

AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS NA PRESERVAÇÃO DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE) EM DIFERENTES TEMPERATURAS

V. Andaló¹, R.S. Cavalcanti¹, J.P. Molina Acevedo², A. Moino Junior¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Entomologia, CP 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil.
E-mail: vanessaandalo@prpg.ufla.br

RESUMO

Foi avaliado o uso de diferentes substâncias com potencial conservante no armazenamento dos nematóides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4. Os nematóides foram mantidos em água destilada (testemunha), sendo os demais tratamentos compostos por água adicionada de: Tween 80[®] (0,1%), etileno glicol (0,1%), glicerina (1%), glicose (1%), CaCO₃ (0,1%), Triton[®] (0,1%), KMnO₄ (0,01%) e NaOCl (0,1%), ambos armazenados em diferentes temperaturas. As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, por meio de contagens dos juvenis infectantes (JI), sendo determinadas a sua viabilidade e infectividade. Constatou-se que a glicerina agiu como substância conservante na temperatura de 28° C para os dois nematóides testados e também a 16° C para o nematóide *S. carpocapsae* A11. As demais substâncias usadas, mesmo quando mantiveram os nematóides vivos, não preservaram a infectividade.

PALAVRAS-CHAVE: *Heterorhabditis*, *Steinernema*, controle biológico, persistência, sobrevivência.

ABSTRACT

EVALUATION OF POTENTIAL PRESERVING SUBSTANCES FOR THE STORAGE OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE, HETERORHABDITIDAE). The use of different substances for the storage of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* A11 and *Heterorhabditis* sp. JPM4 was evaluated. The nematodes were kept in distilled water (control) and the other treatments were made with water with the addition of: Tween 80[®] (0.1%), ethylene glycol (0.1%), glycerin (1%), glucose (1%), CaCO₃ (0.1%), Triton[®] (0.1%), KMnO₄ (0.01%) and NaOCl (0.1%). The evaluations were made at 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days, counting the number of infective juveniles (IJ) and determining their survival and infectivity. It was found that glycerin acted as a preserving substance at the temperature of 28° C for both nematodes and also in 16° C for *S. carpocapsae* A11. The other substances tested, even when they kept the nematodes alive, did not show this effect in relation to infectivity.

KEY WORDS: *Heterorhabditis*, *Steinernema*, biological control, persistence, survival.

INTRODUÇÃO

Diversas espécies de nematóides entomopatogênicos (NEPs) são estudadas para uso em programas de controle biológico de pragas. No entanto, sua sobrevivência tem sido muito discutida, uma vez que em condições de laboratório tem ocorrido alta mortalidade em função do tempo de armazenamento (GLAZER, 2002; HATAB; GAUGLER, 1999).

As estratégias usadas pelos NEPs para sobreviver em condições adversas (dessecação, congelamento, radiação ultravioleta, doenças e predação) são pouco

conhecidas, podendo estar relacionadas com o processo de quiescência, migração ou permanência no cadáver dos insetos por períodos extensos, porém existem diferenças entre as condições ideais para cada espécie (WESTERMAN, 1999). Assim, o estudo dos parâmetros que influenciam a sobrevivência dos NEPs é um aspecto importante para sua liberação no campo, a fim de manter a qualidade do inóculo (BROWN; GAUGLER, 1997).

A glicerina é comumente usada como um crioprotetor e remove osmoticamente a água do corpo do nematóide. A cutícula não é permeável o suficiente para permitir que a glicerina entre no corpo, reduzindo

²Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, LPP, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

os danos na membrana das células. Assim, a glicerina tem sido usada na técnica de criopreservação, na qual os nematóides são submetidos à temperatura de -130°C , em nitrogênio líquido, com a finalidade de minimizar a formação de cristais intracelulares e intercelulares (GLAZER, 2002; KAYA; STOCK, 1997; LEWIS; SHAPIRO-ILAN, 2002). Além disso, é usada como antidessecante a fim de retardar a evaporação da suspensão com nematóides aplicada na folhagem, para controle de insetos-praga reduzindo a dessecação (BROADBENT; OLTHOF, 1995).

O uso de substâncias conservantes pode auxiliar na manutenção da viabilidade desses nematóides, prolongando a sua sobrevivência. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar o uso de diferentes substâncias com potencial conservante para duas espécies de NEPs durante o período de armazenamento em diferentes temperaturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Multiplificação e manutenção dos nematóides entomopatogênicos

Os nematóides *Steinernemacarpocapsae* A11 (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982 (isolado na Carolina do Norte, EUA) e *Heterorhabditis* sp. JPM4 (isolado em Lavras, MG, Brasil) foram cultivados no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. Estes foram mantidos em frascos Erlenmeyer em câmara climática do tipo BOD, a $16 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em suspensão aquosa de 500 a 1.000 JI/mL.

Os nematóides foram multiplicados em lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), criadas no Laboratório de Patologia de Insetos de acordo com metodologia descrita por DUTKY et al. (1964), utilizando dieta artificial modificada por PARRA (1998).

Após a obtenção das lagartas mortas pelos nematóides, estas foram mantidas em câmara seca (MOLINA; LÓPEZ, 2001) por 5 dias e, posteriormente, foram transferidas para armadilhas modificadas de White (WHITE, 1927) para serem coletados os JIs dos nematóides. A quantificação da suspensão de nematóides foi realizada em placas plásticas para testes serológicos ("ELISA") em microscópio estereoscópico.

Viabilidade e patogenicidade de nematóides entomopatogênicos após armazenamento com substâncias com potencial conservante

Os nematóides *S. carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 foram mantidos em diferentes substâncias visando melhor conservação em armazenamento. Utilizaram-se os produtos Triton X-100® (0,1%),

glicerina (1%), KMnO_4 (0,01%), Tween 80® (0,1%), etileno glicol (0,1%), glicose (1%), CaCO_3 (0,1%) e NaOCl (0,1%), os quais foram adicionados às suspensões desses nematóides. No tratamento testemunha foi adicionada apenas água destilada.

As suspensões dos nematóides foram incubadas por 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias em água parada nas temperaturas de 8, 16 e 28°C , com 24 h de escotofase, concentração de 3.000 JIs/mL e 5 repetições por tratamento. Cada parcela foi acondicionada em copo plástico de 110 mL com tampa para cada repetição, com 40 mL de suspensão para cada copo. As tampas foram perfuradas, deixando um orifício de, aproximadamente, 2 cm de diâmetro para possibilitar aeração.

Para avaliação, uma alíquota de 0,1 mL da suspensão de cada repetição foi colocada em placa plástica para testes serológicos ("ELISA") e a contagem foi realizada com auxílio de um microscópio estereoscópico. Antes da retirada das alíquotas das suspensões para as avaliações, estas foram agitadas a fim de homogeneizá-las. A porcentagem de viabilidade foi obtida contando-se o número de nematóides vivos e mortos.

No teste de patogenicidade, cinco lagartas de *G. mellonella* foram colocadas em uma placa de Petri (5 cm) com papel filtro no fundo. Uma alíquota de 0,2 mL de cada suspensão foi retirada e aplicada por placa (uma placa por repetição, em um total de 5 repetições). Estas placas foram colocadas em BOD, com temperatura controlada de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e, após 3 dias, foi avaliada a porcentagem de mortalidade das lagartas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao Teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) para comparação entre as médias para as substâncias conservantes e à análise de regressão para avaliação do efeito do tempo de armazenamento.

RESULTADOS

Viabilidade de juvenis infectantes

Ocorreu redução na sobrevivência dos JIs ao longo do tempo para os dois nematóides testados, a 8°C , 16°C e 28°C , em todos os tratamentos, porém a 28°C o efeito da ação das substâncias utilizadas foi maior quando comparado com o tratamento testemunha (Figs. 1 e 2).

Para *S. carpocapsae* A11 ocorreu redução acentuada na sobrevivência a partir dos 60 dias de armazenamento na temperatura de 28°C . Todavia, no tratamento com glicerina, a sobrevivência dos JIs foi diminuindo gradativamente ao longo do tempo. O mesmo ocorreu na temperatura de 16°C , de forma menos acentuada. Para a temperatura de 8°C , o uso de substâncias para prolongar a sobrevivência dos JI não foi eficaz, com curvas de regressão similares e sobrevivência da testemunha maior do que a dos demais tratamentos (Fig. 1).

Tabela 1 - Efeito de substâncias com potencial conservante na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Steinernema carpocapsae* A11 mantidos em suspensão aquosa, em três temperaturas, ao longo do tempo.

| Tempo (dias) | Temperatura (°C) | Testemunha* | Triton® | Glicerina | CaCO ₃ | NaOCl | Etileno glicol | Glicose | Tween® |
|--------------|------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|--------------|----------------|--------------|---------------|
| 30 | 8 | 88,2 ± 1,4 a | 92,5 ± 1,6 a | 89,3 ± 1,5 a | 88,8 ± 1,2 a | 92,0 ± 1,0 a | 90,9 ± 0,5 a | 88,1 ± 2,3 a | 81,1 ± 1,6 a |
| | 16 | 94,6 ± 3,9 a | 96,8 ± 1,6 a | 81,8 ± 1,6 b | 91,2 ± 1,2 a | 95,1 ± 0,8 a | 90,0 ± 0,7 a | 90,8 ± 1,8 a | 85,2 ± 2,6 b |
| | 28 | 94,6 ± 1,4 a | 88,9 ± 2,4 b | 86,8 ± 1,5 b | 86,0 ± 1,5 b | 94,8 ± 2,8 a | 87,6 ± 1,1 b | 76,8 ± 3,4 c | 84,3 ± 3,0 b |
| 60 | 8 | 87,9 ± 1,1 a | 92,2 ± 1,3 a | 86,7 ± 2,1 a | 85,2 ± 1,2 a | 83,7 ± 0,9 a | 85,9 ± 1,6 a | 86,7 ± 2,1 a | 80,0 ± 1,8 a |
| | 16 | 91,4 ± 1,6 a | 91,4 ± 1,3 a | 85,2 ± 2,2 a | 88,6 ± 1,2 a | 86,2 ± 2,8 a | 85,8 ± 2,3 a | 81,2 ± 1,7 a | 83,8 ± 1,6 a |
| | 28 | 78,3 ± 1,9 a | 82,0 ± 2,1 a | 61,4 ± 1,5 c | 61,4 ± 1,5 c | 64,1 ± 4,9 c | 84,4 ± 4,8 a | 48,0 ± 5,6 d | 69,3 ± 4,1 b, |
| 90 | 8 | 88,2 ± 1,1 a | 91,0 ± 0,7 a | 85,0 ± 2,2 a | 84,3 ± 1,6 a | 83,4 ± 1,4 a | 85,7 ± 1,7 a | 86,0 ± 1,3 a | 80,1 ± 1,5 a |
| | 16 | 90,4 ± 1,1 a | 89,7 ± 1,6 a | 84,6 ± 3,0 b | 80,9 ± 2,2 b | 84,6 ± 1,4 b | 80,7 ± 2,3 b | 81,2 ± 1,4 b | 82,2 ± 2,9 b |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 c | 0,0 ± 0,0 c | 79,8 ± 1,2 a | 0,0 ± 0,0 c | 0,0 ± 0,0 c | 12,6 ± 3,7 b | 0,0 ± 0,0 c | 0,0 ± 0,0 c |
| 120 | 8 | 77,5 ± 1,3 a | 79,8 ± 2,0 a | 72,5 ± 6,1 b | 77,8 ± 2,9 a | 79,0 ± 8,5 c | 54,4 ± 6,0 c | 84,4 ± 1,5 a | 72,4 ± 2,0 b |
| | 16 | 76,3 ± 2,4 a | 81,5 ± 2,1 a | 83,3 ± 1,9 a | 57,1 ± 2,2 b | 45,5 ± 5,6 c | 75,7 ± 1,9 a | 23,0 ± 2,2 d | 50,6 ± 3,5 c |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 58,9 ± 5,3 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b |
| 150 | 8 | 74,1 ± 2,9 a | 67,9 ± 1,2 a | 66,7 ± 2,7 a | 34,0 ± 3,1 c | 53,2 ± 0,5 b | 49,3 ± 1,8 b | 65,6 ± 3,9 a | 65,4 ± 1,6 a |
| | 16 | 55,0 ± 4,7 c | 59,6 ± 4,8 b | 67,8 ± 0,9 a | 26,5 ± 3,4 d | 2,22 ± 2,2 e | 49,6 ± 5,3 c | 9,0 ± 5,6 e | 49,2 ± 3,7 c |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 55,8 ± 1,3 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b |
| 180 | 8 | 57,1 ± 1,7 a | 36,5 ± 1,8 b | 55,3 ± 1,5 a | 15,9 ± 2,3 e | 27,1 ± 4,5 c | 22,6 ± 3,3 d | 15,5 ± 1,9 e | 23,1 ± 3,0 d |
| | 16 | 29,5 ± 3,7 b | 17,0 ± 2,6 c | 53,7 ± 1,0 a | 10,8 ± 1,7 c | 2,0 ± 2,0 d | 35,3 ± 5,0 b | 8,2 ± 2,0 d | 15,9 ± 1,4 c |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 24,7 ± 2,3 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b |

*Médias seguidas por letras distintas nas linhas, dentro de cada tempo, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05). M ± EP (M)

Quando se utilizou 8° C, houve diferença significativa entre os tratamentos a partir de 120 dias. No entanto, aos 180 dias, apenas a testemunha e o tratamento glicerina proporcionaram sobrevivência maior, sem diferença entre si, evidenciando que não houve melhoria na condição de armazenamento nessa temperatura (Tabela 1). A 16° C houve diferença entre os tratamentos desde o princípio das avaliações, e aos 180 dias o tratamento glicerina diferiu dos demais, mantendo maior a sobrevivência dos JIs.

Aos 28° C os tratamentos não apresentaram nematóides vivos a partir dos 90 dias, exceto os tratamentos glicerina e etileno glicol; aos 120 dias apenas o tratamento com glicerina apresentava JIs vivos, o que foi observado até a última avaliação. Apesar da porcentagem de sobrevivência final ter sido baixa aos 28° C, essa diferiu dos demais tratamentos mostrando que a adição de glicerina prolongou o período de sobrevivência desses nematóides para essa temperatura e também na temperatura de 16° C (Tabela 1).

Para *Heterorhabditis* sp. JPM4 houve redução acentuada na sobrevivência aos 60 dias a 8° C para todos os tratamentos. O tratamento em que se empregou NaOCl causou mortalidade dos JI, sendo que aos 60 dias não havia nematóides vivos nas três temperaturas testadas. Quando a 16° C, as curvas de regressão

apresentaram as mesmas características, exceto para NaOCl, com redução acentuada da sobrevivência. A 28° C o tratamento com glicerina teve a sobrevivência reduzida mais lentamente que para os demais tratamentos, pois enquanto aos 120 dias os demais tratamentos quase não tinham mais JI vivos, o tratamento com glicerina ainda apresentava mais de 50% de sobrevivência (Fig. 2).

Quando a 8° C, houve diferença entre os tratamentos somente na avaliação com 30 dias. No entanto, a testemunha, Tween® e Triton® foram os que proporcionaram maior sobrevivência, não havendo diferença entre eles, sem melhoria na condição de armazenamento nessa temperatura. A partir de 60 dias, nessa temperatura, não foram encontrados nematóides vivos (Tabela 2).

A 16° C houve diferença entre os tratamentos em todas as avaliações. Contudo, não houve diferença entre a testemunha e os demais tratamentos aos 180 dias, exceto pelos tratamentos com NaOCl e glicose, que apresentaram porcentagem de sobrevivência menor. Aos 28° C os tratamentos glicerina, seguidos por etileno glicol e Tween®, mantiveram índices maiores de sobrevivência, diferindo da testemunha e dos demais tratamentos aos 90 dias de armazenamento (Tabela 2).

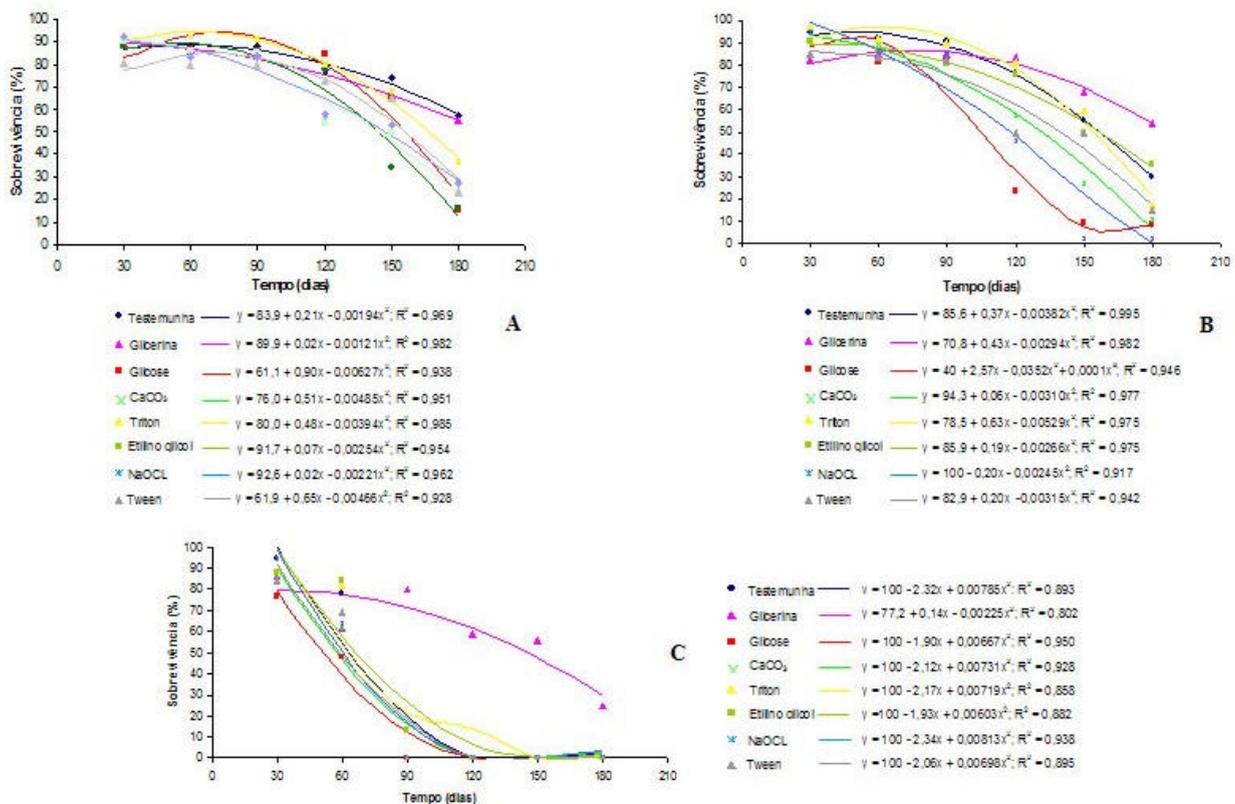


Fig. 1 - Efeito do tempo na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Steinernema carpocapsae* A11 mantidos em suspensão aquosa com substâncias conservantes, em três temperaturas. A: 8° C, B: 16° C e C: 28° C.

Com 120 e 150 dias, apenas o tratamento glicerina manteve os nematóides vivos, e aos 180 dias estes não foram mais encontrados. Apesar dos JIs terem morrido ao final dos 180 dias, observou-se que a sobrevivência foi prolongada quando usada glicerina na temperatura de 28° C para *Heterorhabditis* sp. JPM4 (Tabela 2).

Infectividade de juvenis infectantes

Houve redução na infectividade dos JIs ao longo do tempo para os dois nematóides nas temperaturas testadas em todos os tratamentos. Porém, quando a 28° C, o uso de algumas substâncias manteve maior o índice de infectividade do que quando comparado ao tratamento apenas com água. O mesmo não foi observado para as demais temperaturas (8 e 16° C), nas quais não foi observado efeito das substâncias testadas como agentes conservantes na infectividade (Figs. 3 e 4).

Para *S. carpocapsae* A11 ocorreu uma redução acentuada na infectividade a partir dos 60 dias de armazenamento na temperatura de 28° C, com o tratamento glicerina mantendo a infectividade maior do que para os demais tratamentos e a testemunha

até o período de armazenamento de 120 dias (Fig. 3C). Esse resultado corresponde ao que foi obtido na curva de regressão do estudo de viabilidade (Fig. 1C), mostrando que a glicerina manteve esses nematóides viáveis e infectantes por um período maior de tempo. O mesmo resultado foi obtido para a temperatura de 16° C.

Quando em 8° C, o uso de substâncias para prolongar a infectividade dos JIs não foi eficaz, com curvas similares de regressão entre os tratamentos e a testemunha (Fig. 3A). As curvas de sobrevivência e infectividade foram correspondentes para 16° C e 28° C, mostrando que os JIs mantidos vivos estavam também infectantes, pois pode ocorrer de JIs estarem vivos porém não infectivos, o que não ocorreu nessa situação. Já a 8° C, a sobrevivência manteve-se por um período longo (57,1% para a testemunha aos 180 dias), porém a manutenção da infectividade não foi notada (Figs. 1 e 3).

A 8° C houve diferença significativa entre os tratamentos. Todavia, aos 180 dias nenhum tratamento sobressaiu-se à testemunha, mostrando que não houve melhoria na condição de armazenamento nessa temperatura (Tabelas 1 e 3).

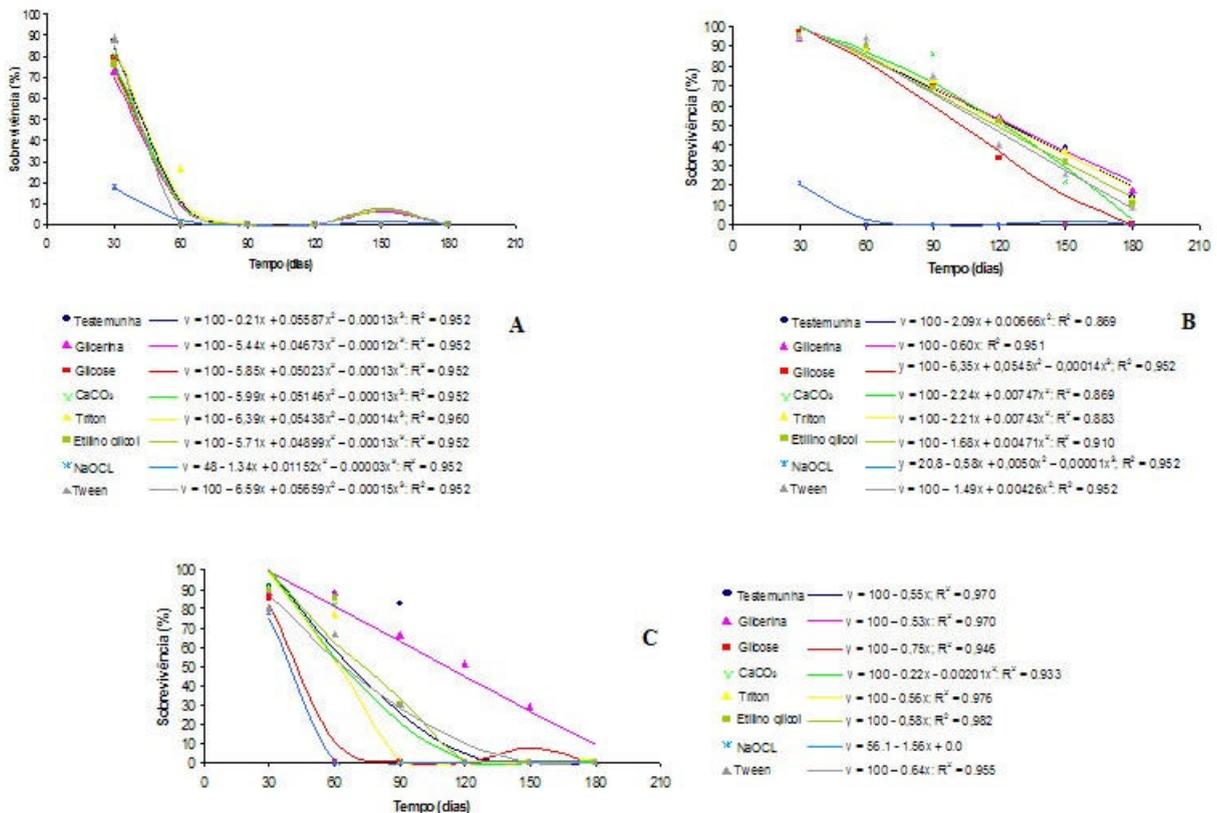


Fig. 2 - Efeito do tempo na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 mantidos em suspensão aquosa com substâncias conservantes, em três temperaturas. A: 8° C, B: 16° C e C: 28° C.

Tabela 2 - Efeito de substâncias com potencial conservante na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 mantidos em suspensão aquosa, em três temperaturas, ao longo do tempo.

| Tempo (dias) | Temperatura (°C) | Testemunha* | Triton® | Glicerina | CaCO ₃ | NaOCl | Etileno glicol | Glicose | Tween® |
|--------------|------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|
| 30 | 8 | 87,4 ± 2,1 a | 88,3 ± 1,9 a | 73,1 ± 4,7 c | 80,5 ± 3,6 b | 18,0 ± 1,0 d | 76,6 ± 2,9 b | 78,6 ± 3,3 b | 88,5 ± 1,5 a |
| | 16 | 94,3 ± 0,7 a | 95,5 ± 1,2 a | 93,8 ± 2,3 a | 94,6 ± 0,9 a | 21,0 ± 1,9 b | 95,4 ± 1,7 a | 96,8 ± 1,3 a | 95,1 ± 1,4 a |
| | 28 | 91,3 ± 1,3 a | 90,3 ± 0,5 a | 88,8 ± 2,0 a | 91,7 ± 0,9 a | 7,8 ± 2,3 c | 89,1 ± 0,7 a | 85,3 ± 3,6 b | 80,5 ± 3,2 b |
| 60 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 90,3 ± 1,1 a | 89,6 ± 1,5 a | 90,6 ± 1,4 a | 90,3 ± 0,7 a | 0,0 ± 0,0 b | 90,0 ± 2,2 a | 89,4 ± 1,8 a | 94,7 ± 1,5 a |
| | 28 | 87,6 ± 1,8 a | 77,1 ± 3,2 b | 88,3 ± 2,1 a | 81,7 ± 2,7 b | 0,0 ± 0,0 d | 85,3 ± 0,7 a | 0,0 ± 0,0 d | 66,1 ± 3,5 c |
| 90 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 73,6 ± 2,1 b | 73,5 ± 3,3 b | 75,6 ± 3,5 b | 86,2 ± 0,8 a | 0,0 ± 0,0 c | 68,9 ± 3,5 b | 69,8 ± 1,5 b | 75,0 ± 3,5 b |
| | 28 | 8,2 ± 3,9 c | 0,0 ± 0,0 d | 66,1 ± 5,7 a | 0,0 ± 0,0 d | 0,0 ± 0,0 d | 30,6 ± 3,9 b | 0,0 ± 0,0 d | 30,4 ± 5,9 b |
| 120 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 53,0 ± 0,9 a | 53,6 ± 4,2 a | 54,5 ± 5,3 a | 40,5 ± 6,5 b | 0,0 ± 0,0 c | 52,2 ± 4,1 a | 33,4 ± 2,7 b | 40,4 ± 5,5 b |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 51,1 ± 1,9 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b |
| 150 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 38,5 ± 2,9 a | 37,1 ± 3,3 a | 37,7 ± 4,5 a | 21,4 ± 2,3 b | 0,0 ± 0,0 c | 31,3 ± 3,6 a | 0,0 ± 0,0 c | 25,5 ± 2,9 b |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 29,5 ± 3,6 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b |
| 180 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 13,5 ± 1,9 a | 13,1 ± 0,9 a | 17,3 ± 2,1 a | 8,9 ± 1,3 a | 0,0 ± 0,0 b | 10,7 ± 2,1 a | 0,0 ± 0,0 b | 8,4 ± 1,5 a |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |

*Médias seguidas por letras distintas nas linhas, dentro de cada tempo, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).
M ± EP (M)

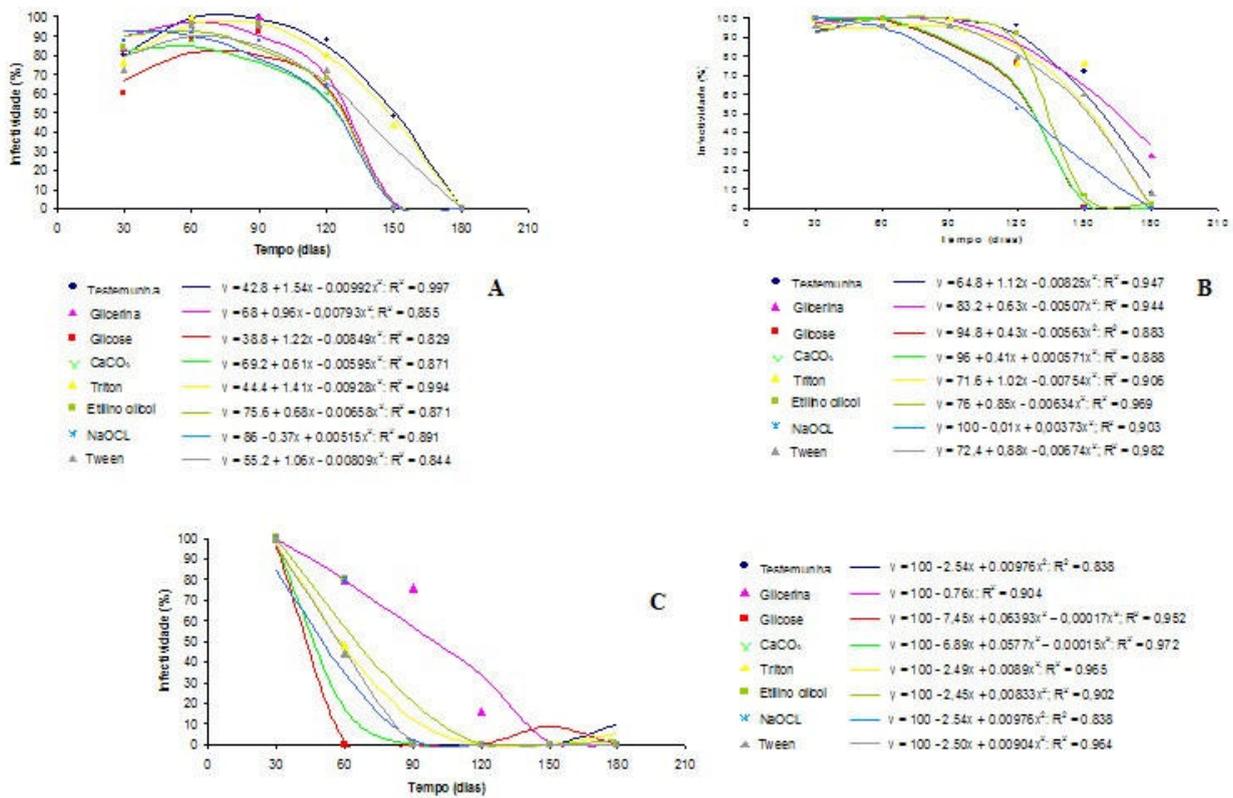


Fig. 3 - Efeito do tempo na infectividade (%) de juvenis infectantes de *Steinernema carpocapsae* A11 sobre lagartas de *Galleria mellonella* mantidos em suspensão aquosa com substâncias conservantes, em três temperaturas. A: 8°C, B: 16°C e C: 28°C.

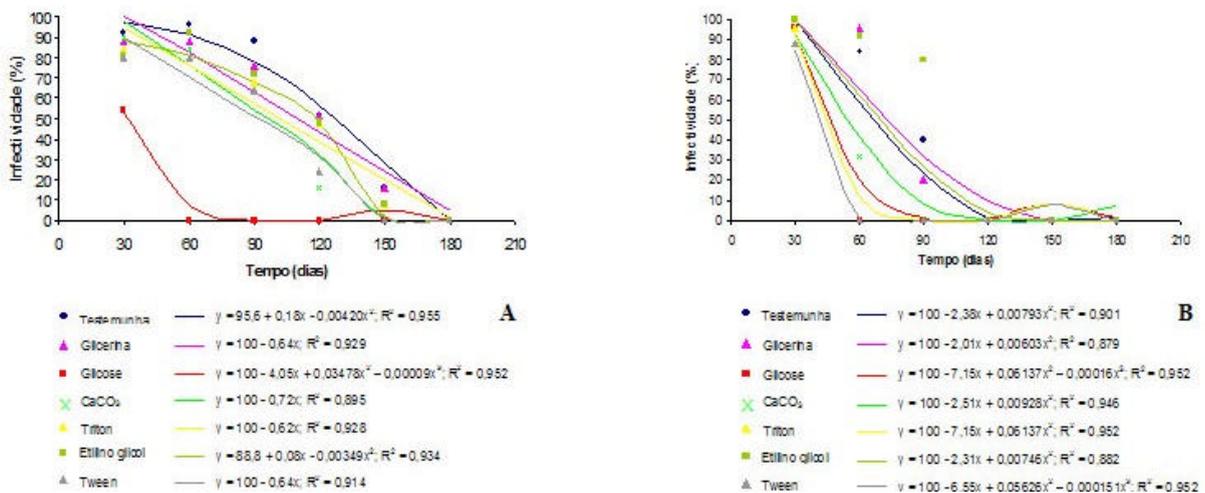


Fig. 4 - Efeito do tempo na infectividade (%) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 sobre lagartas de *Galleria mellonella* mantidos em suspensão aquosa com substâncias conservantes, em duas temperaturas. A: 16°C e B: 28°C.

Quando em 16°C, houve diferença entre os tratamentos a partir de 120 dias, e aos 180 dias os tratamentos glicerina e etileno glicol diferiram dos demais, mantendo maior a infectividade dos JIs. A partir dos 90 dias, na temperatura de 28°C, os tratamentos não apresentaram nematóides infectantes, exceto o tratamento glicerina, e aos 150 dias não foi encontrado nematóide infectante em nenhum tratamento. Apesar da porcentagem de infectividade ter sido baixa aos 28°C no tratamento

com glicerina, essa diferiu dos demais, mostrando que a adição de glicerina prolongou o período de infectividade desses nematóides para essa temperatura, sendo esses dados correspondentes aos de sobrevivência (Tabelas 1 e 3). Assim, a adição de glicerina mostrou efeito de preservar a sobrevivência e a infectividade dos JIs a 28°C, considerada uma temperatura alta para NEPs, diferindo dos demais tratamentos, onde os JIs não se mantiveram infectivos aos 90 dias.

Tabela 3 - Efeito de substâncias com potencial conservante na infectividade (%) de juvenis infectantes de *Steinernema carpocapsae* A11 sobre lagartas de *Galleria mellonella* mantidos em suspensão aquosa, em três temperaturas, ao longo do tempo.

| Tempo (dias) | Temperatura (°C) | Testemunha* | Triton® | Glicerina | CaCO ₃ | NaOCl | Etileno glicol | Glicose | Tween® |
|--------------|------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| 30 | 8 | 80,0 ± 6,3 a | 76,0 ± 4,0 a | 84,0 ± 4,0 a | 76,0 ± 4,0 a | 88,0 ± 4,9 a | 84,0 ± 4,0 a | 60,0 ± 6,3 b | 72,0 ± 4,9 b |
| | 16 | 100,0 ± 0,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 96,0 ± 4,0 a |
| | 28 | 100,0 ± 0,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 100,0 ± 0,0 a |
| 60 | 8 | 100,0 ± 0,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 96,0 ± 0,0 a | 88,0 ± 4,9 a | 92,0 ± 4,9 a | 100,0 ± 0,0 a | 88,0 ± 4,9 a | 96,0 ± 4,0 a |
| | 16 | 100,0 ± 0,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 96,0 ± 4,0 a |
| | 28 | 8,0 ± 4,9 c | 48,0 ± 4,9 b | 79,6 ± 3,3 a | 8,0 ± 4,9 c | 8,0 ± 4,9 c | 80,0 ± 6,3 a | 0,0 ± 0,0 d | 44,0 ± 7,4 b |
| 90 | 8 | 100,0 ± 0,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 88,0 ± 8,0 a | 88,0 ± 8,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 92,0 ± 4,9 a | 96,0 ± 4,0 a |
| | 16 | 100,0 ± 0,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 96,0 ± 4,0 a |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 76,0 ± 7,4 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b |
| 120 | 8 | 88,0 ± 8,0 a | 80,0 ± 6,4 a | 80,0 ± 6,4 a | 60,0 ± 6,4 b | 64,0 ± 7,5 b | 68,0 ± 4,9 b | 68,0 ± 4,9 b | 72,0 ± 4,9 b |
| | 16 | 96,0 ± 4,0 a | 76,0 ± 7,4 b | 80,0 ± 8,9 b | 76,0 ± 4,0 b | 52,0 ± 4,9 c | 92,0 ± 4,9 a | 76,0 ± 7,5 b | 80,0 ± 4,9 b |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 16,0 ± 7,5 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b |
| 150 | 8 | 48,0 ± 8,0 a | 44,0 ± 7,5 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b |
| | 16 | 72,0 ± 4,9 a | 76,0 ± 7,5 a | 76,0 ± 7,5 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 68,0 ± 4,9 a | 0,0 ± 0,0 b | 60,0 ± 6,3 a |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| 180 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 8,0 ± 4,9 b | 0,0 ± 0,0 b | 28,0 ± 4,9 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 20,0 ± 6,3 a | 0,0 ± 0,0 b | 8,0 ± 4,9 b |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |

*Médias seguidas por letras distintas nas linhas, dentro de cada tempo, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05).
M ± EP (M)

Tabela 4 - Efeito de substâncias com potencial conservante na infectividade (%) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 sobre lagartas de *Galleria mellonella* mantidos em suspensão aquosa, em três temperaturas, ao longo do tempo.

| Tempo (dias) | Temperatura (°C) | Testemunha* | Triton® | Glicerina | CaCO ₃ | NaOCl | Etileno glicol | Glicose | Tween® |
|--------------|------------------|---------------|--------------|--------------|-------------------|-------------|----------------|--------------|--------------|
| 30 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 92,0 ± 4,9 a | 84,0 ± 4,0 a | 88,0 ± 8,0 a | 89,6 ± 4,5 a | 0,0 ± 0,0 c | 80,8 ± 6,3 a | 54,4 ± 7,4 b | 80,0 ± 6,3 a |
| | 28 | 100,0 ± 0,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 100,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 c | 100,0 ± 0,0 a | 96,0 ± 4,0 a | 88,0 ± 4,9 b |
| 60 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 96,0 ± 4,0 a | 80,0 ± 6,3 a | 88,0 ± 8,0 a | 84,0 ± 7,4 a | 0,0 ± 0,0 b | 92,0 ± 4,9 a | 0,0 ± 0,0 b | 80,0 ± 6,3 a |
| | 28 | 84,0 ± 7,4 b | 0,0 ± 0,0 d | 96,0 ± 4,0 a | 32,0 ± 8,0 c | 0,0 ± 0,0 d | 92,0 ± 8,0 a | 0,0 ± 0,0 d | 0,0 ± 0,0 d |
| 90 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 88,0 ± 4,9 a | 68,0 ± 8,0 b | 76,0 ± 7,4 b | 72,0 ± 8,0 b | 0,0 ± 0,0 c | 72,0 ± 4,9 b | 0,0 ± 0,0 c | 64,0 ± 7,4 b |
| | 28 | 4,0 ± 4,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 20,0 ± 6,3 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 8,0 ± 4,9 b | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b |
| 120 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 52,0 ± 4,9 a | 48,0 ± 8,0 a | 52,0 ± 8,0 a | 16,0 ± 7,4 b | 0,0 ± 0,0 c | 48,0 ± 8,0 a | 0,0 ± 0,0 c | 24,0 ± 7,4 b |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| 150 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 16,0 ± 7,4 a | 8,0 ± 4,9 a | 16,0 ± 9,8 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b | 8,0 ± 4,9 a | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 b |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| 180 | 8 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 16 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |
| | 28 | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a | 0,0 ± 0,0 a |

*Médias seguidas por letras distintas nas linhas, dentro de cada tempo, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05). M ± EP (M)

Para *Heterorhabditis* sp. JPM4 não foi observada infectividade na temperatura de 8° C para todos os tratamentos já na primeira avaliação, aos 30 dias, mostrando que mesmo havendo nematóides vivos até os 60 dias de armazenamento (Fig. 2), estes não são mais infectantes (Tabela 4). Isto pode ocorrer pela redução da reserva lipídica e de glicogênio dos JIs, perdendo a capacidade de penetrar no inseto, mesmo estando vivos.

Quando em 16° C, a redução da infectividade foi gradativa ao longo do tempo, exceto para o tratamento com glicose, com redução acentuada. Além disso, o tratamento com NaOCl prejudicou a infectividade desde a primeira avaliação aos 30 dias, não causando mortalidade em *G. mellonella*. Este resultado corresponde ao obtido na avaliação de sobrevivência, uma vez que NaOCl causou alta mortalidade desses nematóides desde o princípio do armazenamento em todas as temperaturas (Figs. 2 e 4), não sendo adequado para preservar a sobrevivência desse nematóide.

Em 28° C, os tratamentos reduziram acentuadamente a infectividade até os 90 dias para todos os tratamentos, o que também foi observado para sobrevivência. O tratamento glicerina manteve a sobrevivência elevada até os 150 dias de avaliação, porém, sem manutenção da infectividade (Figs. 2C e 4B). Assim, o uso da glicerina para *Heterorhabditis* sp. JPM4 foi eficiente até os 90 dias, já que aos 150 dias esses não estavam mais infectantes.

Quando em 8° C, nenhuma substância testada promoveu melhoria na condição de armazenamento, pois, apesar de terem sido encontrados nematóides vivos, o teste de infectividade não foi positivo. Em 16° C, houve diferença entre os tratamentos a partir dos 90 dias. Entretanto, nenhum tratamento sobressaiu-se à testemunha, e aos 150 dias o Triton®, glicerina e etileno glicol, apesar de contribuírem para manter a infectividade, não diferiram da testemunha, não havendo efeito dessas substâncias como agentes conservantes para o parâmetro infectividade. Aos 28° C houve diferença entre os tratamentos desde a primeira avaliação, e aos 90 dias o tratamento com glicerina diferiu dos demais, mantendo maior a infectividade dos nematóides. O mesmo foi observado aos 120 dias. Porém, aos 150 dias não houve mortalidade em nenhum tratamento testado, apesar da sobrevivência ter sido mantida (Tabelas 2 e 4). Apesar disso, observou-se que a sobrevivência e a infectividade de *Heterorhabditis* sp. JPM4 foram prolongadas quando usada glicerina na temperatura de 28° C.

Dessa forma, para o nematóide *Heterorhabditis* sp. JPM4 houve efeito da glicerina quando em 28° C para manutenção da sobrevivência e infectividade. A 16° C

não houve efeito dos tratamentos testados, pois glicerina e etileno glicol não diferiram da testemunha quanto à infectividade. Na temperatura de 8° C também não ocorreu efeito das substâncias testadas, já que os nematóides morreram no princípio das avaliações e em nenhuma avaliação causaram mortalidade.

Para *S. carpocapsae* A11 não houve efeito das substâncias testadas na temperatura de 8° C, pois nenhum tratamento foi melhor que a testemunha. A 16° C, o tratamento com glicerina prolongou a sobrevivência e infectividade dos nematóides, diferindo da testemunha apenas na última avaliação, aos 180 dias, e com uma baixa porcentagem de infectividade (28%). A 28° C houve efeito do uso da glicerina, pois esta prolongou a infectividade dos nematóides por 60 dias. No entanto, aos 120 dias a infectividade foi baixa (16%) e aos 150 dias não havia nematóides vivos (Tabela 3).

Constatou-se que a glicerina agiu como uma substância conservante na temperatura de 28° C para os dois nematóides testados e também a 16° C para o nematóide *S. carpocapsae* A11. As demais substâncias usadas, mesmo quando mantiveram os nematóides vivos, não mostraram esse efeito em relação à infectividade, não exercendo uma ação conservante.

DISCUSSÃO

De acordo com FLANDERS *et al.* (1996), diversos são os fatores que influenciam a sobrevivência e infectividade dos nematóides entomopatogênicos, como temperatura, radiação solar, umidade e disponibilidade de oxigênio. Além disso, existem diferenças entre as espécies. Membros da família Heterorhabditidae são mais sensíveis a radiação, produtos químicos, temperatura e dessecação do que os da família Steinernematidae, além de apresentarem pior estabilidade de armazenamento. O mesmo foi observado no presente trabalho, já que *S. carpocapsae* teve uma redução gradual da sobrevivência e infectividade, enquanto para *Heterorhabditis* sp. JPM4 essa diminuição ocorreu rapidamente.

Segundo GLAZER (2002), a temperatura extrema é um dos fatores que limita a sobrevivência desses organismos, influenciando tanto na sobrevivência como na mobilidade e infectividade. Assim, ANDALÓ *et al.* (2005) concluíram que em temperaturas de 8° C e 12° C houve redução de viabilidade e infectividade para os nematóides *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4. Além disso, juvenis infectantes de heterorhabditídeos são afetados em baixa temperatura, diminuindo a proporção de nematóides infectantes e a habilidade para procurar hospedeiros (WESTERMAN,

1999). Dessa forma, esses resultados foram semelhantes aos encontrados nesse trabalho, uma vez que, apesar de terem sido encontrados JIs vivos, muitos já haviam perdido a capacidade de infectar o inseto.

Outro fator que influencia a atividade do nematóide é a mudança na composição química ou microbiana no meio em que ele se encontra (DEMPSEY; GRIFFIN, 2002; FITTERS; GRIFFIN, 2004). O uso de substâncias adicionadas na água da suspensão pode ser prejudicial ou favorecer a sobrevivência dos JIs. Nesse trabalho, concluiu-se que a glicerina favoreceu o armazenamento dos JIs na temperatura de 28° C, no entanto, a 8° C a morte dos nematóides pode estar mais associada à adaptação térmica. Na temperatura de 8° C a adição de substâncias não teve ação conservante, pois a morte provavelmente está associada à baixa temperatura. GREWAL (2000) discute a possibilidade da longevidade desses nematóides a baixas temperaturas ser mais dependente da sua tolerância ao frio do que da quantidade de reservas energéticas. Sendo assim, a glicerina possivelmente agiu dando proteção à cutícula do nematóide a 28° C. BROWN; GAUGLER (1997) obtiveram sobrevivência aumentada para nematóides congelados em glicerina a 20% em comparação com o congelamento usando apenas água, confirmando a ação da glicerina como um protetor.

Quando armazenados em água, os NEPs economizam suas reservas de várias formas, mudando seu comportamento locomotor, adotando postura estacionária ou por meio de processo de agregação. Isso possibilita a diminuição do gasto energético e a população supera as condições de estresse (PATEL *et al.*, 1997; WRIGHT *et al.*, 1997; WRIGHT; PERRY, 2002), mantendo-se viva e infectante mesmo em condições adversas a sua sobrevivência.

As fontes de energia dos nematóides são o glicogênio e lipídios, reservas por meio das quais eles irão manter-se vivos até encontrarem um novo hospedeiro para parasitar. A alta taxa de lipídios em JIs permite maior sobrevivência, assim, os nematóides são dependentes de lipídios para um período maior de armazenamento, uma vez que a sobrevivência declina juntamente com a diminuição das reservas dos JIs (HASS *et al.*, 2002; LEWIS *et al.*, 1995; MENTI *et al.*, 2003). O uso da glicerina como conservante teve efeito principalmente em temperatura de 28° C, quando os nematóides se movimentam bastante e gastam suas reservas energéticas mais rapidamente. O mesmo não foi observado em temperatura de 8° C, quando os nematóides permanecem praticamente imóveis. A ação da glicerina pode ter influenciado na proteção contra a perda de reservas energéticas a 28° C, quando os JIs infectantes se movimentam bastante, no entanto, a 8° C a mortalidade dos JIs pode estar mais associada a sua adaptação a baixas temperaturas do que ao gasto de energia.

O uso da glicerina pode potencializar a sobrevivência de JIs desses NEPs em condições de armazenamento a 28° C, porém, de acordo com ANDALÓ *et al.* (2005), as porcentagens de sobrevivência e infectividade que foram obtidas a 16° C por até 180 dias foram maiores do que as encontradas nesse estudo na temperatura de 28° C com glicerina. Com isso, o uso da glicerina como agente conservante é útil em casos em que o nematóide ficará em temperaturas altas, ou caso não exista controle da temperatura.

A baixa disponibilidade de oxigênio pode reduzir a sobrevivência dos nematóides (GLAZER, 2002), e sua complementação para aumentar a sobrevivência deles em suspensão aquosa durante o armazenamento poderá ser empregada (ANDALÓ *et al.*, 2006). Assim, além dessa condição para aumentar a sobrevivência desses nematóides, pode-se usar a temperatura e a adição de substância conservante.

A sensibilidade de algumas espécies à variação de temperatura, a suscetibilidade a contaminantes microbianos e a toxicidade de agentes antimicrobianos são fatores que influenciam na qualidade do armazenamento em água (GREWAL, 2000). Com isso, apesar da dificuldade de armazenamento ser um dos maiores entraves para a expansão do uso de NEPs como bioinseticidas, estudos que avaliem os fatores que afetam a sobrevivência desses organismos têm permitido que o armazenamento seja realizado de forma mais adequada. Assim, o uso de uma substância que prolongue a sobrevivência e mantenha a infectividade, para uma posterior liberação no campo em programas de controle de insetos, é desejável.

REFERÊNCIAS

- ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR, A.; MOLINA ACEVEDO, J.P.; CAVALCANTI, R.S.; CARVALHO, F.A. Efeito da temperatura e concentração na sobrevivência de nematóides entomopatogênicos em condições de armazenamento, visando seu uso no controle microbiano de pragas. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, v.31, n.2, p.253-265, 2005.
- ANDALÓ, V.; CAVALCANTI, R.S.; MOLINA ACEVEDO, J.P.; MOINO JUNIOR, A.; MAGALHÃES, F.H.L. Influência da aeração no armazenamento de nematóides entomoptogênicos (Rhabditida) em condições de laboratório. *Nematologia Brasileira*, v.30, n.1, p.45-50, 2006.
- BROADBENT, A.B.; OLTHOF, T.H.A. Foliar application of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) to control *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) larvae in chrysanthemums. *Environmental Entomology*, v.24, n.2, p.431-435, 1995.

- BROWN, I.M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. *Nematologica*, v.43, n.5, p.363-375, 1997.
- DEMPSEY, C.M.; GRIFFIN, C.T. Phased activity in *Heterorhabditis megidis* infective juveniles. *Parasitology*, v.124, n.6, p.605-613, 2002.
- DUTKY, S.R.; THOMPSON, J.V.; CANTWE, G.E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology*, v.6, n.4, p.417-422, 1964.
- FITTERS, P.F.L.; GRIFFIN, C.T. Spontaneous and induced activity of *Heterorhabditis megidis* infective juveniles during storage. *Nematology*, v.6, n.6, p.911-917, 2004.
- FLANDERS, K.L.; MILLER, J.M.; SHIELDS, E.J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. *Journal of Economic Entomology*, v.89, n.2, p.373-380, 1996.
- GLAZER, I. Survival biology. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. Wallingford: CABI Publishing, 2002. chap.8, p.169-188.
- GREWAL, P.S. Anhydrobiotic potencial and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *International Journal for Parasitology*, v.30, n.14, p.995-1000, 2000.
- HASS, B.; DOWNES, M.J.; GRIFFIN, C.T. Persistence of four *Heterorhabditis* spp. isolates in soil: role of lipid reserves. *Journal of Nematology*, v.34, n.2, p.151-158, 2002.
- HATAB, M.A.; GAUGLER, R. Lipids of in vitro cultured *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biological Control*, v.15, n.3, p.113-118, 1999.
- KAYA, H.K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology*. New York: Academic Press, 1997. chap.6, p.281-324.
- LEWIS, E.E.; SELVAN, S.; CAMPBELL, J.F.; GAUGLER, R. Changes in foraging behaviour during the infective stages of entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, v.110, n.5, p.583-590, 1995.
- LEWIS, E.E.; SHAPIRO-ILAN, D. Host cadavers protect entomopathogenic nematodes during freezing. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.81, n.1, p.25-32, 2002.
- MENTI, H.; PATEL, M.N.; WRIGHT, D.J.; PERRY, R.N. Lipid utilisation during storage of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* from Greece and the UK. *Nematology*, v.5, n.1, p.31-37, 2003.
- MOLINA J.P.; LÓPEZ, N.J.C. Producción in vivo de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. *Revista Colombiana de Entomología*, v.27, n.1-2, p.73-78, 2001.
- PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.35, p.1015-1037.
- PATEL, M.N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D.J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. *Parasitology*, v.114, n.6, p.489-496, 1997.
- WESTERMAN, P.R. Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20° C and effects on efficacy. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.73, n.2, p.206-213, 1999.
- WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, v.66, p.302-303, 1927.
- WRIGHT, D.J.; GREWAL, P.S.; STOLINSKI, M. Relative importance of neutral lipids and glycogen as energy stores in dauer larvae of two entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*, v.118, n.2, p.269-273, 1997.
- WRIGHT, D.J.; PERRY, R.N. Physiology and biochemistry. In: GAUGLER, R. (Ed.). *Entomopathogenic nematology*. Wallingford: CABI Publishing, 2002. chap.7, p.145-168.

Recebido em 5/3/07
Aceito em 20/8/08