} a

produção é por volta de 400.000 J Is. Em termos de comparação, no presente estudo obtivemos uma produção média de cerca de 42.734 J Is de *S. carpocapsae* {559,2±28,98µm de comprimento} para a larva de *G. mellonella* (massa=0,17g). Em relação aos J Is da espécie *H. riobravus* {555,6±31,04µm de comprimento}, a produção obtida foi por volta de 109.474 J Is no mesmo hospedeiro (**TABs. 1a e 2**). Assim sendo, nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos por POINAR (1990), sugerindo que quanto menor for o nematóide maior será a sua produção em termos numéricos, quando utilizando larvas de *G. Mellonella*.

Tabela 2 - Médias do comprimento corporal e da largura corporal total dos juvenis infectivos dos nematóides *Heterorhabditis riobravus* e *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) multiplicados em larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Espécies	Hospedeiros (<i>larvas</i>)	<i>n</i> (<i>Neps</i>)	C.C.T Médio ± SD µm	<i>E.P</i>	<i>C.V</i>	L.C.T Média ± SD µm	<i>E.P</i>	<i>C.V</i>
<i>H. riobravus</i>	<i>G. mellonella</i>	50	555,6±31,047a	4,390	5,588	23,2±2,674a	0,378	11,528
	<i>A. diaperinus</i>	50	516±21,18b	2,996	4,106	17,85±1,89b	0,267	10,591
<i>S. carpocapsae</i>	<i>G. mellonella</i>	50	559,2±28,98a	4,099	5,183	30,1±3,91a	0,553	12,993
	<i>A. diaperinus</i>	50	510,2±32,54b	4,602	6,378	27,6±2,76b	0,390	10,016

n(*Neps*): Número de juvenis infectivos analisados; C.C.T: Comprimento corporal total; L.C.T: Largura corporal total; *E.P*: Erro padrão; *C.V*: Coeficiente de variação. Médias seguidas das mesmas letras nas colunas dentro de cada espécie de nematóide, não diferem estatisticamente entre si pelo teste “T” de Student (P>0,05).

Todas as duas espécies de NEPs parecem investir mais na produção do que no tamanho dos J Is formados, visto que ambos os parâmetros morfométricos analisados diminuíram significativamente com a redução do tamanho do hospedeiro. Além disso, a espécie *S. carpocapsae* pareceu ter uma maior tendência a priorizar a LCT do que o CCT dos J Is; sendo observado o oposto para a espécie *H. riobravus*. Isto talvez possa ser explicado, devido ao fato dos Heterorhabditídeos possuírem uma estratégia adicional de infecção, comparado aos Steinernematídeos, que é a capacidade de penetrar a cutícula do seu hospedeiro através da utilização de uma estrutura adaptativa conhecida como “dente”.

CONCLUSÕES

- As duas espécies de nematóides apresentaram diferentes comportamentos, no que diz respeito aos seus potenciais de multiplicação em larvas de *G. mellonella*. Este fato não aconteceu quando os hospedeiros utilizados foram larvas de *A. diaperinus*; onde estes potenciais se equivaleram.
- As características anatômicas da espécie hospedeira, sendo esta analisada como um “recurso” para o parasito, pode provocar consideráveis mudanças morfométricas nas populações destes.
- O comportamento de interação dos juvenis infectivos de *H. riobravus* provenientes de diferentes hospedeiros quando armazenados, pode ser alterado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GAUGLER, R., WANG, Y. & CAMPBELL, J.F. 1994. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defenses against entomopathogenic nematode attack. **Journal of Invertebrate Pathology**, **64**: 193-199.
- GEDEN, C. J., AXTELL, R. C. & BROOKS, W. M. 1985. Susceptibility of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* to the entomogenous nematodes *Steinemema feltiae*, *S. glaseri* (Steinemematidae) and *Heterorhabditis he/iothidis* (Heterorhabditidae). **Journal. Ento. Sci.**, **20** (3): 331 - 339.

- HATAB, M. A., GAUGLER, R. & EHLERS, R. 1998. Influence of the methods of culture on lipids *Steinernema Glaseri*. **The Journal of Parasitology**, v.84 n.2.: 215-221.
- MORRISON, A. H. & RITTER, K. S. 1986. Effect of host insect sterols on the development and sterol composition of *Steinernema feltiae*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **19**: 135 -142.
- KAYA, H. K. & KOPPENHÖFER, A. M. 1996. Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, **6**: 357-371.
- KAYA, H. K. & STOCK, P. 1997. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. Biological techniques. Academic Press. p. 281-324.
- KOPPENHÖFER, A.M. & KAYA, H.K. 1995. Density-dependent effects on *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) within an insect host. **Journal of Parasitology**, **80**: 797-799.
- MARTIN JR., W.R. 1997. Using entomopathogenic nematodes to control insects during stand establishment. **Hort. Science**, **32** (2).
- MOLYNEUX, A.S., BEDDING, R.A. & AKHURST, R.J. 1983. Susceptibility of the sheep blowfly *Lucilia cuprina* to various *Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp., and undescribed steinernematid (Nematoda). **Journal of invertebrate Pathology**, **42**: 1-7.
- NGUYEN, K.B. & SMART, JR. 1995. Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rehabditida). **Journal of Nematology**, **27**: 206-212.
- PETERS, A. 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. **Biocontrol Science and Technology** **6**, 389-402.
- POINAR, G. O. JR. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In.: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (eds), **Entomopathogenic nematodes in biological control**. CRC Press, Boca Raton, Flórida, 23-61.
- SAEG (*Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas*) versão 8.0 - manual de instruções. CPD/UFV, Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Viçosa, MG, 142 p., 2000.
- SANDNER, H. & STANUSZEK S. 1971. Comparative research on the effectiveness and reproduction of *Neoaplectana carpocapsae* s.l. **Zeszyt problemowe Postepow Nauk rolniczych**, **121**: 290-226.

- SELVAN, S., CAMPBELL, J. F. & GAUGLER, R. 1993. Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, **62**: 278-284.
- SVOBODA, J. A., THOMPSON, W., ROBBINS, E. & KAPLANIS, J. N. 1978. Insect steroid metabolism. **Lipids**, **13**: 742 - 753.
- WANG, Y., GAUGLER, R. & CUI, L. 1994. Variations in immune response of *Popillia japonica* and *Achetus domesticus* to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* species. **Journal of Nematology**, **26**: 11- 18.
- ZERVOS, S., JOHNSON, S.C. & WEBSTER, J.M. 1991. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. **Canadian Journal of Zoology**, **69**: 1261-1264.
- ZIONI, S., GLAZER, L., & SEGAL, O. (1992) Ufe cycle and reproductive potential of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88. **Journal of Nematology**, **24**: 352-358.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelo fato dos galpões de criação serem sombreados não ocorre excessiva radiação solar; os substratos permanecem até certo grau úmidos devido à entrada dos esterco e da presença dos sistemas de abastecimento de água dentro dos recintos; e ademais, além de causar a morte dos insetos, também ocorre a produção de novos juvenis infectivos no interior do cadáver, que após algum tempo emergem do mesmo, restabelecendo uma nova população infectiva no ambiente por um tempo adicional.

Todos estes fatores podem contribuir para o efetivo controle das populações de *Alphitobius diaperinus* nas criações de aves. Contudo, neste estudo não poderíamos apenas quantificar o número total de hospedeiros mortos para uma dada densidade de juvenis infectivos, pois estaríamos ignorando muitos aspectos da importante biologia do hospedeiro, do seu habitat, da sua interação com o parasito e com as demais comunidades de organismos que coexistem em seu ambiente natural.

Alguns estudos envolvendo a dinâmica dos estádios de *A. diaperinus* com a sazonalidade anual, têm sido realizados. Adultos e larvas são mais abundantes no esterco de aves poedeiras nos meses mais frios, estação de outono e inverno. Estes reduzem em número “sensivelmente” nos

meses mais quentes (primavera e verão), onde a precipitação de chuvas é maior, desfavorecendo a proliferação de adultos e larvas.

Sabendo que larvas e pupas do díptero *Musca domestica* podem ser alvos dos J Is infectivos quando aplicados sobre a cama de frangos, impedindo assim a multiplicação destes, e que muitos dos fracassos na tentativa de controle biológico de insetos pragas no ambiente utilizando as diferentes espécies e linhagens de nematóides entomopatogênicos podem, serem explicados, pelo menos em parte, pelos resultados aqui obtidos; faz - se necessários estudos adicionais com estes nematóides, utilizando os diferentes estágios de *A. diaperinus* e até mesmo de outros hospedeiros, para uma maior compreensão desta possível estratégia evolutiva.

De posse das dosagens e períodos letais obtidos para cada estágio nos diferentes tipos de substratos, do potencial de multiplicação de J Is nas larvas da espécie alvo e nos demais organismos presentes na cama de frango; e da dinâmica populacional dos estágios deste coleóptero ao longo do ano; o controle biológico sobre a espécie poderá ser exercido de forma mais consciente e equilibrada.

Antes de levar a pesquisa para o campo é necessário muito estudo. Lá fora as coisas não são como no laboratório, tudo isto funciona muito bem onde pode ser controlado, mas a natureza tem o seu próprio tempo. A maior preocupação de um pesquisador que se dedica a esta área do conhecimento deve ser sempre a de levar a pesquisa para o campo na tentativa de solucionar, ou ao menos minimizar o problema, sem, contudo, provocar o surgimento de outros, como por exemplo, o desequilíbrio ecológico.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B. J. & NGUYEN, K. B. 2002. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**, CABI Publishing, New York, p: 01-33.

AKHURST, R. J. 1980. Morphological and function dimorphism in *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. **J. Gen. Microbiol.**, **121**: 303-309.

AKHURST, R. J. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. **J. Gen. Microbiol.**, **128**: 3061-3066.

AKHURST, R.J. 1983. *Neoplectana* species: Specificity of association with bacteria of the genus *Xenorhabdus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **33**: 38-45.

AKHURST, R. J. & BROOKS, W. M. 1984. The distribution of entomophilic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) in North Carolina. **Journal of Invertebrate Pathology**, **44**: 140-145.

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

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

ANON, 1980. **Insects in Poultry Houses**. Ministry of Agriculture, fisheries and Food, Advisory Leaflet No. 537, HMSO.

ARENDS, J. J. 1987. Control, management of the litter beetle. **Poult. Dig.**.(april) 172 - 176.

- ARMITAGE, D. M. 1986. Population changes of four species of insects in three deep pit poultry houses. **Entomol. Mont. Mag.**, **122**: 75 - 77.
- BACK, E. A. & COTON, R. 1962. Stored grain pests. U. S. Dept. **Agric. Farm. Bul.** 1920.
- BARKÉ, H. E. & DAVIS, R. 1967. Sexual dimorphism in the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Georgia Ent. Soc.**, **2** (4): 119 - 121.
- BARKÉ, H. E. & DAVIS, R. 1969. Notes on the biology of lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Geogr. Entomol. Soc.**, **4**: 46 - 50.
- BATISTA - FILHO, A. 1996. Produção de nematóides entomopatogênicos "in vitro". **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v. **63**, n.1: 91-97.
- BEDDING, 1984. Large scale production, storage and transport of insect-parasitic nematode *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Annals of Applied Biology**, **104**: 117 - 120.
- BERCHIERI & MACARI. (2000) *apud* Programa de limpeza e desinfecção para a indústria de aves e suínos. **CD Ouro Fino – Produtos veterinários**. (2003).
- CABANILLAS, H. E., POINAR, G.O., JR. & RAULSTON, J.R. 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. **Fundam. Appl. Nematol.**, **17**:123-131.
- CAMPBELL, J. F. & GAUGLER, R. 1993. Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). **Behaviour**, **126**, 155 – 169.
- CAMPBELL, J. F. & GAUGLER, R. 1997. Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: dichotomy or variation along a continuum? **Fundamental and Applied Nematology**, **20**: 393-398.
- CAMPBELL, J. F. & KAYA, H. K. 2002. Variation in entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) infective-stage jumping behaviour. **Nematology**, **4**(4): 471-482.
- CHAPMAN, R.F. 1982. The insects: Structure and function. **Harvard University Press, Cambridge, MA**, 3rd ed., 919p.
- CHERNAKI, A. M., ALMEIDA, L. M. 2001. Exigências térmicas, período de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**; **30** (3): 365-368.

- CHERNAKI, A. M., BIESDORF, S. M., ALMEIDA, L.M., LEFFER, E.V.B. & VIGNE, F. 2002. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, **4**, n.3: 243-247.
- DASS, R.; PAUL, A.V. N. & AGARWAL, R. A. 1984. Feeding potential and biology of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), preying on *Corcyra cephalonica* (Lepdoptera: Pyralidae). **Z. Angew. Entomol**, **98** (5): 444 - 449.
- De Las CASAS, E., POMEROY, B. S. & HAREIN, P. K. 1968. Infection and quantitative recovery of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* from within the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*). **Poult. Sci.**, **47**: 1871 -1875.
- DESPINS, J. L.; TURNER, JR., E. C. & RUSZLER, P. R. 1987. Construction profiles of high rise caged layer houses in association with insulation damage caused by the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* in Virginia. **Poult. Sci.**, **66**(2): 243 – 250.
- DESPINS, J. L.; TURNER, JR., E. C. & RUSZLER, P. R. 1989. Effects of poultry manure moisture and poultry house construction materials on movements of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), a structural insect pest in high rise caged layer houses. **Poult. Sci.**, **68**: 1326 – 1331.
- DOUCET, M.M.A. (1986). A new species of *Neoplectana* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) from Cordoba, Argentina. **Revue de Nématologie**, **9** : 317-323.
- DOWDS, B. C. A & PETERS, A. 2002. Virulence mechanisms. In: Gaugler, R (ed.) **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, Wallingford UK., p. 79-98.
- DOWNES, M. J. E & GRIFFIN, C. T. 1996. Dispersal behaviour and transmission strategies of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Biocontrol Science and Technology**, v.6: 347-356.
- DOYEN, J. T. 1989. Reconstitution of Coelometopini, Tenebrionini and related tribes of América North of Colômbia (Coleóptera: Tenebrionidae). **J. New York Entomol. Soc.**, **97** (3): 277 – 304.
- DUNPHY, G. B.; RUTHERFORD, T. A. & WEBSTER, J. M. 1985. Growth and virulence of *Steinernema glaseri* influenced by different sub-species of *Xenorhabdus nemathophilus*. **Journal of Nematology**, **17**: 476 – 482.
- EDWARDS, J. P. & ABRAHAM, L. 1985. Laboratory evaluation of two insect juvenile hormone analogues against *Alphitobius diaperinus*. **J. Stored Prod. Res.**, **21** (4): 189 – 194.

- EIDSON, C. S.; SCHMITTLE, S. C.; GOODE, R. B. & LAL, J. B. 1965. The role of darkling beetle, *Alphitobius diaperinus* in transmission of acute leucosis in chickens. **Poult. Sci.**, **44**: 1366 – 1367.
- EIDSON, C. S.; SCHMITTLE, S. C.; GOODE, R. B. & LAL, J. B. 1966. Induction of leucosis tumors with the beetle *Alphitobius diaperinus*. **Amer. J. Vet. Res.**, **27** (119): 1053 – 1057.
- ELOWNI, E.E. & ELBIHARI, S. 1979. Natural and experimental infection on the beetle, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) with *Choanotaenia infundibulum* and others chickens tapeworms. **Vet. Sci. Commun.**, (3) 171 – 173.
- FAN, X. & HOMINICK, W. M. 1991. Efficiency of the *Galleria* (Wax Moth) Baiting Technique for Recovering Infective Stages of Entomopathogenic Rhabditids (Steinernematidae e Heterorhabditidae) from Sand and Soil. **Revue Nématol.**, **14** (3): 381-387.
- FORSCHLER, B. T. & GARDNER, W. A. 1991. Concentration-mortality response of *Phyllophaga hirticula* (Knoch) (Coleóptera: Scarabeidae) to three entomogenous nematodes. **J. Econ. Entomol.**, **84**, 841-843.
- FRANCISCO, O. & PRADO, A. P. 2001. Characterization of the larval stages of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) using head capsule width. **Revista Brasileira de Biologia.**, **61**(1): 125 -131.
- FRIEDMAN, M. J. 1990. Commercial production and development. In: Entomopathogenic nematodes in biological control, R. Gaugler & H. K. Kaya (eds.). CRC, Boca Raton, Florida, p. 153-172.
- GAUGLER, R. 1981. Biological control potential of neoaplectanid nematodes. **J. Nematol.**, **13**: 241-249.
- GAUGLER, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil – inhabiting insects pests with entomopathogenic nematodes. **Agricultural Ecosystem Environment.**, **24** (1-3): 351-360.
- GAUGLER, R. & CAMPBELL, J. F. 1991. Behavioral response of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* and heterorhabditis bacteriophora to oxamyl. **Annals of Applied Biology**, **119**: 131-138.
- GAUGLER, R. & HAN, R. 2002. Production technology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**, CABI Publishing, New York, p. 289-310.

- GAUGLER, R. & KAYA, H. K. 1990. **Entomopathogenic nematodes in biological control**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 365 p.
- GEDEN, C. J.; AXTELL, R. C. & BROOKS, W. M. 1985. Susceptibility of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* to the entomogenous nematodes *Steinemema feltiae*, *S. glaseri* (Steinemematidae) and *Heterorhabditis he/iothidis* (Heterorhabditidae). **J. Ent. Sei.**, **20** (3): 331 - 339.
- GEORGIS, R. 1990. Formulation and application. In: **Entomopathogenic nematodes in biological control**, R. Gaugler and H. K. Kaya (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 173-191.
- GEORGIS, R. 1992. Presente and future prospects for entomopathogenic nematodes products. **Biocontrol Science and Technology**, **2**:83-99.
- GEORGIS, R. & GAUGLER, R. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. **Journal of Economic Entomology**, **84**(3): 713-720.
- GEORGIS, R. & HAGUE, N.G.M. 1981. A neoplectanid nematode in the larch sawfly *Cephalcia lariciphila* (Hymenoptera: Pamphiliidae). **Annals of Applied Biology**, **99**: 171-177.
- GLAZER, I. 1996. Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v. **6**: 373 –378.
- GLAZER, I. 2002. Survival biology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**, CABI Publishing, New York, 169-187.
- GLAZER, I. & LEWIS, E. E. 2000. Bioassays of Entomopathogenic Nematodes. In: Navon, A. & Ascher, K. R. S. **Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes**. Hardback, Bet Dagan, Israel. 336p.
- GREEN, M. 1980. *Alphitobius viator* Mulsant and Godard in stored products and its identification (Coleoptera: Tenebrionidae). **Stored Prod. Res.**, **16** (2): 67-70.
- GREWAL, P. S.; GAUGLER, R.; KAYA, H. K. & WUSATY, M. 1993. Infectivity of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scapterisci* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, **62**: 22-28.
- GREWAL, P. S.; LEWIS, E.E.; GAUGLER, R. & CAMPBELL, J. F. 1994. Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, **108**: 207-215.

- GREWAL, P.S., MATSUURA, M. & CONSERVE, V. 1997. Mechanisms of specificity of association between the nematode *Steinernema scapterisci* and its symbiotic bacterium. **Parasitology**, **114**: 483 - 488.
- HANN, R. E & EHLERS, R. U. 2000. Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. **75**: 55 –58.
- HARA, A. H. & KAYA, H. K. 1983. Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae* (Rhabditidae: Steinernematidae). **Environmental Entomology**, **12**: 496-501.
- HARDING JR., W. C. & BISSEL, T. L. 1958. Lesser mealworm in a broiler house. **J. Econ. Entomol.** 51: 112.
- HARRIS, J. E. & H. D. CROFTON. 1957. Structure and function in the nematodes: Internal pressure and cuticular structure in *Ascaris*. **Journal of Experimental Biology**, **34**: 116-130.
- HARRIS, F. 1966. Observations on the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). **J. Georgia Entomol. Soc.** **1**: 17 - 18.
- HATAB, M. A. ; GAUGLER, R. & EHLERS, R. 1998. Influence of the methods of culture on lipids *Steinernema Glaseri*. **The Journal of Parasitology**. v.**84**, n.2: 215-221.
- HOMINICK, W. M. 2002. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. CABI Publishing. Oxford, UK. P. 115-143.
- HULLEY, P.E. & PFLEIDERER, M. 1988. The coleoptera in poultry manure - potential predators of the house flies, *Musca domestica* Linnaeus (Diptera: Muscidae). **J. Entomol. Soc. Sth. Afr.**, **51** (1): 17 - 29.
- ICHINOSE, T.; SHIBAZAKI, S. & OHTA, R. 1980. Studies on the biology and mode of the infestation of the tenebrionidae beetles, *Alphitobius diaperinus* Panzer, harmful to broiler - chicken houses. **J. Jap. Appl. Entomol.**, **24**: 167 - 174.
- ISHIBASHI, N. & E. KONDO. 1986. *Steinernema feltiae* (DD136) and *S. glaseri*: Persistence in soil and bark compost and their influence on native nematodes. **Journal of Nematology** **18**: 310-316.
- JAROSZ, J. & SPIEWAK, N. 1979. Comparative levels of lysozyme activity in larvae and pupae of *Galleria mellonella* after particulate and soluble materials injection. **Cytobios**, **26**: 203-219.

- JAROSZ, J. 1998. Active resistance of entomophagous rhabditid *Heterorhabditis bacteriophora* to insect immunity. **Parasitology**, **117**: 201-208.
- KARUNAMOORTHY, G.; CHELLAPPA, D. J. & ANANDARI, R. 1994. The life history of *Subulura brumpti* in the beetle *Alphitobius diaperinus*. **Indian Veter. Jour.**, **71** (1): 12 - 15.
- KAYA, H. K. 1990. Soil Ecology. In.: GAUGLER, R. & KAYA, H.K. (eds), **Entomopathogenic nematodes in biological control**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 93-111.
- KAYA, H. K. & GAUGLER, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annu. Rev. Entomol**, **38**: 181-206.
- KLINGER, J. (1990). Effects of cold storage on survival and parasitic activity of *Heterorhabditis* sp. **Entomophaga**, **35**: 493-496.
- KONDO, E. 1989. Studies on the infectivity and propagation of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp. (Rhabditida: Steinernematidae), in common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of the Faculty of Agriculture, Saga University**, **67**: 1 – 88.
- KONDO, E. & ISHIBASHI, N. 1986. Nictating behavior and infectivity of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp., to the larvae of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), on the soil surface. **Applied Entomology and Zoology**, **21**: 553-560.
- KOPPENHÖFER, A. M. & KAYA, H. K. 1995. Density-dependent effects on *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) within an insect host. **Journal of Parasitology**, **80**: 797-799.
- KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K.; SHANMUGAM, S. & WOOD, G. L. 1995. Interspecific competition between steinernematid nematodes within an insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, **66**: 99 – 103.
- LANCASTER, J. L. & SIMCO, J. S. 1967. Biology of the lesser mealworm, a suspected reservoir of avian leucosis. **Arkansas Agr. Exp. Stn. Rep. Ser.** 159: 12 p.
- LEGNER, E. F. & OLTON, G. S. 1968. The biological method and integrated control of the house and stable flies in California. **Calif. Agric.**, **22**: 2 - 4.
- LEGNER, E. F.; BOWEN W. F.; ROONEY, W. F. & MCKEEN, W. D. 1975. Integrated fly control on poultry ranches. **Calif. Agric.**, **29** (5): 8 - 10.

- LESCHEN, R. A. B. & STEELMAN, C. D. (1988). Worldwide survey and comparison of adult predator and scavenger insect populations associated with domestic animal manure where livestock is artificially congregated. **Hilgardia**, **40** (9): 225 - 266.
- LÊ TORC'H, J. M. & LETENNEUR, R. 1983. Essais en laboratoire de resistance de differents isolants thermiques aux perforations du tenebrion, *Alphitobius diaperinus* panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). **C. R. Sci. Acad. Agric. France**, **6**: 188 - 200.
- LEWIS, D. J. 1958. Coleoptera of medical interest in the Sudan Republic. Proc. R. Entomol. Soc. London, Ser. A, **Gen. Entomol.**, **33**: 37 - 42.
- LEWIS, E. E.; GAUGLER, R. & HARRISON, R. 1992. Entomopathogenic nematode host finding: Response to host contact cues by cruise and ambush foragers. **Parasitology**, **105**: 109-115.
- LEWIS, E. E. 2002. Behavioural ecology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**, CABI Publishing, New York, p. 205-223.
- MARTIN JR., W. R. 1997. Using Entomopathogenic Nematodes to Control Insects During Stand Establishment. **Hort. Science**, **32** (2).
- MCALLISTER, J. C.; STEELMAN, C. D. & CARLTON, C. E. 1995. Histomorphology of the larval and adult digestive systems of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Kansas Entomol. Soc.**, **68** (2): 195 - 205.
- MCFARLANE, J. A. 1971. The carnivorous beetles of Ithunda caves, Kenya. **Stud. Speleol.**, **2**:149 - 158.
- MILLER, R. W. & REDFERN, R. E. 1988. Feed additives for control of the lesser mealworm (Col: Ten.) in poultry houses. **J. Econ. Entom.**, **81** (4): 1137 - 1139
- MOLYNEUX, A. S. 1986. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (= *Neoplectana*) spp: temperature and aspects of behaviour and infectivity. **Exp. Parasitol**, **62**: 169-180.
- MOYLE, P. & KAYA, H. K. 1981. Dispersal and infectivity of the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida: Steinernematidae), in sand. **Journal of Nematology**, **13**: 295-300.
- NELSON, W.A.; KEIRANS, J. E.; BELL, J.F. & CLIFFORD, C.M. 1975. Host-ectoparasite relationships. **Journal of Medical Entomology**, **12**, 143 -166.

- NEVES, D. P.; SILVA, M. L.; SOUZA, F. T. P. & CUNHA, H. C. 1987. Controle de *Musca domestica* (Diptera, Muscidae) em dejetos de galinhas poedeiras, por larvas de *Alphitobius piceus* (Coleoptera, Tenebrionidae). **Arq. Bras. Med. Veter. Zoot.**, **39** (4): 547 - 551.
- NGUYEN, K. B. & SMART JR., G. C. 1990. *Heterorhabditis* spp: Nematode Parasites of Insects. **Nematology Circular**, 173. Fla. Dept. Agric. & Consumer Serv., Division of Plant Industry.
- NICHOLAS, W.L. 1984. **The biology of free-living nematodes**. Clarendon Press, Oxford, 251 p.
- OLAFSEN, J. A. 1996. Lectins: models of natural and induced molecules in invertebrates. In **Advances in Comparative and Environmental Physiology**, Vol. **24**: Invertebrate Immune Responses (ed. Cooper, E. L.) p.49-77. Springer-Verlag, Berlin.
- O'LEARY, A.; STACK, C. M.; CHUBB, M. A. & BURNELL, A. M. 1998. The effect of day of emergence from the insect cadaver on the behavior and environmental tolerances of infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* (Strain UK211). **J. Parasitology**; **84**(4): 665-672.
- PFEIFFER, D. G. & AXTELL, R. C. 1980. Coleoptera of poultry manure in caged layer houses in North Carolina. **Environ. Entomol.**, **9**: 21-28.
- POINAR, G. O., JR. 1975. Entomogenous Nematodes. **A manual and host list of insect Nematode Associations**. E. J. Brill, Leiden, 317 p.
- POINAR, G. O., JR. 1974. Insect immunity to parasitic nematodes. In: **Contemporary Topics in Immunology**, Vol. **4**, (ed. Cooper, E. L.) p. 167-178. Plenum Press, New York.
- POINAR, G.O., JR. 1979. **Nematodes for Biological Control of Insects**. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 277 p.
- POINAR, G. O., JR. 1989. Non-insect host for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoaplectana* (Steinenematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). **Revue. Nématol.**, **12**(4): 423-428.
- POINAR, G. O., JR. 1990. Taxonomy and biology os Steinernematidae and Heterorhabditidae. In.: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (eds), **Entomopathogenic nematodes in biological control**. CRC Press, Boca Raton, Flórida, p. 23-61.
- POINAR, G. O., JR. 1993. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Fundamental and Applied nematology**, **16**: 333-338.

- PROPP, G. D. & MORGAN, P. B. 1985. Mortality of eggs and first-stage of the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) in poultry manure. **J Kansas Entomol. Soc.**, **58** (3): 442 - 447.
- RAHAMAN, P. F.; SHARMA, S. B. & WIGHTMAN, J. A. 2000. A review of insect-parasitic nematodes research in India: 1927-1997. **International Journal of Pest Management**, **46**(1): 19-28.
- RATCLIFFE, N. A. 1982. Cellular defence reactions of insects. In: Immune Reaction to Parasites (ed. Frank, W.). **Fischer Verlag, Stuttgart**. p.233 - 244.
- REYNS, P. S., MACDOUGALD, L. R. & MATHIS, G. F. 1983. Survival of coccidia in poultry litter and reservoirs of infections. **Avian dis.**, **27**: 464 - 473.
- RIBEIRO, J. C. 1994. Estudo do Relacionamento entre *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e o parasitóide *Apanteles galleriae* (Hymenoptera: Braconidae). **Dissertação de Mestrado, UNESP, Rio Claro**. 149p.
- SAFRIT, R. D. & AXTELL, R. C. 1984. Evaluations of sampling methods for darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) in the litter of turkey and broiler houses. **Poult. Sci.**, **63** (12): 2368 - 2375.
- SALT, G. 1970. **The Cellular Defence Reactions of Insects**. Cambridge University, PRESS, Cambridge.
- SAXENA, S. C. & SARIN, K. 1974. Chitinase in the alimentary tract of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Appl. Entomol. & Zool.** **7**: 94.
- SCHROEDER, W. J. & BEAVERS, J. B. 1987. Movement of the entomogenous nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae in soil. **Journal of Nematology**, **19**: 257-259.
- SELVAN, S.; CAMPBELL, J. F. & GAUGLER, R. 1993. Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, **62**: 278-284.
- SMART JR., G. O. 1995. Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of Insects. **Jour. Nematol.**, **27** (4 Su): 529-534.
- SMITS, P. H. 1996. Post - application persistence of entomopathogenic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v.6: 379 – 387.
- SPILMAN, T. J. (1968). (In minutes of meeting: the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*). **Proc. Entomol. Soc. Washington**, **70**: 294 -295.

- STEELMAN, D. 1996. Beetles threaten profit by damaging house insulation, carrying diseases and reducing growth, fees efficiency. **Poultry Digest.**; p.22-23.
- STEINKRAUS, D. C.; GEDEN, C. J. & RUTZ, D. A. 1991. Susceptibility of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) to *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae): effects of host stage, substrate, formulation and host passage. **J. Med. Entomol.**, **28** (3): 314 - 321.
- STUART, R. J., LEWIS, E. & GAUGLER, R. 1996. Selection alters the pattern of emergence from the host cadaver in the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*. **Parasitology**, **113**: 183-198.
- TURNER JR., E. C. 1986. Structural and litter pests. **Poult. Sci.**, **65**: 644 - 648.
- VAUGHAN, J. A. & TURNER JR, E. C. 1984. Residual and topical toxicity of various insecticides to the lesser mealworm (Col. Teneb). **J. Econ. Entomol.**, **77** (1): 216 - 220.
- VAUGHAN, J. A., TURNER JR, E. C. & RUSZLER, P. L. 1984. Infestation and damage of poultry house insulation by the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*. **Poult. Sci.**, **63** (6): 1094 – 1100.
- WILSON, T. A. & MINER, F. D. 1969. Influence of temperature on development of the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Kansas Entomol. Soc.**, **42** (3): 294 303.
- WOODRING, J. L. & KAYA, H. K. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A handbook of techniques. **Arkansas Agricultural Experiment Station Southern Cooperative Bulletin**. 331, 30p.

APÊNDICE - A

Tabela 1 - Patógenos transmitidos e carreados por *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) e suas respectivas doenças provocadas sobre as aves.

Agente Etiológico	Doença
<i>Escherichia coli</i>	Aerosaculite, salpingite e colisepticemia
<i>Salmonella</i> sp	Pulorosa, tifo e paratifo
<i>Mycoplasma paragallinarum</i>	DCR, aerosaculite, sinovite infecciosa
<i>Haemophilus paragallinarum</i>	Coriza infecciosa
<i>Clostridium</i> sp	Botulismo, enterites
Birnavírus	Doença de Gumboro
Paramixovírus	Doença de Newcastle
Herpesvírus	Doença de Marek
Coronavírus	Bronquite infecciosa
Adenovírus	EDS (síndrome da queda de postura)
<i>Aspergillus</i> sp	Aspergilose
<i>Candida</i> sp	Candidíase
<i>Eimeria</i> sp	Coccidiose
Ascaridia, Heterakis, Daivainea, Raillietina	Helmintoses

Fonte: Adaptado de Berchieri & Macari (2000).