

Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos

Imagem: Paulo R. V. da S. Pereira



Marcio Voss¹
Vanessa Andaló²
Aldomário Santo Negrissoli Júnior³
Carla Ruth Barbosa-Negrissoli⁴



I Nematoides entomopatogênicos (Neps) como agentes de controle biológico de insetos

Marcio Voss¹

Introdução

Os nematoides são vermes muito comuns nos solos. Em determinados ambientes, constituem a maior parte da microfauna do solo, que inclui ácaros e colêmbolas, entre outros. A diversidade de tipos de nematoides é ampla, abrangendo desde os fitopatogênicos até aos que podem se alimentar de animais, de microorganismos, de resíduos orgânicos e até nematoides que afetam insetos. Destes últimos, um exemplo conhecido no sul do Brasil é o nematoide mermitídeo, que se desenvolve dentro do inseto até provocar sua morte, após um tempo prolongado

¹ Pesquisador, Dr. (aposentado). Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. E-mail: vosm2@yahoo.com

² Pesquisadora, Dra. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. E-mail: vanessaandalo@yahoo.com.br

³ Pesquisador, Dr. (bolsista). Embrapa Tabuleiros Costeiros, Maceió, AL. E-mail: negrissoli_junior@hotmail.com

⁴ Dra. Maceió, AL. E-mail: carlaruthdecarvalhobarbosa@gmail.com

(Fig. 1). Nos anos de 1960, os mermitídeos foram usados no controle de larvas de dípteros, sendo, posteriormente, substituídos por bactérias do gênero *Bacillus* (STOCK, 2005).

Foto: Marcio Voss

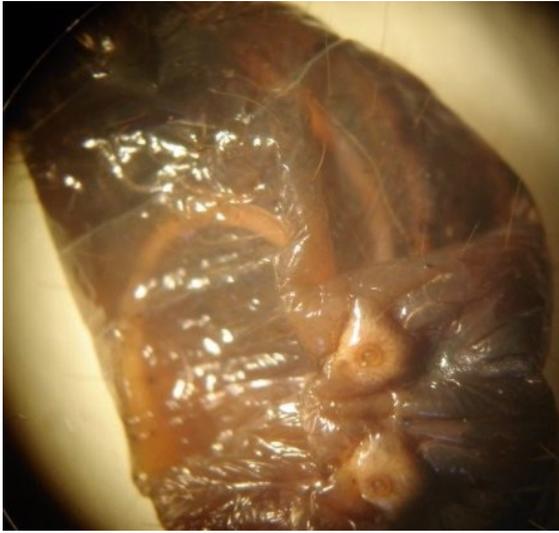


Fig. 1. Larva de *Diloboderus abderus* infectada por um nematoide mermitídeo (alças claras no interior do inseto).

Atualmente, o uso de nematoides como agente de controle biológico concentra-se nos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, especialmente para insetos de solo.

Esses gêneros de nematoides, somados ao gênero *Neosteinernema*, são chamados de nematoides entomopatogênicos (Neps) (GAUGLER & KAYA, 1990). Eles são vetores de uma espécie de bactéria, que é o agente patogênico. Ao serem introduzidas no interior da hemocele do inseto pelo nematoide, as células bacterianas são liberadas na hemolinfa, onde excretam toxinas, que matam o inseto em 24 a 48 horas. A proliferação de bactérias altera a cor do inseto, que varia de marrom-escuro, com *Photorhabdus* (Fig. 2), a marrom claro ou amarelado para *Xenorhabdus*.

Foto: Marcio Voss



Fig. 2. Lagartas de *Galleria mellonella*, à esquerda, e larvas de *Tenebrio molitor*, à direita, infectadas pelo nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis*. Verifica-se o contraste entre as larvas de *T. molitor* infectadas, de cor marrom, com as larvas não infectadas, de cor mais clara.

O nematoide digere substâncias do inseto, além de se alimentar das próprias bactérias que nele se multiplicaram. Os Neps têm quatro fases larvais (juvenis), uma fase adulta e ovo, dentro do inseto, onde se multiplicam por vários

ciclos. Quando as reservas nutricionais do inseto encontram-se exauridas, juvenis da terceira fase larval engolem algumas bactérias e saem em busca de outro inseto para infectar. São os chamados juvenis infectivos (JIs), única fase adaptada para sobreviver fora do inseto. O tamanho dos JIs varia de cerca de 400 a 900 µm, conforme a espécie (POINAR JR., 1990). Na fase de JI, os Neps podem ser obtidos do solo, servem de inóculo para controlar insetos e podem ser armazenados em água ou criopreservados, além de serem fonte de bactérias entomopatogênicas.

As bactérias guardam uma estreita relação com seu nematoide, ao nível de gênero e de espécie: as bactérias do gênero *Xenorhabdus* são simbioses dos nematoides do gênero *Steinernema*, enquanto que as do gênero *Photorhabdus* são simbioses dos nematoides do gênero *Heterorhabditis*. Na maioria dos casos, uma única espécie de bactéria associa-se a uma determinada espécie de nematoide. Alguns exemplos de associação de bactéria com nematoide são: *Xenorhabdus nematophila-Steinernema carpocapsae*, *Photorhabdus luminescens akhurstii-Heterorhabditis indica* (GRIFFIN et al., 2005).

Adequabilidade para o controle biológico

Os Neps dispõem de características altamente desejáveis para o controle biológico:

1. matam rapidamente;
2. não atacam plantas;
3. não são prejudiciais para vertebrados;
4. não são capazes de matar todos os tipos de insetos;
5. não poluem as águas;
6. não necessitam de equipamentos especiais para aplicação;
7. não necessitam de equipamentos de proteção individual para o aplicador;
8. podem ser produzidos em insetos ou em meio de cultura;
9. deslocam-se no solo em busca do inseto;
10. podem se estabelecer no solo, mantendo, por longo tempo, baixa população da praga combatida.

Com tantas qualidades favoráveis, esses dois gêneros de nematoides são os mais pesquisados e usados no controle de insetos. Pesquisas feitas no Japão, EUA e Europa propiciaram o desenvolvimento de produtos comerciais. Atualmente, há mais de 60 empresas produzindo Neps para controle de uma série de insetos-praga, com ênfase em culturas de alto valor comercial e/ou com maior rigor quanto à presença de inseticidas.

No site <http://oardc.osu.edu/nematodes/> encontram-se informações gerais sobre empresas produtoras de nematoides, sobre pragas combatidas, além de informações acadêmicas e aplicadas sobre Neps no Hemisfério Norte (OARDC-Ohio Agricultural Research and Development Center).

No Brasil, as pesquisas intensificaram-se a partir da década de 1990, na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), na Universidade Federal de Lavras (UFLA), na Universidade Estadual Norte Fluminense (UENF), no Instituto Biológico (IB) e na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). A UFLA e o IB estão desenvolvendo pesquisas para disponibilizar produto comercial com Neps para os agricultores.

Insetos-alvos potenciais dos Neps no Brasil

São alvos potenciais dos nematoides entomopatogênicos diversos insetos-praga de lavouras brasileiras, especialmente os que têm uma fase do seu ciclo no solo.

Entre os insetos com testes avançados visando seu controle, estão:

- Cigarra-da-raiz do cafeeiro (*Quesadas gigas*),
- Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar (*Mahanarva sp.*),
- Broca-da-cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*),
- Broca-do-rizoma-da-cana-de-açúcar (*Sphenosphorus levis*),
- Gorgulho-da-goiabeira (*Conotrachelus psidii*).

Os insetos que têm apresentado alta taxa de mortalidade em ensaios feitos em laboratórios são:

- Lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*),
- Cascudinho de aviário (*Alphitobius diaperinus*),
- Mosca-das-frutas (*Anastrepha fraterculus*),
- Coró-das-pastagens (*Diloboderus abderus*) (Fig. 3),
- Larva-alfinete (*Diabrotica speciosa*),
- Tamanduá-da-soja (*Sternechus subsignatus*).

Os insetos de solo que afetam diversas culturas no Brasil e que deveriam ser objeto de mais estudos, pois já têm histórico de infecção por Neps, são:

- Coró-da-soja (*Phyllophaga cuyabana*),
- Coró-sulino-da-soja (*Demodema brevitarsis*),
- Coró-do-trigo (*Phyllophaga triticophaga*),
- Curculionídeos-das-raízes em citrus (*Pantomorus*, *Naupactus*, etc.),
- Filoxera-da-uva (*Phylloxera phylloxera*),
- Lagarta-rosca (*Agrotis ypsilon*),
- Lagarta-elasmo (*Elasmopalpus lignosellus*),
- Broca-dos-rizomas (*Migdolus fryanus*),
- Perceijos-castanhos (*Scaptocoris castanea*),
- Bicheira-da-raiz do arroz (*Oryzophagus oryzae*),
- Grilos (*Gryllus assimilis*, *Gryllotalpa hexadactyla*).

A maioria dos insetos de solo arrolados neste trabalho são descritos e seus danos abordados em Salvadori et al. (2004).

Foto: Marcio Voss



Fig. 3. Coró-das-pastagens (*Diloboderus abderus*).

Além de insetos que ocorrem no solo, também podem ser controlados por Neps alguns insetos que se refugiam em ambientes protegidos, como estruturas crípticas nas plantas ou substratos usados para cultivos em casas-de-vegetação, pois os Neps são sensíveis à baixa umidade, alta temperatura e radiação ultravioleta.

O controle de *Sciaridae* em cultivo de flores por *Steinernema feltiae* e por *Heterorhabditis indica* foi utilizado por produtores dos EUA em casa-de-vegetação, ajudando a diminuir o uso de inseticidas (JAGDALE et al., 2007). No caso de estruturas vegetais, são favoráveis à atuação dos Neps as que evitam a exposição direta ao sol e mantêm água ou umidade de saturação no microambiente, como, por exemplo, o cartucho do milho (Fig. 4).

Foto: Marcio Voss



Fig. 4. Cartucho de milho com lagarta de *Spodoptera frugiperda*.

No presente manual, objetiva-se disponibilizar as técnicas mais usuais em pesquisas com Neps, com ênfase nas atividades laboratoriais, divididas em duas seções. A primeira apresenta as técnicas para obtenção, manutenção e seleção de nematoides eficientes contra insetos-praga e a segunda descreve procedimentos para identificação dos Neps.

II Técnicas para obtenção, conservação e seleção de nematoides entomopatogênicos

Marcio Voss
Aldomario Santo Negrisoni Junior
Carla Ruth Barbosa-Negrisoni

Isolamento de nematoides

O método mais comum para isolar Neps baseia-se na técnica do inseto-armadilha ou inseto-isca, sendo os métodos diretos de extração limitados aos pesquisadores especializados em taxonomia. A obtenção de nematoides é favorecida pela escolha do local de coleta de solo onde haja abundante entomofauna de solo e pela repetição do processo de inseto-armadilha em amostras negativas, pois os juvenis infectivos (JIs) podem permanecer não infectantes durante algum período. Por outro lado, mesmo que não se obtenham nematoides de amostra de solo de um local, não significa que não haja nematoides, pois a infecção do inseto armadilha pode ser dificultada por baixa sensibilidade a determinado nematoide e pela baixa população dos Neps ou distribuição agregada (falso negativo) (HOMINICK, 2002).

Basicamente, o isolamento de Neps pode ter dois objetivos distintos. Estudos exploratórios visam à obtenção de novos isolados de Neps, sendo que as amostragens devem ser conduzidas preferencialmente nas estações do ano com maior abundância de insetos (primavera-verão), aumentando, dessa forma, a chance de sucesso. Por outro lado, quando se deseja conhecer a dinâmica populacional de determinada espécie/isolado de Nep nativo ou exótico (aplicado ou de ocorrência natural) em um ecossistema restrito, as amostragens devem ser tomadas sistematicamente ao longo do período de estudo.

Coleta de solo

Amostras de solo são extraídas a uma profundidade entre 0 a 10 cm, com auxílio de trado, num raio de 5 m, sendo cada ponto da amostra constituído de 5-10 sub-amostras de solo, de cerca de 100 gramas cada. As sub-amostras são misturadas em baldes, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas ao laboratório (modificado de KAYA & STOCK, 1997). A identificação das amostras deve permitir a recuperação do ponto de amostragem, e também permitir conotações com o habitat associado (altitude, temperatura predominante e tipo de vegetação) (Fig. 5). O uso de GPS é recomendável. Entre um ponto amostrado e outro, os equipamentos devem ser limpos com álcool 70% ou solução de hipoclorito 0,5%, a fim de evitar contaminação entre amostras.

Foto: Marcio Voss



Fig. 5. Gramado no município de Carazinho, RS, de cujo solo foi isolado nematoide entomopatogênico. A coleta foi feita no sulco central, com maior conservação de umidade.

Coleta de insetos contaminados

De forma geral, para isolamento de Neps em insetos infectados no campo, podem ser utilizadas todas as técnicas de coleta de insetos, exceto aquelas que utilizam etanol ou detergente.

Obtenção de nematoides entomopatogênicos

Técnica do inseto-armadilha

Para o isolamento de Neps a partir do solo, utilizando a técnica do inseto-armadilha, o solo de cada amostra obtida no campo deve, inicialmente, ser umedecido com água destilada (quando necessário), para atingir umidade próxima e inferior à da capacidade de campo. De acordo com a metodologia modificada de Bedding & Akhurst (1975), cada amostra pode ser mantida em recipientes plásticos nos quais são colocadas dez lagartas de *Galleria mellonella* (L.) do último ínstar, ou de *Tenebrio molitor*, sob o solo, de forma que as lagartas fiquem em contato com o substrato (Fig. 6). Estes frascos devem ser mantidos em temperatura de 25 ± 3 °C.

Foto: Marcio Voss



Fig. 6. Potes plásticos com solo e inseto-isca em câmara, a 23 °C.

Após cinco a sete dias, os insetos mortos e com sintomas de infecção por Neps devem ser desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio a 0,1%, colocados em câmara seca (placa de Petri de 9 cm de diâmetro com papel de filtro) e incubados em câmara climatizada a 23-25 °C. Após três dias, os cadáveres devem ser transferidos para armadilhas de White (WHITE, 1927) para a coleta dos JIs (Fig. 7).

Foto: Marcio Voss



Fig. 7. Armadilha de White, com larva de *Cyclocephala flavipennis* contaminada com um isolado de nematoide do gênero *Heterorhabditis* da coleção da Embrapa Trigo.

A armadilha inventada por White (1927) consiste em uma placa de Petri em cuja base se acondiciona um suporte que é recoberto com papel filtro ou papel germiteste. Adiciona-se água deionizada ou com baixo teor de cloro para cobrir o fundo da placa e apenas umedecer o papel. Sobre o papel, coloca-se uma ou mais larvas do inseto contaminado. Após 10 a 15 dias os JIs deslocam-se do inseto para a água, pela ponte de papel, enquanto que os indivíduos adultos ou de outras fases larvais permanecem no inseto. Pode-se recolher JIs por cerca de 15 dias,

mas é recomendável não prolongar a coleta por mais de uma semana, para evitar contaminações por microorganismos ou coletar nematoides menos vigorosos.

Os JIs coletados devem ser purificados conforme descrição feita no item 4.2. Parte da suspensão obtida é usada para confirmação de virulência em *T. molitor* ou *G. mellonella*, para atender aos postulados de Koch, e parte é conservada em geladeira a 10-15 °C, em recipientes contendo lâmina d'água inferior a 3 mm, para facilitar a troca gasosa, evitando anoxia (vide item 2.1).

O mesmo procedimento deve ser aplicado com insetos mortos oriundos de coleta de campo.

Técnicas de obtenção direta

Outras técnicas são as de obtenção direta de JI a partir do solo, com o emprego de funil de Baermann, ou peneiramento-gravidade, ou elutriação ou a técnica de centrifugação-flotação (KAYA & STOCK, 1997). Essas técnicas não serão abordadas neste manual.

Conservação de nematoides

Câmara com temperatura controlada

Muitas espécies de nematoides provenientes de regiões mais quentes podem morrer em temperatura de geladeira comum. Assim, estes nematoides deverão ser colocados em câmara com temperatura de 10 °C, podendo ser usado até 15-16 °C com conservação por período de 2 a 3 meses em garrafas de cultura de tecido (Fig. 8). Em geral, *Steinernema* é mais tolerante ao frio do que *Heterorhabditis*. Adicionalmente, pode-se utilizar esponja de poliuretano (Fig. 8), cujas condições de superfície específica e de aeração e umidade podem ampliar o tempo de sobrevivência (BARBOSA-NEGRISOLI et al., 2009).

Foto: Marcio Voss



Fig. 8. Armazenamento de JI em garrafas de cultura de tecido e em esponja de poliuretano.

As esponjas podem ser mantidas também em sacos plásticos. Para a recuperação dos JIs, as esponjas são imersas em água e pressionadas. Esse método pode ser utilizado como um tipo de formulação de Neps ativos e permite o envio de JIs em condições adequadas de aeração e umidade.

O transporte ou envio postal dessas esponjas pode ser feito por poucos dias em isopor em temperatura ambiente, sem comprometer a qualidade do inóculo. Os sacos com as esponjas devem ser embalados após climatização à temperatura ambiente, para evitar que a expansão da atmosfera interna causada pelo aumento da temperatura abra os sacos durante o transporte e provoque perdas e contaminações.

Criopreservação

A criogenia consiste na manutenção dos nematoides abaixo de 130 °C negativos, em nitrogênio líquido, para conservação de estoque-mestre para longa duração (Fig. 9).

Foto: Marcio Voss



Fig. 9. Botijão com nitrogênio líquido para conservação de coleção de nematoides entomopatogênicos.

Os procedimentos descritos a seguir seguem Popiel & Vasquez (1991), modificado por Nugent et al. (1996), e com adaptações às condições de operação do laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa Trigo:

1. Misturar vigorosamente igual quantidade de suspensão de nematoides e solução de glicerol a 28%, ou a 34%, e incubar por 72 horas a 23 °C, para obter concentrações finais de 14% ou 17%.

Para muitas estirpes de origem tropical, a concentração final de 14% de glicerol permite maior recuperação de JIs criopreservados do que a de 17%. Um pré-teste pode ser feito verificando-se a sobrevivência após 24 horas em criopreservação.

2. Verter a suspensão sobre disco de papel Whatman n. 42 ou Whatman n. 1 sobre funil de Buchner submetido à sucção através de Kitasato conectado à bomba de vácuo (Fig. 10). A deposição da suspensão sobre o filtro deve ser feita lentamente, de modo a evitar extravasamento pelas bordas do mesmo.

Foto: Marcio Voss



Fig. 10. Retirada do excesso de glicerol da suspensão de JI, sobre papel filtro em funil de Buchner, com vácuo.

3. Verter metanol 70%, mantido a 23 °C, sobre os Neps retidos no papel na operação anterior, para remover o excesso de glicerol, utilizando sucção.
4. Colocar o papel filtro com os nematoides em 5 mL de metanol 70% à temperatura aproximada de 5 °C, em placa de Petri de 60 mm de diâmetro, imersa parcialmente no gelo.
5. Deixar por 10 minutos.
6. Retirar o papel filtro de modo a deixar escorrer o metanol do papel, para deixar a maior parte dos JIs na placa.
7. Agitar e colocar 1 mL da suspensão sobre um disco de papel filtro de 2 cm diâmetro, sobre funil de Buchner, para retirar o excesso de metanol, por sucção.
8. Transferir o disco de papel com os JIs para criotubo de 2-3 mL com tampa provida de anel de silicone. Essa quantidade de suspensão trabalhada permite fazer quatro criotubos. Enquanto completa a operação de acondicionamento de Nep no papel filtro, deixar o criotubo pronto mergulhado no gelo ou em nitrogênio líquido.
9. Colocar os criotubos em suporte adequado e inserir no botijão de nitrogênio líquido (Fig. 11).

Foto: Marcio Voss



Fig. 11. Criotubo sustentado em perfil metálico para acondicionamento em botijão com nitrogênio líquido.

10. Anotar a data da operação e a localização das amostras.

11. Para descongelar, abrir o criotubo, adicionar 1-2 mL de água ou solução salina com temperatura entre 23 °C a 30 °C. Colocar o tubo aberto dentro da placa de Petri com cerca de 15 mL de água ou solução salina, a 23°C, por 24 horas. A rapidez do descongelamento a partir da retirada do criotubo do botijão de nitrogênio líquido é crítica, pois os nematoides vão perecendo à medida que o tempo de descongelamento se prolonga acima de 45 segundos (NUGENT et al., 1996).

Manutenção de Neps pela obtenção de isolinhas

Os isolados de Neps constituem uma população que pode conter variantes, sujeitas a uma seleção inadvertida, por multiplicações sucessivas ou por alterações ao longo do tempo por adaptação às condições de laboratório (HOPPER et al., 1993; WANG & GREWAL, 2002). A produção de isolinhas a partir dessas populações constitui uma forma de conservação de Neps porque tem como princípio manter populações de Neps geneticamente homogêneas. Com as isolinhas, corre-se menor risco de alterações de características dos Neps pelo manuseio e multiplicação em laboratório.

Os procedimentos baseiam-se em provocar cruzamentos entre Neps irmãos e são diferenciados conforme o gênero de nematoide, porque o gênero *Heterorhabditis* tem a sua primeira geração de fêmeas hermafroditas, diferenciando-se em macho e fêmea apenas a partir da segunda geração, enquanto *Steinernema* tem JI anfimítico, levando ao cruzamento de macho e fêmea desde a primeira geração.

Obtenção de linhas endogâmicas em *Heterorhabditis*

In vivo: infectar inseto suscetível com apenas um juvenil infectivo do isolado selvagem, coletar os novos JIs produzidos de cada cadáver de inseto e reinfectar outros insetos sucessivamente, sempre inoculando apenas um JI por inseto (BAI et al., 2005). Como é difícil conseguir infecção com apenas um JI, há necessidade de se usar

vários insetos para garantir a obtenção de larva infectada. Com 10 passagens por insetos é possível obter-se em torno de 95% de homozigose.

In vitro: colocar um JI esterilizado superficialmente e inoculado em Meio de Crescimento de Nematóide (NGM), (Anexo), semeado previamente com sua bactéria simbiótica *Photorhabdus* para alimentar o nematóide. Após 72 horas, transferir juvenis do quarto estágio ou fêmea virgem, individualmente, para nova placa com meio de cultura. Como são hermafroditas, esses indivíduos se reproduzirão por autofecundação (GLAZER et al., 1991). Repetir essa multiplicação por, pelo menos, sete vezes.

Obtenção de isolinhas com *Steinernema*

Deve-se partir de um adulto macho e de uma fêmea virgem em meio de cultura e promover o cruzamento entre irmãos nas progênes seguintes, como nos procedimentos descritos acima para cruzamentos de *Heterorhabditis*, *in vitro*.

Caracterização das isolinhas obtidas

Com a homozigose, características recessivas podem se manifestar, levando a fenótipos diferenciados. Por isso, devem ser conduzidas diversas linhas de uma mesma população selvagem, simultaneamente, para poder selecionar características de interesse para o controle biológico, como o de sobrevivência em condições adversas (temperatura, raios ultravioleta e dessecação), capacidade infectiva, capacidade de multiplicação e virulência (SHAPIRO-ILAN et al., 1996). Pesquisas feitas por Wang & Grewal (2002) sobre essas características mostraram que, uma vez fixadas, não houve alteração do comportamento das isolinhas durante o período de um ano em que foram monitoradas. Técnicas para testes específicos podem ser encontradas em Wang & Grewal (2002).

Isolamento de bactérias simbióticas de nematoides entomopatogênicos

Além de produzirem toxinas para matar os insetos, as bactérias entomopatogênicas produzem antibióticos, que lhes permitem crescerem, no inseto, livres de outras bactérias e fungos. As bactérias também sintetizam diversas enzimas extracelulares, pigmentos com ou sem bioluminescência e inclusões cristalinas que são de interesse biotecnológico. Na multiplicação *in vitro* de nematoides, como a necessária para a produção de isolinhas e produção de inoculante comercial, as bactérias são adicionadas ao meio de desenvolvimento dos Neps, servindo de alimento para estes. Para estudos genéticos e biotecnológicos e para produção *in vitro* de Neps, as bactérias podem ser isoladas partindo-se de um único JI ou de um grupo de JIs.

A seguir, descreve-se o procedimento rápido de isolamento, desenvolvido na Embrapa Trigo, que parte de um grupo de 100 a 200 JIs. Em câmara de fluxo laminar, coloca-se uma suspensão concentrada de 50 µL de juvenis infectivos de Neps em solução de 50 µL de hipoclorito de sódio a 2%, em placa esterilizada, deixando-se por 5 minutos para promover a assepsia externa dos JIs. Com a ajuda de micropipeta, provoca-se a ressuspensão da mistura e transfere-se 50 µL para gota de água deionizada e esterilizada de mesmo volume. Mistura-se a suspensão aspirando e retornando com micropipeta, distribuindo-se imediatamente sobre a superfície de meio de cultura Ágar Nutriente (Anexo) em placa de Petri. As placas são incubadas a 23 °C, em câmara DBO, até o aparecimento de colônias formadas pelas bactérias que o nematóide liberou (Fig. 12).

Foto: Marcio Voss



Fig. 12. Bactérias simbióticas de nematoide entomopatogênico em meio de cultura Ágar Nutriente.

O isolamento segue os procedimentos de bacteriologia e a manutenção das bactérias pode ser feita inoculando-se cerca de 50 μ L de cultura do isolado em 5 mL de Caldo Nutriente (Anexo) com 17 % de glicerol, colocando-se imediatamente a 70 °C negativos. Para uso frequente, pode-se manter as bactérias em meio de cultura sólido Ágar Nutriente, em bisel, a 12 °C-15 °C, refazendo-se mensalmente a cultura.

Preparo de inóculo de nematoides entomopatogênicos para biotestes de virulência contra insetos-praga

Para se proceder à inoculação de Neps em insetos ou substratos, deve-se usar JIs multiplicados recentemente, de preferência com menos de 15 dias e um máximo de um mês após a purificação. Os passos principais no preparo de inóculo são:

Multiplicação

A multiplicação feita em insetos consiste em se aplicar uma suspensão de JI em papel colocado como base sobre o fundo de placa de Petri em volume suficiente para umedecer completamente o papel (Fig. 13). Diversos insetos podem ser usados para a multiplicação de Neps. O mais usado nos laboratórios de patologia de insetos são as lagartas de *G. mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), por sua ampla suscetibilidade aos Neps e alta multiplicação de JIs. Outro inseto comumente empregado é a larva de *T. molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), por seu manejo mais simples e facilidade de aquisição. No entanto, existem nematoides que não se multiplicam bem nesses dois insetos. *Steinernema scapterisci*, *S. kushidae* e *S. scarabaei* são exemplos.

A quantidade indicada de JIs aplicada por larva está em torno de 20. A adição de muitos JIs acaba proporcionando menor número de progênies devido à competição por alimentos ou contaminação com bactérias externas.

Foto: Marcio Voss



Fig. 13. Placa de Petri com larvas de *Tenebrio molitor* sobre papel germiteste, embebido com a forma infectiva de nematoides entomopatogênicos.

Usa-se a quantidade de larvas suficiente para obter o número previsto no inóculo. Uma larva de *G. mellonella* pode sustentar a produção de mais de 10.000 JIs, podendo ultrapassar 100.000.

Deixa-se a placa incubando por cerca de quatro dias, e colocam-se as larvas mortas em armadilha de White, para recolher os JIs produzidos. A temperatura indicada é de 23 a 25 °C.

Os insetos não devem ficar em contato direto com a água, para não ocorrer anoxia e, conseqüentemente, apodrecimento. Por outro lado, se durante o tempo de incubação o nível de água diminuir muito, deve-se ter o cuidado de se adicionar água apenas na base da placa e nunca diretamente no inseto, pois, além de favorecer apodrecimento nas fases iniciais, pode conduzir para a água, outras fases dos Neps que não os juvenis infectivos. Se isso ocorrer, devem ser separados os JIs dessas outras fases, por peneiramento, por filtragem em papel ou por retirada direta, pois essa mistura não é desejável na produção de inóculo, bem como para manutenção da coleção. As outras fases, além de não servirem para infectar insetos e atrapalharem na contagem, morrem rapidamente, afetando a sobrevivência dos JIs pela decomposição de seus corpos.

Purificação

Após 10 a 15 dias começam a aparecer os primeiros juvenis infectivos na água (Fig. 14).

Foto: Marcio Voss

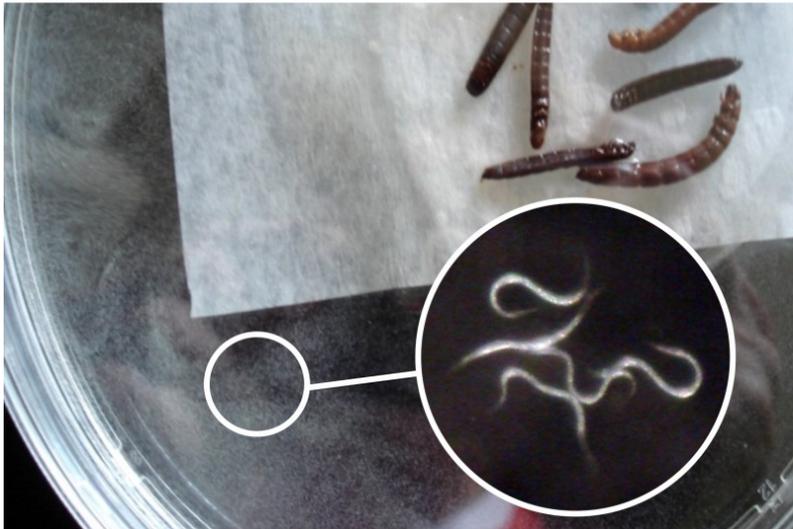


Fig. 14. Juvenis infectivos deslocados na água (pontos esbranquiçados sobre a base da placa de Petri), a partir dos cadáveres de *T. molitor*, pela ponte de papel germiteste.

Considera-se que os JIs obtidos na primeira semana após o início da liberação deles na armadilha de White são mais vigorosos e preferíveis para uso nos testes e para conservação. No entanto, os JIs podem continuar saindo dos insetos por cerca de duas semanas. Os JIs encontram-se em uma suspensão de resíduos dos insetos e bactérias, e por isso devem ser retirados dela. Coletam-se os JIs de uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro em um becker de 80 ml e adiciona-se água para diluir a suspensão (Fig. 15). Deixa-se de meia a uma hora. Verificada a sedimentação dos JIs no fundo do recipiente, elimina-se cuidadosamente o sobrenadante e se repete o processo de diluição, precipitação e eliminação do sobrenadante por mais duas vezes.

Foto: Marcio Voss



Fig. 15. Purificação por sedimentação dos juvenis infectivos e eliminação de sobrenadante.

Pode-se, também, fazer um processo rápido, que é o de peneiramento, usando-se tamanho adequado para não se perder os JIs. Peneiras de 500 mesh são seguras, mas há nematoides que são retidos em 325 mesh ou menos. O peneiramento é menos prático quando se necessita trabalhar com muitos isolados ao mesmo tempo e pode, além disso, causar contaminações entre estirpes, devido à insuficiente eliminação de uma estirpe filtrada

imediatamente antes. O uso de água com temperatura superior a 70 °C é indicada para matar os nematoides restantes nos recipientes usados.

Contagem

A contagem direta é feita sob lupa, usando-se repetições, para fugir da variabilidade de tomada da amostra. Uma forma rápida para obter a concentração de Neps de uma suspensão é a descrita a seguir.

Com pipeta de deslocamento ativo, distribuem-se sete gotas de 20 µL sobre uma tampa de placa de Petri (Fig. 16). Indica-se usar concentrações ajustadas previamente por diluições aleatórias para obter-se cerca de 30 JIs por gota. Em microscópio estereoscópico conta-se o número de JIs de cada gota, descarta-se o número maior e o menor, e calcula-se a média das cinco gotas restantes. Por regra de três, calcula-se o volume de suspensão necessário para a inoculação de cada parcela ou inseto: concentração inicial x volume inicial = concentração final x volume final.

Foto: Marcio Voss



Fig. 16. Placa de Petri com sete gotas de 20 µL de suspensão homogênea de juvenis infectivos. Foto M.Voss.

Para se ter uma boa aproximação, deve-se ter os cuidados de se eliminar a água que fica aderida externamente à ponteira e se proceder a uma rigorosa homogeneização. A melhor homogeneização para JIs em suspensão é conseguida por retorno, usando-se dois recipientes. Para a primeira tomada de amostra para a contagem, fazem-se quatro retornos. Para as gotas seguintes, basta um retorno. Em um copo de becker pequeno, é necessário ter pelo menos 5 mL de volume para o procedimento. Caso se disponha de menor quantidade de suspensão de nematoides, pode-se usar pipeta, aspirando e ejetando a suspensão antes de cada gota amostrada.

As técnicas acima podem ser visualizadas no vídeo “Metodologias usadas na Embrapa Trigo para obtenção e manutenção de nematoides entomopatogênicos” (VOSS, 2009).

Testes de virulência de Neps contra insetos, em laboratório

Os testes para determinar a virulência de Neps sobre os insetos em laboratório podem ser conduzidos em papel filtro, sobre recipiente adequado, ou com os insetos imersos em areia ou em solo. Os substratos podem ser ou não esterilizados, conforme o objetivo dos testes.

Substrato

Testes preliminares de virulência podem ser feitos aplicando-se os Neps em papel filtro ou papel germiteste no fundo de placa de Petri (Fig. 17) ou de outro recipiente. Substratos como areia e solo são usados geralmente para os biotestes seguintes.

Foto: Marcio Voss



Fig. 17. Bioteste de virulência de Nep contra lagarta de *Spodoptera frugiperda* sobre papel germiteste, com folhas de milho para alimentação.

A areia normalmente é usada esterilizada, quando se objetiva obter resultados isentos da interferência de outros organismos.

O solo pode ser usado esterilizado ou sem esterilização. A não ser para casos de estudos específicos, a preferência de substrato para os biotestes de virulência de Neps para insetos de solo recai sobre o solo não esterilizado, pois este mimetiza as condições que o nematoide vai encontrar a campo, incluindo a exposição a predadores (Fig. 18). Deve-se lembrar que a esterilização produz alterações no solo, podendo levar a aumento na disponibilidade de elementos a níveis potencialmente tóxicos.

Foto: Marcio Voss



Fig 18. Bioteste de virulência de juvenis infectivos de nematoides entomopatogênicos em coró de *Demodema brevitarsis*, em copo plástico com solo.

O solo deve ser umedecido à capacidade de campo ou menos, para permitir o deslocamento e sobrevivência dos Neps. A porcentagem de umidade do solo com base no peso do solo não é uma referência adequada, pois a capacidade do solo de manter água varia com a textura e composição mineralógica. Por exemplo, a capacidade de campo pode ser de 35% em solo argilosos e apenas 12% em solo arenoso. O próprio conceito de capacidade de campo é vago: a grosso modo, capacidade de campo é aquela que o solo atinge três dias após uma chuva, ou seja, em que os macroporos ficam sem água, e os microporos ficam cheios, proporcionando aeração e umidade, simultaneamente. Assim, em trabalhos de pesquisa em que o conteúdo de água tem valor decisivo, deve-se determinar, em laboratórios especializados, a curva de retenção de água, que define mais precisamente o conteúdo de água do solo e as forças matriciais e osmóticas de retenção da água. Em ensaios preliminares, pode-se utilizar o conceito de capacidade de campo, sendo recomendável que a umidade esteja próxima, mas abaixo da capacidade de campo.

Normalmente, usa-se temperatura constante de 23 °C para a condução dos ensaios de virulência de Neps contra insetos, em laboratório.

Inoculação

Antes da inoculação, os nematoides devem ficar por 24 horas à temperatura escolhida para condução do ensaio. Os JIs devem ter, no máximo, 30 dias após a multiplicação, sendo preferível usá-los com menos de 15 dias. O período de tempo transcorrido entre a obtenção dos JIs e a aplicação dos mesmos deve ser explicitado na descrição dos materiais e métodos do ensaio.

A aplicação do inóculo pode ser feita diretamente no inseto e no papel, homogêaneamente na areia ou no solo, ou aplicada sob ou sobre a superfície de areia ou de solo. Este último é o modo preferível, pois é o mais utilizado a campo. Em todos os casos, deve-se repetir a homogeneização dos Neps na suspensão a cada inoculação de parcela. Deve-se, também, colocar água na testemunha em volume correspondente ao aplicado nas parcelas dos

tratamentos, usando água de mesma procedência. A quantidade de nematoides a ser usada não é pré-definida, mas é comum o uso de 100 JIs por larva de inseto, podendo-se chegar a 1000 ou mais por inseto mais resistente aos Neps. De qualquer modo, após determinar-se que existe virulência do isolado de Nep contra o inseto em estudo, deve-se estudar a dose-resposta, em busca de quantidade economicamente factível para inocular, a campo.

Cuidados com os insetos

Os insetos devem ficar à temperatura do ensaio por um a dois dias antes da instalação do mesmo.

Deve-se ter cuidados com o vigor dos insetos a serem utilizados nos ensaios. Insetos estressados por falta de comida ou manutenção imediatamente precedente à instalação do ensaio podem produzir resultados peculiares e pouco representativos. Quando em fases móveis, uma forma de evitar o emprego de insetos debilitados é colocá-los sobre o solo ou areia e deixar penetrar nesse substrato. Os que não conseguem adentrar o substrato são descartados. Deve-se colocar alimento nas parcelas para os insetos em fase ativa (Fig. 19).

Foto: Marcio Voss



Fig. 19. Coró rizófago, com raízes de trigo, em parcela com solo como substrato.

A fase do inseto deve ser homogênea e definida, com a ajuda de especialista. É recomendável obter-se medidas do inseto, seja de comprimento, de peso, ou ambos. A perda de peso é um dos parâmetros usados para definir a efetividade de agentes de controle de insetos, indicando problemas alimentares induzidos pelo agente usado. Por outro lado, insetos de tamanhos diferentes, embora dentro de mesma fase do ciclo, podem apresentar respostas diferentes aos Neps.

Avaliações

A variável avaliada nos testes de virulência de Neps é a da mortalidade dos insetos. Outros parâmetros são selecionados conforme o objetivo do estudo, como capacidade reprodutiva, distância de deslocamento no solo, tempo de sobrevivência, etc.

As observações de mortalidade ou de alterações provocadas nos insetos pelos Neps devem ser feitas periodicamente, conforme a espécie. Verificações diárias ou a cada três dias são indicadas no caso de insetos mais sensíveis aos Neps, ou com resposta desconhecida. Insetos mais resistentes, como no caso de larvas de *Scarabaeidae* (corós), devem ser vistoriados a cada semana, por períodos de um mês. Ao morrer por ataque de Neps, alguns insetos podem mostrar coloração diferente, facilitando a atribuição da morte ao agente. Insetos mortos por *Heterorhabditis* x *Photorhabdus* apresentam coloração inicial avermelhada, tornando-se marrom, em seguida (Fig. 20). Insetos mortos por *Steinernema* x *Xenorhabdus* podem ficar com um tom de marrom mais claro do que os mortos por *Heterorhabditis* (como no caso do *T. molitor*), mas geralmente ficam mais escurecidos (como no caso de *G. mellonella*) ou amarelados.

Foto: Marcio Voss



Fig. 20. Lagarta de *Spodoptera frugiperda* morta por *Heterorhabditis*. Foto M. Voss.

Os resultados da mortalidade dos insetos normalmente são apresentados e analisados como porcentagem, após correção da mortalidade da testemunha com a fórmula de Abbott (1925), que desconta a mortalidade da testemunha. Por isso, um número grande de insetos para cada parcela (geralmente dez) é indicado. Insetos canibais ou agressivos devem ser colocados isoladamente, somando-se aos outros para a formação da parcela. Para análise estatística, as porcentagens são transformadas em arcoseno.

O número de insetos mortos no tratamento, subtraído do número de insetos mortos na testemunha, pode ser considerado como resultante do tratamento. Mas, eventualmente, há necessidade de se confirmar a presença de Neps ou sua multiplicação. No último caso, coloca-se o inseto morto em armadilha de White para se obter novos JIs, enquanto, no primeiro caso, pode-se abrir o inseto e verificar a presença de Neps sob lupa. Para evitar o processo trabalhoso de dissecação dos insetos, podem ser usadas enzimas para decompor os tecidos do inseto. A pepsina a 8% (Anexo), em agitador a 120 rpm, leva pouco mais de 1 hora a 37 °C para desfazer os tecidos do

inseto previamente dissecado. Após a digestão, as placas podem ser guardadas em geladeira por vários dias enquanto não são contadas.

Exemplos de avaliações especiais de Neps

Determinação da concentração letal de isolados de Neps sobre larvas de insetos

Determina-se a concentração letal capaz de matar pelo menos 50% (CL₅₀) ou 90% da população (CL₉₀). Essas determinações são usadas para padronização e controle de qualidade de inoculantes. A seguir fornece-se um exemplo de determinação de CL em *Diloboderus abderus*. Os tratamentos consistem de concentrações crescentes de JI: 0 (testemunha), 100, 200, 400, 800, 1.200 JI por larva de um inseto. Cada repetição é composta por cinco larvas. Recomenda-se o uso de 10 repetições por tratamento. A porcentagem de mortalidade de larvas corrigida pela fórmula de Abbott (1925) é submetida à análise de Probit pelo programa Polo Plus 1.0 ($P \leq 0,05$) (LEORA, 2008), obtendo-se curva de mortalidade que permite definir a CL₅₀ ou CL₉₀. Vide GLAZER & LEWIS (2000).

Testes de compatibilidade de Neps com produtos fitossanitários

Para determinar a compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos, pode-se adotar a metodologia sugerida por Negrisoni Júnior et al. (2008), baseado na metodologia de Vainio (1992). Um litro de calda de cada produto deve ser preparado com o dobro da concentração desejada. Desta solução, alíquotas de 1 mL de cada produto são colocadas em cinco tubos de vidro de fundo chato, aos quais são adicionados 2.500 JIs de cada nematoide contidos em 1 mL de água destilada e agitados, considerando-se cada tubo uma repetição. O bioensaio deve ser conduzido em câmara climatizada a 22 ± 1 °C; UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

São avaliadas a mortalidade dos JIs e a manutenção da capacidade infectiva.

A mortalidade dos nematoides deve ser avaliada 48 horas após exposição aos produtos. Assim, uma alíquota de 0,1 mL da suspensão é retirada, observando-se 100 JIs sob microscópio estereoscópico. São considerados mortos aqueles que não se movimentam e não respondem a toque, agitação da suspensão ou de estímulo químico, como a adição de Oxamil (10 a 50 mg/L), por exemplo.

A infectividade dos nematoides é testada como descrito a seguir:

Os tubos com os tratamentos são completados com água destilada (3 mL) e deixados para decantar por meia hora em câmara climatizada a 12 ± 1 °C. O sobrenadante (cerca de 3 mL) deve ser descartado e a lavagem repetida por três vezes. Após a última lavagem, 0,2 mL (cerca de 100 JIs) são retirados do fundo de cada tubo e pipetados em cinco placas de Petri (9 cm de diâmetro) com papel filtro umedecido previamente com 1,8 mL de água destilada por tratamento. Cada placa é considerada como uma repetição e recebe dez lagartas de último instar de *G. mellonella*, sendo mantida em câmara climatizada nas mesmas condições do teste anterior, durante cinco dias. As lagartas mortas são transferidas para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo uma folha de papel seco e mantidas no escuro por mais três dias, sendo submetidas à dissecação para a verificação da presença de

nematoides. O delineamento do experimento é inteiramente ao acaso, sendo os valores de mortalidade de JIs submetidos à análise de variância e teste de comparação entre as médias dos tratamentos ($P \leq 0,05$).

O efeito dos tratamentos sobre a infectividade dos Neps sobre lagartas de *G. mellonella* é classificado conforme sugerido por Peters & Poullot (2004), baseando-se no protocolo da Organização Internacional para o Controle Biológico e Integrado de Animais e Plantas Nocivas (*International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants-IOBC*), por meio da fórmula:

$$E\% = 100 - (100 - \text{mortalidade corrigida}) \times (100 - \text{Red})$$

onde:

E% : efeito sobre a infectividade.

Mortalidade corrigida: porcentagem de mortalidade corrigida conforme Abbott (1925).

Red: porcentagem de redução da infectividade no tratamento.

$$\text{Mortalidade corrigida} = (M_t - M_c/100 - M_c) \times 100$$

onde:

Mt: porcentagem de mortalidade no tratamento.

Mc: mortalidade na testemunha (controle).

A porcentagem de redução da infectividade dos Neps deve ser calculada através da fórmula:

$$\text{Red} = (1 - I_t/I_c) \times 100,$$

onde:

Red: porcentagem de redução da infectividade no tratamento.

It: mortalidade nos tratamentos.

Ic: mortalidade na testemunha (controle).

Com base no valor de E%, os produtos são classificados como:

- 1: inócuo (< 30%);
- 2: levemente nocivo (30% a 79%);
- 3: moderadamente nocivo (80% a 99%) e
- 4: nocivo (>99%).

Teste de eficiência da mistura de inseticidas e Neps contra pragas

Diferentes fases (larva, ninfa, pupa ou adulto) do inseto-alvo podem ser expostas aos tratamentos em recipientes plásticos (150 mL) ou outro tipo de recipiente (descartável ou autoclavável, de preferência) contendo como substrato areia umedecida (10%, p/p), além de dieta natural ou artificial no caso de insetos em fase ativa. Os tratamentos são os seguintes: 1) produto fitossanitário na subdose desejada; 2) nematoides entomopatogênicos e 3) a combinação de cada produto (subdose) e cada nematoide, sendo considerado como uma repetição um grupo de 10 insetos, totalizando 10 repetições por tratamento. A aplicação tópica dos tratamentos pode ser feita

utilizando-se micropipeta (100 µL de capacidade) ou torre de Potter na dose correspondente ao que seria aplicado em um hectare, expressa em microlitros por centímetro quadrado. A concentração de nematoides pode ser padronizada a 100 JIs por recipiente (= 2,6 JIs por cm²) ou ajustada em bioensaio preliminar. Os insetos devem ser individualizados, sendo a mortalidade registrada 2 e 4 dias após a aplicação. O delineamento experimental é fatorial, sendo os valores de mortalidade submetidos à análise de variância e posterior teste de comparação entre as médias dos tratamentos ($P \leq 0,05$).

Uma das formas de se avaliar o efeito da interação dos inseticidas e nematoides sobre a praga é através do teste binomial para comparação da percentagem de mortalidade observada e estimada, de Robertson & Preisler (1992), modificado por Nishimatsu & Jackson (1998). Neste caso, a porcentagem de mortalidade esperada é obtida pela fórmula:

$$P_e = P_o + (1 - P_o) + (1 - P_o) (1 - P_1) (P_2)$$

onde:

P_e : mortalidade esperada na combinação de Neps e inseticidas;

P_o : mortalidade na testemunha (mortalidade natural do inseto);

P_1 : mortalidade após tratamento somente com inseticida;

P_2 : mortalidade após tratamento somente com nematoide.

O valor de qui-quadrado (X^2) é calculado pela fórmula:

$$X^2 = (L_o - L_e)/L_e + (P_o - P_e)/P_e$$

onde:

L_o : número observado de insetos vivos;

L_e : número esperado de insetos vivos;

P_o : mortalidade observada na combinação inseticida-Nep.

Para conhecer o valor de $X^2 = 3,84$, tabelado, deve-se considerar um grau de liberdade (n-1) e $P = 0,05$, sendo

interação aditiva indicada por $X^2 < 3,84$,

antagonismo indicado por $X^2 < 3,84$ e $P_o < P_e$ e

sinergismo indicado por $X^2 < 3,84$ e $P_o > P_e$.

III Identificação de nematoides

Vanessa Andaló

Introdução

O número de novas espécies de nematoides entomopatogênicos, descritas com potencial para o biocontrole, vem crescendo significativamente desde a última década. Atualmente, 56 espécies estão descritas na família *Steinernematidae* e 12 no gênero *Heterorhabditidae*. A descoberta de novas espécies está associada à necessidade de alternativas biológicas para o manejo de insetos-praga (HUNT, 2007; MALAN et al., 2008).

A correta identificação desses organismos requer o uso de ferramentas apropriadas, incorporando às técnicas tradicionais, como estudos morfológicos e morfométricos, os estudos moleculares, a fim de alcançar as expectativas de uma precisa identificação ou diagnose do grupo em estudo. A relativa falta de características morfológicas diferenciais e sua limitada utilidade na identificação e/ou diagnose de muitos grupos de nematoides têm resultado em uma maior exploração dos métodos moleculares. Essas técnicas têm fornecido importantes idéias sobre a biodiversidade e a evolução de nematoides (ADAMS & NGUYEN, 2002).

Atualmente, é possível identificar isolados, ou mesmo novas espécies, com maior exatidão, através de métodos como a eletroforese, a análise de restrição enzimática (RFLP- *Restriction fragment length polymorphism*), a amplificação polimórfica casual de DNA (RAPD-*Random amplification of polymorphic DNA*) e o teste de PCR (*Polymerase chain reaction*) (ALBERTS et al., 1994).

Fixação e conservação de nematoides entomopatogênicos

A observação de Neps em microscópio é facilitada quando estes são fixados. Além disso, este processo aumenta o tempo de conservação desses organismos. Para isso, estes podem ser colocados em solução salina de Ringer (Anexo) a 60 °C durante 2 minutos. Posteriormente, são transferidos para o fixador TAF (Anexo), para confecção de lâminas semi-permanentes, com as quais podem ser observados os caracteres morfológicos de juvenis infectantes, machos e fêmeas em microscopia óptica de luz (Fig. 21). Para melhor conservação, são mescladas partes iguais da suspensão de nematoides com formalina a 4% (KAYA & STOCK, 1997).

Análise morfométrica e morfológica de nematoides entomopatogênicos

Fonte: Poinar, 1979.

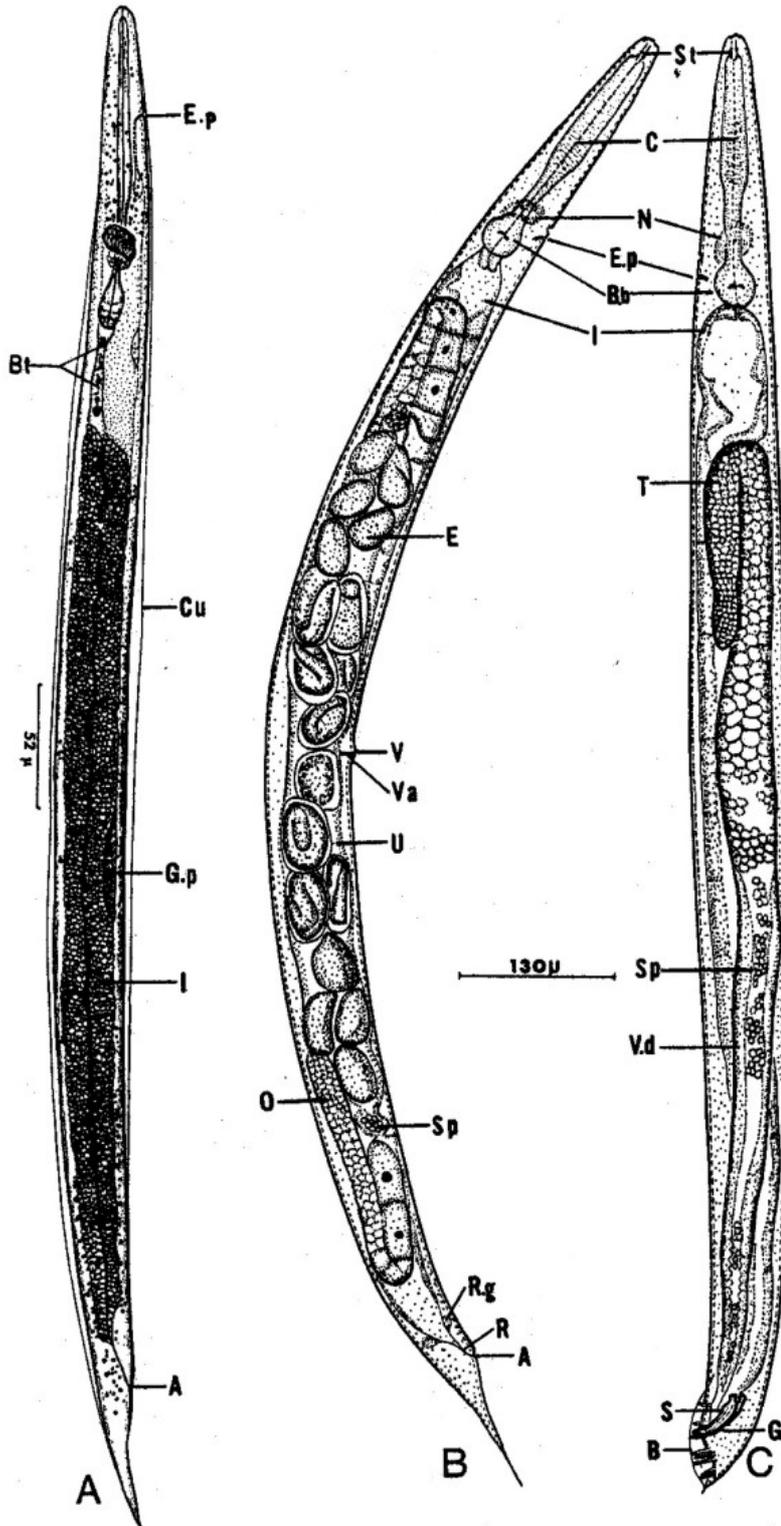


Fig. 21. A. Juvenil infectivo de *Steinernema carpocapsae*. B. Estruturas de fêmea. C. Estruturas de macho.
 A: Ânus; B: Bursa com papilas; Bt: Bactérias; Bb: Bulbo basal valvulado da faringe; C: Corpo excretor; Cu: Cutícula remanescente do segundo estágio; E: Ovo; Ep: Poro excretor; G: Gubernáculo; Gp: Primórdio gonadal; I: Intestino; N: Nervo em anel; O: Ovário; R: Reto; Rg: Glândula retal; S: Espícula; Sp: Espermateca; St: Estoma; T: Testículo; U: Útero; V: Vulva; Va: Vagina.

Microscopia óptica

Para estudos morfológicos, as fêmeas de primeira geração (hermafroditas), as fêmeas de segunda geração e os machos são obtidos através da dissecação dos insetos infectados após 3-4 dias para as fêmeas hermafroditas e 6-7 dias para fêmeas anfimíticas e machos, após a morte do inseto. Os JIs de terceiro estágio são obtidos durante os dois primeiros dias após a emergência destes dos cadáveres dos insetos (NGUYEN et al., 2006; NGUYEN & SMART, 1995a). São comumente usadas larvas de insetos da espécie *G. mellonella* ou *T. molitor*.

Para microscopia de luz, pelo menos 20 machos e fêmeas (20 para cada estágio) e 25 juvenis infectantes devem ser examinados. Os Neps são mortos e fixados em TAF como sugerido por Courtney et al. (1955) e espécimens adicionais são transferidos para lactofenol (FRANKLIN & GOODEY, 1949), a fim de que estruturas morfológicas sejam melhor observadas. Os nematoides fixados em TAF são colocados em glicerina utilizando o método de Seinhorst (SEINHORST, 1959). Suportes para lamínula são usados em todos os casos para evitar achatamento dos espécimens (Fig. 22).

As medidas a serem observadas em juvenis infectantes são:

L = comprimento total do corpo;

W = maior largura do corpo;

NR = distância da extremidade anterior ao anel nervoso;

EP = distância da extremidade anterior ao poro excretor;

ES = comprimento do esôfago;

T = comprimento da cauda;

ABW = largura do corpo na altura do ânus;

Hyaline = porção entre a cutícula interna e a externa.

Usam-se também os seguintes índices:

$D (\%) = (EP/ES)$;

$E (\%) = (EP/T)$;

$H/T (\%) = (Hyaline/T)$;

$a = (L/W)$;

$b = (L/ES)$;

$c = (L/T)$.

Nas fêmeas de primeira e segunda geração, as medidas são:

L;

W;

NR;

EP;

ES;

ABW;

T;

STW = largura do estoma;

STL = comprimento do estoma;

V = distância da vulva à extremidade anterior;

V (%) = distância da porção anterior à vulva/tamanho do corpo x 100.

As medidas morfométricas em machos são:

L;

W;

NR;

EP;

ES;

ABW;

T;

SP = tamanho da espícula;

SW = maior largura da espícula;

GU = comprimento do gubernáculo (Fig. 22A);

TR = testículo reflexo;

D%;

SW (%) = SP/ABW;

GS (%) = GU/SP.

Fonte: Andaló et al., 2006.

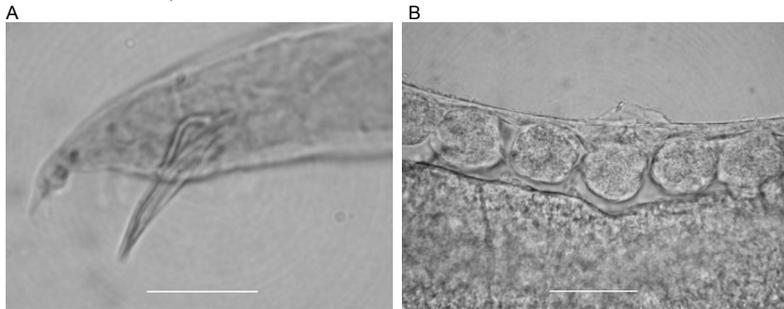


Fig. 22. Imagens de microscopia óptica de *Heterorhabditis* sp. A. Espícula e gubernáculo de macho. B. Vulva de fêmea anfimítica. Escala: A = 7,5 μ m; B = 23 μ m.

A morfologia da bursa é determinada apenas para espécies do gênero *Heterorhabditis*. Os machos são transferidos para um disco com lactofenol em uma chapa aquecida a 65-70 °C. Após 30 minutos, um macho é transferido para uma gota de lactofenol em uma lâmina. A parte anterior do macho é removida e, em seguida, uma lamínula é colocada sobre a gota de lactofenol contendo a parte posterior do nematoide, observando-se dez

machos (NGUYEN et al., 2004). A quantidade e distribuição das papilas na bursa são características usadas para diferenciação de espécie (Fig. 23).

Fonte: Andaló et al., 2006.

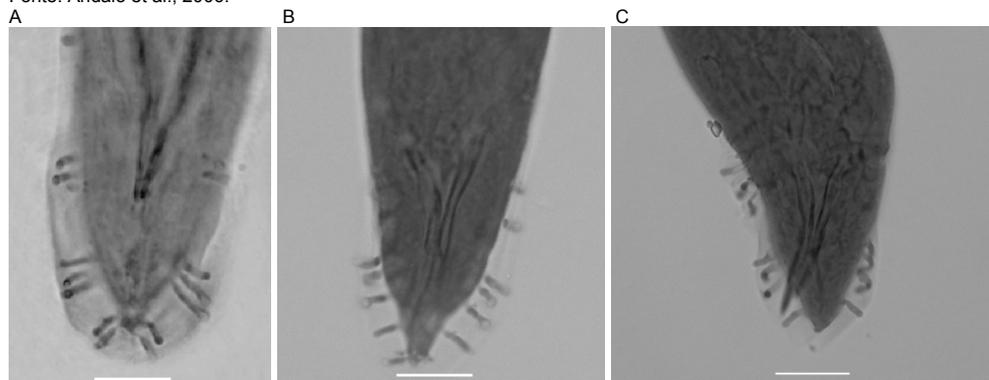


Fig. 23. *Heterorhabditis* sp. Região da cauda de macho com papilas da bursa. Escala: A = 6,0 µm; B= 8,7 µm; C= 13 µm.

Microscopia eletrônica de varredura

Adultos e JIs de Neps são fixados em glutaraldeído 3% com 0,1 M cacodilato de sódio, pH 7,2 por 24 h a 8 °C. Os Neps são pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 2% por 12 h a 25 °C, desidratados em etanol, obtendo-se o ponto crítico com CO₂ líquido. Posteriormente são montados em suportes para microscopia e cobertos com ouro (NGUYEN & SMART, 1995b). As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura possibilitam melhor visualização das estruturas externas do corpo do Nep, auxiliando na comparação e diferenciação entre nematoides (Fig. 24).

Fonte: Andaló et al., 2006.

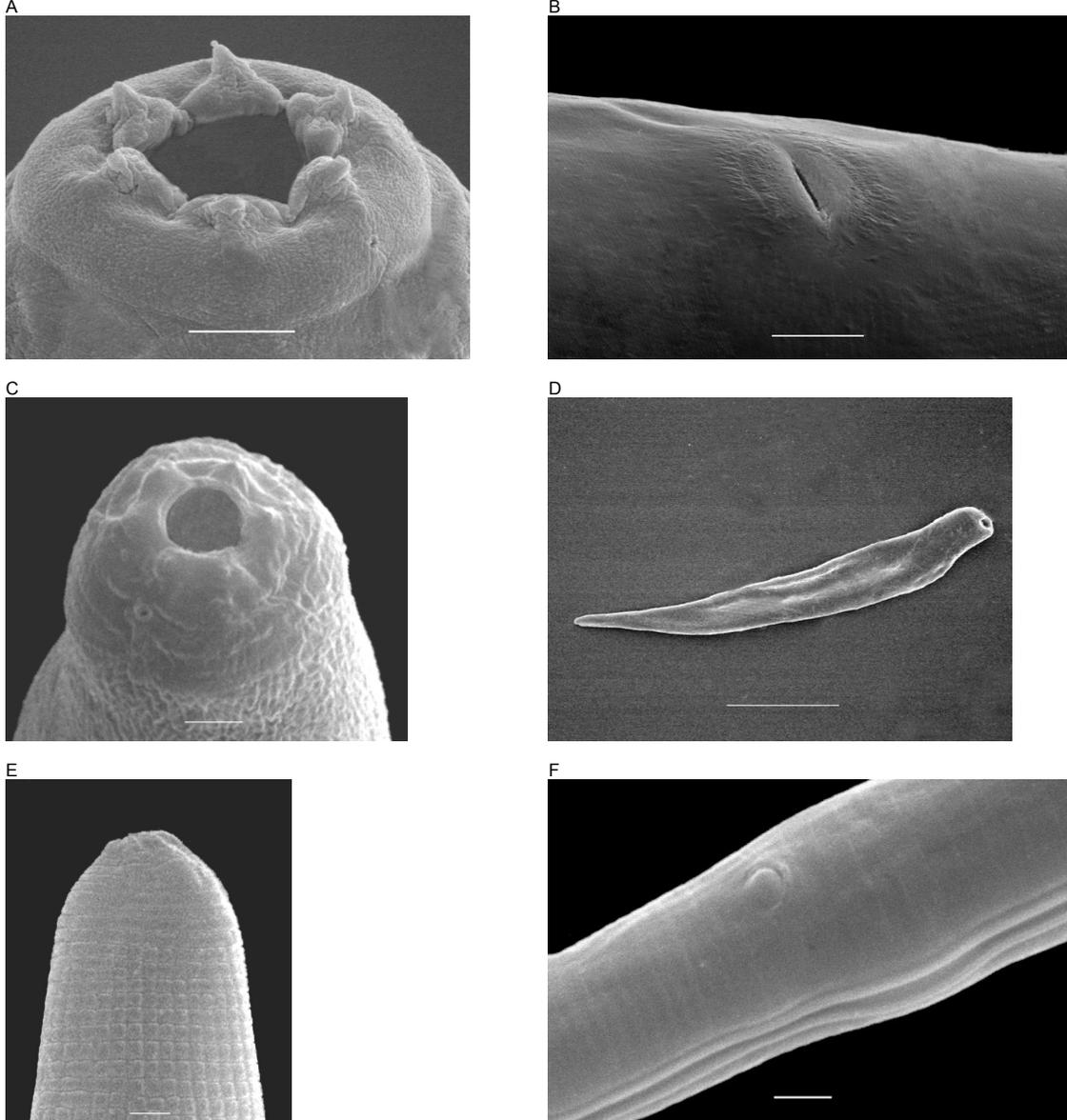


Fig. 24. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Heterorhabditis sp.* A: Região anterior de fêmea hermafrodita; B: Vulva de fêmea hermafrodita; C: Região anterior de macho; D: Espícula; E: Região anterior de juvenil infectante; F: Região posterior de juvenil infectante mostrando campo lateral e ânus. Escala: A = 8,6 μm ; B = 20 μm ; C = 2 μm ; D = 33,4 μm ; E = 4 μm ; F = 2 μm .

Caracterização molecular de Neps

Extração de DNA

O DNA é extraído de uma fêmea hermafrodita ou JIs como descrito por Nguyen et al. (2001). Para isso, estes são macerados em 20 μL , quando fêmea, e 10 μL , quando juvenil infectante, de suspensão composta por 50 mM de KCl, 10 mM de Tris pH 8,3, 2,5 mM de MgCl_2 , 0,45% de NP04, 0,45% de Tween 20, 0,01% de gelatina e 60 $\mu\text{g/mL}$ de proteinase K e transferidos 0,5 mL para microcentrífuga. Esses tubos são congelados a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ por 10

minutos, depois incubados a 65 °C por 1 hora e posteriormente incubados em 95 °C por mais 10 minutos. Esses processos são feitos para completar a quebra das células, a digestão de proteínas e para inativar a proteinase K, respectivamente. Em seguida, os tubos são colocados em gelo e centrifugados em 12.000 rpm por 2 minutos. Coleta-se o sobrenadante com o DNA e mantém-se a 4 °C para uso subsequente (NGUYEN et al., 2001).

Amplificação de PCR

O próximo passo a ser seguido é a amplificação de PCR, na região ITS do DNA ribossomal.

A amplificação do PCR é feita usando os “primers”:

18S: 5_-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3_ (frente) e

26S: 5_-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3_ (reverso).

Os “primers” internos usados são:

58P = 5'-ACGAATTGCAGACGCTTAG-3' (frente) e

H58R = 5'-GTGCGTTCAAACCTTCACC-3' (reverso) (NGUYEN et al., 2004).

A região ITS é amplificada em uma reação usando 100 µL do kit DNA polimerase.

Para completar a reação, são usados 10 µL de 10x suspensão de PCR (composta por 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), adicionado de 2 µL de dNTP, 2 µL do “primer” à frente, 2 µL do “primer” oposto, 0,5 µL de Thermalase Thr, 74 µL de água destilada e 10 µL do extrato do DNA.

As reações são conduzidas em ciclos padrões:

1 ciclo de 94 °C por 7 minutos seguido de

35 ciclos a 94 °C por 1 minuto; posteriormente

1 ciclo a 45 °C por 1 minuto,

1 ciclo de 72 °C por 1 minuto e

1 ciclo de 72 °C por 10 minutos.

Estes ciclos devem ser ajustados de acordo com o Nep em que se deseja a amplificação do DNA (NGUYEN et al., 2004).

Sequenciamento

Após a amplificação, é feito o sequenciamento. Os produtos do PCR são sequenciados bi-direcionalmente. O produto do sequenciamento é precipitado em etanol a fim de remover “primers” e nucleotídeos não incorporados. Para isso, 1 µL de acetato de sódio 3 M, pH 4,06 e 25 µL de etanol a 95% são adicionados a 10 µL da reação sequenciada, incubando em gelo por 10 minutos e centrifugando em microcentrifuga por 15 minutos. O pelete é lavado com etanol a 70% e seco em dessecador a vácuo.

As sequências completas da região ITS são alinhadas usando “software” para alinhamento Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e, então, ajustadas manualmente, usando MacClade 4.05 (MADDISON & MADDISON, 2002).

Análise filogenética

Análises filogenéticas podem ser feitas usando PAUP, (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*), conforme Swofford (2002). Para análise de parcimônia, as árvores mais curtas são obtidas usando “*branch and bound algorithm*”. *Caenorhabditis elegans* e *Pellioditis typica* são espécies usadas como grupo externo ao táxon e raiz da árvore.

Referências bibliográficas

- ABBOTT, W. S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 18, p. 265-267, 1925.
- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 1-33.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland, 1994. 1294 p.
- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. B.; MOINO JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brasil. **Nematology**, Leiden, v. 8, p. 853-867, 2006.
- BAI, C.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R.; HOPPER, K. R. Stabilization of beneficial traits in *Heterorhabditis bacteriophora* through creation of inbred lines. **Biological Control**, San Diego, v. 32, p. 220-227, 2005.
- BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. C.; GARCIA, M. S.; DOLINSKI, C. M.; NEGRISOLI JUNIOR, A. S.; BERNARDI, D.; NAVA, D. E. Efficiency of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul, Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 102, p. 6-13, 2009.
- BEDDING, R. A.; AKHURST, R. J. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**, Leiden, v. 21, p.109-110, 1975.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, p. 71–94, 1974.
- COURTNEY, W. D.; POLLEY, D.; MILLER, V. I. TAF, an improved fixative in nematode technique. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 39, p. 570-571, 1955.
- FRANKLIN, M.; GOODEY, J. B. A cotton blue lactophenol technique for mounting plant-parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, London, v. 23, p. 175-178, 1949.
- GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 365 p.
- GLAZER, I.; GAUGLER, R.; SEGAL, D. Genetics of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88: The diversity of beneficial traits. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 23, p. 324-333, 1991.
- GLAZER, I.; LEWIS, E. E. Bioassays of entomopathogenic nematodes. In: NAVON, A.; ASCHER, K. R. S. (Ed.). **Bioassays of entomopathogenic microbe and nematodes**. Boston: Cabi Publishing, 2000. 324 p.
- GRIFFIN, C. T.; BOEMARE, N. E.; LEWIS, E. E. Biology and behavior. In: GREWALL, P. S.; EHLERS, R. -U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (Ed.). **Nematodes as Biocontrol Agents**. Boston: Cabi Publishing, 2005. p. 47-64.
- HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopatogenic entomology**. Wallingford, UK: CAB International, 2002. p. 115-143.

- HOPPER, K. R.; ROUSH, R. T.; POWELL, W. Management of genetics of biological control introductions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 38, p. 27-51, 1993.
- HUNT, D. J. Overview of taxonomy and systematics. In: NGUYEN, K. B.; HUNT, D. J. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts**. The Netherlands: Brill NV, 2007. p. 27-57.
- JAGDALE, G. B.; CASEY, M. L.; GREWAL, P. S.; LUIS CAÑAS. Effect of entomopathogenic nematode species, split application and potting medium on the control of the fungus gnat, *Bradysia difformis* (Diptera : Sciaridae), in the greenhouse at alternating cold and warm temperatures. **Biological Control**, San Diego, v. 43, p. 23-30, 2007.
- KAYA, H. K.; STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 281-324.
- LEORA SOFTWARE COMPANY. **LeOra software**. Petaluma, CA, 2008.
- MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. **MacClade version 4.0**. Massachusetts, Sinauer Associates, 2002. 1 CD-ROM.
- MALAN, A. P.; NGUYEN, K. B.; WAAL, J. Y.; TIEDT, L. *Heterorhabditis safricana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**, Leiden, v. 10, p. 381-396, 2008.
- NEGRISOLI JR., A. S.; BARBOSA, C. R. C.; MOINO JR., A. Comparação entre metodologias de avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n. 1, p. 65-75, 2008.
- NGUYEN, K. B.; GOZEL, U.; KOPPENHÖFER, H. S.; ADAMS, B. J. *Heterorhabditis floridensis* n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Florida. **Zootaxa**, Auckland, v. 1177, p. 1-19, 2006.
- NGUYEN, K. B.; MARUNIAK, J.; ADAMS, B. J. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 33, p. 73-82, 2001.
- NGUYEN, K. B.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; STUART, R. J.; MCCOY, C. W.; JAMES, R. R.; ADAMS, B. J. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. **Nematology**, Leiden, v. 6 p. 231-244, 2004.
- NGUYEN, K. B.; SMART, G. C. Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida). **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 27, p. 206-212, 1995a.
- NGUYEN, K. B.; SMART, G. C. Scanning electron microscope studies of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). **Nematologica**, Leiden, v. 41, p. 183-190, 1995b.
- NISHIMATSU, T.; JACKSON, J. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 91, p. 410-418, 1998.
- NUGENT, M. J.; O'LEARY, S. A.; BURNELL, A. M. Optimised procedures for the cryopreservation of different species of *Heterorhabditis*. **Fundamental & Applied Nematology**, Montrouge, v. 19, p. 1-6, 1996.
- OARDC. **Insect parasitic nematodes**. Wooster, OH. Disponível em: <http://oardc.osu.edu/nematodes/>.
- Acesso em 1 dez. 2009.
- PETERS, A.; POULLOT, D. Side effects of surfactants and pesticides on entomopathogenic nematodes assessed using advanced IOBC guidelines. **IOBC/WPRS Bulletin**, Montfavet, v. 27, n. 6, p. 67-72, 2004.

- POINAR JR., G. O. Biology and taxonomy of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boston: CRC Press, 1990. p. 23-62.
- POINAR JR., G. O. **Nematodes for Biological Control of insects**, Boca Raton: CRC Press, 1979. 451p.
- POPIEL, I.; VASQUEZ, E. M. Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 23, p. 432-437, 1991.
- ROBERTSON, J. L.; PREISLER, H. K. **Pesticide bioassays with arthropods**. London: CRC Press, 1992. 127 p.
- SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep, 2004. 541 p.
- SEINHORST, J. W. A rapid method for transfer of nematodes from fixate to anhydrous glycerin. **Nematologica**, Leiden, v. 4, p. 67-69, 1959.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; GLAZER, I.; SEGAL, D. Trait stability and fitness of the heat tolerant entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* IS5 strain. **Biological Control**, San Diego, v. 6, p. 238-244, 1996.
- STOCK, S. P. Insect-parasitic nematodes: from lab curiosities to model organisms. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 89, p. 57-66, 2005.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP* phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 4876-4882, 1997.
- VAINIO, A. Guideline for laboratory testing of the side-effects of pesticides on entomophagous nematodes *Steinernema* spp. **IOBC/WPRS Bulletin**, Montfavet, v. 15, p. 145-147, 1992.
- VOSS, M. **Metodologias usadas na Embrapa Trigo para obtenção e manutenção de nematoides entomopatogênicos**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. Video, 8 min e 20 seg, DVD.
- WANG, X.; GREWAL, P. S. Rapid genetic deterioration of environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance. **Biological Control**, San Diego, v. 23, p. 71-78, 2002.
- WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, Washington, v. 66, p. 302-303, 1927.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. José Roberto Salvadori, ao Egidio Sbrissa e ao Dr. Paulo Roberto S.V. Pereira pelo apoio nas atividades do Laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa Trigo, e à Dra. Marineide A. Aguilera e Alcides Moino Jr. pelo incentivo no estudo dos Neps e pelos primeiros ensinamentos. Agradecem, também, aos estudantes que participaram das atividades de laboratório: Aline Esther da Silva, Amanda Nery da Silva, Débora Schalleberger, Diane Klincowsky, Eduardo S. L. Barreto, Graziela Franciscão, Juliana Salvadori, Renato Oliveira.

As atividades em nematologia entomopatogênica da Embrapa Trigo, entre os anos de 2007 e 2010, foram parcialmente financiadas pelo Convênio Agrofuturo.

Glossário

Anfimítico: produzido por união de dois gametas na reprodução sexual.

Anoxia: baixo teor de oxigênio.

Bulbo basal: alargamento da parede do esôfago, na parte posterior do esôfago de Nep (Nematoide entomopatogênico).

Bursa: extensão da cutícula lateral no final da cauda do macho de Nep.

Críptico: qualquer pequena cavidade de uma parte ou órgão vegetal.

Espermateca: bolsa da fêmea onde ficam armazenados os espermatozóides que servirão, mais tarde, para a fecundação.

Espícula: estrutura de penetração do nematoide adulto macho que é extrusível através da abertura cloacal e funciona durante a cópula para a transferência de esperma.

Estoma: cavidade bucal de Nep.

GPS: Sistema Global de Localização (*Global Positioning System*), sistema de navegação via satélite, disponibilizado pelos EUA, que permite a localização por coordenadas terrestres.

Gubernáculo: estrutura cuticularizada em nematoides machos que guia a espícula na cópula.

Hemocele: parte do inseto que contém a hemolinfa. É o alvo dos nematoides entomopatogênicos, que geralmente nele adentram perfurando o intestino do inseto.

Hemolinfa: líquido vital dos insetos, de cor esbranquiçada, equivalente ao sangue nos vertebrados.

Hermafrodita: indivíduo com órgãos reprodutivos de ambos os sexos.

Juvenil infectivo: fase do ciclo de vida de nematoide com características que lhe permitem infectar um hospedeiro.

Juvenil: estágio do nematoide equivalente ao de larva. Termo preferido para evitar confusão com o estágio imaturo de insetos.

Mermítideo: nematoide da família *Mermithidae*, parasita obrigatório de diversas espécies de invertebrados, que pode atingir 50 cm de comprimento, mas que, normalmente, tem de 1 a 10 cm. A espécie mais estudada para o controle biológico é *Romanomermis culicivorax*, parasita de larvas de mosquito.

Papilas: projeções da cutícula com função sensorial.

Anexo

Ágar Nutriente

3 g de extrato de levedura

5 g de Peptona

8 g de NaCl

15 g de ágar

1 L de água destilada ou deionizada

1. Aquecer até a dissolução do ágar.
2. Colocar em tubo de ensaio, se for o caso.
3. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
4. Verter o meio em placa de Petri, em câmara de fluxo laminar, e deixar solidificar.

(KAYA & STOCK, 1997)

Caldo Nutriente

3 g de extrato de levedura

5 g de peptona

8 g de NaCl

1 L de água destilada ou deionizada

Autoclavar a 121 °C, por 15 min.

(KAYA & STOCK, 1997)

Solução de pepsina

8 g de pepsina

23 g de NaCl

20 mL de HCl

940 mL de água destilada ou deionizada

Agitar até que os ingredientes se dissolvam.

Manter a 4 °C.

Para se ter maior certeza da atividade da enzima, indica-se preparar apenas o volume de uso imediato.

(KAYA & STOCK, 1997)

Solução de Ringer

9 g NaCl

0,4 g KCl

0,4 g CaCl₂

0,2 g NaH₂CO₃

1 L água destilada ou deionizada

(KAYA & STOCK, 1997)

NGM- Meio para crescimento de nematoide

Ágar 20 g

NaCl 1,5 g

Peptona 4,0 g

Colesterol 0,0008 g

Monofostato de Potássio 3,0 g

Fosfato básico de Potássio 0,5 g

1 L de água destilada ou deionizada

(BRENNER, 1974)

TAF

7 mL de formalina (40% de formaldeído)

2 mL de triethanolamina

91 mL de água destilada ou deionizada

(COURTNEY et al., 1955)

Embrapa

Trigo

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações da Unidade Presidente: **Leandro Vargas**

Anderson Santi, Antônio Faganello, Casiane Salete Tibola, Leila Maria Costamilan, Lisandra Lunardi, Maria Regina Cunha Martins, Sandra Maria Mansur Scagliusi, Sandro Bonow

Expediente Referências bibliográficas: Maria Regina Martins

Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

VOSS, M.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI JÚNIOR, A. S.; BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 44 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 119). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do119.htm>.