



NATALIA RAMOS MERTZ

**INTERAÇÕES ENTRE NEMATOIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS, O PREDADOR
Calosoma granulatum PERTY, 1830
(COLEOPTERA: CARABIDAE) E ESPÉCIES
VEGETAIS UTILIZADAS NA
DIVERSIFICAÇÃO AGRÍCOLA PARA O
CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (J. E.
SMITH, 1797)**

LAVRAS – MG

2013

NATALIA RAMOS MERTZ

**INTERAÇÕES ENTRE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS, O
PREDADOR *Calosoma granulatum* PERTY, 1830
(COLEOPTERA: CARABIDAE) E ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS
NA DIVERSIFICAÇÃO AGRÍCOLA PARA O CONTROLE DE
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH, 1797)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador

Alcides Moino Junior

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Mertz, Natália Ramos.

Interações entre nematóides entomopatogênicos, o predador *Colosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) e espécies vegetais utilizadas na diversificação agrícola para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) / Natália Ramos Mertz. – Lavras : UFLA, 2013.

137 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Alcides Moino Junior.

Bibliografia.

1. Organismos não-alvo. 2. Compatibilidade. 3. Deslocamento.
4. Forésia. 5. Infectividade. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 595.781

NATALIA RAMOS MERTZ

**INTERAÇÕES ENTRE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS, O
PREDADOR *Calosoma granulatum* PERTY
(COLEOPTERA: CARABIDAE) E ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS
NA DIVERSIFICAÇÃO AGRÍCOLA PARA O CONTROLE DE
Spodoptera frugiperda (J. E. SMITH, 1797)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Amarildo Pasini	UEL
Prof. Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho	UFU
Prof. Dr. Luis Cláudio Paterno Silveira	UFLA
Prof. Dr. Martin Francisco Pareja	UFLA

Prof. Dr. Alcides Moino Junior
Orientador

**LAVRAS – MG
2013**

Aos meus pais, Urbano e Noemi, e
ao meu amigo e parceiro, Marlon,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia (DEN) e ao CNPq, eu agradeço por todo o apoio e confiança.

Aos professores do Departamento de Entomologia, pelo carinho, ensinamentos e tempo dedicado à nossa formação como Entomólogos.

Ao professor Alcides Moino Jr, pela confiança, orientação e ajuda.

Ao professor Amarildo Pasini, que me auxiliou na metodologia de criação do *Calosoma granulatum* quando eu estava quase desistindo.

A todos os colegas do laboratório de Patologia de Insetos, em especial aos meus três anjos: Dona Irene, Judith e Fernanda, que foram muito importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos parceiros e amigos do grupo de autoajuda do almoço: DeJane, Juraci, Valkiria, William, Adriano e Judith, que foram os responsáveis pelas melhores horas do dia.

Um agradecimento adicional aos amigos Cristhiane e Martin, que me ajudaram nos momentos em que eu mais estava perdida.

À amiga Juliana, que mais uma vez dividiu comigo todas as alegrias e tristezas deste período e ajudou a torná-lo mais fácil.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me deram força, mesmo tão longe de mim.

Ao Marlon, que foi um companheiro excepcional, um excelente estagiário, ótimo conselheiro e o meu aconchego nessa fase de doutorado, mesmo com a distância nos separando.

Obrigada a todos!

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar”

Eduardo H. Galeano

RESUMO

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) são agentes de controle biológico de pragas no solo, suprimindo populações de insetos fitófagos naturalmente ou em programas de controle biológico. A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é suscetível a nematoides do gênero *Heterorhabditis*, principalmente quando vai ao solo para empupar. Outro inimigo natural desta lagarta é o besouro *Calosoma granulatum*, cujas larvas e adultos predam as fases larval, de pré-pupa e pupa de *S. frugiperda*, sendo considerado um dos principais agentes de controle natural de lagartas em sistemas agrícolas. Apesar de haver pouco conhecimento a respeito da compatibilidade entre os NEP e o predador e as possíveis interações entre eles, tanto o controle biológico, aplicado com NEP, quanto o natural, com o predador, podem ser potencializados com estratégias conservacionistas que aumentam a persistência dos nematoides e a população dos predadores no ambiente agrícola. Os objetivos deste trabalho visaram avaliar tais efeitos e interações. Para isso, realizaram-se experimentos de laboratório para avaliar o efeito direto de dois nematoides nativos do gênero *Heterorhabditis* sobre o predador, e foi observado que apenas o primeiro ínstar larval é suscetível aos NEP, quando aplicados topicamente em concentrações maiores que 150 JI (juvenis infectantes)/mL. Experimentos observacionais, com e sem chance de escolha alimentar, foram realizados. No primeiro, o predador possuía duas opções de presa, uma contaminada por NEP e a outra não. No segundo, avaliou-se a sua sobrevivência quando existia apenas uma dessas opções como alimento por tratamento. Foi constatado que, com outra opção alimentar, o predador evita lagartas infectadas quando estas já hospedam a bactéria simbiote do NEP, e quando são oferecidos somente cadáveres infectados, ocorre grande mortalidade de suas larvas. Avaliou-se, em laboratório, a capacidade que larvas de terceiro ínstar e adultos do predador têm em dispersar os NEP por forésia, constatando-se que ambos são bons agentes de dispersão e que o transporte de maior número de nematoides pelos adultos ocorre quando a distância percorrida é curta (10 cm), sendo estes capazes de carregá-los a distâncias maiores (40 cm). Em casa-de-vegetação, foram avaliadas a persistência e a capacidade de deslocamento em direção ao hospedeiro do NEP na presença de plantas utilizadas como adubo verde e para a atração de inimigos naturais. Os resultados indicaram que as plantas *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora* e *Tagetes erecta* não influenciam a infectividade, o deslocamento e a persistência do NEP em longo prazo. Porém, *C. spectabilis* proporcionou o maior número de NEP viáveis em curto prazo, e *T. erecta* causou uma rápida supressão populacional dos NEP aplicados inundativamente.

Palavras-chave: Compatibilidade. Organismos não-alvo. Forésia. Deslocamento. Infectividade.

ABSTRACT

The entomopathogenic nematodes (EPN) are biological control agents of pests in the soil, by suppressing phytophagous populations naturally or in biological control programs. *Spodoptera frugiperda*, is susceptible to nematodes of the genus *Heterorhabditis*, especially when the larvae drop to the ground and pupate. Another natural enemy of this caterpillar is *Calosoma granulatum* beetle, whose larvae and adults prey the larval, prepupal and pupal stages of *S. frugiperda* and is considered one of the main agents of natural control of insects on agricultural systems. Both biological control with EPN and the natural one using the predator, can be improved with conservation strategies that increases the persistence of nematodes' and predator's population in the agricultural environment. However, little is known about the compatibility between the EPN and the predator and the possible interactions among them, and there are few studies on the effects of plants used in agricultural diversification on the EPN. The objectives of this study were to evaluate such effects and interactions. Laboratory tests were conducted to evaluate the direct effect of two native nematodes of *Heterorhabditis* genus on *C. granulatum*. It was observed that only the first instar larvae are susceptible to EPN when applied topically at concentrations larger than 150 IJ (infective juveniles)/mL. Two observational tests with and without feeding choice were conducted. At first the predator had two feeding options, contaminated or not by EPN. In the second one, *C. granulatum* survivorship was evaluated when there was only one of these food options. With two feeding options the predator avoided infected larvae where they host the symbiotic bacteria of EPN, when there were only offered infected carcasses, there is a high mortality of predator's larvae. In another essay, we evaluated in laboratory the ability of third instar larvae and adult of *C. granulatum* to transport EPN by phoresy, confirming that both are good dispersing agents. The greater number of nematodes transported by adults occurred when the distance traveled was short (10 cm), but they are able to transport at greater distances (40 cm). In a greenhouse, we evaluated the nematodes' persistence and its ability to move towards *S. frugiperda* in the presence of plants used as green manure and to attract natural enemies. The results indicated that plants *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora* and *Tagetes erecta* did not affect the persistence, the infectivity and the dispersion of EPN at long-term. *C. spectabilis* obtained the largest number of viable nematodes at short-term and *T. erecta* caused a rapid population suppression of EPN applied as an inundative biological control agent.

Keywords: Compatibility. Non-target organisms. Phoresy. Displacement. Infectivity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Importância e controle de <i>Spodoptera frugiperda</i>	15
2.2	Controle biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i>	16
2.2.1	Utilização de nematoides entomopatogênicos para o controle de <i>Spodoptera frugiperda</i>	17
2.2.2	Importância dos predadores da família Carabidae no controle natural de <i>Spodoptera frugiperda</i>	19
2.3	A diversificação do sistema no manejo de pragas e sua interação com agentes de controle biológico.....	21
2.3.1	Conservação de nematoides entomopatogênicos.....	22
2.3.2	Conservação de predadores	24
2.4	Interação nematoides entomopatogênicos × predadores.....	26
	REFERÊNCIAS.....	28
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	40
	ARTIGO 1 Efeitos de nematoides entomopatogênicos sobre o predador <i>Calosoma granulatum</i> em laboratório	41
1	INTRODUÇÃO.....	43
2	MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1	Produção dos nematoides entomopatogênicos.....	46
2.2	Criação do predador <i>Calosoma granulatum</i> e de <i>Spodoptera frugiperda</i>	46
2.3	Efeito da aplicação direta de nematoides <i>Heterorhabditis amazonensis</i> isolado RSC 5 e <i>Heterorhabditis amazonensis</i> isolado JPM 4 sobre o predador <i>Calosoma granulatum</i>	48
2.4	Testes de alimentação com chance de escolha	49
2.5	Teste de alimentação sem chance de escolha	52
3	RESULTADOS	54
3.1	Efeito da aplicação direta de nematoides <i>Heterorhabditis amazonensis</i> isolado RSC 5 e <i>Heterorhabditis amazonensis</i> isolado JPM 4 sobre o predador <i>Calosoma granulatum</i>	54
3.2	Teste de alimentação com chance de escolha.....	56
3.3	Teste de alimentação sem chance de escolha	61
4	DISCUSSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	73
	ARTIGO 2 Dispersão forética de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> pelo predador <i>Calosoma granulatum</i> , em laboratório	79
1	INTRODUÇÃO.....	81
2	MATERIAIS E MÉTODOS	85

2.1	Produção do nematoide entomopatogênico	85
2.2	Criação do predador <i>Calosoma granulatum</i>	85
2.3	Ação de adultos e larvas do predador na forésia de NEP em diferentes concentrações.....	86
2.4	Efeito da distância na forésia do NEP pelo adulto do predador	87
2.5	Avaliação dos experimentos: Extração e quantificação dos nematoides	88
2.6	Análise de dados	89
3	RESULTADOS	90
3.1	Ação de adultos e larvas do predador na forésia de NEP em diferentes concentrações.....	90
3.2	Efeito da distância na forésia do NEP pelo adulto do predador	93
4	DISCUSSÃO	95
	REFERÊNCIAS	100
	ARTIGO 3 Efeito de plantas utilizadas na diversificação agrícola sobre o nematoide <i>Heterorhabditis amazonensis</i> em casa-de-vegetação.....	107
1	INTRODUÇÃO	109
2	MATERIAIS E MÉTODOS	112
2.1	Produção do nematoide entomopatogênico	112
2.2	Criação de <i>Calosoma granulatum</i>	112
2.3	Cultivo das plantas.....	113
2.4	Experimento de persistência	113
2.5	Experimento de deslocamento	116
2.6	Análise dos dados	118
3	RESULTADOS	119
3.1	Experimento de persistência	119
4	DISCUSSÃO	124
	REFERÊNCIAS	130
1	CONCLUSÕES GERAIS	136

1 INTRODUÇÃO

A agricultura sustentável vem crescendo nas últimas décadas, devido, principalmente, aos efeitos dos inseticidas sintéticos sobre mamíferos e organismos não-alvo, e ao desenvolvimento de resistência em insetos herbívoros. Por este motivo, técnicas alternativas de controle de pragas têm sido buscadas por agricultores e pesquisadores, e muitos destes sustentam hipóteses acerca da redução populacional de insetos fitófagos como consequência do aumento da biodiversidade agrícola (GURR; WRATTEN; LUNA, 2003).

Os trabalhos realizados com este propósito envolvem o favorecimento de inimigos naturais no sistema através da manipulação ou introdução de plantas que dispõem de recursos extras, como pólen e néctar, ou presas/hospedeiros alternativos, que são refúgios e locais de acasalamento e oviposição para inimigos naturais ((LANDIS; WRATTEN; GURR, 2000). Estas plantas podem ser cultivadas ou não e arrançadas de diferentes formas no sistema: como em faixas nas entrelinhas, na bordadura ou formando “ilhas” em diferentes locais na cultura. São vários os inimigos naturais beneficiados com a diversificação do sistema, como parasitoides (BAGGEN; GURR, 1998), predadores de partes aéreas (PERDIKIS et al., 2007) e predadores de solo (VARCHOLA; DUNN, 2001). Além disso, pesquisas mostram que ambientes em policultivo também atuam a favor de entomopatógenos (JABBOUR; BARBERCHECK, 2008).

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto-praga extremamente polífago que ataca diversas culturas, como alfafa, algodão, amendoim, arroz, aveia, batata, cana-de-açúcar, soja, hortaliças e, principalmente, gramíneas (LEIDERMAN; SAUER, 1953), e é considerada a principal praga da cultura do milho (CRUZ; TURPIN, 1983). Os danos causados por ela são variados, podendo matar plantas novas por se alimentar do cartucho do milho ou inviabilizar a comercialização dos grãos

por se alimentar da espiga (GASSEN, 1996). Sob o ponto de vista da conservação dos inimigos naturais na cultura de milho, estudos mostram que a diversificação do cultivo e seu plantio consorciado ou próximo às áreas florestais aumentam o número de inimigos naturais e também o controle biológico da lagarta (BASTOS et al., 2003; SOUSA et al., 2011).

Os predadores da família Carabidae, inimigos naturais da lagarta-do-cartucho, ocorrem em todo o Brasil e são coletados com grande frequência em trabalhos de levantamentos sobre inimigos naturais (BRONDANI et al., 2008; CIVIDANES; CIVIDANES, 2008), sendo muito eficientes no controle biológico natural desta lagarta (MENALLED; LEE; LANDIS, 1999). Como a maioria dos predadores, são também beneficiados pela diversificação do sistema agrícola (KROMP, 1999; PENAGOS et al., 2003). Além dos predadores, os nematoides entomopatogênicos (NEP) também têm destaque como agentes de controle biológico da lagarta-do-cartucho, sendo que trabalhos mostram grande eficiência de várias espécies das famílias Steinernematidae (FUXA; RICHTER; AGUDELO-SILVA, 1988; GARCIA; RAETANO; LEITE, 2008) e Heterorhabditidae (ANDALÓ et al., 2010; MOLINA-OCHOA et al., 1996) no seu controle em experimentos de laboratório e de campo.

Com isso, a utilização do controle biológico aplicado, como com entomopatógenos, aliada com a maior diversidade de plantas no sistema, favorecendo o aumento de predadores, é uma estratégia interessante para o controle de pragas. Porém, para garantir sua eficiência, os inimigos naturais atraídos para o sistema não podem ser prejudicados pela utilização de nematoides, e estes não podem ter sua ação afetada pelas plantas utilizadas para aumentar a diversidade agrícola.

Considerando-se a importância econômica da lagarta-do-cartucho e as diferentes possibilidades de controlá-la biologicamente (controle aplicado com NEP e controle natural por predadores de solo - potencializado por plantas

benéficas para os inimigos naturais), o objetivo geral deste trabalho foi estudar a compatibilidade e os efeitos da interação entre essas formas de controle biológico. Para tal, foram confeccionados três artigos com os seguintes objetivos específicos:

Artigo 1:

- Avaliar, em laboratório, o efeito direto de quatro diferentes concentrações dos nematoides *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 e *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 sobre a mortalidade de todas as fases de desenvolvimento do predador *Calosoma granulatum*;
- Avaliar, em laboratório, o comportamento alimentar de adultos do predador quando ofertadas lagartas de *S. frugiperda* recém-infectadas por *H. amazonensis* isolado RSC 5 ou *H. amazonensis* isolado JPM 4 a lagartas saudáveis como opção alimentar;
- Avaliar, em laboratório, o comportamento alimentar de larvas de terceiro ínstar e adultos do predador quando ofertados cadáveres de lagartas de *S. frugiperda* infectadas pelos nematoides *H. amazonensis* isolado RSC 5 ou *H. amazonensis* isolado JPM 4 e mortas por congelamento como opção alimentar;
- Avaliar, em laboratório, a mortalidade e o consumo diário de larvas de terceiro ínstar e adultos do predador quando alimentados apenas com lagartas de *S. frugiperda* mortas pelos nematoides *H. amazonensis* isolado RSC 5 ou *H. amazonensis* JPM 4 ou mortas por congelamento;

Artigo 2:

- Avaliar, em laboratório, a capacidade de larvas de terceiro ínstar e adultos do predador de atuarem como agentes de dispersão forética de juvenis infectantes de *H. amazonensis* isolado RSC 5 em três diferentes concentrações;

- Avaliar, em laboratório, a capacidade de adultos do predador de atuar como agentes de dispersão forética de juvenis infectantes de *H. amazonensis* isolado RSC 5 em três diferentes distâncias;

Artigo 3:

- Avaliar, em casa-de-vegetação, o efeito das plantas *Crotalaria spectabilis* L., *C. breviflora* L. (Fabaceae) e *Tagetes erecta* L. (Astraceae) na persistência e infectividade de juvenis infectantes de *H. amazonensis* isolado RSC 5;
- Avaliar, em casa-de-vegetação, o efeito das plantas *C. breviflora* e *T. erecta* e do adulto do predador *C. granulatum* no deslocamento do nematoide *H. amazonensis* em direção ao hospedeiro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância e controle de *Spodoptera frugiperda*

A lagarta-do-cartucho *S. frugiperda* é uma praga cosmopolita que ataca diversas culturas, como algodão, batata, arroz, soja, hortaliças e gramíneas (LEIDERMAN; SAUER, 1953). Ela é considerada a principal praga da cultura do milho no Brasil, ocorrendo em todo o ciclo da cultura, e seus danos à produção podem variar quanto à cultivar utilizada, fase de desenvolvimento da cultura e local de plantio (SARMENTO et al., 2002).

Os danos causados pela lagarta derivam de sua alimentação das folhas e do cartucho, comprometendo o vigor das plantas e a produção dos grãos (GALLO et al., 2002). Quando ela ataca plantas de até 30 dias, pode matá-las e, em plantas maiores, reduzir a produtividade ao alimentar-se do parênquima das folhas, do broto central da planta e dos grãos da espiga (CRUZ; TURPIN, 1983). O maior prejuízo é causado pela destruição do cartucho, sendo que, quando a lagarta ataca a base da espiga, permite a entrada de microrganismos, podendo ainda causar a queda da mesma (ANDREWS, 1988). A lagarta alimenta-se do cartucho do milho e o abandona ao terminar seu desenvolvimento larval, deslocando-se ao solo para empupar (SARMENTO et al., 2002).

Normalmente, o controle dessa praga é curativo e feito quimicamente com produtos de alta toxicidade, ou tratando-se as sementes, mudas ou o sulco do plantio com piretroides ou inseticidas sistêmicos (GALLO et al., 2002). Além do controle químico, o advento da biotecnologia permitiu e popularizou o controle de lepidópteros-pragas através do cultivo de plantas de milho transgênicas que portam o gene da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), sendo capazes de produzir a proteína inseticida desta bactéria em seus tecidos (ARMSTRONG et al, 1995). Porém, a resistência da lagarta-do-cartucho a

inseticidas químicos (YU, 1991) e à proteína Bt em culturas transgênicas (STORER et al., 2010; TABASHINIK et al., 2003), os danos ao meio ambiente e aos inimigos naturais causados por estes produtos, além da pressão do mercado a favor de alimentos saudáveis e que causem poucos impactos ambientais no seu processo de produção têm feito com que muitos produtores adotem o controle biológico de pragas (ALVES, 1998).

2.2 Controle biológico de *Spodoptera frugiperda*

Os inimigos naturais da lagarta-do-cartucho têm grande importância para a cultura do milho, sendo que somente o controle biológico natural evita cerca de 50% da redução do rendimento de grãos causada por fitófagos (FIGUEIREDO; MARTIN-DIAS; CRUZ, 2006). Porém, além do controle biológico natural, os inimigos naturais podem ser adicionados ao sistema agrícola através do controle biológico aplicado, com a produção massal e aplicação de microrganismos entomopatogênicos, ou com a liberação de parasitoides e predadores. O controle microbiano da lagarta-do-cartucho pode ser feito com a utilização de bactérias, como Bt (POLANCZYK; SILVA; FIUZA, 2000; SALAMA et al., 1995); vírus, como o vírus da poliedrose nuclear (CRUZ et al., 1997) e, quando as lagartas deslocam-se para o solo, onde passam para a fase de pupa, podem ser controladas por NEP (FUXA; RICHTER; AGUDELO-SILVA, 1988; KAYA, 1993).

Já para o controle com artrópodes inimigos naturais, pode-se citar os parasitoides, importantes tanto para o controle natural quanto para o controle aplicado de *S. frugiperda*, sendo as principais espécies *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae), *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (LENTEREN; BUENO, 2003), *Campoletis sonorensis* Cameron (Hymenoptera: Ichneumonidae) (HOBALLAH et al., 2004) e

Chelonus insularis Cresson (Hymenoptera: Braconidae) (PENAGOS et al., 2003).

Quanto aos predadores que se alimentam de *S. frugiperda*, a maioria dos trabalhos publicados está relacionada ao controle biológico natural da praga. Dessa forma, podemos citar hemípteras da espécie *Geocoris uliginosus* Say (Hemiptera: Geocoridae) (BRAMAN et al., 2003), dermápteros do gênero *Doru* (Dermaptera: Forficulidae) (SUELDO; BRUZZONE; VIRLA, 2009; WYCKHUYS; O'NEIL, 2006) e diversos besouros das famílias Carabidae (KAGAWA; MAETO, 2007; PENAGOS et al., 2003; WYCKHUYS; O'NEIL, 2006; YOUNG, 2008).

2.2.1 Utilização de nematoides entomopatogênicos para o controle de *Spodoptera frugiperda*

A utilização de nematoides é uma boa alternativa para o controle de pragas, pois, além de não serem tóxicos para os mamíferos, têm rápida ação de controle, levando-as à morte entre 24 e 72 horas. Além disso, os nematoides têm o potencial para o estabelecimento em longo prazo no solo através de sua reprodução em hospedeiros infectados (ALVES, 1998; GAUGLER, 2002).

As duas principais famílias de NEP, Heterorhabditidae e Steinernematidae, possuem ciclo de vida semelhante. Elas estão mutualisticamente associadas às bactérias patogênicas *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente, que são as responsáveis pela morte do hospedeiro. O ciclo de vida dos NEP ocorre no interior do hospedeiro, havendo apenas um estágio livre, o terceiro estágio larval, também chamado de juvenil infectante (JI), que não se alimenta e é mais resistente ao dessecamento, pois se mantém no interior da cutícula do estágio anterior. Quando encontra um hospedeiro, o JI penetra através de seu tegumento ou por aberturas naturais e

libera a bactéria na hemolinfa, onde se multiplica e degrada os tecidos. O NEP, por sua vez, alimenta-se da bactéria e dos tecidos degradados, completa o seu desenvolvimento, acasala e reproduz. Quando a fonte de alimento do cadáver é exaurida, novos JI são formados e deixam o cadáver em busca de outros hospedeiros (KAYA; GAUGLER, 1993; POINAR JR., 1972).

Os NEP podem reduzir a população de *S. frugiperda* pelo controle biológico natural, causando epizootias por populações nativas (LEZAMA-GUTIÉRREZ et al., 2001; MOLINA-OCHOA et al., 2003; WYCKHUYS; O'NEIL, 2006) ou através do controle biológico aplicado, com a produção massal de JI, seguida de liberações inoculativas ou inundativas. Geralmente, as aplicações inoculativas são feitas para o controle de focos locais de pragas (WILSON et al., 2003). Porém, como os nematoides têm pouca persistência no ambiente agrícola devido a sua suscetibilidade aos raios UV, ao dessecamento e à atuação dos seus antagonistas (STUART et al., 2006), aplicações de pequenas concentrações de JI, espaçadas ao longo do tempo, não são efetivas.

Assim, a maioria dos programas de controle com NEP é inundativa, utilizando-se grandes concentrações de JI (GEORGIS et al., 2006), que atuam de forma rápida na mortalidade dos insetos (KAYA; GAUGLER, 1993). Como as lagartas, pré-pupas e pupas de *S. frugiperda* são suscetíveis aos NEP (MOLINA-OCHOA et al., 1996), as aplicações inundativas para o seu controle podem ser feitas com a pulverização dos JI, aplicados na parte aérea para o controle das lagartas, ou no solo para o controle das pré-pupas ou pupas (GARCIA; RAETANO; LEITE, 2008; RICHTER; FUXA, 1990; SHAPIRO-ILAN et al., 2006).

Trabalhos de campo realizados por Richter e Fuxa (1990) com a espécie de NEP *S. feltiae* mostraram que a pulverização de JI no cultivo de milho pode resultar em 33 a 43% das lagartas infectadas pelo nematoide e também em consequente diminuição da sua infestação na cultura.

Dessa forma, as espécies de NEP que possuem potencial para causar redução populacional à *S. frugiperda* são *S. feltiae* (FUXA et al., 1988), *S. ribrave* (MOLINA-OCHOA et al., 1996), *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) (GARCIA; RAETANO; LEITE, 2008) e *H. megidis* (MOLINA-OCHOA et al., 1996). Além destas, trabalhos recentes de laboratório e casa-de-vegetação realizados por Souza et al. (2012) e Andaló et al. (2010) mostram a eficiência de vários isolados nativos brasileiros, inclusive com a espécie *H. amazonensis*, causando mortalidade das lagartas.

Para aumentar a eficiência do controle com nematoides, estratégias conservacionistas visando à manutenção e ao aumento populacional dos NEP podem ser adotadas da mesma forma que são utilizadas para inimigos naturais de partes aéreas, como parasitoides e predadores (LANDIS; WRATTEN; GURR, 2000). Essas estratégias visam à manipulação do ambiente agrícola a fim de aumentar áreas com boas condições para a sobrevivência de NEP e aumentar também o número de hospedeiros alternativos que serão responsáveis pela reciclagem e persistência destes entomopatógenos em longo prazo, mesmo na ausência da cultura principal (ALUMAI et al., 2006; JABBOUR; BARBERCHECK, 2008; SUSURLUK; EHLERS, 2008). Portanto, o controle biológico natural de *S. frugiperda* pode ter sua eficiência aumentada com o manejo correto do solo e aumento da biodiversidade agrícola.

2.2.2 Importância dos predadores da família Carabidae no controle natural de *Spodoptera frugiperda*

Os coleópteros da família Carabidae estão entre os principais agentes de controle natural de *S. frugiperda* (BRUST; STINNER; MCCARTNEY, 1986; RIDDICK; MILLS, 1994; SUENAGA; HAMAMURA, 1998). Levantamentos realizados por Wyckhuys e O'Neil (2006) mostram alta incidência destes insetos

na cultura de milho. No Brasil, uma das espécies mais importantes desta família é *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae), um importante predador de lagartas e pupas de *S. frugiperda* (ALLEN, 1977; BRUST; STINNER; MCCARTNEY, 1986). Esta espécie é uma das mais estudadas em agroecossistemas brasileiros (CHOCOROSQUI; PASINI, 2000; CIVIDANES et al., 2009; PEGORARO; FOERSTER, 1988), com distribuição por todo o país (GIDASPOW, 1963).

A ocorrência de *C. granulatum* em ambientes agrícolas está relacionada aos períodos de maior umidade e de maior incidência de lagartas (PEGORARO; FOERSTER, 1988), e sua reprodução ocorre somente quando há presas abundantes para os adultos (WESELOH, 1993). Além disso, possuem uma grande capacidade de predação, sendo que estudos realizados por Best e Beegle (1977) mostraram que os *C. granulatum* podem consumir, diariamente, até cinco lagartas de *Agrotis ipsilon* H. (Lepidoptera: Noctuidae), que possuem tamanho semelhante ao da *S. frugiperda*. Este besouro apresenta hábito predador também na fase larval, e ambas as fases de desenvolvimento são consideradas importantes na redução populacional de lagartas e pupas de *S. frugiperda* (ALLEN, 1977).

O desenvolvimento de ovo a adulto de *C. granulatum* tem duração de 22 dias (PEGORARO; FOERSTER, 1985), sendo que as fêmeas adentram ao solo em períodos de oviposição, e a postura é feita entre 4 e 5 cm de profundidade. De 10 a 11 dias, as larvas passam por três instares até a fase de pré-pupa. Esta constrói uma câmara pupal a 8-12 cm de profundidade do solo, onde passa para a fase de pupa e lá permanece até a emergência do adulto (cerca de cinco dias) (PASINI, 1995). Os adultos também se enterram quando entram em hibernação, o que ocorre na região sul do País em períodos frios e de menor umidade. Além disso, os insetos também demonstram este comportamento como forma de proteção e esconderijo (PEGORARO; FOERSTER, 1985). Provavelmente, tal

comportamento seja uma forma de proteção contra a dessecação, à qual são altamente suscetíveis (LOVEI; SUNDERLAND, 1996).

As larvas de *C. granulatum* apresentam maior atividade no período diurno, e os adultos são mais ativos durante a noite (PASINI; FOERSTER, 1996). Elas possuem o hábito alimentar predominantemente carnívoro, e esta predominância é maior para larvas que para adultos, mas como possuem mobilidade mais limitada e não podem migrar a longas distâncias, alimentam-se principalmente de pré-pupas e pupas de lepidópteros no solo (LOVEI; SUNDERLAND, 1996). Por outro lado, os adultos, além de carnívoros, têm hábito fitófago e são capazes de se deslocar a grandes distâncias, podendo utilizar o voo para tal e, assim, buscar alimento (LOVEI; SUNDERLAND, 1996). Em trabalhos realizados por Pasini e Foerster (1996), adultos de *C. granulatum* marcados foram recapturados em até 800 m do ponto de liberação na cultura de soja.

Esses insetos atuam no controle biológico natural de *S. frugiperda*, porém, o manejo dos sistemas agrícolas pode influenciar a sua eficiência, por exemplo, aumentando a disponibilidade de abrigo e presas alternativas na ausência da cultura principal. Isso mantém estes insetos no ambiente agrícola, evitando que migrem em busca de alimento (BRUST; STINNER; MCCARTNEY, 1986; CLARK; GAGE; SPENCE, 1997; HATTEN et al., 2007; MAGURA; TÓTHMÉRÉSZ; BÓRDAN, 2000).

2.3 A diversificação do sistema no manejo de pragas e sua interação com agentes de controle biológico

Os inimigos naturais podem ter sua eficiência de controle aumentada através de estratégias conservacionistas, que envolvem a manipulação correta do solo e do sistema agrícola, e a sua diversificação. Um exemplo disso é o cultivo

consorciado em faixas de duas ou mais plantas cultivadas, com a manutenção de plantas espontâneas com a cultura principal, ou de plantas benéficas não cultivadas, como as utilizadas na cobertura vegetal (ANDOW, 1991) Este manejo do agroecossistema prevê condições favoráveis para aumentar a atividade dos inimigos naturais, incluindo os entomopatógenos (FUXA, 1998).

2.3.1 Conservação de nematoides entomopatogênicos

A conservação de nematoides entomopatogênicos é influenciada tanto por fatores do solo, como o tipo, o tamanho de suas partículas, umidade, pH e temperatura, quanto pela presença de vegetação no agroecossistema (STRONG, 2002). Isso porque as plantas podem alterar a compactação e os aspectos químicos do solo, reduzir a temperatura e aumentar a umidade através da diminuição da incidência de luz solar e do movimento de ar no local. As plantas utilizadas na diversificação agrícola protegem os nematoides do dessecação durante períodos de estiagem (PREISSER et al., 2006) e, como podem atuar como áreas de refúgio para insetos durante o manejo das áreas cultivadas, aumentam a comunidade de artrópodes local, os quais podem colaborar para o deslocamento dos entomopatógenos (EKESI et al., 2005; JABBOUR; BARBERCHECK, 2008) ou aumentar a gama de hospedeiros em potencial para os nematoides. Este é um fator fundamental para a sua persistência em longo prazo no campo (LAWRENCE; HOY; GREWAL, 2006; SUSURULUK; EHLERS, 2008).

Em um trabalho realizado por Hoy et al. (2008), que visou encontrar as condições agrícolas ideais para aumentar a sobrevivência dos NEP, foi constatado que o aumento na estrutura da teia alimentar, seguido da diminuição dos índices de P, aumento dos de K e menor razão C:N foram as variáveis que mais influenciaram as ótimas condições para NEP. Estas condições são

manipuláveis pelas práticas de manejo do solo, com a incorporação de mais matéria orgânica, cultivo de leguminosas e diminuição da utilização de fertilizantes sintéticos.

Os efeitos da cobertura de plantas na população de nematoides podem variar, dependendo do ecossistema e do tipo de cobertura (ALUMAI et al., 2006; DUPONT; FERRIS; HORN, 2009). Por exemplo, as plantas crotalária (*Crotalaria* spp. L. (Fabaceae)) e o cravo (*Tagetes erecta* L. (Asteraceae)) atuam na adubação verde, atraem inimigos naturais (SILVEIRA et al., 2009; TAVARES et al., 2011) e atuam no controle de nematoides fitopatogênicos, suprimindo-os severamente (WANG et al., 2007). Sabe-se que estas plantas produzem compostos secundários que são responsáveis pelo controle de nematoides, como os alcaloides pirrolizidínicos (SANTANA et al., 2012) e o α -terthienil, que são liberados pelas raízes no solo (HOOKS et al., 2010). Pouco se sabe sobre o efeito destas substâncias químicas sobre os NEP, mas em um trabalho realizado por Kanagy e Kaya (1996) foi comprovado que a substância α -terthienil prejudica a eficiência de *S. carpocapsae*. Porém, ainda são escassos os trabalhos que visam à compatibilidade da utilização de NEP em áreas onde estão presentes plantas benéficas a insetos inimigos naturais.

Além dos efeitos diretos de compostos químicos sobre os NEP, sabe-se que algumas plantas podem aumentar a resistência dos insetos fitófagos aos nematoides, como observado por Gassmann et al. (2010), com as lagartas *Grammia incorrupta* (H. Edwards) (Lepidoptera: Arctiidae). Estas se alimentam da planta *Senecio longilobus* Benth. (Astraceae), que também produz alcaloides pirrolizidínicos e aumenta a resistência do herbívoro, interferindo no desenvolvimento dos nematoides dentro dele e afetando a dinâmica populacional da próxima geração destes entomopatógenos no campo.

Esses trabalhos mostram a necessidade de se conhecer os efeitos da diversificação sobre os NEP, pois, da mesma forma que algumas plantas podem

prejudicá-los, outras podem potencializar a sua ação no controle biológico de pragas. Estas características dos NEP, aliadas ao aumento da sua persistência no campo, levam a uma redução dos custos de controle através da simples introdução de plantas benéficas, que também podem favorecer parasitoides e predadores.

2.3.2 Conservação de predadores

A conservação do habitat de artrópodes inimigos naturais, através do manejo do agroecossistema, traz grandes benefícios para as espécies nativas, aumentando o controle natural de pragas (ELLIS et al., 2005; KOJI; KHAN; MIDEGA, 2007). Isto ocorre porque a vegetação utilizada para o manejo provê alimento, como pólen e néctar (IRVIN et al., 2006; LEE; HEIMPEL, 2008), abrigo (CORBETT; ROSENHEIM, 1996; GRIFFITHS et al., 2008), locais para oviposição (TREFAS; LENTEREN, 2008) e para acasalamento, além de hospedeiros/presas alternativos (LANDIS; WRATTEN; GURR, 2000).

A maior parte destas pesquisas é acerca dos efeitos da diversificação sobre parasitoides (BAGGEN; GURR, 1998; BRENDT; WRATTEN; SCARRATT, 2006; CORBETT; ROSENHEIM, 1996). Tais estudos com predadores visam, principalmente, ao controle de pragas de solo (VARCHOLA; DUNN, 2001; WOODCOCK et al., 2005) com coleópteros predadores, como os da família Carabidae.

Assim como para outros inimigos naturais, os predadores carabídeos podem ser conservados no sistema por meio do aumento da complexidade vegetal, que traz certas características para o cultivo, pois ela aumenta a preferência por oviposição destes insetos (TREFAS; LENTEREN, 2008), eleva a taxa de migração para a área cultivada e diminui a de emigração de besouros do local. Dessa forma, Varchola e Dunn (2001) observaram que os carabídeos

são mais ativos e possuem maior riqueza de espécies em cultivo de milho bordado por uma cerca viva, com maior riqueza de espécies vegetais, em relação a uma simples bordadura de grama.

Em trabalho realizado por Penagos et al. (2003), no qual se fez o levantamento de inimigos naturais de *S. frugiperda* em cultivos de milho, observou-se que predadores da espécie *Calosoma calidum* F. (Coleoptera: Carabidae) foram mais frequentemente capturados no milho diversificado que em monocultivo. Porém, deve-se ressaltar que diferentes espécies de Carabidae respondem de maneiras diferentes a diferentes níveis de diversificação do sistema (FRAMPTON et al., 1995; WOODCOCK et al., 2005).

Esquemas de diversificação do sistema a favor destes predadores são adotados em diferentes países, como é o caso dos “beetle banks” na Europa, que são formados por faixas cultivadas com gramíneas que fornecem habitat para os predadores, inclusive para várias espécies de besouros da família Carabidae (MACLEOD et al., 2004; THOMAS et al., 2002). A importância dos “beetle banks” em países europeus é tão grande que, em alguns deles, existem incentivos fiscais para que produtores orgânicos os implantem em sua propriedade (DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS, DEFRA, 2002)

O aumento da complexidade do habitat a fim de favorecer e aumentar a persistência de inimigos naturais no ambiente pode ser aplicado para o controle de pragas, como para *S. frugiperda*. Porém, mais pesquisas são necessárias para determinar os demais efeitos da diversificação agrícola no controle inundativo com NEP e a sua interação com demais predadores de solo.

2.4 Interação nematoides entomopatogênicos × predadores

O ciclo de desenvolvimento dos NEP, como já mencionado, ocorre dentro do hospedeiro. Este permanece intacto enquanto o nematoide se desenvolve, o que pode levar de 7 a 15 dias (KAYA, 2002). Durante este período, os hospedeiros ficam suscetíveis à predação, já que sua eficiência de defesa é reduzida (FOLTAN; PUZA, 2009). Porém, a predação pode afetar tanto a dinâmica populacional dos nematoides quanto a população de predadores de solo.

Segundo Baur, Kaya e Strong (1998), a relação entre predadores e nematoides tem grande importância, pois a persistência e efetividade destes entomopatogênicos no controle de pragas depende do seu total desenvolvimento dentro do hospedeiro, já que os estágios anteriores ao JI não sobrevivem fora deste. Estes autores observaram que, logo que formigas causavam orifícios derivados de mordidas no tegumento de lagartas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) mortas por nematoides do gênero *Steinernema*, ocorria o ressecamento do cadáver e, conseqüentemente, a morte dos nematoides que se desenvolviam no seu interior.

Além da interrupção do desenvolvimento e morte dos nematoides, a relação entre estes e os predadores pode também ser prejudicial para os predadores, que podem ser afetados tanto indiretamente, através da morte da presa ou hospedeiro, quanto diretamente, através de sua infecção e conseqüente morte (ROSENHEIM et al., 1995). Isto acontece devido aos NEP atuarem regulando populações de diferentes espécies de insetos (KAYA, 1993; LACEY et al., 2001).

Para alguns predadores e parasitoides, a presa e o hospedeiro tornam-se menos atrativos quando parasitados por nematoides, o que evita o seu consumo (BAUR; KAYA; STRONG, 1998; EVERARD; GRIFFIN; DILLON, 2009;

FOLTAN; PUZA, 2009; LACEY; UNRUH; HEADRICK, 2003). Infelizmente, a maioria dos estudos destinados à predação intraguilda entre nematoides e outros inimigos naturais enfoca, principalmente, os parasitoides (EVERARD; GRIFFIN; DILLON, 2009; LACEY; UNRUH; HEADRICK, 2003; SHER; PARRELLA; KAYA, 2000), sendo escassas as informações desta relação entre nematoides e predadores.

Além destas relações negativas que ocorrem entre nematoides e predadores no ambiente, existem aquelas que são positivas para uma das partes e que não prejudicam a outra, como a forésia. Esta consiste de uma estratégia de locomoção comum entre os nematoides de vida livre, ocorrendo também entre os entomopatogênicos, que se aderem a partes externas do corpo de insetos e de outros invertebrados que habitam o solo para se locomoverem em grandes distâncias (AKBULUT; LINIT, 1999; BAUR; KAYA; STRONG, 1998; ESPKY; WALTER; CAPINERA, 1988; SHAPIRO-ILAN; BERRY; LEWIS, 1993).

Como os NEP possuem movimentos limitados e a capacidade de locomoção varia entre as espécies e o tipo de solo (SCHROEDER; BEAVERS, 1987; PORTILLO-AGUILAR et al., 1999), através de uma associação forética com outros organismos de solo, estes podem dispersar-se em distâncias maiores, resultando num aumento do controle de pragas. Em trabalhos de laboratório realizados por Eng. Preisser e Strong (2005), observou-se que o nematoide *H. marelatus* utiliza o isópodo *Porcellio scaber* L. (Isopoda: Oniscidea) para se dispersar, sem causar a mortalidade deste crustáceo. Esta relação foi observada também com anelídeos (CAMPOS-HERRERA; TRIGO; GUTIÉRREZ, 2006; SHAPIRO-ILAN; BERRY; LEWIS, 1993), ácaros, colêmbolas (EPSKY; WALTER; CAPINERA, 1988) e com besouros escarabeídeos (LACEY; KAYA; BETTENCOURT, 1995). Porém, pouco ainda se sabe sobre quais outros organismos possuem relação forética com os NEP.

REFERÊNCIAS

- AKBULUT, S.; LINIT, M. J. Flight performance of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera : Cerambycidae) with respect to nematode phoresis and beetle characteristics. **Environmental Entomology**, College Park, v. 28, n. 6, p. 1014-1020, Dec. 1999.
- ALLEN, R. T. *Calosoma* (Castrida) *alternans granulatum* Perty: a predator of cotton leaf worms in Bolivia (Coleoptera: Carabidae: Caribini). **The Coleopterists Bulletin**, v. 31, n. 1, p. 73-76, Mar. 1977.
- ALUMAI, A. et al. Factors affecting the natural occurrence of entomopathogenic nematodes in turfgrass. **Biological Control**, Orlando, v. 36, n. 3, p. 368-374, Mar. 2006.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.
- ANDALÓ, V. et al. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1860-1866, 2010.
- ANDOW, D. A. Vegetational diversity and arthropod population response. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 36, p. 561-586, Jan. 1991.
- ANDREWS, K. L. Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 71, n. 4, p. 630-653, Dec. 1988.
- ARMSTRONG, C. L. et al. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 2, p. 550-557, Mar. 1995.
- BAGGEN, L. R.; GURR, G. M. The influence of food on *Copidosoma koehleri* (Hymenoptera: Encyrtidae), and the use of flowering plants as a habitat management tool to enhance biological control of potato moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Biological Control**, Orlando, v. 11, n. 1, p. 9-17, Jan. 1998.

BASTOS, C. S. et al. Incidência de insetos fitófagos e de predadores no milho e no feijão cultivados em sistema exclusivo e consorciado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 391-397, maio/jun. 2003.

BAUR, M. E.; KAYA, H. K.; STRONG, D. R. Foraging ants are scavengers on entomopathogenic nematode-killed insects. **Biological Control**, Orlando, v. 12, n. 3, p. 231-236, July 1998.

BEST, R. L.; BEEGLE, C. C. Consumption of *Agrotis ipsilon* by several species of Carabids found in Iowa. **Environmental Entomology**, College Park, v. 6, n. 4, p. 532-534, Aug. 1977.

BRAMAN, S. K. et al. Predator occurrence and performance of *Geocoris uliginosus* (Say) on pest-resistant and susceptible turfgrasses. **Environmental Entomology**, College Park, v. 32, n. 4, p. 907-914, 2003.

BRENDT, L. A.; WRATTEN, S. D.; SCARRATT, S. L. The influence of floral resource subsidies on parasitism rates of leafrollers (Lepidoptera: Tortricidae) in New Zealand vineyards. **Biological Control**, Orlando, v. 37, p. 50-55, Jan. 2006.

BRONDANI, D. et al. Ocorrência de insetos na parte aérea da soja em função do manejo de plantas daninhas em cultivar convencional e geneticamente modificada resistente a glyphosate. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2132-2137, 2008.

BRUST, G. E.; STINNER, B. R.; MCCARTNEY, D. A. Predator activity and predation in corn agroecosystems. **Environmental Entomology**, College Park, v. 15, n. 5, p. 1017-1021, Oct. 1986.

CAMPOS-HERRERA, R.; TRIGO, D.; GUTIÉRREZ, C. Phoresy of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* by the earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 92, n. 1, p. 50-54, Mar. 2006.

CHOCOROSQUI, V. R.; PASINI, A. Predação de pupas de *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) por larvas e adultos de *Calosoma granultum* Perty (Coleoptera: Carabidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 65-70, Mar. 2000.

CIVIDANES, F. J.; CIVIDANES, T. M. S. Flutuação populacional e análise faunística de Carabidae e Staphylinidae (Coleoptera) em Jaboticabal, São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 449-456, out./dez. 2008.

CIVIDANES, F. J. et al. Faunistic analysis of Carabidae and Staphylinidae (Coleoptera) in five agroecosystems in northeastern São Paulo state, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 8, p. 954-958, Aug. 2009.

CLARK, M. S.; GAGE, S. H.; SPENCE, J. R. Habitats and management associated with common Ground beetles (Coleoptera: Carabidae) in a Michigan agricultural landscape. **Environmental Entomology**, College Park, v. 26, n. 3, p. 519-527, 1997.

CORBETT, A.; ROSENHEIM, J. A. Impact of a natural enemy overwintering refuge and its interaction with the surrounding landscape. **Ecological Entomology**, London, v. 21, n. 2, p. 155-164, May 1996.

CRUZ, I. et al. Application rate trials with a nuclear polyhedrosis vírus to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) on maize. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 145-152, Apr. 1997.

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Yield impact of larval infestation of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) to mid-whorl growth stage of corn. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 76, n. 5, p. 1052-1054, 1983.

DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT, FOOD AND RURAL AFFAIRS. **The countryside stewardship scheme 2003**: payment summary sheet. London, 2002.

DUPONT, S. T.; FERRIS, H.; HORN, M. van. Effect of cover crop quality and quantity on nematode-based soil food webs and nutrient cycling. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 157-167, 2009.

EKESI, S. et al. Conservation biological control with the fungal pathogen *Pandora neoaphidis*: implications of the aphid species, host plant and predator foraging. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 7, n. 1, p. 21-30, Feb. 2005.

ELLIS, J. A. et al. Conservation biological control in urban landscapes: Manipulating parasitoids of bagworm (Lepidoptera: Psychidae) with flowering forbs. **Biological Control**, Orlando, v. 34, p. 99-107, Mar. 2005.

ENG, M. S.; PREISSER, E. L.; STRONG, D. R. Phoresy of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis marelatus* by a non-host organism, the isopod *Porcellio scaber*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 88, n. 2, p. 173–176, Feb. 2005.

EPSKY, N. D.; WALTER, D. E.; CAPINERA, J. L. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 81, n. 3, p. 821-825, June 1988.

EVERARD, A.; GRIFFIN, C. T.; DILLON, A. B. Competition and intraguild predation between the braconid parasitoid *Bracon hylobii* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis downesi*, natural enemies of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 99, n. 2, p. 151–161, Apr. 2009.

FIGUEIREDO, M. L. C.; MARTIN-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1693-1698, 2006.

FOLTAN, P.; PUZA, V. To complete their life cycle, pathogenic nematode-bacteria complexes deter scavengers from feeding on their host cadaver. **Behavioral Processes**, v. 80, n. 1, p. 76-79, Jan. 2009.

FRAMPTON, G. K. et al. Effects of grassy banks on the dispersal of some carabid beetles (Coleoptera: Carabidae) on farmland. **Biological Conservation**, Essex, v. 71, n. 3, p. 347-355, 1995.

FUXA, J. R. Environmental manipulation for microbial control of insects. In: Barbosa P. (Ed.). **Conservation biological control**. San Diego: Academic, 1998. p. 255–268.

FUXA, J. R.; RICHTER, A. R.; AGUDELO-SILVA, F. Effect of host age and nematode strain on susceptibility of *Spodoptera frugiperda* to *Steinernema feltiae*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 20, n. 1, p. 91-95, Jan. 1988.

GALLO, D et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GARCIA, L. C.; RAETANO, C. C. G.; LEITE, L. G. Application technology for the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 305-311, May/June 2008.

GASSEN, D. N. **Manejo de pragas associadas à cultura de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 127 p.

GASSMANN, A. J. et al. Tritrophic effects of host plants on herbivore-pathogen interaction. **Annals of Entomological Society of America**, v. 103, n. 3, p. 371-378, 2010.

GAUGLER, R. **Entomopathogenic Entomology**. New York: CABI, 2002. 402 p.

GEORGIS, R. et al. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 103-123, 2006.

GIDASPOW, T. The genus *Calosoma* in Central America, the Antilles, and South America (Coleoptera: Carabidae). **Bulletin of American Museum Natural History**, New York, v. 124, p. 275-314, 1963.

GRIFFITHS, G. J. K. et al. Efficacy and economics of shelter habitats for conservation biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 45, p. 200-209, 2008.

GURR, G. M.; WRATTEN, S. D.; LUNA, J. M. Multi-function agricultural biodiversity: pest management and other benefits. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 4, n. 2, p. 107-116, 2003.

HATTEN, T. D. et al. Effects on tillage on the activity density and biological diversity of Carabidae beetles in spring and winter crops. **Environmental Entomology**, College Park, v. 36, n. 2, p. 356-368, 2007.

HOBALLAH, M. E. et al. Occurrence and direct control potential of parasitoids and predators of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on maize on subtropical lowlands of Mexico. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 6, n. 1, p. 83-88, Feb. 2004.

HOOKS, C. R. R. et al. Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 307-320, Nov. 2010.

HOY, C. W. et al. Canonical correspondence analysis demonstrates unique soil conditions for entomopathogenic nematodes species compared with other free-living nematode species. **Biological Control**, Orlando, v. 46, n. 3, p. 371-379, Sept. 2008.

IRVIN, N. A. et al. The effects of floral understoreys on parasitism of leafrollers (Lepidoptera: Tortricidae) on apples in New Zealand. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 8, p. 25–34, 2006.

JABBOUR, R.; BARBERCHECK, M. E. Soil and habitat complexity effects on movement of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in maize. **Biological Control**, Orlando, v. 47, n. 2, p. 235–243, Nov. 2008.

KAGAWA, Y.; MAETO, K. Laboratory-based study on the predatory ability of *Carabus yaconinus* (coleopteran: Carabidae) on larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 42, p. 49-53, 2007.

KANAGY, J. M. N.; KAYA, H. K. The possible role of marigold roots and α -terthienyl in mediating host-finding by Steinernematid nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 42, n. 2, p. 220-231, 1996.

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

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

KAYA, H. K. Natural enemies and other antagonists. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic entomology**. New York: CABI, 2002. p. 189–204.

KOJI, S.; KHAN, Z. R.; MIDEGA, C. A.O. Field boundaries of *Panicum maximum* as a reservoir for predators and a sink for *Chilo partellus*. **Journal of Applied Entomology**, v. 131, n. 3, p. 186–196, 2007.

KROMP, B. Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74, p. 187-228, 1999.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? **Biological Control**, Orlando, v. 21, p. 230–248, 2001.

LACEY, L.A.; KAYA, H. K.; BETTENCOURT, R. Dispersal of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) in adult Japanese beetles, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 121-130, 1995.

LACEY, L. A.; UNRUH, T. R.; HEADRICK, H. L. Interactions of two idiobiont parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae) of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 83, p. 230–239, 2003.

LANDIS, D. A.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 175-201, 2000.

LAWRENCE, J. L.; HOY, C. W.; GREWAL, P. S. Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematode in a heterogeneous vegetable production landscape. **Biological Control**, Orlando, v. 37, p. 247-255, 2006.

LEE, J. C.; HEIMPEL, G. E. Floral resources impact longevity and oviposition rate of a parasitoid in the field. **Journal of Animal Ecology**, v. 77, p. 565-572, 2008.

LEIDERMAN, L.; SAUER, H. F. G. A lagarta dos milho *Laphygma frugiperda* (Abbot & Smith, 1797). **O Biológico**, v. 19, p. 105-113, 1953.

LENTEREN, van J.; BUENO, V. H. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. **BioControl**, v. 48, p. 123-139, 2003.

LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. et al. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán Colima, Jalisco and Tamaulipas. **Florida Entomologist**, v. 84, n. 1, p. 23-29, 2001.

LOVEI, G. L.; SUNDERLAND, K. D. Ecology and behavior of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). **Annual Reviews Entomology**, v. 41, p. 231-256, 1996.

MACLEOD, A. et al. 'Beetle banks' as refuges for beneficial arthropods in farmland: long-term changes in predator communities and habitat. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 6, p. 147–154, 2004.

MAGURA, T.; TÓTHMÉRÉSZ, T.; BÓRDAN, Z. Effects of nature management practice on carabid assemblages (Coleoptera: Carabidae) in a non-native plantation. **Biological Conservation**, Essex, v. 93, p. 95-102, 2000.

MENALLED, F. D.; LEE, J. C.; LANDIS, D. A. Manipulating carabid beetle abundance alters prey removal rates in corn field. **BioControl**, v. 43, p. 441-456, 1999.

MOLINA-OCHOA, J. et al. Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae in Mexico. **Florida Entomologist**, v. 83, n. 3, p. 244-253, 2003.

MOLINA-OCHOA, J. et al. Virulence of six-entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Vedalia**, v. 3, p. 25-30, 1996.

PASINI, A. **Biologia e técnica de criação do predador *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) em *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), lagarta-da-soja.** 1995. 67 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba, 1995.

PASINI, A.; FOERSTER, L. A. Ritmo diário de atividade e dispersão de *Calosoma granulatum* P. (Coleoptera: Carabidae) na cultura de soja. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 395-399, 1996.

PEGORARO, R. A.; FOERSTER, L. A. Observações sobre o ciclo evolutivo e hábitos alimentares de *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 14, n. 2, p. 269-275, 1985.

PEGORARO, R. A.; FOERSTER, L. A. Abundância e distribuição de larvas e adultos de *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) dentre cultivares de soja em diferentes épocas de semeadura. **Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia**, v. 17, p. 237-248, 1988.

PENAGOS, D. I. et al. Effect of weeds on insect pest of maize and their natural enemies in South Mexico. **International Journal of Pest Management**, v. 49, p. 155-161, 2003.

PERDIKIS, D. et al. Ecological relationships between non-cultivated plants and insect predators in agroecosystems: the case of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae) and *Macrolophus melanotoma* (Hemiptera: Miridae). **Acta Oecologica**, v. 31, p. 299-306, 2007.

POINAR JR, G. O. Nematode as facultative parasites of insects. **Annual Review of Entomology**, v. 17, p. 103-122. 1972.

POLANCZYK, R. A.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 165-167, 2000.

PORTILLO-AGUILAR, C. et al. Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. **Environmental Entomology**, College Park, v. 28, n. 6, p. 1021-1035, 1999.

PREISSER, E. L. et al. Plant facilitation of a belowground predator. **Ecology**, v. 87, n. 5, p. 1116-1123, 2006.

RICHTER, A. R.; FUXA, J. R. Effect of *Steinernema feltiae* on *Spodoptera frugiperda* and *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 4, p. 1286-1291, 1990.

RIDDICK, E. W.; MILLS, N. J. Potential of adults carabids (Coleoptera: Carabidae) as predators of Fifth-Instar codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple orchards in California. **Environmental Entomology**, College Park, v. 23, n. 5, p. 1338-1345, 1994.

ROSENHEIM, J. A. et al. Intraguild predation among biological-control agents: theory and evidence. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 303-335, 1995.

SALAMA, H. S. et al. The use of bacillus-thuringiensis to control 2 lepidopterous insect pests (*Agrotis ypsilon* and *Spodoptera littoralis*). **Anzeiger Fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, v. 68, n. 1, p. 15-17, 1995.

SANTANA, S. M. et al. Manejo de *Pratylenchus zae* por plantas antagonistas, em solos de áreas de cultivo de cana-de-açúcar. **Nematropica**, v. 42, p. 63-71, 2012.

SARMENTO, R. de A. et al. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 18, p. 41-48, 2002.

SCHROEDER, W. J.; BEAVERS, J. B. Movement of entomogenous nematodes of the families Heterorhabditidae e Steinernematidae in soil. **Journal of Nematology**, College Park, v. 19, n. 2, p. 257-259, 1987.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; BERRY, E. C.; LEWIS, L. C. Interaction between nematodes and earthworm: enhanced dispersal of *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 25, n. 2, p. 189-192, 1993.

SHAPIRO-ILAN, D. I. et al. Application technology and environmental consideration for use of entomopathogenic nematodes in biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 124-133, 2006.

SHER, R. B.; PARRELLA, M. P.; KAYA, H. K. Biological control of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Burgess): implications for intraguild predation between *Diglyphus begini* Ashmead and *Steinernema carpocapsae* (Weiser). **Biological Control**, Orlando, v. 17, p. 155-163, 2000.

SILVEIRA, L. C. P. et al. Plantas cultivadas e invasoras como habitat para predadores do gênero *Orius* (Wolff) (Heteroptera: Anthocoridae). **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 261-265, 2003.

SILVEIRA, L. C. P. et al. Marigold (*Tagetes erecta* L.) as an attractive crop to natural enemies in onion fields. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 6, p. 780-787, 2009.

SOUSA, E. H. S. et al. Forest fragments' contribution to the natural biological control of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 755-760, 2011.

SOUZA, L. M. et al. Nematóides entomopatogênicos e compatibilidade com Imidaclopride visando o controle de *Spodoptera frugiperda* em viveiro florestal. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 36, n. 1-2, mar./jun. 2012.

STORER, N. P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010.

STRONG, D.R. Population of entomopathogenic nematodes in foodwebs. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic entomology**. New York: CABI, 2002. p. 225-245.

STUART, R. J. Population biology of entomopathogenic nematodes: concepts, issues, and models. **Biological Control**, Orlando, v. 38, n. 1, p. 80-102, July 2006.

SUELDO, M. R.; BRUZZONE, O. A.; VIRLA, E. G. Characterization of the earwing, *Doru lineare*, as a predator of larvae of the armyworm, *Spodoptera frugiperda*: a functional response study. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 38, p. 1-10, 2009.

SUENAGA, H.; HAMAMURA, T. Laboratory evaluation of carabids beetles (Coleoptera: Carabidae) as predator of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae. **Biological Control**, Orlando, v. 27, n. 3, p. 767-772, 1998.

SUSURLUK, A.; EHLERS, R. U. Field persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* in different crops. **BioControl**, v. 53, p. 627-641, 2008.

TABASHNIK, B. E. et al. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, n. 4, p. 1031-1038, 2003.

TAVARES, W. S. et al. Soil organisms associated to the weed suppressant *Crotalaria juncea* (Fabaceae) and its importance as a refuge for natural enemies. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 473-479, 2011.

THOMAS, S. R. et al. Botanical diversity of beetle banks Effects of age and comparison with conventional arable field margins in southern UK. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 93, p. 403-412, 2002.

TREFAS, H.; LENTEREN, J. C. van. Egg- laying- site preferences of *Pterostichus melanarius* in mono- and intercrops. **Bulletin of Insectology**, v. 61, n. 2, p. 225-231, 2008.

VARCHOLA, J. M.; DUNN, J. D. Influence of hedgerow and grassy field borders on ground beetle (Coleoptera: Carabidae) activity in fields of corn. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 83, p. 153-163, 2001.

YOUNG, O. P. Body weight and survival of *Calosoma sayi* (Coleoptera: Carabidae) during laboratory feeding regimes. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, p. 104-112, 2008.

YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 84-91, 1991.

WANG, Q.; LI, Y.; HANDOO, Z.; KLASSEN, W. Influence of cover crops on populations of soil nematodes. **Nematropica**, v. 37, p. 79-92, 2007.

WESELOH, R. M. Adult feeding affects fecundity of the predator *Calosoma sycophanta* (Col.: Carabidae). **Entomophaga**, v. 38, n. 4, p. 435-439, 1993.

WILSON, M. J. et al. Application pattern and persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biological Control**, Orlando, v. 26, p. 180-188, 2003.

WYCKHUYS, K. A. G.; O'NEIL, R. J. O. Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. **Crop Protection**, v. 25, p. 1180-1190, 2006.

WOODCOCK, B. A. et al. Establishing field margins to promote beetle conservation in arable farms. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 107, p. 255-266, 2005.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 Efeitos de nematoides entomopatogênicos sobre o predador
Calosoma granulatum em laboratório

RESUMO

Os nematoides (NEP) do gênero *Heterorhabditis* são inimigos naturais utilizados, geralmente, de forma inundativa em programas de controle de pragas, com ação comprovada sobre diversos lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda*, que é alvo, principalmente, quando vai ao solo para empupar. Para completar o seu desenvolvimento dentro do hospedeiro e formar novos juvenis infectantes (JI), os NEP necessitam de 7 a 15 dias, período no qual a carcaça do inseto permanece intacta, mas fica suscetível à predação, o que afeta a dinâmica populacional dos nematoides e a população de predadores de solo. Dentre os principais predadores de solo de *S. frugiperda*, está o carabídeo *Calosoma granulatum*, que se alimenta de lagartas, pupas e também de carcaças de insetos mortos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos diretos de contato de NEP com este predador, e os efeitos de NEP parasitando presas sobre a alimentação do predador. Para isso, foram utilizados os NEP *H. amazonensis* isolado RSC 5 e *H. amazonensis* isolado JPM 4 NEP com ação comprovada contra *S. frugiperda*, e o predador *C. granulatum*. Realizaram-se experimentos de laboratório com aplicação tópica de JI no predador, e experimentos com e sem chance de escolha utilizando-se lagartas de *S. frugiperda*, infectadas pelos NEP, e saudáveis como presas. Verificou-se que apenas o primeiro ínstar larval do predador é suscetível aos NEP, quando aplicados topicamente em concentrações maiores que 150 JI/mL. As larvas de terceiro ínstar e os adultos evitam alimentar-se de lagartas infectadas, mas a repulsa só ocorre depois de liberada a bactéria simbiote pelo NEP dentro do hospedeiro (> de 24 horas após inoculação). Nos casos em que o predador só possuía cadáveres de lagartas infectadas como opção de alimento, houve mortalidade da maioria das larvas durante os seis dias de alimentação. Os efeitos negativos, observados unicamente em larvas do predador em laboratório, não são suficientes para afirmar que os NEP causarão efeitos negativos sobre *C. granulatum* em campo. Com a utilização de estratégias conservacionistas, ambos agentes de controle podem potencialmente atuar em conjunto para o controle de *S. frugiperda*, sem afetar as suas dinâmicas populacionais.

Palavras-chave: controle biológico, não-alvo, compatibilidade, inimigo natural, controle microbiano.

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são parasitas letais de insetos que habitam o solo ou que passam uma parte do seu ciclo de vida nele (SHAPIRO-ILAN; GOUGE; KOPPENHOFE, 2002). As duas famílias possuem um ciclo de desenvolvimento semelhante, matando o hospedeiro em 24-72 horas e, a partir do momento em que penetram nele, requerem de 7 a 15 dias para completar o seu desenvolvimento e produzir juvenis que irão deixar o cadáver e buscar novos hospedeiros (POINAR, 1979). Os nematoides carregam bactérias simbiotes (do gênero *Photorhabdus* sp. pela família Heterorhabditidae, e do gênero *Xenorhabdus* spp. pela família Steinernematidae) que, quando liberadas, degradam os tecidos do hospedeiro, causando a sua morte (KAYA; GAUGLER, 1993; POINAR, 1972).

Os nematoides possuem hospedeiros que estão distribuídos em diversas ordens de insetos, como coleópteros, lepidópteros, dípteros, tripes e ortópteros (BARBARA; BUSS, 2006; LIM; DRIESCHE, 2005; MALAN; MANRAKHAN, 2009; PUŽA; MRÁČEK, 2005; WANG; GAUGLER, 1998), e são usados comercialmente em programas de controle biológico, comumente aplicados inundativamente (BARBARA; BUSS, 2006; TOEPFER et al., 2010) ou inoculativamente (ARTHURS; HEINZ, 2006; DILLON et al., 2007; WILSON et al., 2003). As taxas de juvenis infectantes (JI), aplicados em programas inundativos, são altas, podendo ser de 2,5 a $7,5 \times 10^9$ JI por hectare, segundo levantamento realizado por Georgis et al. (2006). A grande gama de ordens em que os NEP possuem hospedeiros, assim como a grande concentração de JI utilizados nos programas de controle de pragas, indicam que os nematoides entomopatogênicos podem causar algum impacto sobre populações de insetos não-alvo. Isto deve ser avaliado, principalmente, em programas de manejo

integrado de pragas (MIP), nos quais os métodos de controle devem ser seguros para artrópodes não-alvo (LEWIS et al., 1997).

Existem vários trabalhos publicados que avaliaram a ação da aplicação direta de NEP sobre a mortalidade de diversas espécies de organismos não-alvo (MILLAR; BARBERCHECK, 2001; POWELL; WEBSTER, 2004; ROJHT; KAČ; TRDAN 2009; ROPEK; JAWORSKA, 1994; SHAPIRO-ILAN; COTTRELL, 2005; SOMASEKHAR et al., 2002). Em alguns deles, foram demonstradas a suscetibilidade de inimigos naturais, como predadores coleópteros da família Coccinellidae (SHAPIRO-ILAN; COTTRELL, 2005), dípteros predadores da família Cecidomyiidae (POWELL; WEBSTER, 2004) e larvas das vespas parasitoides da família Braconidae (SHANNAG; CAPINERA, 2000). Porém, a maioria dos trabalhos é realizada em laboratório e trata apenas dos efeitos diretos (mortalidade causada pela inoculação direta), desconsiderando-se os efeitos indiretos da interação do complexo nematoide/bactéria com outros agentes de controle biológico, como o efeito do consumo de presas contaminadas por NEP por predadores. Nesta área, sabe-se apenas a respeito do efeito da predação sobre o desenvolvimento do nematoide no interior do inseto, já que até mesmo a tentativa de consumo de um hospedeiro pode interromper o ciclo de desenvolvimento do NEP, por abrir buracos no tegumento que permitirão o ressecamento do interior do hospedeiro, matando, assim, os nematoides (BAUR; KAYA; STRONG 1998; FOLTAN; PUZA, 2009).

A função ecológica de predadores polípagos da família Carabidae no controle biológico natural de lagartas que atacam diversas culturas tem sido relatada (DESNEUX et al., 2010; KROMP, 1999; LÖVEI; SUNDERLAND, 1996; WYCKHUYS; O'NEIL, 2006), sendo estes predadores considerados alguns dos principais responsáveis pela redução de lepidópteros-pragas no solo de sistemas agrícolas (BRUST; STINNER; MCCARTNEY, 1986; RIDDICK;

MILLS, 1994; SUENAGA; HAMAMURA, 1998). A espécie *Calosoma granulatum* Perty (Coleoptera: Carabidae) é importante no controle de lagartas e pupas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) (ALLEN, 1977), e pupas de *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (CHOCOROSQUI; PASINI, 2000), com alta incidência nos períodos de maior precipitação e de maior ocorrência de lagartas (PEGORARO; FOERSTER, 1998). Esta espécie apresenta hábito predador nas fases larval e adulta, sendo que as larvas habitam o solo, onde, em um período de 10 a 12 dias, passam por três ínstares até alcançar a fase de pupa. A pupa permanece dentro de uma câmara pupal de 8 a 12 cm de profundidade no solo, onde passa para a fase de pupa, e lá permanece até a emergência do adulto (cerca de cinco dias) (PASINI, 1995). Os adultos também se enterram quando entram em hibernação, o que ocorre na região sul do país em períodos frios e de menor umidade. Este comportamento também é observado nos casos de defesa e busca por esconderijo (PEGORARO; FOERSTER, 1985)

Como os predadores de solo ocupam o mesmo ambiente que os NEP e se alimentam de insetos que podem ser hospedeiros dos mesmos, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade do predador *C. granulatum* a dois nematoides nativos brasileiros da família Heterorhabditidae, que apresentaram alta eficiência no controle de *S. frugiperda* comprovada por Andaló et al. (2010) e Souza et al. (2012). Além disso, devido à possibilidade de o predador encontrar lagartas contaminadas por nematoides em campo, os outros objetivos do trabalho foram avaliar a preferência alimentar e o efeito da alimentação de *C. granulatum* a presas hospedando NEP.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Insetos da Universidade Federal de Lavras, localizada em Lavras, no Estado de Minas Gerais, Brasil. Todos os insetos utilizados foram retirados de criações mantidas no mesmo laboratório.

2.1 Produção dos nematoides entomopatogênicos

Os nematoides utilizados nos experimentos foram produzidos em condições de laboratório, utilizando-se dois isolados de uma espécie nativa do Brasil, *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5, nativo do Estado do Amazonas, e *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4, nativo do Estado de Minas Gerais. Estes nematoides foram produzidos pelo método *in vivo*, adaptado a partir de Woodring e Kaya (1988), em lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae) criadas de acordo com a metodologia descrita por Dutky et al. (1964), e sendo utilizada uma dieta artificial modificada por Parra (1998). Os JI, emergidos de 1º e 2º dia viáveis, foram contabilizados e armazenados em suspensão por período máximo de cinco dias a $16\pm 1^\circ\text{C}$ em câmara climática até a utilização no experimento, quando foi conferida novamente a viabilidade destes.

2.2 Criação do predador *Calosoma granulatum* e de *Spodoptera frugiperda*

Adultos de *C. granulatum* foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Lavras, durante a noite, e individualizados em frascos de vidro (capacidade de 1,3 L, diâmetro de 12 cm, altura de 17 cm) envoltos por plástico

preto para diminuir o estresse do inseto. A criação de laboratório foi uma adaptação da metodologia proposta por Pasini (1995). Os frascos foram preenchidos com substrato artificial comercial Plantmax®, esterilizado em autoclave por 30 minutos, a 121°C, e umedecido sempre que necessário. Foram mantidos um adulto por frasco, recebendo água em um pedaço de algodão umedecido e alimentados com um pedaço de banana da variedade “Terra” (*Musa paradisiaca* (Musaceae)). Quando havia a necessidade de larvas para os experimentos, estes insetos foram acasalados e, para que houvesse a oviposição, eram alimentados com duas lagartas vivas de último ínstar de *S. frugiperda* por dia. Quando constatada a postura, os ovos foram separados e transferidos para recipientes de plástico transparentes e quadrados com capacidade para 400 mL (4 cm de altura e 11 cm de largura), preenchido o mesmo substrato artificial mencionado anteriormente e mantidos em câmara climática a 27±1°C, com fotofase de 14 horas. Devido ao seu hábito canibal, as larvas emergidas foram individualizadas em recipientes de plástico (iguais aos utilizados para os ovos) contendo substrato artificial e alimentadas diariamente com 1 a 3 lagartas de *S. frugiperda* ou larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) de aproximadamente 1 cm para o primeiro ínstar, 1 a 3 lagartas de 1 a 2 cm para o segundo ínstar, e 2 a 4 lagartas maiores de 2 cm para o terceiro ínstar de larvas de *C. granulatum*.

A criação de *S. frugiperda* iniciou-se a partir de lagartas coletadas no campo, mantidas com dieta artificial (BOWLING, 1967), em tubos de vidro de fundo chato (15 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro) fechados com algodão hidrófilo. Quando as larvas alcançaram a fase de pupa, foram transferidas para gaiolas que consistiam de cano de PVC (cloro de polivinil) com 20 cm de diâmetro e 30 cm de altura, e parede interna forrada com papel. A alimentação dos adultos foi composta por uma suspensão de 10% de mel impregnada em pedaços de algodão. As massas de ovos depositadas no papel foram recolhidas e

transferidas para placas de Petri. Quando constatada a eclosão das larvas, adicionou-se um pedaço de dieta à placa, e as larvas de 0,5 cm de comprimento foram individualizadas em tubos que continham dieta.

2.3 Efeito da aplicação direta de nematoides *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 e *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 sobre o predador *Calosoma granulatum*

Com o objetivo de constatar se dois isolados de nematoides da espécie *H. amazonensis* (isolado RSC 05, originário do Estado do Amazonas, e isolado JPM 4, originário de Estado de Minas Gerais) são capazes de causar a mortalidade do predador quando em contato direto com este, foram conduzidos experimentos com os três ínstares larvais, pupas e adultos de *C. granulatum* e com as concentrações de zero (controle), 75, 150, 300 e 600 JI/mL dos nematoides. Os experimentos com cada ínstar larvar e fase de desenvolvimento foram conduzidos separadamente, nos quais um tratamento era uma das concentrações de um dos isolados do nematoide.

Para os ensaios com larvas e pupas, utilizaram-se copos plásticos (50 mL) preenchidos com 50 g de substrato comercial Plantmax[®] esterilizado em autoclave por 30 minutos a 121°C. Foi inoculado 1 mL da suspensão, contendo JI sobre o substrato e, em seguida, adicionado um predador por copo, que foi fechado com tampa de acrílico. Como as larvas possuem hábito alimentar mais carnívoro que os adultos, estas foram alimentadas diariamente com larvas de *T. molitor* mortas por congelamento, já que as larvas do 1º e 2º ínstar do predador demonstravam dificuldade em manipular larvas vivas. O tamanho e a quantidade de presas foram determinados pelo ínstar do predador.

Para avaliar o efeito sobre adultos, utilizaram-se recipientes de plástico com 15 cm de diâmetro e 10 cm de altura envoltos em plástico preto para

diminuir o estresse do inseto. O fundo dos recipientes foi preenchido com 100 g de substrato comercial para plantio Plantmax[®] esterilizado em autoclave por 30 minutos a 121 °C. Foi adicionado um inseto adulto (\pm 20 dias de idade) por recipiente, sobre o qual foi inoculado 1 mL da suspensão que continha JI. Em seguida, os potes foram tampados com tecido organza e elástico. Os adultos receberam algodão embebido em água e foram alimentados diariamente com um pedaço de banana da variedade “Terra”.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento, considerando-se cada inseto uma repetição, mantidos em um ambiente a $27\pm 3^{\circ}\text{C}$, com fotofase de 14 horas. As avaliações foram diárias durante cinco dias, registrando-se o número de insetos mortos. Estes foram removidos do experimento e mantidos em câmara climática ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotofase de 14 horas) por cinco dias para serem dissecados e, assim, confirmada a mortalidade por nematoide.

As diferenças na sobrevivência entre as concentrações avaliadas para cada instar foram analisadas utilizando-se o método de Kaplan-Meier, para plotar as funções de sobrevivência cumulativas pelos tratamentos com comparações de pares realizadas pelo teste de logrank. As análises foram conduzidas no software R (versão 2.13.2, pacotes “survival” e “KMsurv”).

2.4 Testes de alimentação com chance de escolha

Com o objetivo de avaliar se o predador aceita ou rejeita uma presa contaminada quando há outra opção de presa saudável, foram realizados experimentos com chance de escolha com os nematoides *H. amazonensis* isolado RSC 5 e *H. amazonensis* isolado JPM 4, larvas de terceiro ínstar (oito dias de idade) e adultos (cerca de 20 dias de idade) do predador *C. granulatum*. Os insetos foram submetidos a dois tipos de teste com oferta de lagartas de *S.*

frugiperda de 5º instar, infectadas ou não pelos nematoides, um com chance de escolha entre duas opções de lagartas vivas, e outro com chance de escolha entre duas opções de lagartas mortas.

Para ambos os testes, foram utilizadas arenas montadas em um recipiente de plástico quadrado com 5 cm de altura e 15 cm de largura, cujas paredes laterais externas foram envoltas com plástico preto para evitar o estresse visual do inseto. Na parte interna do recipiente, no centro de duas paredes opostas, foi colado um pedaço quadrado (1×1 cm) de armadilha adesiva amarela (marca Biocontrole[®]) a 1 cm de distância do fundo, de forma que os dois pedaços de armadilha ficassem de frente um para o outro. Estes pedaços de armadilha foram utilizados para colar a opção alimentar na parede interna da arena. O fundo do recipiente foi coberto com uma fina camada (cerca de 100 g) de substrato comercial para plantio Plantmax[®] esterilizado em autoclave por 30 minutos a 121°C.

O teste com chance de escolha entre lagartas vivas de *S. frugiperda* teve o objetivo de avaliar se o predador era capaz de distinguir entre uma lagarta que continha apenas o NEP em seu interior (sem a presença da bactéria na hemocele, isto é, infectada pelo nematoide, 24 horas antes (KAYA; GAUGLER, 1993)), e uma lagarta saudável, sem o entomopatógeno. Para tal, utilizaram-se apenas os adultos do predador, devido à dificuldade que as larvas tinham em manipular as lagartas de 5º instar vivas de *S. frugiperda* coladas na arena. Dessa forma, foram ofertadas ao adulto predador uma lagarta viva saudável e uma lagarta viva que recebeu inoculação tópica de uma suspensão de 1 mL, que continha cerca de 1000 JI (de *H. amazonensis* ou *Heterorhabditis* sp. isolado JPM 4), 24 horas antes de ser utilizado no teste.

Já o teste com chance de escolha entre lagartas mortas de *S. frugiperda* teve o intuito de avaliar se o predador era capaz de distinguir entre uma lagarta hospedando o complexo nematoide/bactéria e uma lagarta morta por

congelamento (saudável). Neste experimento, foram utilizadas as larvas e os adultos do predador, para os quais se ofertou uma lagarta morta por congelamento (submetida à temperatura de -32°C por 24 horas e oferecida depois de descongelada por cerca de 15 min. em temperatura ambiente) e uma lagarta morta pelo NEP através de inoculação tópica de uma suspensão de 1 mL, contendo cerca de 1000 JI (de *H. amazonensis* ou *Heterorhabditis* sp. isolado JPM 4), 72 horas antes do experimento.

Em ambos os testes, após afixar as duas opções alimentares na arena, o predador foi solto no centro dela e observado durante 60 minutos, sendo os números de ocorrência dos comportamentos de ataque (mordida com duração menor de 30 segundos) e consumo (mordida com duração maior de 30 segundos) registrados, com a duração dos eventos cronometrada. Os predadores foram utilizados nos testes somente uma vez, após 24 horas de inanição. Quando não registrado nenhum comportamento em até 20 minutos de observação, o inseto foi trocado. Antes de utilizados nos experimentos, as larvas e os adultos de *C. granulatum* nunca haviam se alimentado de lagartas de *S. frugiperda*. Foram montadas 20 repetições para cada teste, sendo 20 para adultos e 20 para larvas, em ambiente iluminado com temperatura média de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para avaliar se a escolha do predador ocorreu na mesma frequência entre o ataque e o consumo de lagartas infectadas e saudáveis, realizou-se o teste de qui-quadrado com correção de Yates (devido ao pequeno número de valores observados). O tempo total gasto na manipulação (todos os ataques e consumos) da presa pelo predador, no teste com chance de escolha, foi transformado em porcentagem em relação ao tempo total de observação (uma hora). A diferença entre os tempos médios de manipulação das lagartas dos dois tratamentos (*H. amazonensis* isolado RSC 5 e JPM 4) foi analisada pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon, por não seguir a distribuição normal.

2.5 Teste de alimentação sem chance de escolha

Este experimento visou avaliar a sobrevivência de *C. granulatum* quando submetido a apenas uma opção alimentar, podendo ser lagartas saudáveis ou lagartas infectadas pelo nematoide e sua bactéria. Foi montado apenas um experimento com larvas de 3º instar, juntamente com adultos do predador, sendo que, para cada uma destas fases havia três tratamentos, e cada regime alimentar foi considerado um tratamento. Para isso, foram utilizados adultos de cerca de 20 dias de idade, larvas de 3º instar (oito dias de idade) de *C. granulatum* e lagartas de 5º instar (cerca de 15 dias de idade) de *S. frugiperda* mortas pelos nematoides ou por congelamento (submetidas a -32°C, por 24 horas, e ofertadas descongeladas em temperatura ambiente). Cada indivíduo foi mantido isolado em recipientes de plástico com 10 cm de altura e 15 cm de diâmetro, envoltos em plástico preto para evitar o estresse do inseto e fechados com tampa.

Os tratamentos foram controle, para o qual foi considerada a lagarta de *S. frugiperda* morta por congelamento; lagarta de *S. frugiperda* morta pelo nematoide *H. amazonensis* isolado RSC 5 (através de uma inoculação de 1 mL de suspensão com cerca de 1000 JI, 72 horas antes); e lagarta de *S. frugiperda* morta pelo nematoide *H. amazonensis* isolado JPM 4 (através de uma inoculação de 1 mL de suspensão com cerca de 1000 JI, 72 horas antes).

Diariamente, foram adicionadas duas lagartas ao recipiente que continha o adulto do predador e, ao recipiente contendo a larva, uma lagarta, sendo que, ao adicionar novas lagartas, eram removidas as oferecidas no dia anterior. A mortalidade e o peso do predador foram registrados diariamente, assim como o peso das lagartas antes e depois de serem ofertadas para ele, para ser mensurado o peso consumido. Quando constatada mortalidade, o inseto era dissecado após cinco dias, para verificar a presença ou não de nematoides em seu interior. O

experimento teve duração de seis dias, contou com 20 repetições para cada estágio de desenvolvimento, foi arranjado em um delineamento inteiramente casualizado e mantido em uma sala com fotofase de 14 horas e $27\pm 3^{\circ}\text{C}$.

As porcentagens de consumo de cadáveres de lagartas de *S. frugiperda* pelo predador, no primeiro dia de avaliação (o único em que se manteve o mesmo número de observações em todos os tratamentos), e a porcentagem de peso ganho entre o início do experimento e a primeira avaliação foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk, para testar a normalidade. Em seguida, foi realizada a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software BioEstat, versão 5.3 (AYRES et al., 2007).

As diferenças de sobrevivência entre os diferentes tratamentos foram analisadas através do método de Kaplan-Meier, para plotar as funções de sobrevivência cumulativas pelos tratamentos, com comparações de pares realizadas pelo teste de logrank. As análises foram conduzidas no software R (versão 2.13.2, pacotes “survival” e “KMsurv”).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito da aplicação direta de nematoides *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 e *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 sobre o predador *Calosoma granulatum*

Apenas o primeiro ínstar larval sofreu mortalidade pelos dois isolados do nematoide. Neste ínstar, os dois nematoides reduziram a sobrevivência após cinco dias de exposição, não sendo constatada mortalidade no tratamento-controle, no qual as larvas alcançaram o segundo ínstar. A única concentração que não causou mortalidade pelo nematoide *H. amazonensis* isolado RSC 5 foi a de 75 JI/mL (logrank: $p=0,152$). Porém, ao aumentar a concentração de JI, a sobrevivência das larvas diminuiu progressivamente, sobrevivendo $65\pm 0,55\%$ dos insetos na concentração de 150 JI/mL, e $30\pm 0,53\%$ na concentração de 600 JI/mL após cinco dias da inoculação. Estes tratamentos diferiram entre si (logrank: $p=0,0103$), e apenas o tratamento de 300 JI/mL assemelhou-se a eles (logrank: $p=0,148$, $p=0,283$), resultando em uma quantidade intermediária de insetos sobreviventes (Figura 1).

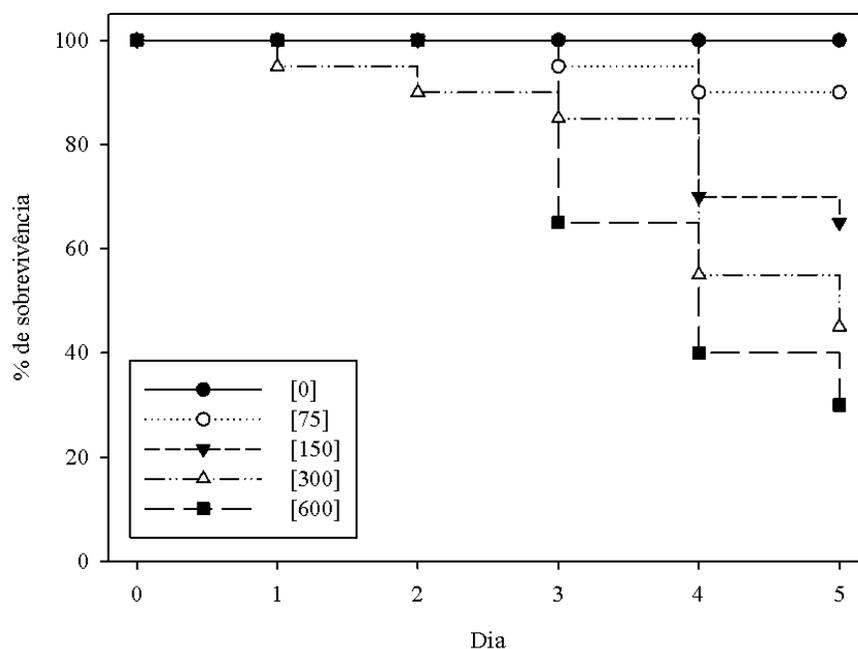


Figura 1 Sobrevivência diária de larvas de primeiro ínstar de *Caolosoma granulatum* inoculadas com 0, 75, 150, 300 e 600 JI/mL do nematoide *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 durante cinco dias após a inoculação em experimento de laboratório.

Assim como para o nematoide *H. amazonensis* isolado RSC 5, o nematoide *H. amazonensis* isolado JPM 4 não causou mortalidade das larvas de primeiro ínstar do predador na concentração de 75 JI/mL (logrank: $p=0,152$). Houve diminuição da sobrevivência do predador ao aumentar a concentração de JI, mas sem diferença significativa entre as concentrações de 150, 300 e 600 JI/mL (logrank: $p=0,146$), sobrevivendo mais que 55% das larvas após cinco dias da aplicação (Figura 2).

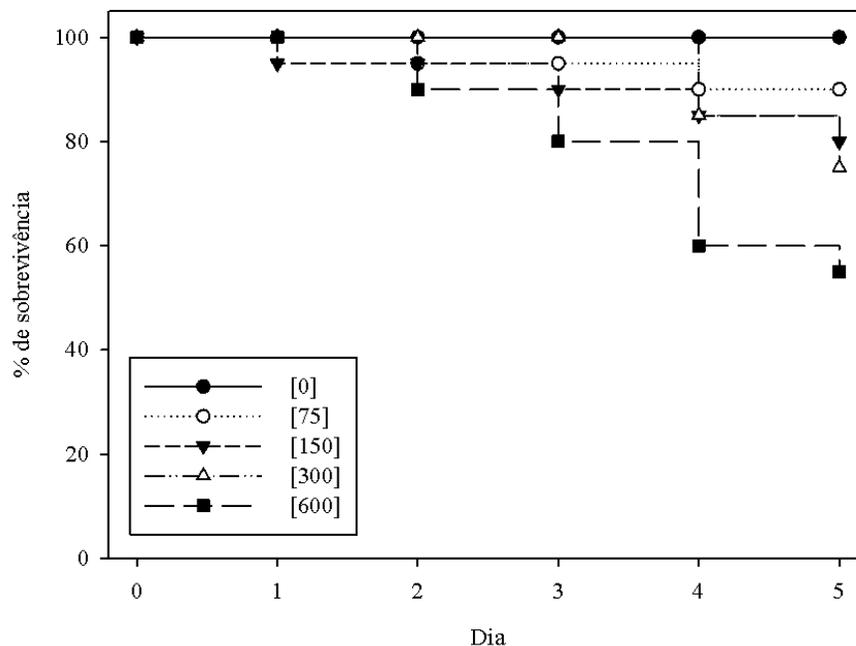


Figura 2 Sobrevivência diária de larvas de primeiro ínstar de *Calosoma granulatum* inoculadas com 0, 75, 150, 300 e 600 JI/mL do nematoide *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 durante cinco dias após a inoculação em experimento de laboratório.

3.2 Teste de alimentação com chance de escolha

Primeiramente, foram consideradas a primeira ocorrência de ataque e a de consumo das lagartas de *S. frugiperda* como fatores separados. Desta forma, houve quatro possibilidades de comportamento do predador, nas quais ele podia atacar a lagarta infectada e consumir a saudável; atacar e consumir a lagarta infectada; atacar a lagarta saudável e consumir a infectada; e atacar e consumir a saudável. Os dados de adultos atacando e consumindo lagartas vivas e mortas de *S. frugiperda* estão representados nas Figuras 3 e 4, respectivamente, e os de larvas atacando e consumindo lagartas mortas, na Figura 5.

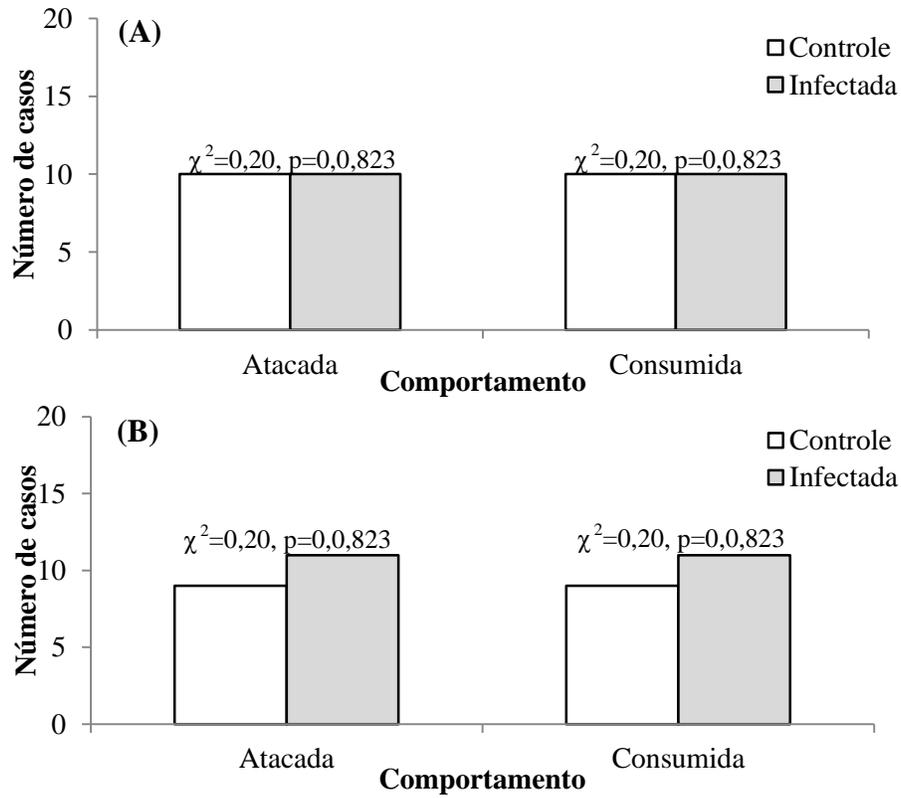


Figura 3 Número de ataques e consumos de adultos de *Calosoma granulatum* a lagartas controle (saudáveis) e vivas infectadas pelos nematoides *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 (A) e *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 (B) em um experimento com chance de escolha.

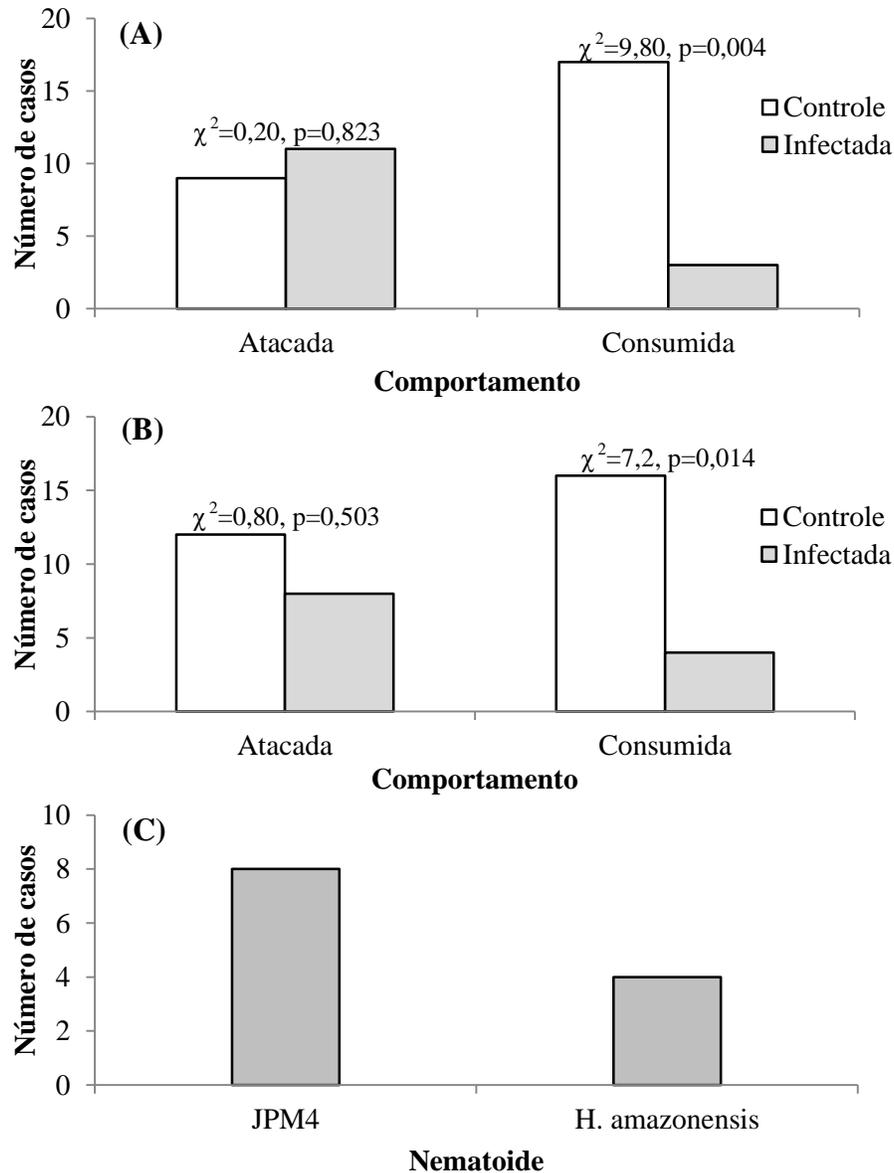


Figura 3 Número de ataques e consumos de adultos de *Calosoma granulatum* a cadáveres infectados pelos nematoides *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 (A) e infectados pelo nematoide *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 (B) e o número de trocas entre cadáveres infectados e controle (o adulto primeiramente atacou o infectado, mas consumiu o saudável) (C) em um experimento com chance de escolha.

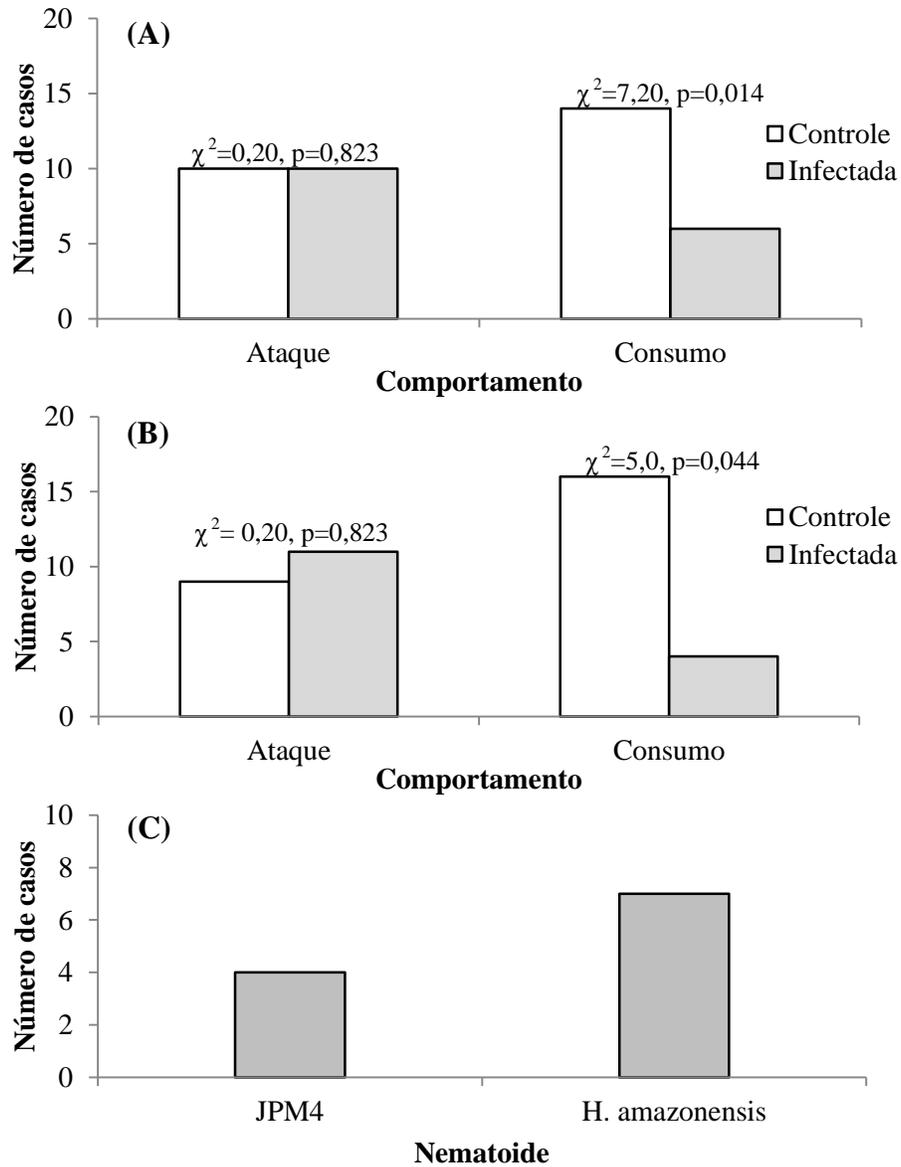


Figura 5 Número de ataques e consumos de larvas 3º instar de *Calosoma granulatum* a cadáveres infectados pelos nematoides *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 (A) e infectados pelo nematoide *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 (B) e o número de trocas entre cadáveres infectados e controle (a larva primeiramente atacou o infectado, mas consumiu o saudável) (C) em um experimento com chance de escolha.

Observou-se que as larvas e os adultos do predador que puderam optar entre cadáveres saudáveis e infectados por NEP atacaram aleatoriamente as duas opções de presa, mas preferiram consumir os cadáveres-controle. Quando as larvas atacaram primeiramente um cadáver hospedando o isolado JPM 4, 40% delas trocaram de presa e passaram a se alimentar do cadáver-controle, sendo que, quando atacaram primeiramente cadáveres mortos pelo isolado RSC 5, 64% trocaram para o consumo da lagarta-controle. Os adultos do predador também demonstraram este comportamento de troca, pois quando o primeiro ataque foi desferido contra o cadáver infectado por JPM 4 e RSC 5, foram observadas trocas em, respectivamente, 73 e 50% dos casos, com os insetos passando a consumir os cadáveres-controle.

Quando houve o consumo das lagartas infectadas pelo predador (tanto larvas quanto adultos, Figuras 3 e 4), em todos os casos, este comportamento foi relativamente curto e seguido por uma troca, na qual o inseto passou para um segundo comportamento de consumo com a outra opção de presa, a controle (dados não representados graficamente). Não foram observadas trocas quando o predador atacou primeiramente a lagarta-controle (saudável).

No experimento com a oferta de lagartas vivas de *S. frugiperda*, o adulto do predador demonstrou a mesma frequência entre ataque e consumo, sendo as duas opções alimentares (lagartas saudáveis e contaminadas) atacadas e consumidas aleatoriamente, não havendo trocas entre o ataque à determinada lagarta e o consumo de outra (Figura 5).

Quanto ao tempo total de manipulação de lagartas infectadas *versus* controle pelo predador, não houve diferença entre o tempo gasto manipulando lagartas infectadas pelo isolado JPM 4 e RSC 5, assim como não houve diferença entre o tempo despendido com a manipulação das lagartas-controle dos mesmos tratamentos (wilcoxon, adulto consumindo lagarta morta, infectada

e controle: $p= 0,626$; Lagarta controle, $p= 0,160$, respectivamente; adulto consumindo lagarta viva, infectada e controle: $p= 0,766$, $p= 0,570$, respectivamente; larva consumindo lagarta infectada e controle: $p= 0,829$, $p= 0,372$, respectivamente). Os adultos e larvas do predador gastaram, em média, 1,4% do tempo manipulando cadáveres hospedando nematoides e bactérias, e 73,1% do tempo manipulando cadáveres saudáveis (controle). Para lagartas vivas, a porcentagem de tempo manipulando lagartas infectadas e controle foi semelhante, sendo, em média, de 38,3% para lagartas infectadas e 37,5% para lagartas-controle (Tabela 1).

Tabela 1 Porcentagens (em relação ao tempo total de observação de uma hora) do tempo despendido por adultos e larvas do predador *Calosoma granulatum* na manipulação de lagartas de *Spodoptera frugiperda* infectadas pelos nematoides *Heterorhabditis amazonensis*, isolado JPM 4, e *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 e controle (lagarta saudável) em experimento com chance de escolha.

Fase	Tratamento	Lagarta morta		Lagarta viva	
		Infectada	Controle	Infectada	Controle
Adulto	JPM 4	1,6±1,1 ^a	82,4±3,8	40,0±9,1	34,0±8,0
	RSC 5	1,8±1,4	73,7±5,4	36,7±9,5	41,1±8,9
Larva	JPM 4	1,3±0,4	70,3±4,5	-	-
	RSC 5	1,1±0,4	66,2±4,2	-	-

^amédias na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Wilcoxon ($p \geq 0,05$) para larvas e adultos.

3.3 Teste sem chance de escolha

De forma geral, a alimentação exclusiva de cadáveres infectados com NEP causou grande mortalidade de larvas de terceiro ínstar do predador (logrank: (2) $p= 8,15e-07$), sendo que a mortalidade não foi diferente entre os dois nematoides (isolado JPM 4 e isolado RSC 5) (logrank: (1) $p=0,691$). O

tratamento com o nematoide *H. amazonensis* isolado RSC 5 começou a causar mortalidade no segundo dia de avaliação, e as larvas consumindo lagartas mortas por *H. amazonensis* isolado JPM 4 começaram a sofrer mortalidade apenas no quarto dia. Nos dois tratamentos, foi observada uma taxa de sobrevivência inferior a 20% no sétimo dia de avaliação (Figura 6), e não se constatou a presença de nematoides no interior das larvas mortas.

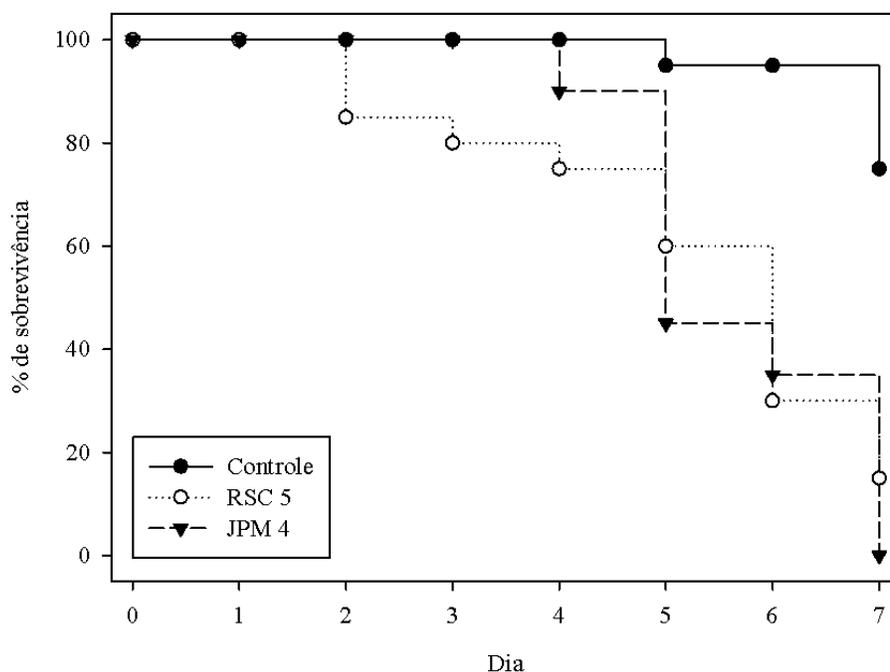


Figura 4 Sobrevivência de larvas de terceiro ínstar de *Calosoma granulatum* alimentadas diariamente com um cadáver de lagarta de *Spodoptera frugiperda* morta por congelamento (controle) e pelos nematoides *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 e *H. amazonensis* isolado RSC 5 em experimento sem chance de escolha.

Durante os seis dias de avaliação dos adultos de *C. granulatum*, observou-se mortalidade a partir do terceiro dia em todos os tratamentos, tanto dos que receberam cadáveres contaminados por NEP quanto dos mortos por

congelamento (controle) (logrank: (2) $p= 0,288$). Em todos os tratamentos, a probabilidade de sobrevivência do inseto, registrada no último dia de avaliação, foi de cerca de 60% (Figura 7). Assim como para as larvas, não foi constatada a presença de nematoides no interior dos adultos mortos no experimento.

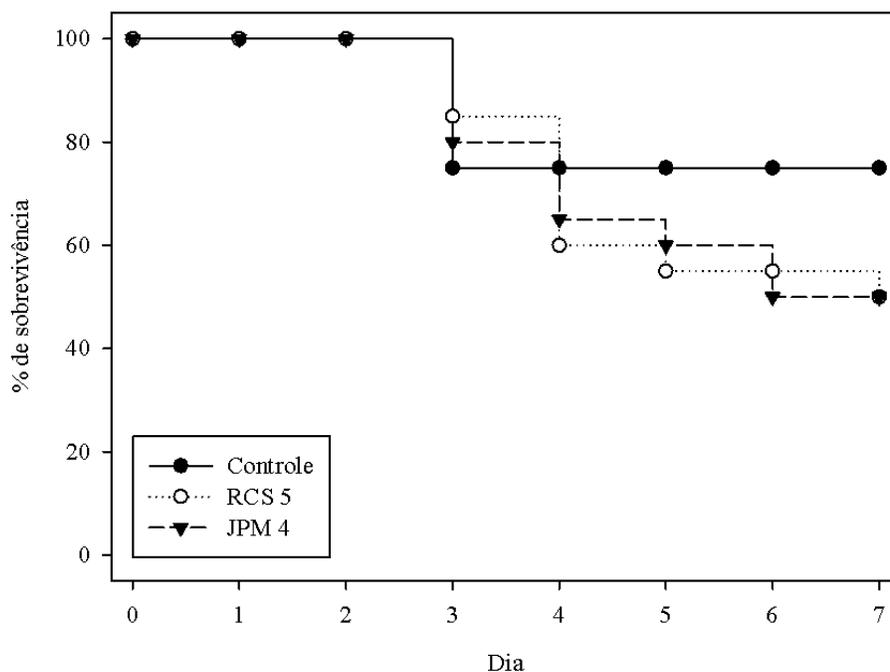


Figura 5 Sobrevivência de adultos de *Calosoma granulatum* alimentados diariamente com dois cadáveres de lagartas de *Spodoptera frugiperda* mortas por congelamento (controle) e pelos nematoides *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 e *H. amazonensis* isolado RCS 5 em teste sem chance de escolha.

Quanto à porcentagem média do peso consumido em relação ao peso total ofertado diariamente para o predador, observou-se que tanto as larvas quanto os adultos consumiram mais quando ofertados apenas os cadáveres saudáveis (controle), em vez dos mortos por ação dos NEP, não havendo diferença entre a quantidade consumida entre os tratamentos com NEP. As

larvas e os adultos consumiram, em média, 88 e 67%, respectivamente, do peso das presas saudáveis (tratamento- controle), contra 38 e 30,5%, respectivamente, do peso das lagartas mortas por NEP no primeiro dia de experimento. Apenas no tratamento-controle foi observado ganho de peso pelo predador (larvas e adultos) entre o dia inicial e o primeiro dia de avaliação (após uma única alimentação). Houve um aumento médio de 53% para larvas e 13% para adultos. Nos tratamentos com NEP, houve uma perda média de 16% para larvas e aproximadamente 17% para adultos (Tabela 2).

Tabela 2 Peso consumido e peso ganho (média±EP) pelo predador *Calosoma granulatum* (larva e adulto) antes e depois da primeira alimentação de cadáveres de lagartas de *Spodoptera frugiperda* mortas por congelamento (controle) e mortas pelos nematoides *Heterorhabditis amazonensis* isolado JPM 4 e *H. amazonensis* isolado RSC 5, e suas respectivas porcentagens em relação ao peso total oferecido em um experimento sem chance de escolha.

Fase	Tratamento	Consumo dia 1 (N=20) ¹		Peso ganho (dia inicial - dia 1)	
		(g)	(%)	(g)	(%)
Larva	Controle	0,348±0,024	88,2±4,2 ² a	0,086±0,013	53,2±11,6 ² a
	JPM 4	0,124±0,009	37,1±2,4 b	-0,027±0,005	-13,6±3,4 b
	RSC 5	0,128±0,008	38,3±2,7 b	-0,035±0,008	-18,2±4,4 b
Adulto	Controle	0,557±0,033	67,0±4,3 a	0,046±0,027	13,4±6,9 a
	JPM 4	0,208±0,024	30,3±3,5 b	-0,069±0,014	-17,2±3,5 b
	RSC 5	0,164±0,017	30,8±3,6 b	-0,059±0,012	-16,4±3,3 b

¹números iguais de observações entre os tratamentos ocorreram apenas no primeiro dia de avaliação, quando não havia insetos mortos entre os tratamentos;

²médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade para larvas e adultos.

4 DISCUSSÃO

De forma geral, a fase de desenvolvimento larval de *C. granulatum* foi a única afetada pelos nematoides, sofrendo mortalidade tanto na inoculação direta quanto ao se alimentar exclusivamente de cadáveres de lagartas de *S. frugiperda* hospedando os nematoides e sua bactéria simbiote.

Nos testes com inoculação direta de NEP, apenas o primeiro ínstar larval foi suscetível à infecção com os NEP e em concentrações iguais ou maiores que 150 JI/mL. Desta forma, o nematoide *H. amazonensis* isolado RSC 5 foi mais prejudicial que o isolado JPM 4, já que resultou em menor quantidade de insetos sobreviventes depois de cinco dias de sua inoculação na maior concentração avaliada, que foi de 600 JI/mL (30% de sobrevivência com o isolado RSC 5 versus 55% com isolado JPM 4). Vale ressaltar a grande resistência dos demais ínstares larvais, pupas e adultos aos nematoides avaliados, o que indica que a suscetibilidade de larvas jovens justifica-se, provavelmente, pela ausência de algum mecanismo de defesa contra estes entomopatógenos, ainda não desenvolvido no primeiro ínstar larval.

Este contato direto dos NEP com larvas do predador, simulado em laboratório, só é possível em campo em programas de controle inundativo de pragas, nos quais normalmente são aplicadas concentrações equivalentes a bilhões de JI/hectare (GEORGIS et al., 2006). Porém, em laboratório, a condição de contato estabelecida é extrema e garantida, com condições ambientais ótimas para a infecção. Devido a vários fatores ecológicos e biológicos, o potencial para os NEP causarem o mesmo impacto nas populações do inimigo natural em campo é reduzido (HAJEK; GOETTEL, 2000), como já comprovado em experimentos realizados por Georgis, Kaya e Gaugler (1991), nos quais os NEP que causaram mortalidade a insetos não-alvo em laboratório não ocasionaram a supressão populacional dos mesmos em campo. Além disso, os resultados aqui

apresentados mostram a ocorrência de mortalidade apenas em um ínstar larval (o primeiro), o que não indica necessariamente um risco à espécie, já que, em condições de campo, o predador está presente em diversas fases de desenvolvimento e instares larvais. Sendo assim, testes de campo são importantes para verificar se os resultados observados em laboratório se repetem no ambiente natural.

Mesmo com a reduzida probabilidade de os NEP diminuírem a população do predador em campo, os resultados mostraram que as larvas de primeiro ínstar são suscetíveis aos NEP avaliados, e ainda que não mensurada a capacidade reprodutiva dos nematoídes neste hospedeiro, eles foram encontrados viáveis e colonizando as larvas quando dissecadas após cinco dias da sua morte. A capacidade dos NEP em infectar uma grande gama de espécies de insetos, mesmo os considerados não-alvo, é importante sob o ponto de vista da reciclagem do nematoíde na ausência de hospedeiros mais suscetíveis no campo, pois o hospedeiro, além de fonte de alimento, representa um local de acasalamento para o nematoíde (LEWIS et al., 2006).

Os resultados do experimento com chance de escolha mostraram que as larvas de 3º ínstar e adultos do predador, que não foram afetados pelos nematoídes nas aplicações diretas, evitam o consumo de cadáveres de *S. frugiperda* que os hospedam. Em uma situação onde o adulto de *C. granulatum* possui a opção de se alimentar de presas vivas, sendo uma saudável e outra recém-infectada pelo NEP, mas sem a presença da bactéria simbiote liberada por ele (24 horas após a inoculação, período no qual a bactéria ainda não foi liberada (KAYA; GAUGLER, 1993)), não há distinção entre as duas e ambas são predadas. Porém, quando os adultos e larvas do predador podem optar por duas lagartas mortas, uma por congelamento (saudável) e outra pela ação do complexo nematoíde/bactéria (72 horas após a inoculação), houve grande preferência no consumo do cadáver saudável. Estes resultados comprovaram que

somente a presença do nematoide no hospedeiro não é o suficiente para evitar sua predação, havendo a necessidade da presença da bactéria simbiote na sua hemocele para que não seja consumido.

Este efeito de “evitar o consumo” dos cadáveres infectados pelo predador é considerado deterrente porque ele morde aleatoriamente as duas opções de cadáveres (infectados ou não) e, depois, decide se irá consumi-los. É importante ressaltar que, quando infectado, o cadáver é rejeitado. Assim, na maioria dos casos em que o ataque foi desferido contra um cadáver infectado, este comportamento foi seguido de uma troca para uma presa morta por congelamento. Nos casos em que os indivíduos além de provar, consumiram o cadáver infectado (larvas e adultos consumindo cadáver contaminado com o isolado JPM 4, N=6 e N=3, respectivamente, com o isolado RSC 5, N=4 para larvas e adultos), o tempo de consumo foi relativamente curto e, após este pequeno período, o predador trocava de presa e passava a consumir a lagarta morta por congelamento.

Resultados semelhantes foram obtidos por Foltan e Puza (2009) com outro besouro carábido, o predador/detritívoro *Pterostichus melanarius* (Illiger) (Coleoptera: Carabidae), em experimentos com chance de escolha, nos quais o inseto atacava aleatoriamente lesmas (*Deroceras reticulatum* (Müller) (Pulmonata: Stylommatophora)) e lagartas (*G. mellonella*) mortas por congelamento ou pelos nematoides *Phasmarhabditis hermafrodita* (Rhabditidae) e *S. affine*, mas evitava o seu consumo.

Baur, Kaya e Strong (1998) publicaram um dos primeiros trabalhos relacionados ao efeito deterrente de cadáveres que continham o complexo nematoide/bactéria sobre artrópodes detritívoros, indicando que a bactéria simbiote dos nematoides da família Heterorhabditidae, *Photorhabdus luminescens*, produzia alguma substância química que levava as operárias das formigas *Linepithema humile* (Mayr) (Hymenoptera: Formicidae) a evitar o

consumo total de cadáveres de insetos hospedeiros. A existência desta substância foi comprovada por Zhou et al. (2002), que a encontraram no sobrenadante da bactéria simbiótica associada a NEP, relacionando novamente a sua produção a estas bactérias e passando a chamá-la de “fator deterrente a formigas” (ADF – “ant deterrent factor”). Porém, Gulcu, Hazir e Kaya (2012) mostraram que ela não é só deterrente a formigas, mas também a grilos (*Gryllusbimaculatus* De Geer (Orthoptera: Gryllidae)), vespas (*Vespa orientalis* L. e *Paravespula* sp. (Hymenoptera: Vespidae) e a moscas (*Chrysomya albiceps* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae)), as quais evitaram ovipositar em substrato contendo esta mesma bactéria simbiótica e, desta forma, os autores propuseram que a substância passasse a ser chamada de “fator deterrente a detritívoros” (SDF – “scavenger deterrent factor”). Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com os obtidos em outras pesquisas, mostrando que *C. granulatum*, predador que também possui comportamento detritívoro (YOUNG, 1984), é afetado pelo fator deterrente. Porém, nem todos os detritívoros são afetados por este fator.

Ekmen et al. (2010) mostraram que o ácaro detritívoro e nematófago *Sancassania polyphyllae* Z. (Acari: Acaridae) consome lagartas mortas por *Steinernema feltiae* e *Heterorhabditis bacteriophora*, e não é afetado nem sofre mortalidade devido ao fator deterrente.

A função desta substância seria a proteção do complexo nematoide/bactéria, evitando que o cadáver hospedando o entomopatógeno seja destruído, já que ele permanece intacto durante todo o ciclo de desenvolvimento do nematoide, que dura de 7 a 15 dias (POINAR, 1979). Além disso, sua destruição implicaria na interrupção do ciclo de desenvolvimento do nematoide (BAUR; KAYA; STRONG, 1998; ZHOU et al., 2002). De fato, no experimento com chance de escolha aqui apresentado, quando o predador mordeu o cadáver infectado, os buracos feitos no tegumento foram pequenos, não sendo suficientes

para expor o conteúdo interno do cadáver. Como já mencionado, quando houve o consumo desta mesma presa, a duração foi curta e insuficiente para exauri-la.

Alguns autores hipotetizam que o fator deterrente esteja mais relacionado a uma adaptação evolucionária do complexo nematoide/bactéria para evitar que sejam consumidos do que a uma capacidade do besouro em evitar consumir um cadáver potencialmente infectante (FOLTAN; PUZA, 2009; ZHOU et al., 2002). Sendo assim, Foltan e Puza (2009) afirmam que é insignificante uma pressão evolutiva sobre insetos detritívoros facultativos para que desenvolvam mecanismos de reconhecimento de cadáveres infectantes.

Porém, os resultados do experimento sem chance de escolha, no qual o predador não possuía outra opção de alimento além da ofertada, mostraram que ele consome o cadáver infectado, mas em uma proporção inferior à consumida no tratamento-controle (38 e 30% do peso de lagartas que continham NEP consumido por larvas e adultos, respectivamente, *versus* 88 e 67% no tratamento-controle, dados representados na Tabela 2). Este consumo de cadáveres infectados por isolado RSC 5 por larvas de terceiro ínstar acarretou sua mortalidade a partir do segundo dia de avaliação (com 15% dos insetos mortos) e alcançou 85% dos insetos em seis dias de alimentação (dados representados na Figura 6). Estes resultados demonstraram que, mesmo ingerindo uma pequena quantidade de presa infectada (consumo médio de 0,13 g no primeiro dia no tratamento isolado RSC 5 contra 0,35 g no tratamento-controle, dados representados na Tabela 2), esta é suficiente para causar a mortalidade da larva. Logo, o comportamento de evitar uma presa morta por ação de nematoides provavelmente seja também uma decisão tomada pelo predador a fim de evitar o consumo de um alimento que irá prejudicá-lo, e não apenas a ação do fator deterrente atuando na proteção do entomopatógeno contra a destruição do cadáver.

A grande mortalidade de larvas ao final de seis dias alimentando-se exclusivamente de cadáveres hospedando NEP (85 e 100% nos tratamentos com os nematoides, isolado RSC 5 e isolado JPM 4, respectivamente, dados representados na Figura 6), além do efeito negativo do complexo nematoide/bactéria, provavelmente deveu-se à sua subnutrição, pois passaram um longo período ingerindo quantidades muito inferiores às ingeridas no tratamento-controle e perderam peso no primeiro dia de alimentação (redução de 16% do peso). Ao contrário, houve acréscimo de peso entre as larvas alimentadas com cadáveres saudáveis, em que se observou um aumento de 53% (dados representados na Tabela 2).

Os adultos, por outro lado, não sofreram mortalidade significativa ao se alimentarem exclusivamente de cadáveres hospedando NEP por seis dias (dados representados na Figura 7). Young (2008) observou que adultos do predador *Calosoma sayi* (Coleoptera: Carabidae), que possui tamanho semelhante ao de *C. granulatum*, sobreviveram por 26 a 36 dias sem alimentação. Logo, a capacidade de estes insetos sobreviverem a um longo período sem alimentação não implica que sejam resistentes ao consumo de presas contaminadas com NEP, até porque a quantidade ingerida destas foi menor que a do tratamento-controle (ingestão de 30,5 e 67% do peso dos cadáveres hospedando NEP e saudáveis, respectivamente, dados representados na Tabela 2). Desta forma, não se pode garantir que a probabilidade de sobrevivência mantenha-se a um período maior que o avaliado, já que assim como as larvas, os adultos perderam peso logo na primeira alimentação com lagartas infectadas (redução de 17% nos tratamentos com NEP contra aumento de 13% no tratamento-controle, dados representados na Tabela 2). Além disso, uma perda constante de peso foi verificada ao longo do experimento (dados não representados).

Em campo, uma situação semelhante à de laboratório, na qual todas as lagartas de *S. frugiperda* estariam infectadas ou mortas por NEP, seria

praticamente impossível, mesmo dentro de um programa de controle inundativo, pois dificilmente o entomopatógeno nativo conseguiria causar a mortalidade total de uma população de inseto fitófago (MILNE, 1962; SIMBERLOFF; STILING, 1996). Do mesmo modo, em condições naturais, os besouros possuem mais opções de alimento que as ofertadas em laboratório, já que as espécies deste gênero são predadores generalistas e consomem certa variedade de artrópodes mortos (LÖVEI; SUNDERLAND, 1996; YOUNG, 1984).

Além disso, a ocorrência de larvas e adultos de *C. granulatum* em campo, além das condições climáticas, está relacionada também com os períodos de maior população lagartas/presas (PEGORARO; FOERSTER, 1988). Assim, a ausência de presas saudáveis levaria à migração do inseto para outras áreas em busca de alimento. Esta migração seria facilitada pela alta capacidade de deslocamento dos adultos, que podem se deslocar a distâncias superiores a 150 m na cultura de soja (PASINI; FOERSTER, 1996). Já as larvas do predador, que são mais carnívoras que os adultos (estes são mais polívoros), possuem deslocamento limitado, habitando normalmente o mesmo local onde eclodiram (LÖVEI; SUNDERLAND, 1996). Portanto, estas larvas encontrariam dificuldade em alcançar áreas distantes, com maior disponibilidade e qualidade de presas, o que colabora com um possível efeito negativo dos NEP sobre esta fase de desenvolvimento.

Neste sentido, no trabalho de Pasini e Foerster (1994) sobre o efeito de inseticidas químicos a larvas e adultos de *C. granulatum* em campo e em laboratório, foi observado que o inseticida Clorpirifós causa a mortalidade do adulto em laboratório e, assim como a Permetrina e o Diflubenzuron, causam a redução populacional de larvas e adultos no campo. Porém, os autores não souberam distinguir se a diminuição da ocorrência do predador nas áreas tratadas do campo deveu-se à sua migração, motivada pela baixa disponibilidade

de presas afetadas pela aplicação de inseticidas (PASINI; FOERSTER, 1994), ou à ação direta dos inseticidas sobre o predador.

Os dois nematoides e o besouro utilizados nos experimentos são inimigos naturais nativos que atuam no controle natural de diversos insetos fitófagos (ALLEN, 1977; ANDALÓ et al., 2010; CHOCOROSQUI; PASINI, 2000; PEGORARO; FOERSTER, 1998) e, no caso dos nematoides, são usados em programas de controle biológico inundativo (BARBARA; BUSS, 2006; TOEPFER et al., 2010). Os resultados obtidos nos experimentos mostraram que a fase de desenvolvimento larval de *C. granulatum* é a única que pode sofrer algum impacto pela utilização dos nematoides no campo, seja pela inoculação direta ou pelo consumo de cadáveres infectados por eles.

No entanto, a utilização de estratégias conservacionistas, como a aplicação dos nematoides em horários diferentes aos de maior atividade das larvas (entre 10 e 19 horas, segundo Pasini e Foerster (1996)), a utilização de áreas de refúgio para os artrópodes inimigos naturais e a diversificação das plantas cultivadas que aumentam as opções de fitófagos, presas resistentes aos NEP (GURR; WRATTEN; LUNA, 2003; LANDIS; WRATTEN; GURR, 2000), podem reduzir as chances de supressão populacional direta dos inimigos naturais pelos NEP e também diminuir a migração dos adultos do predador para outras áreas com mais opções de presas. Assim, estas estratégias podem aumentar a eficiência do controle biológico de pragas e melhorar a eficácia destas duas alternativas de controle em um sistema de manejo integrado de pragas (MIP).

REFERÊNCIAS

- ALLEN, R. T. *Calosoma (Castrida) alternans granulatum* Perty: a predator of cotton leaf worms in Bolivia (Coleoptera: Carabidae: Caribini). **The Coleopterists Bulletin**, v. 31, n. 1, p. 73-76, Mar. 1977.
- ANDALÓ, V. et al. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1860-1866, 2010.
- ARTHURS, S.; HEINZ, K. M. Evaluation of the nematodes *Steinernema feltiae* and *Thripinema nicklewoodi* as biological control agents of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* infesting chrysanthemum. **Biocontrol Science and Technology**, v. 16, n. 2, p. 141-155, 2006.
- AYRES, M. et al. **BioEstat** – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: OngMamirua, 2007.
- BARBARA, K. A.; BUSS, E. A. Augmentative applications of *Steinernema scapterisci* (Nematoda: Steinernematidae) for mole cricket (Orthoptera: Gryllotalpidae) control in golf courses. **Florida Entomologist**, v. 89, n. 2, p. 257-262, 2006.
- BAUR, M. E.; KAYA, H. K.; STRONG, D. R. Foraging ants as scavengers on entomopathogenic nematode-killed insects. **Biological Control**, Orlando, v. 12, p. 231-236, 1998.
- BOWLING, C. C. Rearing of two lepidopterous pests of rice on common artificial diet. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 60, p. 1215-1216, 1967.
- BRUST, G. E.; STINNER, B. R.; MCCARTNEY, D. A. Predator activity and predation in corn agroecosystems. **Environmental Entomology**, College Park, v. 15, n. 5, p. 1017-1021, Oct. 1986.
- CHOCOROSQUI, V. R.; PASINI, A. Predação de pupas de *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) por larvas e adultos de *Calosoma granulatum* Perty (Coleoptera: Carabidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 65-70, Mar. 2000.

- DESNEUX, N. et al. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 197-215, 2010.
- DILLON, A. B. et al. Optimizing application of entomopathogenic nematodes to manage large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae) populations developing in pine stumps, *Pinus sylvestris*. **Biological Control**, Orlando, v. 40, p. 253-263, 2007.
- 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, p. 417-422, 1964.
- EKMEN, Z. I. et al. Food preference of *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae): living entomopathogenic nematodes or insect tissues? **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 6, p. 553-566, 2010.
- FOLTAN, P.; PUZA, V. To complete their life cycle, pathogenic nematode-bacteria complex deter scavengers from feeding on their host cadaver. **Behavioural Processes**, v. 80, n. 1, p. 76-79, Jan. 2009.
- GEORGIS, R.; KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Effect of Steinernematid and Heterorhahditid nematodes (Rhahditida: Steinernematidae and Heterorhahditidae) on non target arthropods. **Environmental Entomology**, College Park, v. 20, n. 3, p. 815-822, 1991.
- GEORGIS, R. et al. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 103-123, 2006.
- GULCU, B.; HAZIR, S.; KAYA, H. K. Scavenger deterrente fator (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 110, p. 326-333, 2012.
- GURR, G. M.; WRATTEN, S. D.; LUNA, J. M. Multi-function agricultural biodiversity: pest management and other benefits. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 4, p. 107-116, 2003.
- HAJEK, A. E.; GOETTEL, M. S. Guidelines for evaluation of entomopathogens on non-target organisms. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic, 2000. p.847-868.
- KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v. 38, p. 181-206, 1993.

KROMP, B. Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74, p. 187-228, 1999.

LANDIS, D. A.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 175-201, 2000.

LEWIS, E. E. et al. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 66-79, 2006.

LEWIS, W. J. et al. A total system approach to sustainable pest management. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 12243-12248, 1997.

LIM, U. T.; DRIESCHE, R. G. van. A new potential host and transmission routes of *Thripinema nicklewoodi*, an entomogenous nematode of western flower thrips. **Biological Control**, Orlando, v. 33, p. 49-55, 2005.

LÖVEL, G. L.; SUNDERLAND, K. D. Ecology and behavior of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 231-256, 1996.

MALAN, A. P.; MANRAKHAN, A. Susceptibility of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitiscapitata*) and the Natal fruit fly (*Ceratitisorosa*) to entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 100, p. 47-49, 2009.

MILLAR, L. C.; BARBERCHECK, M. E. Interaction between endemic and introduced entomopathogenic nematodes in conventional-till and no-till corn. **Biological Control**, Orlando, v. 22, p. 235-245, 2001.

MILNE, A. On a theory of natural control of insect population. **Journal of Theoretical Biology**, v. 3, p. 19-50, 1962.

PARRA, J. R. P. Raising insects for studies of pathogens. In: Alves, S.B.; ed. **Microbial control of insects**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1015-1037.

PASINI, A. **Biologia e técnica de criação do predador *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) em *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), lagarta-da-soja**. 1995. 67 p. Tese (Doutorado em Entomologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, 1995.

- PASINI, A.; FOERSTER, L. A. Efeito de inseticidas sobre *Calosoma granulatum* P. (Coleoptera: Carabidae). **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 23, n. 3, p. 455-460, 1994.
- PASINI, A.; FOERSTER, L. A. Ritmo diário de atividade e dispersão de *Calosoma granulatum* P. (Coleoptera: Carabidae) na cultura de soja. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 395-399, 1996.
- PEGORARO, R. A.; FOERSTER, L. A. Abundância e distribuição de larvas e adultos de *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) dentre cultivares de soja em diferentes épocas de semeadura. **Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia**, v. 17, p. 237-248, 1988.
- PEGORARO, R. A.; FOERSTER, L. A. Observações sobre o ciclo evolutivo e hábitos alimentares de *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 14, n. 2, p. 269-275, 1985.
- POINAR JR, G. O. **Nematodes for biological control of insects**. Boca Raton: CRC, 1979.
- POINAR JR., G. O. Nematode as facultative parasites of insects. **Annual Review of Entomology**, v. 17, p. 103-122. 1972.
- POWELL, J. R.; WEBSTER, J. M. Interguild antagonism between biological controls: impact of entomopathogenic nematode application on an aphid predator, *Aphidoletes aphidimyza* (Diptera: Cecidomyiidae). **Biological Control**, Orlando, v. 30, p.110-118, 2004.
- PŮŽA, V.; MRÁČEK, Z. Seasonal dynamics of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* as a response to abiotic factors and abundance of insect hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 89, p. 116-122, 2005.
- RIDDICK, E. W.; MILLS, N. J. Potential of adults carabids (Coleoptera: Carabidae) as predators of Fifth-Instar codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple orchards in California. **Environmental Entomology**, College Park, v. 23, n. 5, p. 1338-1345, 1994.
- ROJHT, H.; KAČ, M.; TRDAN, S. Nontarget effect of entomopathogenic nematodes on larvae of two spotted lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) and green lacewing (Neuroptera: Chrysopidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 4, p. 1440-1443, 2009.

- ROPEK, D.; JAWORSKA, M. Effect of an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser (Nematoda, Steinernematidae), on carabid beetles in field trials with annual legumes. **Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz**, v. 67, p. 97-100, 1994.
- SHANNAG, H. K.; CAPINERA, J. L. Interference of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) with *Cardiochiles diaphaniae* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of melon worm and pickleworm (Lepidoptera: Pyralidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 29, n. 3, p. 612-617, 2000.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; COTTRELL, T. E. Susceptibility of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) to entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 89, p. 150-156, 2005.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; GOUGE, D. H.; KOPPENHOFER, A. M. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. Wallingford: CABI, 2002. p. 333-355.
- SIMBERLOFF, D.; STILING, P. Risks of species introduced for biological control. **Biological Conservation**, Essex, v. 78, p. 185-192, 1996.
- SOMASEKHAR, N. et al. Non-target effects of entomopathogenic nematodes on the soil nematode community. **Journal of Applied Ecology**, v. 39, p. 735-744, 2002.
- SUENAGA, H.; HAMAMURA, T. Laboratory evaluation of carabids beetles (Coleoptera: Carabidae) as predator of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae. **Biological Control**, Orlando, v. 27, n. 3, p. 767-772, 1998.
- TOEPFER, S. et al. The effect of application techniques on field-scale efficacy: can the use of entomopathogenic nematodes reduce damage by western corn rootworm larvae? **Agricultural and Forest Entomology**, n. 12, p. 389-402, 2010.
- YOUNG, O. P. Body weight and survival of *Calosoma sayi* (Coleoptera: Carabidae) during laboratory feeding regimes. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, n. 1, p. 104-112, 2008.
- YOUNG, O. P. Prey of adult *Calosoma sayi* (Coleoptera: Carabidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, v. 19, n. 4, p. 503-507, 1984.

WANG, Y.; GAUGLER, R. Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese Beetle larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 72, p. 313-318, 1998.

WILSON, M. J. et al. Application pattern and persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biological Control**, Orlando, v. 26, p. 180-188, 2003.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: hand book of biology and techniques. **Southern Cooperative Series Bulletin. Arkansas Agricultural Experimental Station**, Fayetteville, v. 331, p.1-30, 1998.

WYCKHUYS, K. A. A. G.; O'NEIL, R. J. Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. **Crop Protection**, v. 25, p. 1180-1190, 2006.

ZHOU, X. et al. Response of ants to a deterrent factor(s) produced by the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6202-6209, 2002.

ARTIGO 2 Dispersão forética de *Heterorhabditis amazonensis* pelo predador *Calosoma granulatum*, em laboratório

RESUMO

Devido à capacidade limitada de deslocamento, os nematoides entomopatogênicos adotam estratégias alternativas para alcançar hospedeiros que estão em longas distâncias, podendo prender-se a um organismo que irá atuar apenas como agente dispersor, deslocando-o para locais onde não conseguiria ir sozinho. O besouro *Calosoma granulatum* apresenta hábito predador na fase larval e adulta e é considerado um dos principais predadores de lagartas no solo em sistemas agrícolas. Por outro lado, o nematoide *Heterorhabditis amazonensis* é um entomopatógeno nativo com grande ação no controle de lagartas de *Spodopetra frugiperda*. Desta forma, o presente trabalho avaliou a capacidade deste predador para carregar e dispersar o nematoide *H. amazonensis* em condições de laboratório. Foram utilizadas arenas compostas por dois recipientes contendo substrato e ligados por um cano, onde o inseto poderia se deslocar livremente. Um dos recipientes recebeu inoculação de juvenis infectantes (JI) e o outro foi considerado recipiente teste, recebendo apenas água destilada. O primeiro experimento foi conduzido com larvas e adultos do predador e foi avaliada a influência de diferentes concentrações de *H. amazonensis* no comportamento de forésia. No segundo experimento, avaliou-se o efeito do deslocamento da fase adulta do predador em diferentes distâncias na dispersão do nematoide. Os resultados de ambos os experimentos mostraram que o predador *C. granulatum* é um bom agente de dispersão forética, sendo que o transporte de nematoides exercido pelas larvas sofre menor influência da mudança de concentração de JI que os adultos. Além disso, os nematoides são mais carregados pelo adulto quando a distância percorrida é curta (10 cm), mas a detecção de forésia, mesmo em distâncias maiores (40 cm), indica que o inseto é capaz de transportar o nematoide a distâncias maiores que as avaliadas.

Palavras-chave: organismo não-alvo, entomopatógeno, controle biológico, transporte.

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) das famílias Heterorhabditidae e Sternematidae são parasitas obrigatórios que necessitam de um inseto hospedeiro para se multiplicar. Estão mutualisticamente associados às bactérias patogênicas dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente, as quais são responsáveis pela morte do hospedeiro. A fase chamada juvenil infectante (JI) do NEP penetra no inseto e libera a bactéria na hemolinfa, onde esta se multiplica e degrada os tecidos. O NEP, por sua vez, alimenta-se da bactéria e dos tecidos degradados e se multiplica dentro do hospedeiro. Quando a fonte de alimento do cadáver é exaurida, novos juvenis infectantes são formados e deixam o cadáver em busca de outros hospedeiros (KAYA; GAUGLER, 1993; POINAR, 1972).

Muitos insetos que habitam o solo ou que passam uma parte do ciclo de desenvolvimento neste ambiente são controlados por NEP. Assim, estes organismos têm sido pesquisados e comercializados para controlar diversas pragas de solo e pragas de parte aérea que passam para a fase adulta ou empupam no solo, como as das ordens Lepidoptera, Diptera, Hemiptera e Coleoptera (ANDALÓ et al., 2010; BATALLA-CARRERA et al., 2010; BATISTA et al., 2011; EBSSA; KOPPENHOFER, 2012; HUSSEIN et al., 2012; KHATRI-CHHETRI et al., 2011; LEITE et al., 2005; MALAN; MANRAKHAN, 2009; MCGRAW et al., 2010; TOEPFER et al., 2009).

O nematoide *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 (Rhabditida: Heterorhabditidae) é uma espécie nativa da Amazônia, descrita em 2006 por Andaló et al. (2006), e muito eficiente no controle de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (ANDALÓ et al., 2010), larvas de *Diabrotica speciosa* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) (SANTOS et al., 2011), ninfas da cigarra *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera:

Cercopidae) (BATISTA et al., 2011) e carrapatos (MONTEIRO et al., 2010). Esta espécie de entomopatógeno possui grande potencial para ser utilizada em programas de controle biológico no Brasil, por se adaptar facilmente às condições climáticas locais.

Geralmente, a aplicação dos NEP em campo é feita de forma inundativa, liberando-se um grande número de juvenis infectantes e obtendo-se um rápido controle (GREWAL et al., 2001; TOEPFER et al., 2010). Trabalhos mostram que aplicações inoculativas de certas espécies de nematoides também podem levar a uma redução populacional de pragas, mas a baixa capacidade de deslocamento deste agente de controle é um fator limitante da sua eficiência, pois reduz a sua chance de encontro com o hospedeiro (DILLON et al., 2007; KAYA; GAULGER, 1993; PARKMAN et al., 1993; WILSON et al., 2003).

Para o deslocamento em grandes distâncias, muitos nematoides entomopatogênicos e de vida livre o fazem através de forésia, que consiste de uma associação entre indivíduos de espécies diferentes, na qual um transporta o outro sem se prejudicarem (FERRAZ, 1998). Para esta associação, os nematoides fazem uso de diversos invertebrados, como coleópteros (KRUITBOS et al., 2009; LACEY et al., 1995), ácaros (EPSKY et al., 1988), crustáceos isópodes (ENG et al., 2005) e anelídeos (CAMPOS-HERRERA et al., 2006; MACMILLAN et al., 2009; SHAPIRO et al., 1993, 1995).

No trabalho de Campos-Herrera et al. (2006), foi observado que minhocas da espécie *Eisenia fetida* Savigny (Oligochaeta: Lumbricidae) são capazes de transmitir foreticamente o nematoide *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) após ingeri-lo e este passar pelo seu sistema digestivo. Porém, o efeito de dispersão de determinada espécie de invertebrado pode variar de acordo com a espécie de nematoide, como observado por Shapiro et al. (1995), com os nematoides *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *S. glaseri* e o

anelídeo *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta: Lumbricidae), sendo *S. feltiae* o NEP que menos sofreu influência da minhoca para sua dispersão.

Os coleópteros da família Carabidae são importantes predadores de lagartas de lepidópteros e alguns dos principais responsáveis pela sua redução populacional no solo em sistemas agrícolas (BRUST et al., 1986; RIDDICK; MILLS, 1994; SUENAGA; HAMAMURA, 1998). Um estudo mostrou que certas espécies de ocorrência nos EUA podem consumir diariamente até cinco lagartas de *Agrotis ipsilon* H. (Lepidoptera: Noctuidae) (BEST; BEEGLE, 1977).

No Brasil, um dos principais predadores desta família é o besouro *Calosoma granulatum* Perty, 1830, sendo uma das espécies mais estudadas em agroecossistemas brasileiros (CHOCOROSQUI; PASINI, 2000; CIVIDANES et al., 2009; PEGORARO; FOERSTER, 1988) e com distribuição por todo o País (GIDASPOW, 1963). A ocorrência desta espécie de predador em habitats agrícolas está relacionada aos períodos de maior umidade e de maior ocorrência de lagartas (PEGORARO; FOERSTER, 1988). Este inseto apresenta hábito predador na fase larval e adulta, e ambas as fases de desenvolvimento são consideradas importantes na redução populacional de lagartas e pupas de *S. frugiperda* (ALLEN, 1977), e de pupas de *Alabama argillacea* H. (Lepidoptera: Noctuidae) (CHOCOROSQUI; PASINI, 2000).

As larvas da família Carabidae possuem mobilidade limitada se comparadas aos adultos, não podendo migrar a longas distâncias, habitando geralmente o ambiente onde o ovo do qual eclodiu foi depositado. Por outro lado, os adultos são capazes de se deslocar a grandes distâncias, podendo utilizar o voo para migração (LOVEI; SUNDERLAND, 1996). As larvas e adultos possuem o hábito de se enterrarem no solo, sendo que este comportamento pode ocorrer como forma de proteção e esconderijo, quando a larva passa para a fase de pupa (enterrando-se de 8 a 12 cm de profundidade), quando a fêmea está em

período de oviposição (postura é feita entre 4 e 5 cm de profundidade) ou quando os adultos entram em hibernação na região sul do País (penetram a uma profundidade de 8 a 12 cm) (PEGORARO; FOERSTER, 1985).

Este contato de *C. granulatum* com o solo, a capacidade de deslocamento e a ocorrência dos insetos em épocas de ocorrência de pragas, assim como seu potencial no controle das mesmas, são características que fazem com que este inseto seja considerado um potencial agente dispersor de entomopatógenos. Desta forma, considerando-se a importância de *H. amazonensis* como um agente de controle de pragas e a influência que a sua dispersão tem na sua eficiência de controle, o presente estudo teve como objetivos avaliar a capacidade dispersora de larvas e adultos do predador *C. granulatum* por forésia do nematoide *H. amazonensis* e o efeito de diferentes distâncias sobre o carregamento de JI por adultos do predador, em laboratório.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Patologia de Insetos da Universidade Federal de Lavras, localizada em Lavras, no Estado de Minas Gerais, Brasil.

2.1 Produção do nematoide entomopatogênico

Para a realização dos experimentos, utilizou-se o nematoide pertencente à espécie nativa *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 que foi produzido pelo método *in vivo*, adaptado a partir da metodologia de Woodring e Kaya (1988), em lagartas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) que foram criadas de acordo com a metodologia descrita por Dutky et al. (1964), fazendo uso de uma dieta artificial modificada por Parra (1998). Os JI viáveis, emergidos até dois dias desde o início da emergência, foram contabilizados e armazenados até a utilização no experimento por um período máximo de 5 dias, a $16 \pm 1^\circ\text{C}$, em câmara climática.

2.2 Criação do predador *Calosoma granulatum*

Adultos do predador *C. granulatum* foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Lavras, durante a noite, e individualizados em frascos de vidro com capacidade para 1,3L (12cm de diâmetro por 17cm de altura), envoltos por plástico preto para diminuir o estresse do inseto. A criação em laboratório foi adaptada a partir da metodologia proposta por Pasini (1995).

2.3 Ação de adultos e larvas do predador na forésia de NEP em diferentes concentrações

Previamente aos experimentos de forésia, foram conduzidos testes preliminares de patogenicidade com as mesmas concentrações (600, 1200 e 2400 JI/inseto) utilizadas no experimento do nematoide *H. amazonensis* a larvas de terceiro instar (\pm 8 dias de idade) e a adultos do predador *C. granulatum*. Estes testes não apresentaram mortalidade causada pelo nematoide.

Para os experimentos, construíram-se arenas formadas por dois recipientes plásticos redondos (13 cm de diâmetro e 8 cm de altura) com tampa, conectados lateralmente por um tubo do tipo PVC (cloreto de polivinil), com 50 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento, disposto a 2 cm de distância do fundo dos recipientes plásticos. As partes externas dos recipientes e de suas tampas foram pintadas com tinta acrílica da cor preta, em aerosol, para evitar o estresse visual do inseto (cerca de 30 dias antes de serem usados no experimento). Cada recipiente da arena recebeu 150 g de substrato (1:1 terra/areia) esterilizado em autoclave por 30 minutos, a 121°C. Esta quantidade de substrato foi o suficiente para não obstruir o tubo, sendo que a distância livre entre o substrato e o tubo foi de 1 cm.

Os tratamentos consistiram de três diferentes concentrações de JI de *H. amazonensis* isolado RSC 5 em suspensões de 10 mL aplicadas em um dos recipientes das arenas, sendo estes 600 JI (cerca de 2 JI por cm² de substrato do recipiente), 1200 JI (cerca de 4 JI por cm² de substrato do recipiente) e de 2400 JI (cerca de 8 JI por cm² do substrato do recipiente). O outro recipiente da arena recebeu 10 mL de água destilada (recipiente teste). Aleatoriamente, em um dos lados da arena, foi liberado um adulto (30 dias de idade) ou larva (último instar, 8 dias de idade) não sexados do predador. Os adultos foram alimentados com banana e água, trocadas diariamente e colocadas em lados alternados da arena, o

que forçava o deslocamento do inseto entre um recipiente e outro. As larvas foram alimentadas com quatro larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) mortas por congelamento, adicionadas diariamente em lados alternados da arena. Os experimentos com larvas e adultos foram montados separadamente. As arenas tiveram seus recipientes tampados e foram mantidas em uma sala escura com temperatura média $27\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Para avaliar se o nematoide era capaz de atravessar de um recipiente para outro da arena, sem o auxílio do predador, foram montadas, separadamente, dez arenas-controle para cada concentração de nematoide, semelhantes às demais, mas sem conter o inseto. Estas foram mantidas nas mesmas condições que as descritas anteriormente.

A avaliação foi realizada cinco dias após a montagem e consistiu na extração e contagem dos nematoides em cada recipiente. Cada arena foi considerada uma repetição, sendo que cada tratamento contou com 15 repetições para cada concentração de nematoide e fase de desenvolvimento do predador. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado.

2.4 Efeito da distância na forésia do NEP pelo adulto do predador

Para avaliar se a distância entre um recipiente e outro da arena tem influência sobre o carregamento do NEP pelo inseto adulto, foram montadas arenas semelhantes às descritas no experimento anterior, variando o comprimento do tubo do tipo PVC que conectava os recipientes. Cada distância entre um recipiente e outro foi determinada pelo comprimento do cano PVC que as conectava, constituindo assim três tratamentos: 10, 20 e 40 cm.

No substrato de um dos recipientes da arena foi aplicada uma suspensão de 10 mL contendo 1200 JI, cerca de $4 \text{ JI}/\text{cm}^2$ (menor concentração com maior eficiência de transporte pelo inseto) do nematoide *H. amazonensis*, e o outro,

chamado recipiente-teste recebeu 10 mL de água destilada. Aleatoriamente, em um dos lados da arena, foi liberado um adulto (30 dias de idade) do predador, que foi alimentado com banana e água disponibilizadas em pedaços de algodão umedecido, trocados diariamente e colocados em lados alternados da arena, forçando o deslocamento do inseto entre uma arena e outra.

As arenas com os recipientes tampados foram mantidas durante cinco dias em uma sala escura, com temperatura média $27\pm 3^{\circ}\text{C}$, quando foi realizada a avaliação do experimento, que consistiu da extração e contagem dos nematoides em cada recipiente. Cada arena foi considerada uma repetição, sendo que cada tratamento contou com 20 repetições para cada distância. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado.

2.5 Avaliação dos experimentos: extração e quantificação dos nematoides

Para a extração dos nematoides do substrato, utilizou-se primeiramente a metodologia de funil de Baremann (1917), que é baseada na movimentação do nematoide, devido à ação da gravidade. Foram utilizados funis de vidro (200 mL de capacidade) contendo uma rede de alumínio ao fundo (como suporte para a amostra) e um pedaço de cano de borracha de silicone maleável ligado à sua haste, fechado com um grampo de Mohr. Colocou-se o substrato do recipiente sob um lenço de papel, posicionado ao fundo do funil sobre a rede de alumínio, e foi adicionada água destilada até cobrir toda a amostra. Após 24 horas, o grampo de Mohr foi aberto, liberando-se a passagem da suspensão pelo cano, permitindo a sua coleta em um frasco do tipo Becker.

Para determinar a eficiência da metodologia de extração, misturou-se, em 150 g de substrato (1:1 terra/areia) (esterilizado em autoclave por 30 minutos a 121°C), uma suspensão de 10 mL de água destilada contendo 2000 JI de *H.*

amazonensis. O substrato foi transferido imediatamente para o funil de Baermann, realizando-se o recolhimento. Após 24 horas de decantação e padronização das suspensões, foi feita a contagem dos nematoides. A eficiência de extração foi calculada baseando-se na porcentagem de JI extraída em relação ao número de JI aplicado. Foi utilizada a média (\pm erro padrão) entre 10 repetições para o cálculo.

Após 24 horas de decantação das soluções extraídas, a quantidade extra de água foi descartada, extraindo-se cuidadosamente a água da camada superficial da suspensão com o auxílio de uma pipeta automática, padronizando-se um volume de 10 mL para todas as amostras extraídas. A partir destas, foram quantificados os nematoides viáveis de cada tratamento por meio de um microscópio estereoscópio e placas tipo Elisa. Para isso, dez alíquotas de 10 μ L da suspensão que continha os JI foram inoculadas em dez poços da placa, quantificando-se, no microscópio estereoscópio, os JI presentes em cada um deles. Assim, foi possível obter o número de JI em 1 mL da suspensão.

2.6 Análise de dados

Os dados de contagem dos nematoides não foram distribuídos normalmente pelo teste de Shapiro-Will. Então, as médias entre os tratamentos foram analisadas utilizando-se as comparações não-paramétricas: Mann-Whitney para comparações de dois grupos, e teste de Kruskal-Wallis para múltiplas comparações (software R[®] versão 2.13.2).

3 RESULTADOS

A análise da eficiência de extração mostrou que a metodologia de funil de Baermann, seguida de decantação, adaptada para o presente trabalho, foi capaz de extrair $255 \pm 45,44$ JI dos 2000 JI aplicados no substrato imediatamente antes da extração. Este valor representa uma eficiência de 10,5 a 15% de extração.

3.1 Ação de adultos e larvas do predador na forésia de NEP a diferentes concentrações

Observou-se o deslocamento do nematoide *H. amazonensis* somente nas arenas que possuíam o predador *C. granulatum*, sendo que as larvas demonstraram uma eficiência três vezes maior que os adultos no carregamento da menor concentração de JI testada. Além disso, a concentração do nematoide influenciou o seu deslocamento por ambos os estágios de desenvolvimento do predador, e a sobrevivência dos insetos não foi afetada pelo nematoide (Tabela 1).

Tabela 1 Número de juvenis infectantes (média \pm EP) de *Heterorhabditis amazonensis*, extraídos pelo funil de Baermann, após cinco dias da inoculação de diferentes concentrações de JI (600, 1200 e 2400 JI/recipiente), na presença de larva de terceiro instar, adulto de *Calosoma granulatum* ou na ausência de inseto (controle). Dados de extração do recipiente inoculado (recebeu inoculação de nematoides) e do recipiente-teste (não recebeu inoculação de nematoides).

Tratamento	Larva (n=15)			Adulto (n=15)			Controle (n=10)	
	Recipiente		Arenas com deslocamento (%)	Recipiente		Arenas com deslocamento (%)	Recipiente	
	Inoculado	Teste		Inoculado	Teste		Inoculado	Teste
600 JI	13,00 \pm 2,23 a ¹	2,00 \pm 0,65 a	40	15,33 \pm 3,25 a	0,67 \pm 0,45 a	13	12,40 \pm 3,18 a	0,00 \pm 0,00
1200 JI	17,00 \pm 2,23 a	5,67 \pm 1,28 b	66	16,00 \pm 2,54 ab	3,67 \pm 1,98 ab	40	33,50 \pm 7,85 b	0,00 \pm 0,00
2400 JI	36,67 \pm 4,75 b	6,00 \pm 1,11 b	80	38,33 \pm 8,71 b	4,67 \pm 1,33 b	60	58,00 \pm 4,61 c	0,00 \pm 0,00

¹Médias da mesma coluna, seguidas por letra diferente, são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

Detectou-se deslocamento do nematoide em 40% das arenas que receberam a larva do carabídeo e 600 JI do NEP em um dos recipientes, com uma média de 2 JI entre todas as amostras. Nas arenas onde se aplicou 1200 JI, notou-se que o deslocamento foi maior, ocorrendo em 66% das arenas, com uma média total de 5,67 JI carregados entre os recipientes. Nas que receberam o tratamento de 2400 JI em um dos recipientes, a larva foi capaz de carregar o nematoide em 80% das arenas, com uma contagem média de 6 JI nos recipientes- teste. A análise estatística dos dados de larvas e dos recipientes-teste apontou diferença significativa apenas entre a média do tratamento 600 JI com a dos demais, sendo que os tratamentos 1200 e 2400 JI foram semelhantes (Kruskal-Wallis chi-squared = 7,7409, gl = 2, p = 0,02085).

Os adultos colocados nas arenas que continham o tratamento 600 JI transportaram o nematoide por forésia em 13% das arenas, carregando uma média geral de 0,67 JI. Quando o inseto foi colocado nas arenas com o tratamento de 1200 JI, o carregamento ocorreu em 40% destas, com uma média de 3,67 JI carregados. No tratamento com 2400 JI, ocorreu deslocamento dos JI em 60% das arenas, com uma média de 4,67 JI entre os recipientes-teste. A análise dos dados mostrou que, no lado onde não houve aplicação de nematoides, a quantidade destes aumentou na medida em que se aumentava a concentração de JI aplicada no lado oposto, sendo que o tratamento com 600 JI diferiu apenas do tratamento com 2400 JI, e o tratamento com 1200 JI foi semelhante aos demais (Kruskal-Wallis chi-squared = 7,3976, gl = 2, p = 0,02475). Nas arenas que não continham o inseto, não foi detectado deslocamento dos JI para o recipiente-teste.

3.2 Efeito da distância na forésia do NEP pelo adulto do predador

O experimento que visou avaliar o efeito das diferentes distâncias entre os recipientes sobre o deslocamento dos nematoides por forésia indicou que o fator “distância” influencia inversamente na capacidade do adulto do *C. granulatum* em transportar o nematoide (Tabela 2).

No tratamento com 10 cm de distância entre os recipientes, houve carregamento por forésia em 95% das arenas, com uma média de 21,25 nematoides carregados entre os recipientes, sendo a distância em que mais houve carregamento de nematoides. Quando os dois recipientes estavam distantes em 20 cm, houve carregamento em 90% das repetições e a média de nematoides transportados de um recipiente para outro foi de 8 JI. Já na maior distância testada, a de 40 cm, o adulto do predador transportou o nematoide em 70% das arenas, com carregamento de 6,25 JI em média, sendo que estas duas últimas distâncias foram semelhantes entre si (Kruskal-Wallis chi-squared = 17,2682, $gl = 2$, $p = 0,0001779$).

Tabela 2 Número (média \pm EP) de juvenis infectantes do nematoide *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 extraídos pelo funil de Baermann nos tratamentos, contados após cinco dias de experimento na presença de adulto de *Calosoma granulatum*. Dados de extração do recipiente inoculado (recebeu inoculação prévia de 1200 JI) e do recipiente-teste (não recebeu inoculação de nematoides).

Distâncias (n=20)	Recipiente		Arenas com deslocamento (%)
	Inoculado	Teste	
10 cm	41,75 \pm 5,22 a ¹	21,25 \pm 4,12 a	95
20 cm	68,25 \pm 8,50 b	8,00 \pm 1,05 b	90
40 cm	49,75 \pm 5,74 a	6,25 \pm 1,30 b	70

¹Médias da mesma coluna, seguidas por letra diferente, são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

4 DISCUSSÃO

Os dados de contagem de nematoides, tanto no recipiente que recebeu aplicação de JI quanto no recipiente-teste, foram muito baixos após a extração nos dois experimentos (de concentrações e distâncias), devido à baixa eficiência da metodologia de extração por funil de Baerman (1917), seguida de decantação, adaptada para o presente trabalho. Esta metodologia baseia-se no movimento de nematoides viáveis, seguida de decantação por ação da gravidade e é influenciada por fatores como a quantidade de amostra adicionada ao funil, características do substrato e temperatura ambiente (ROBINSON; HEALD, 1989).

Mesmo com a eficiência de extração de 10,5 a 15%, a contagem de JI mostra que as larvas e adultos de *C. granulatum* podem ser considerados bons agentes dispersores do nematoide *H. amazonensis*, já que foi contabilizado carregamento de JI em todos os tratamentos e não foi constatada a mortalidade do agente dispersor. Esta é uma boa estratégia de dispersão adotada pelos nematoides, já que ficam aderidos ao corpo do agente dispersor e, quando este se aproxima de um inseto hospedeiro dos nematoides, estes podem abandonar o dispersor, infectar e se multiplicar em um novo hospedeiro (CURRAN; HENG, 1992; EPSKY et al., 1988).

Os resultados mostraram que as larvas possuem alta capacidade de carregamento do nematoide, mesmo na menor concentração de NEP testada. No entanto, o fato de as larvas carregarem a mesma quantidade de nematoides nos tratamentos 1200 e 2400 JI, pode significar que a capacidade de carregamento das larvas tenha um limite máximo, o qual foi alcançado quando elas entraram em contato com a concentração de 1200 JI. Por outro lado, os adultos são pouco eficientes no transporte de nematoides quando há baixa concentração de JI no solo. A eficiência de transporte aumenta gradativamente com o aumento da

quantidade de nematoides, sendo possível que concentrações maiores de 2400 JI (ou maiores que 4 JI/cm²) acarretem um maior número de nematoides transportados pelo adulto.

Essas diferenças na eficiência de transporte, observadas entre larvas e adultos de *C. granulatum*, provavelmente estão relacionadas com a diferença no comportamento de enterrar, já que as larvas o fazem com maior frequência que adultos, nas diferenças de tamanho, da distância que os seus tórax e abdômen estão do solo e da aderência de seus tegumentos. As larvas de *C. granulatum* são do tipo oligópode (com pernas torácicas funcionais e sem apêndices abdominais) (GULLAN; CRANSTON, 2005) e atingem 25 mm de comprimento no terceiro instar (STEHR, 1991), com pernas posteriores com 7,23 mm de comprimento (COLEN, 2004). Os adultos desta espécie possuem tamanho médio de 24 mm e pernas ambulatórias, sendo que as posteriores possuem comprimento médio de 27 mm (COLEN, 2004). Esta pequena diferença no tamanho corpóreo entre larvas e adultos, e a proximidade do corpo ao solo, determinada pelo comprimento das pernas, são características que podem auxiliar as larvas do predador a serem melhores agentes dispersores de nematoides que os adultos. Além disso, os adultos possuem o corpo bastante esclerotizado (COLEN, 2004), enquanto que as larvas são totalmente esclerotizadas apenas no dorso e pouco na região ventral, com regiões intersegmentares evidentes (STEHR, 1991). Considerando-se que as regiões membranosas e intersegmentares são áreas de adesão e penetração de JI (LIM; DRIESCH, 2005; WANG; GAUGLER, 1998), as larvas possuem maiores áreas para afixação de nematoides.

Porém, mesmo que as larvas de terceiro instar possuam maior capacidade de carregamento de nematoides, elas possuem mobilidade limitada, sendo que, no ambiente natural, elas normalmente permanecem próximas de onde eclodiram (LOVEI; SUNDERLAND, 1996). Além disso, a duração deste estágio é tão pequena em relação à longevidade dos adultos, que a sua

importância na forésia de JI pode ser considerada reduzida. O estágio de desenvolvimento larval tem duração de 12 dias, distribuídos em três instares, sendo que o terceiro tem duração média de 5,3 dias (sem incluir a fase de pré-pupa) (PEGORARO; FOERSTER, 1985) contra 132 dias de longevidade média dos adultos (PASINI, 1995).

A dispersão de entomopatógenos para diferentes áreas por besouros adultos deste gênero já foi confirmada por Capinera e Barbosa (1975), estudando *Calosoma sycophanta*, (Coleoptera: Carabidae), a qual foi capaz de transmitir vírus de poliedrose nuclear através de suas fezes e, desta forma, contaminar e matar lagartas da mariposa-cigana *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae).

No presente trabalho, os adultos foram capazes de carregar juvenis infectantes até a maior distância avaliada, apesar de a quantidade ser muito inferior à menor distância, a qual foi a única diferente das demais. Isto pode indicar que o deslocamento do inseto entre as arenas, mesmo que forçado pela alternância diária do alimento entre os recipientes (e mesmo observando-se que houve alimentação), pode ter sido menos intenso na maior distância.

Estes resultados podem indicar também que a maioria dos nematoides que estão presos no tegumento do inseto está fracamente aderida a ele, já que, provavelmente, muitos JI não permaneceram fixados ao inseto quando ele percorreu uma distância maior que 10 cm entre o recipiente contendo JI e o recipiente-teste. Por outro lado, uma pequena quantidade dos nematoides que se fixaram ao inseto resistiu ao transporte por distâncias de 20 e 40 cm, indicando que provavelmente existam áreas de boa fixação para o JI no tegumento do adulto, que permitem que os nematoides persistam presos ao inseto por um maior período de tempo. Logo, pode-se considerar que os adultos de *C. granulatum* possuem capacidade de carregar JI por distâncias maiores que as avaliadas.

Em um trabalho realizado por Andaló et al. (2012), constatou-se ainda que este nematoide é capaz de se deslocar por até 20 cm em colunas horizontais com areia na ausência do hospedeiro, e até 60 cm na presença de larvas hospedeiras *G. mellonella* ou *S. frugiperda*, durante 6 dias de deslocamento. Porém, o deslocamento do NEP pode ser diferente em campo, já que a composição e estrutura do solo afetam o movimento de nematoides (CHOO; KAYA, 1991; GEORGIS; POINAR, 1983; GOUGE et al., 2000). O agente de dispersão foretica proposto no presente trabalho, diferentemente do nematoide, possui uma alta capacidade de deslocamento e dispersão e, apesar de este comportamento também sofrer influência de fatores como a heterogeneidade ambiental e a presença de presas, este agente é capaz de se deslocar por mais de 150 m em ambiente agrícola na busca por presas, em um intervalo de 4 a 7 dias (PASINI; FOERSTER, 1996). Dado que os NEP dispersados foreticamente podem resistir à dessecação por vários dias (EPSKY et al., 1988) e *C. granulatum* possui uma alta dispersão e maior ocorrência em áreas com presença de lagartas (PEGORARO; FOERSTER, 1988), este inseto pode servir como um agente de transmissão destes entomopatógenos por longas distância entre áreas cultivadas.

A família Steinernematidae é a que possui maior número de espécies estudadas em trabalhos de forésia (CAMPOS-HERRERA et al., 2006; EPSKY et al., 1988; KRUITBOS et al., 2009; SHAPIRO et al., 1995), devido à presença da estratégia de forrageamento do tipo “ambusher” em várias delas, a qual consiste em aguardar e saltar sobre o hospedeiro em movimento (CAMPBELL et al., 2003; CAMPBELL; GAUGLER, 1993). A habilidade de nematoides da família Heterorhabditidae em se dispersar por forésia é, muitas vezes, desconsiderada pelo fato de estes possuírem outra estratégia de forrageamento, a do tipo “cruiser”, na qual o nematoide desloca-se ativamente na busca do hospedeiro e não possui o comportamento de saltar sobre ele (CAMPBELL;

GAUGLER, 1993; CAMPBELL; KAYA, 2002). Contudo, os resultados mostrados no presente trabalho corroboram com outros que mostram que, mesmo sem saltar sobre o artrópode, nematoides da família Heterorhabditidae podem ser afixados ao tegumento deste e assim serem carregados, demonstrando que o comportamento de “saltar” não é essencial para a forésia (ENG et al., 2005; KRUITBOS et al., 2009).

Ecologicamente, a limitada capacidade de dispersão dos nematoides entomopatogênicos faz com que haja uma forte pressão para que encontrem diferentes formas para se dispersar. Assim, aquelas espécies adaptadas à dispersão por forésia por insetos resistentes ao parasitismo estariam à frente na pressão de seleção (KNELL; WEBBERLEY, 2004).

O besouro *C. granulatum* pode ser considerado um bom agente de dispersão forética devido, também, a sua ampla distribuição sobre o território brasileiro (GIDASPOW, 1963). Esta associação facultativa que ocorre entre o nematoide e o organismo resistentes a ele enfatiza a importância de considerarmos as interações que ocorrem além da NEP × hospedeiros, já que a presença de organismos não-alvo no solo pode aumentar a eficiência de programas de controle biológico baseados em NEP (ENG et al., 2005). A forésia pode ter um valor adaptativo para NEP permitindo-os dispersar até onde não poderiam chegar sozinhos, protegendo-os da predação por nematófagos e aumentando sua chance de parasitismo.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, R. T. *Calosoma (Castrida) alternans granulatum* Perty: a predator of cotton leaf worms in Bolivia (Coleoptera: Carabidae: Caribini). **The Coleopterists Bulletin**, v. 31, p. 73-76, 1977.
- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. N.; MOINO-JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brasil. **Nematology**, v. 8, p. 853-867, 2006.
- ANDALÓ, V.; SANTOS, V.; MOREIRA, G. F.; MOREIRA, C. C.; MOINO JR, A. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1860-1866, 2010.
- ANDALÓ, V.; SANTOS, V.; MOREIRA, G. F.; MOREIRA, C.; FREIRE, M.; MOINO-JR, A. Movement of *Heterorhabditis amazonensis* and *Steinernema arenarium* in search of corn fall armyworm larvae in artificial conditions. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 3, p. 226-230, 2012.
- BAERMANN, G. 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ancylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. **Geneeskunding Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië**, v. 57, p. 131-137, 1917.
- BATALLA-CARRERA, L.; MORTON, A.; GARCÍA-DEL-PINO, G. Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. **Biocontrol**, v. 55, p. 523-530, 2010.
- BATISTA, E. S. de P.; AUAD, A. M.; RESENDE, T. T.; MONTEIRO, C. M. O. Screening of entomopathogenic nematodes to control *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 37, n. 2, p. 198-202, 2011.
- BEST, R. L.; BEEGLE, C. C. Consumption of *Agrotis ipsilon* by several species of Carabids found in Iowa. **Environmental Entomology**, v. 6, n. 4, p. 532-534, 1977.
- BRUST, G. E.; STINNER, B. R.; MCCARTNEY, D. A. Predator activity and predation in corn agroecosystems. **Environmental Entomology**, v. 15, n. 5, p. 1017-1021, 1986.

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

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

CAMPBELL, J. F.; LEWIS, E. E.; STOCK, S. P.; NADLER, S.; KAYA, H. K. Evolution of host search in entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 35, n. 2, p. 142-145, 2003.

CAMPOS-HERRERA, R.; TRIGO, D.; GUTIÉRREZ, C. Phoresy of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* by the earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 92, p. 50-54, 2006.

CAPINERA, J. L.; BARBOSA, P. Transmission of nuclear-polyhedrosis virus to gypsy moth larvae by *Calosoma sycophanta*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 68, n. 3, p. 593-594, 1975.

CHOCOROSQUI, V. R.; PASINI, A. Predação de pupas de *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) por larvas e adultos de *Calosoma granulatum* Perty (Coleoptera: Carabidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 65-70, 2000.

CHOO, H. Y.; KAYA, H. K. Influence of soil texture and presence of roots on host finding by *Heterorhabditis bacteriophora*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 279-280, 1991.

CIVIDANES, F. J.; BARBOSA, J. C.; IDE, S.; PERIOTO, N. W.; LARA, R. I. R. Faunistic analysis of Carabidae and Staphylinidae (Coleoptera) in five agroecosystems in northeastern São Paulo state, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 8, p. 954-958, 2009.

COLEN, K. G. F. **Biologia e caracterização morfológica e morfométrica dos estágios imaturo e adulto de *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae)**. Tese de doutorado – UNESP – Botucatu, 2004. 69p.

CURRAN, J.; HENG, J. Comparison of three methods for estimating the number of entomopathogenic nematodes present in soil samples. **Journal of Nematology**, v. 24, n. 1, p. 170-176, 1992.

DILLON, A. B.; DOWNES, M. J.; WARD, D.; GRIFFIN, C. T. Optimizing application of entomopathogenic nematodes to manage large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae) populations developing in pine stumps, *Pinus sylvestris*. **Biological Control**, v. 40, p. 253-263, 2007.

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, p. 417-422, 1964.

EBSSA, L.; KOPPENHOFER, A. Entomopathogenic nematodes for the management of *Agrotis ipsilon*: effect of instar, nematode species and nematode production method. **Pest Management Science**, v. 68, n. 6, p. 947-957, 2012.

ENG, M. S.; PREISSER, E. L.; STRONG, D. R. Phoresy of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis marelatus* by a non-host organism, the isopod *Porcellio scaber*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 173-176, 2005.

EPSKY, N. D.; WALTER, D. E.; CAPINERA, J. L. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 81, n. 3, p. 821-825, 1988.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides entomopatogênicos. In: **Controle microbiano de insetos**. Alves, S.B.A (ed.). 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998, p. 541-569.

GEORGIS, R.; POINAR JR, G. O. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoplactana glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Nematology**, v. 15, n. 3, p. 329-332, 1983.

GIDASPOW, T. The genus *Calosoma* in Central America, the Antilles, and South America (Coleoptera: Carabidae). **Bulletin of American Museum Natural History**, v. 124, p. 275-314, 1963.

GOUGE, D. H.; SMITH, K. A.; LEE, L. L.; HENNEBERRY, T. J. Effect of soil depth and moisture on the vertical distribution of *Steinernema ribrave* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Nematology**, v. 32, n. 2, p. 223-228, 2000.

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

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. Insect development and life histories, In: **The insects: an outline of entomology**, 3 ed. Blackwell Publishing Ltd, 2005, p.142-176.

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

KNELL, R. J.; WEBBERLEY, K. M. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behavior. **Biological Reviews**, v. 79, p. 557-581, 2004.

KHATRI-CHHETRI, H. B.; TIMSINA, G. P.; MANANDHAR, H. K.; MOENS, M. Potential of Nepalese entomopathogenic nematodes as biocontrol agents against *Holotrichia longipennis* Blanch. (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 475-469, 2011.

KRUITBOS, L. M.; HERITAGE, S.; WILSON, M. J. Phoretic dispersal of entomopathogenic nematodes by *Hylobius abietis*. **Nematology**, v. 11, n. 3, p. 419-427, 2009.

LACEY, L. A.; KAYA, H. K.; BETTENCOURT, R. Dispersal of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) in adult Japanese beetles, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 121-130, 1995.

LEITE, L. G.; MACHADO, L. A. M.; GOULART, R. M.; TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, A. Screening of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 785-790, 2005.

LIM, U. T.; van DRIESCHE, R. G. A new potential host and transmission routes of *Thripinema nicklewoodi*, an entomogenous nematode of western flower thrips. **Biological Control**, v. 33, p. 49-55, 2005.

LOVEI, G. L.; SUNDERLAND, K. D. Ecology and behavior of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). **Annual Reviews Entomology**, v. 41, p. 231-256, 1996.

MACMILLAN, K.; HAUKELAND, S.; RAE, R.; YOUNG, I.; CARWFORD, J.; HAPCA, S.; WILSON, M. Dispersal patterns and behavior of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* in mineral soils and organic media. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 1483-1490, 2009.

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

MCGRAW, B. A.; VITTUM, P. J.; COWLES, R. S.; KOPPENHOFER, A. M. Field evaluation of entomopathogenic nematodes for the biological control of the annual bluegrass weevil, *Listronotus maculicollis* (Coleoptera: Curculionidae), in golf course turfgrass. **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 149-163, 2010.

MONTEIRO, C. M. O.; PRATA, M. C. A.; FURLONG, J.; FAZA, A. P.; MENDES, A. S.; ANDALÓ, V.; MOINO-JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae) strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplu* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 106, p. 821-826, 2010.

PARKMAN, J. P.; FRANK, J. H.; NGUYEN, K. B.; SMART JR. G. C. Dispersal of *Steinernema scapterisci* (Rhabditida: Steinernematidae) after inoculative applications for mole cricket (Orthopetar: Gryllotalpidae) control in pastures. **Biological Control**, v. 3, p. 226-232, 1993.

PARRA, J. R. P. Raising insects for studies of pathogens. In: Alves, S.B. (ed.) Microbial control of insects. FEALQ, Piracicaba, SP, Brazil. 1998, p. 1015-1037.

PASINI, A. **Biologia e técnica de criação do predador *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) em *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), lagarta-da-soja**. Tese de doutorado, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”. 1995, 67p.

PASINI, A.; FOERSTER, L. A. Ritmo diário de atividade e dispersão de *Calosoma granulatum* P. (Coleoptera: Carabidae) na cultura da soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 25, n. 3, p. 395-399, 1996.

PEGORARO, R. A.; FOERSTER, L. A. Observações sobre o ciclo evolutivo e hábitos alimentares de *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 14, n. 2, p. 269-275, 1985.

PEGORARO, R. A.; FOERSTER, L. A. Abundância e distribuição de larvas e adultos de *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) dentre cultivares de soja em diferentes épocas de semeadura. **Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia**, v. 17, p. 237-248, 1988.

POINAR JR, G. O. Nematode as facultative parasites of insects. **Annual Review of Entomology**, v. 17, p. 103-122. 1972.

RIDDICK, E. W.; MILLS, N. J. Potential of adults carabids (Coleoptera: Carabidae) as predators of Fifth-Instar codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple orchards in California. **Environmental Entomology**, v. 23, n. 5, p. 1338-1345, 1994.

ROBINSON, A. F.; HEALD, C. M. Accelerated movement of nematodes from soil in Baermann Funnels with temperature gradients. **Journal of Nematology**, v. 21, n. 3, p. 370-378, 1989.

SANTOS, V.; MOINO-JR, A.; ANDALÓ, V.; MOREIRA, C. C.; OLINDA, R. A. Virulence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the control of *Diabrotica speciosa* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1149-1156, 2011.

STEHR, F. W. Carabidae - Adephaga. In: **Immature insects**. Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company, v. 2. p. 306-310, 1991.

SHAPIRO, D. I.; BERRY, E. C.; LEWIS, L. C. Interactions between nematodes and earthworms: enhanced dispersal of *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 2, p. 189-192, 1993.

SHAPIRO, D. I.; TYLKA, G. L.; BERRY, E. C.; LEWIS, L. C. Effects of earthworms on the dispersal of *Steinernema* spp. **Journal of Nematology**, v. 27, n. 1, p. 21-28, 1995.

SUENAGA, H.; HAMAMURA, T. Laboratory evaluation of carabids beetles (Coleoptera: Carabidae) as predator of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) larvae. **Biological Control**, v. 27, n. 3, p. 767-772, 1998.

TOEPFER, S.; BURGER, R.; EHLERS, R. U.; PETERS, A.; KUHLMANN, U. Controlling western corn rootworm larvae with entomopathogenic nematodes: effect of application techniques on plant-scale efficacy. **Journal of Applied Entomology**, v. 134, n. 5, p. 467-480, 2009.

TOEPFER, S.; HATALA-ZSELLER, I.; EHLERS, R. U.; PETERS, A.; KUHLMANN, U. The effect of application techniques on field-scale efficacy: can the use of entomopathogenic nematodes reduce damage by western corn rootworm larvae? **Agricultural and Forest Entomology**, v. 12, p. 389-402, 2010.

WANG, Y.; GAUGLER, R. Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese Beetle larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 313-318, 1998.

WILSON, M. J.; LEWIS, E. E.; YODER, F.; GAUGLER, R. Application pattern and persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biological Control**, v. 26, p. 180-188, 2003.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: hand book of biology and techniques. **Southern Cooperative Series Bulletin. Arkansas Agricultural Experimental Station**, Fayetteville, Arkansas, v. 331, p. 1-30, 1998.

ARTIGO 3 Efeito de plantas utilizadas na diversificação agrícola sobre o nematoide *Heterorhabditis amazonensis* em casa-de-vegetação

RESUMO

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) são agentes de controle biológico de pragas no solo, causando supressão de insetos fitófagos quando ocorrem naturalmente no ambiente ou em programas de controle biológico inundativo, nos quais são utilizados em grandes concentrações de juvenis infectantes (JI), pois atuam como inseticidas, causando a morte rápida do hospedeiro. Muitas plantas que atraem inimigos naturais de partes aéreas podem ser cultivadas junto à cultura principal em um sistema agrícola, visando ao aumento do controle biológico dos insetos fitófagos. Porém, pouco se sabe sobre o efeito de muitas destas plantas sobre os NEP, e se elas podem ter alguma ação na conservação destes inimigos naturais edáficos. Com o objetivo de avaliar o efeito de algumas destas plantas sobre NEP, foram montados dois experimentos em casa-de-vegetação. O primeiro mediu o efeito das plantas *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria breviflora* e *Tagetes erecta* sobre a persistência e infectividade de *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 durante 27 dias, comparadas a um tratamento-controle sem plantas. Já o segundo experimento avaliou o efeito de *C. breviflora* e *T. erecta* e tratamento sem plantas, com a presença ou não do adulto do predador *Calosoma granulatum* no deslocamento do mesmo nematoide. Os resultados indicaram que as plantas não influenciaram na persistência dos nematoides em longo prazo nem na infectividade e no deslocamento de *H. amazonensis*. Porém, a planta *C. spectabilis* possibilitou a maior persistência de nematoides no substrato em curto prazo, e *T. erecta* causou a supressão mais rápida da população inicial. Estes resultados mostram que o conhecimento prévio das plantas a serem utilizadas na diversificação agrícola pode auxiliar no controle inundativo de pragas por NEP.

Palavras-chave: controle biológico conservativo, controle inundativo, conservação, nematoides entomopatogênicos, persistência.

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são inimigos naturais de vários insetos de importância econômica e são parasitas obrigatórios (LEWIS et al., 2006; SHAPIRO-ILAN; GOUGE; KOPPENHOFER, 2002). O ciclo de vida dos NEP pertencentes às duas famílias é semelhante, com um único estágio de vida livre resistente, o juvenil infectante (JI), o qual não se alimenta e vive no solo procurando hospedeiros, que são infectados através de aberturas naturais ou pela cutícula. Os nematoides carregam a bactéria simbiótica (*Xenorhabdus* ou *Photorhabdus* spp.), liberada no hemocele do hospedeiro, que morre por septicemia de 24 a 72 horas. Dentro do hospedeiro, os nematoides alimentam-se dos tecidos degradados pela bactéria, desenvolvem-se, acasalam e reproduzem, e este ciclo é repetido até que o alimento seja exaurido, quando então é formada uma nova geração de JI que irá deixar o hospedeiro (KAYA; GAUGLER, 1993).

Os nematoides contribuem para a supressão populacional de pragas através do controle natural, com populações endêmicas (DUNCAN et al., 2003; LAWRENCE; ; HOY; GREWAL, 2006) ou através do controle biológico aplicado, com os controles inoculativo (PARKMAN et al., 1993) e inundativo (GEORGIS et al., 2006), e, devido a sua grande eficiência no controle biológico de pragas no solo (KAYA; GAUGLER, 1993), são comercializados em vários países (GEORGIS, 1992).

Apesar de muito se saber sobre os fatores que afetam as populações de nematoides (KAYA; GAUGLER 1993; STUART et al., 2006; WILSON; GAUGLER, 2004), são poucos os estudos que visam efetivamente a sua manutenção no solo. A conservação de inimigos naturais em programas de controle biológico é feita através da modificação do sistema agrícola, para

aumentar o sucesso dos inimigos naturais introduzidos ou daqueles que já habitam o local (LANDIS; WRATTEN; GURR, 2000).

Segundo McGraw e Koppenhöfer (2009), os nematoides possuem vários atributos que os tornam bons candidatos para o controle biológico conservativo, como a ampla gama de espécies hospedeiras que permite a persistência deles no ambiente, durante a ausência do hospedeiro-alvo, e a habilidade em criar uma grande resposta numérica após a infecção. A adaptação do ambiente agrícola para favorecer estas características dos nematoides aumentaria sua eficiência no controle natural ou aplicado de pragas, além de poder ser vantajoso economicamente, já que a manutenção da população é menos onerosa que um programa de controle inoculativo ou inundativo.

Para que o controle conservativo funcione, é necessário identificar qual composição, em termos de biodiversidade, é necessária para manter ou aumentar o controle biológico (LEWIS; CAMPBELL; GAUGLER, 1998). As plantas utilizadas para a diversificação de inimigos naturais de partes aéreas (LANDIS; WRATTEN; GURR, 2000) afetam os NEP, devido a variações que elas causam no solo, como a compactação, temperatura e composição, já que retiram a sua água e geram áreas sombreadas. Além disso, muitas plantas também atuam na fixação de nitrogênio no solo, favorecendo as demais plantas cultivadas, como no caso das plantas do gênero *Crotalaria* (DUNCAN; MCCOY, 2001; JABBOUR; BARBERCHECK, 2008; PREISSER et al., 2006; TAVARES et al., 2010).

Além de afetar vários fatores abióticos do solo, as plantas também afetam fatores bióticos, já que aumentam a disponibilidade de insetos que irão promover o deslocamento dos nematoides e aumentam a gama de insetos hospedeiros alternativos à praga-chave, que atuam na renovação dos nematoides, aumentando o tamanho de sua população e persistência no solo (SUSURLUK; EHLERS, 2008). Além disso, as raízes das plantas podem afetar a habilidade

dos nematoides em encontrar um inseto hospedeiro (CHOO; KAYA, 1991; ENNIS; DILLON; GRIFFIN, 2010).

A eficiência de controle de fitófagos por nematoides, assim como por predadores e parasitoides de partes aéreas, também está associada a substâncias químicas secundárias produzidas pelas plantas, que podem atrair os NEP (TURLINGS; HILTPOLD; RASMANN 2012), aumentar ou diminuir a suscetibilidade do hospedeiro e a reprodução do nematoide dentro dele (GASSMANN et al., 2010). Podem, também, simplesmente causar prejuízos ao NEP por serem compostos tóxicos a ele (BARBERCHECK; WANG; HIRSH, 1995).

Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar o efeito direto de plantas utilizadas na diversificação do ambiente agrícola e um predador que pode ser beneficiado por estas plantas sobre o nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5, que possui ação comprovada no controle de várias pragas no solo (ANDALÓ et al., 2010; BATISTA et al., 2011; SANTOS et al., 2011). Os efeitos avaliados foram a persistência, capacidade de deslocamento e infectividade em casa-de-vegetação, quando associados a diferentes plantas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos em casa-de-vegetação e no Laboratório de Patologia de Insetos da Universidade Federal de Lavras, localizada em Lavras, no Estado de Minas Gerais, Brasil. A casa-de-vegetação utilizada foi do tipo automática, com um sistema de refrigeração por resfriamento evaporativo do ar do tipo meio poroso-exaustor. Os insetos utilizados nos experimentos foram retirados de criações mantidas no mesmo laboratório.

2.1 Produção do nematoide entomopatogênico

O nematoide utilizado nos experimentos foi a espécie nativa da Amazônia, *H. amazonensis* isolado RSC 5, produzido pelo método *in vivo*, adaptado a partir de Woodring e Kaya (1988), em lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) criadas de acordo com a metodologia descrita por Dutky, Thompson e Cantwe (1964), utilizando-se uma dieta artificial modificada por Parra (1998). Os JI viáveis foram contabilizados e armazenados por período máximo de cinco dias, a $16\pm 1^{\circ}\text{C}$, em câmara climática até a utilização no experimento.

2.2 Criação de *Calosoma granulatum*

Adultos do predador foram coletados no *campus* da Universidade Federal de Lavras, durante a noite, e individualizados em frascos de vidro com capacidade para 1,3L (12cm de diâmetro por 17cm de altura), envoltos por plástico preto para diminuir o estresse do inseto. A criação em laboratório foi adaptada a partir da metodologia proposta por Pasini (1995).

2.3 Cultivo das plantas

O cultivo foi feito em casa-de-vegetação, utilizando-se *Tagetes erecta* L. (Astraceae), *Crotalaria breviflora* L. e *Crotalaria spectabilis* Roth (Fabaceae) plantadas em sementeiras com substrato comercial para plantio (Plantmax[®]) a partir de sementes obtidas comercialmente. Quando as mudas atingiram 15 cm de altura, foram transferidas para vasos de plástico com capacidade para 2 L, sendo uma muda por vaso. Estes foram preenchidos com creca de 1 Kg de substrato composto por terra, areia e adubo orgânico, na proporção de 2:1:1. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação, em temperatura de $29\pm 4^{\circ}\text{C}$ e umidade de cerca de 80%. A irrigação foi feita diretamente no solo, duas vezes ao dia.

2.4 Experimento de persistência

Quando feita a transferência das mudas para os vasos plásticos, foram montados vasos adicionais, semelhantes aos demais, que possuíam 2 L do mesmo substrato utilizado nos vasos das plantas (terra, areia e adubo na proporção de 2:1:1). Estes foram mantidos nas mesmas condições que os demais, sendo molhados diariamente e, semanalmente, era feita a remoção de plantas espontâneas que cresciam no substrato. As plantas utilizadas no experimento estavam em fase de florescência (cerca de 70 dias após a semeadura), com cerca de 40 cm de comprimento, e o experimento foi montado onde elas foram plantadas.

O experimento consistiu de 40 vasos com e sem as três espécies de plantas, sendo cada uma considerada um tratamento, e os vasos sem plantas, o tratamento-controle. Em cada vaso, após a molhagem, foi aplicada homogeneamente uma suspensão de 30 mL de água destilada contendo 15000 JI

do nematoide *H. amazonensis* no substrato dos vasos. Estes foram cobertos e envoltos com um pedaço de tecido do tipo voil de 30 × 10 cm, cujas extremidades foram amarradas de forma que cobrissem o substrato, protegendo-o de eventuais artrópodes que pudessem habitar o solo ou de sofrer infecção pelo nematoide (o que aumentaria a persistência deste), mas, ao mesmo tempo, que mantivessem livre o caule da planta. A molhagem das plantas foi feita sobre o tecido diariamente, e duas vezes por dia (com cerca de 300 mL de água) quando necessário.

Para avaliar a persistência e a infectividade, foram utilizadas duas metodologias de amostragem de nematoides: a técnica do inseto-armadilha e a extração por funil de Baermann (BAERMANN, 1917). A primeira é seletiva aos NEP e é eficiente para medir a infectividade dos nematoides, sendo que a porcentagem de mortalidade dos insetos usados como armadilha ajuda a monitorar as mudanças na infectividade do nematoide ao longo do tempo (HASS; GRIFFIN; DOWNES, 1999). Porém, é pouco quantitativa e até considerada semiquantitativa (CURRAN; HENG, 1992). Já a extração por funil de Baermann (BAERMANN, 1917) extrai nematoides viáveis (pois é dependente da movimentação deles e da ação da gravidade) e permite uma melhor quantificação, mas não permite informações quanto a sua infectividade (CURRAN; HENG, 1992; GRIFFIN; DOWNES, 1999). Logo, as duas metodologias, utilizadas em conjunto, provêm informações da quantidade e infectividade dos NEP.

Três dias após a aplicação da suspensão, 10 vasos de cada tratamento foram separados, e a planta, quando presente nestes, foi descartada e o substrato foi separado cuidadosamente e homogeneizado para a separação de duas alíquotas de 150 mL. Uma foi transferida para um pote plástico com tampa (10×5×5cm), onde foram enterradas três lagartas de *G. mellonella* que atuaram como insetos-armadilha para o nematoide. Os potes foram mantidos em

laboratório por cinco dias, quando as lagartas foram removidas do substrato e as mortas foram dissecadas para confirmar a presença de nematoide.

A outra alíquota de substrato foi utilizada para a extração dos nematoides por funil de Baermann. Foram utilizados funis de vidro (200 mL de capacidade) contendo uma rede de alumínio ao fundo (como suporte para a amostra) e um pedaço de cano de borracha de silicone maleável ligado à sua haste, fechado com um grampo de Mohr. A alíquota de substrato foi colocada sob um lenço de papel, posicionado ao fundo do funil sobre a rede de alumínio, e foi adicionada água destilada até cobrir toda a amostra. Após 24 horas, o grampo de Mohr foi aberto, liberando-se a passagem da suspensão pelo cano, permitindo a sua coleta em um frasco do tipo Becker. Após 24 horas de decantação das soluções extraídas, a quantidade extra de água foi descartada, padronizando-se um volume de 10 mL para todas as amostras extraídas. Todo o processo foi realizado em uma sala climatizada a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A partir dessas amostras, quantificaram-se os nematoides de cada tratamento por meio de um microscópio estereoscópio e placas do tipo Elisa. Para isso, dez alíquotas de 10 μL da suspensão que continha os JI foram inoculadas em dez poços da placa, quantificando-se, no microscópio estereoscópio, os JI presentes em cada um deles. Assim, foi possível obter o número de JI em 1 mL da suspensão. Em alguns poços da placa Elisa, adicionou-se uma amostra do nematoide *H. amazonensis* para servir como padrão para a contagem, evitando que outros nematoides, que não o entomopatogênico, fossem contados.

Todos os procedimentos de remoção das duas alíquotas do substrato dos vasos e amostragem de nematoides foram repetidos após 11, 19 e 27 dias da inoculação da suspensão, sendo que, em cada data, os vasos eram descartados e outros eram utilizados para a próxima avaliação. Logo, cada tratamento contou com 10 repetições avaliadas em quatro datas consecutivas, com um intervalo de

oito dias entre elas. Os vasos foram arranjados aleatoriamente sobre bancadas na casa-de-vegetação e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A casa-de-vegetação foi mantida em uma temperatura de $29\pm 4^{\circ}\text{C}$ e umidade de cerca de 80%. A irrigação foi feita diretamente no solo (cerca de 300 mL de água), duas vezes ao dia.

2.5 Experimento de deslocamento

A fim de avaliar se as plantas *T. erecta* e *C. breviflora* (a planta *C. spectabilis* não se estabeleceu nos novos vasos utilizados neste experimento) e o predador de solo, *C. granulatum* causam algum efeito sobre o deslocamento do nematoide em direção a um hospedeiro, foram utilizadas para o experimento plantas na mesma idade e tamanho que o anterior. Porém, antes das plantas alcançarem a fase de florescência, elas foram transferidas dos vasos plásticos de 40 cm de comprimento, 20 cm de largura e 20 cm de profundidade, (uma por vaso), sendo plantadas no centro destes, e o substrato ao qual estavam plantadas foi distribuído ao fundo da “floreira”. Sobre o substrato, foram adicionados mais 4 L de solo, que cobriram o substrato e preencheram a floreira até uma altura de 12 cm. As plantas foram mantidas assim até quando começaram a florescer. Este experimento também contou com vasos sem plantas, considerados o tratamento-controle, que foram montados juntamente aos demais. Nestes, foram adicionados 2 L de substrato (mesma mistura usada nos vasos com plantas) e, acima, foram adicionados 4 L de solo, que foram espalhados no fundo da “floreira”, alcançando uma altura de 12 cm.

Telas de material “styrofoam” (malha com 1 mm de abertura) foram utilizadas para montar envelopes (7×7 cm). Dentro destes, foram colocadas 10 lagartas de *G. mellonella* (3 cm de comprimento) e, logo após, fechados com grampos para papel. Em uma das extremidades do vaso, a 10 cm de distância do

caule da planta e a 10 cm do final do vaso, foi feita uma espécie de trincheira onde foi enterrado verticalmente o envelope que continha as lagartas. Na extremidade oposta, também a 10 cm de distância do caule da planta e a 10 cm do final do vaso, fez-se um pequeno buraco, de 3-5 cm de profundidade, onde foi aplicada uma suspensão de 30 mL contendo 20000 JI do nematoide *H. amazonensis*.

Em 15 dos 30 vasos de cada tratamento (as duas espécies das plantas e controle), foi feita a liberação de um adulto de *C. granulatum* (\pm 40 dias de idade) que podia deslocar-se livremente no vaso. Então, metade dos vasos de cada tratamento possuía um besouro e a outra metade não. O alimento para o predador, um pedaço com cerca de 5 mm de espessura de banana da variedade “Terra” e água embebida em um pedaço de algodão foram posicionados aleatoriamente no vaso.

Dessa forma, cada espécie de planta, com a presença ou não do adulto do predador, foi considerada um tratamento, e o controle para tal foi considerado o caso sem planta, com a presença ou não do predador.

A molhagem das plantas foi feita cuidadosamente, duas vezes ao dia, utilizando-se pouca quantidade de água (cerca de 100 mL), evitando, assim, que esta acumulasse ou escorresse. A temperatura na casa-de-vegetação foi de $29\pm 4^{\circ}\text{C}$ e umidade de aproximadamente 80%. Os vasos foram arranjados aleatoriamente sobre as bancadas e o experimento em delineamento inteiramente casualizado. A avaliação foi feita cinco dias após a aplicação do nematoide (como os nematoides levam até 72 horas para matar o hospedeiro, teriam dois dias para percorrer os 20 cm de distância até as lagartas) e consistiu da remoção dos envelopes que continham as lagartas de *G. mellonella*. As mortas foram dissecadas e observadas em microscópio estereoscópio para a confirmação da mortalidade por nematoides.

2.6 Análise dos dados

Os dados foram previamente normalizados através da transformação matemática $\log_{10}(x + 1)$ para o número de nematoides extraídos da amostra de 150 mL de substrato, pela metodologia de funil de Baermann, e em raiz quadrada para dados de número de lagartas de *G. mellonella* mortas em relação ao número total (dado de proporção). Em seguida, foram sujeitos à análise de variância e testados quanto às diferenças significativas pelo teste LSD (diferença mínima significativa), com 5% de significância. Os dados estão representados como médias não transformadas \pm EP (erro padrão). Todas as análises foram feitas utilizando-se o software BioEstat, versão 5.3 (AYRES et al., 2007).

3 RESULTADOS

De forma geral, as plantas não aumentaram a persistência dos nematoides em curto prazo nem prejudicaram a persistência em longo prazo, em relação ao tratamento-controle. Elas também não afetaram a infectividade nem o comportamento de busca ao hospedeiro dos nematoides.

3.1 Experimento de persistência

Neste experimento, foram detectados nematoides tanto via extração por funil de Baermann quanto infectando e matando lagartas de *G. mellonella* em até 27 dias após a inoculação. A proporção de lagartas infectadas e a quantidade de nematoides extraídos diminuíram ao longo das avaliações, indicando que houve uma redução da sobrevivência dos nematoides ao longo do tempo, em todos os tratamentos (Figuras 1 e 2).

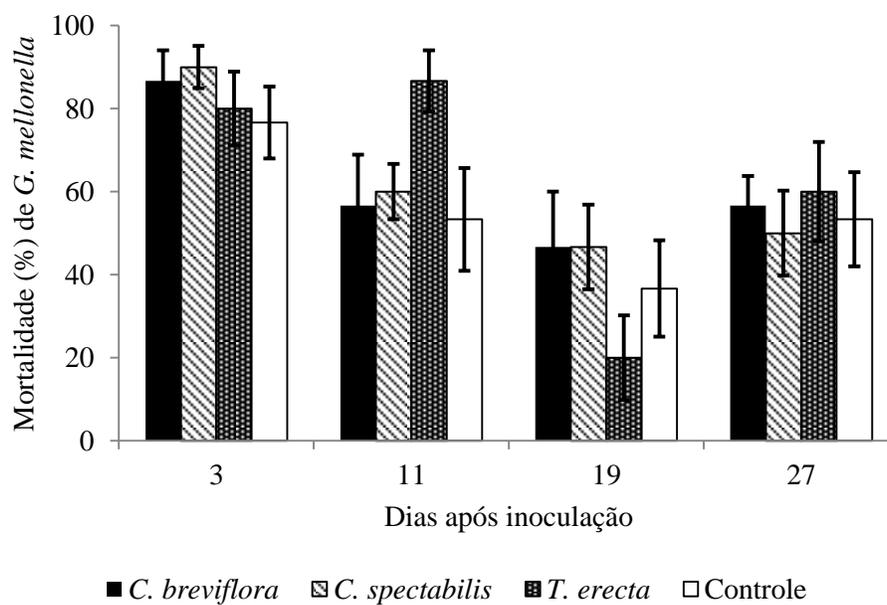


Figura 1 Porcentagem de mortalidade média (\pm EP) de lagartas *Galleria mellonella* que atuaram como inseto-armadilha pelo nematoide *Heterorhabditis amazonensis* nos tratamentos-controle (apenas substrato), *Crotalaria brevisflora*, *Crotalaria spectabilis* e *Tagetes erecta* (substrato onde estavam plantas), após 3, 11, 19 e 27 dias da inoculação, em experimento em casa-de-vegetação ($29\pm 4^{\circ}\text{C}$, 80 UR).

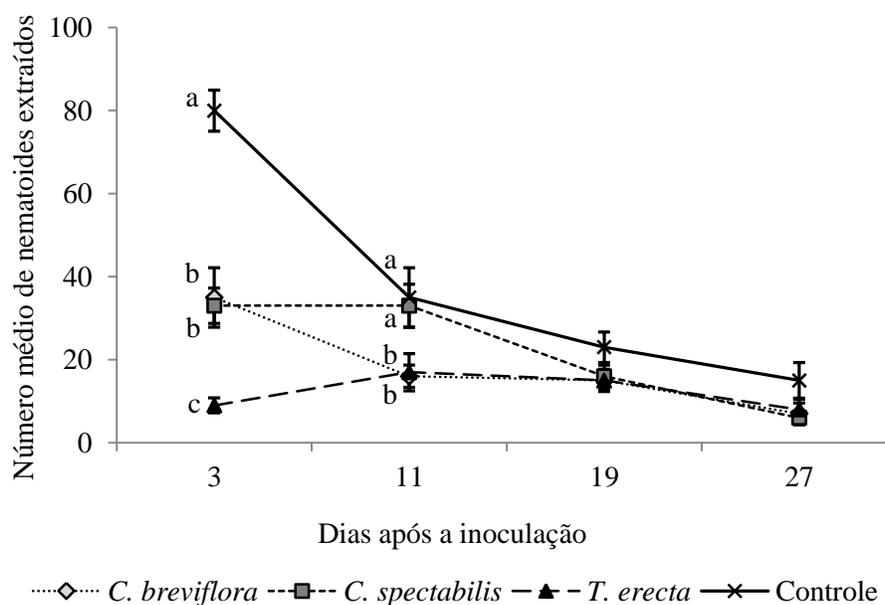


Figura 2 Persistência de nematoides *Heterorhabditis amazonensis* extraídos via funil de Baermann dos tratamentos-controle (apenas substrato), *Crotalaria breviflora*, *Crotalaria spectabilis* e *Tagetes erecta* (substrato onde estavam plantas), em experimento em casa-de-vegetação. As diferentes letras, próximas aos símbolos, indicam diferenças significativas entre as médias da mesma data de avaliação ($p < 0.05$, LSD).

A metodologia de inseto-armadilha não apresentou diferença significativa entre os tratamentos em cada avaliação. Após três dias da inoculação, a mortalidade média entre os tratamentos foi de 83% e, aos 27 dias após a inoculação, foi de 55%. A menor média de mortalidade foi observada aos 19 dias após a inoculação, com 38% dos insetos mortos. Este baixo valor da média ocorreu principalmente pelo tratamento *T. erecta* que, nesta avaliação, apresentou o menor resultado de mortalidade dentre todas as observações (Figura 1). Esta planta demonstrou alta variação dos resultados de mortalidade ao longo do tempo.

Quanto à quantificação de nematoides via extração por funil de Baermann, houve diferença significativa entre os tratamentos no terceiro e no décimo primeiro dia após a inoculação. Pôde-se notar que o tratamento-controle foi o que manteve o maior número de nematoides viáveis no solo após três dias da aplicação de grande quantidade de JI, sendo contabilizado, nele, o dobro de nematoides que nos tratamentos *C. breviflora* e *C. spectabilis*. O tratamento *T. erecta* não conseguiu manter uma grande quantidade de nematoides viáveis logo após a inoculação, possuindo, no terceiro dia, cerca de quatro vezes menos nematoides que nas demais plantas. Ao 11^o dia após a inoculação, a população de nematoides do tratamento-controle sofreu uma queda, e este passou a se igualar ao tratamento *C. spectabilis*. Uma redução na população do tratamento *C. breviflora*, observada na mesma avaliação, fez com que este tratamento apresentasse o mesmo número de nematoides do tratamento *T. erecta*. A partir da terceira avaliação, aos 19 dias após a inoculação, os tratamentos passaram a se igualar até a última avaliação, não havendo diferença estatística (Figura 2).

A extração também indicou que, em todos os tratamentos, exceto *T. erecta*, houve uma redução de 80% no número de nematoides, entre a primeira e a última avaliação. Os tratamentos controle e *C. breviflora* causaram a maior redução populacional entre o terceiro e o décimo primeiro dia após a inoculação, quando a população caiu pela metade entre as duas avaliações. No tratamento *C. spectabilis*, a maior redução ocorreu entre o 11^o e o 19^o dia após a inoculação, já que, entre o 3^o e 11^o, o número de nematoides foi estável. O tratamento *T. erecta* foi o único que não seguiu o mesmo padrão das demais plantas, pois o número de nematoides nele foi muito pequeno no 3^o e no 27^o dia após a inoculação (cerca de 10 nematoides). A população aumentou no 11^o dia, manteve-se estável até o 19^o dia e caiu novamente na última avaliação.

Quanto ao experimento de deslocamento, não houve diferença de mortalidade das lagartas de *G. mellonella* entre os tratamentos, pela análise de

variância ($p = 0,3528$; $f = 1,1260$). Isto indicou que, em um período de cinco dias, um número semelhante de nematoides conseguiu deslocar 20 cm de distância em direção ao hospedeiro, independentemente da presença da planta ou do adulto do predador *C. granulatum*. Desta forma, houve mortalidade de 30 a 40% das lagartas nos tratamentos (Figura 3).

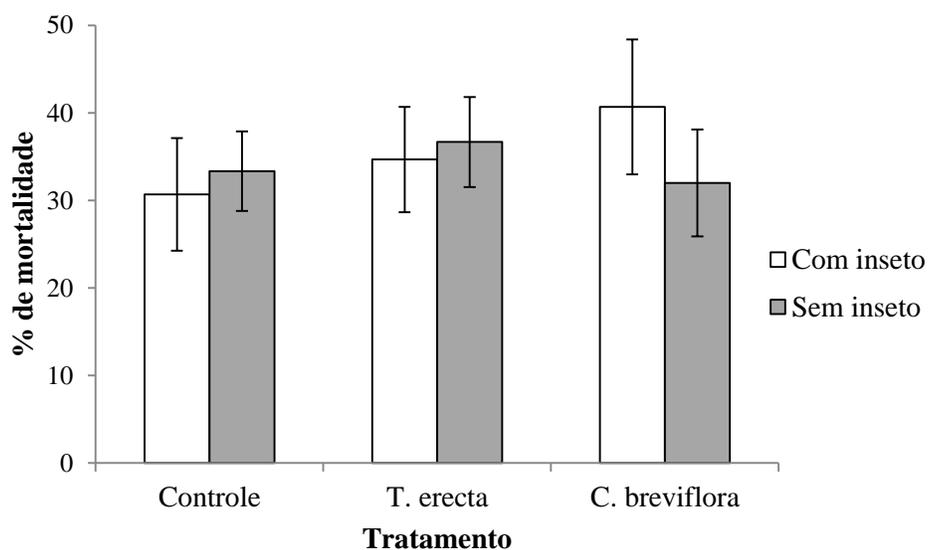


Figura 3 Porcentagem (média±EP) de mortalidade de lagartas de *Galleria mellonella* por ação do nematoide *Heterorhabditis amazonensis* aplicado em substrato (controle) ou onde estavam plantadas as espécies *Crotalaria breviflora* de *Tagetes erecta*, e liberado ou não um adulto de *C. granulatum*. Nematoides (20000 JI) aplicados a 20 cm de distância do hospedeiro, cinco dias antes da avaliação, em experimento em casa-de-vegetação ($29\pm 4^{\circ}\text{C}$, 80 UR).

4 DISCUSSÃO

Em geral, o nematoide teve uma grande persistência no substrato, sendo observados nematoides viáveis e lagartas mortas por eles até 27 dias após ser inoculado, o que é interessante, já que ele resistiu às altas temperaturas da casa-de-vegetação (média de 29°C, com picos de 33°C). Em testes realizados por Shapiro-Ilan, Stuart e MCcoy (2006), a maioria dos nematoides do gênero *Heterorhabditis* avaliada sobreviveu por, no máximo, 28 dias, em condições naturais, em laboratório. Além disso, estes resultados trazem mais informações sobre a persistência de *H. amazonensis*, que é uma espécie descrita recentemente (ANDALÓ; NGUYEN; MOINO-JR, 2006) e eficiente no controle de diversas pragas (ANDALÓ et al., 2010; BATISTA et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

Porém, deve-se ressaltar que a sobrevivência do nematoide por um período não significa necessariamente que ele irá permanecer infectante durante este tempo. No entanto, os resultados de mortalidade de lagartas de *G. mellonella*, que atuaram como inseto-armadilha, mostram que o nematoide permaneceu infectivo, causando a mortalidade de 80% das lagartas na primeira avaliação e cerca de 50% delas na última avaliação. Este decréscimo, ao longo do tempo, provavelmente está relacionado à diminuição populacional dos nematoides.

Ainda quanto à persistência, foi observado que, logo após a inoculação de uma grande quantidade de nematoides, o tratamento sem nenhuma planta (controle) conseguiu manter o maior número de nematoides viáveis em relação às plantas, mas não conseguiu manter esta alta população até a avaliação seguinte (aos 11 dias após a inoculação), quando o número de nematoides caiu pela metade. Neste tratamento, durante as contagens em microscópio estereoscópio das soluções extraídas, observou-se uma maior diversidade de espécies de nematoides e de outros organismos em relação aos demais

tratamentos (dados observacionais, não quantificados). Então, esta grande redução populacional, observada entre as duas primeiras avaliações, provavelmente está relacionada à competição dos NEP com outros microrganismos ou à predação deles por inimigos naturais nematófagos presentes no solo, como já observado por Wilson e Gaugler (2004), que determinaram que estes são os principais responsáveis por limitar persistência a curto prazo dos NEP no ambiente.

As plantas do gênero *Crotalaria* são muito utilizadas como plantas de cobertura ou em consórcio com outras culturas (WANG; SIPES; SCHMITT, 2002), pois provém boa cobertura vegetal, atraem uma grande diversidade de insetos e inimigos naturais (TAVARES et al., 2010), atuam como adubo verde fixando nitrogênio (graças à simbiose que realizam com bactérias do gênero *Rhizobium*), possuem poucas espécies de fitófagos ou patógenos associados a elas, competem com ervas daninhas e crescem em diferentes tipos de solo (WANG; SIPES; SCHMITT, 2002). Além disso, são importantes no controle de nematoides parasitas de plantas, já que beneficiam os antagonistas a eles e produzem compostos secundários que lhes são tóxicos ou inibitórios, como os alcaloides pirrolizidínicos monocrotalina, que reduzem a eclosão dos juvenis e a motilidade de fitonematoides (CHITWOOD, 2002; GALBIERI et al., 2011; KUSHIDA et al., 2003; RATNADASS et al., 2012; RODRÍGUEZ-KÁBANA et al., 1992; OSEI et al., 2010; SANTANA et al., 2012; WANG; SIPES; SCHMITT, 2002).

Apesar desse efeito nematicida às espécies de nematoides fitófagos, os resultados aqui apresentados mostram que a planta *C. spectabilis* manteve o maior e constante número de NEP viáveis em três e onze dias após a inoculação, em relação às demais plantas avaliadas (dados representados na Figura 2), sem causar efeito sobre a infectividade deles (dados representados na Figura 1). Isto mostra que *C. spectabilis* pode ser utilizada com segurança como adubo verde,

para aumentar a heterogeneidade ambiental, favorecendo os inimigos naturais, além do controle de fitonematoides, sem causar grandes efeitos negativos na população do nematoide *H. amazonensis* quando aplicado inundativamente.

Por outro lado, a outra planta do mesmo gênero, *C. breviflora*, apesar de também não afetar a infectividade, causou redução populacional do NEP mais rapidamente que *C. spectabilis*. Mesmo pertencentes ao mesmo gênero, o efeito que as plantas podem causar sobre nematoides varia muito entre as espécies (WANG; SIPES; SCHMITT, 2001; 2002) e, apesar de também serem utilizadas como adubo verde para o solo (WANG; SIPES; SCHMITT, 2002), elas são pouco estudadas acerca dos efeitos sobre os organismos de solo.

A planta *T. erecta* foi a responsável por causar rápida redução populacional dos nematoides aplicados inundativamente no solo. As plantas deste gênero, assim como as demais, também são eficientes no controle de nematoides fitopatogênicos quando utilizadas como cobertura vegetal ou em rotação com demais culturas. Elas também atuam como plantas não-hospedeiras, beneficiam os antagonistas a estes nematoides e são fonte de extratos nematicidas (ADEKUNLE, 2011; CHITWOOD, 2002; WANG; SIPES; SCHMITT, 2001). O cultivo das espécies *T. patula* e *T. erecta* é capaz de suprimir a população de 14 gêneros de fitonematoides, podendo ter ação igual ou melhor que os fumigantes de solo (REYNOLDS; POTTER; BALL-COELHO, 2000; HOOKS et al., 2010).

Um dos principais compostos nematicidas produzidos por *T. erecta* é o α -tertienil (HOOKS et al., 2010), o qual foi testado sobre o NEP *S. glaseri* em trabalhos realizados por Kanagy e Kaya (1996). Comprovou-se que ele reduz o número de JI que infectam hospedeiros. Porém, ainda não é clara a forma de liberação deste composto pela planta e como seu efeito tóxico é ativado, mas as hipóteses mais aceitas são as que envolvem a liberação do composto no solo e ativação da toxicidade através da luz UV (BAKKER et al., 1979; CHITWOOD,

2002; HOOKS et al., 2010; NIVSARKAR, CHERIAN; PADH, 2001). Independentemente de como o efeito tóxico ocorre, os resultados aqui apresentados mostram que *H. amazonensis* teve, logo no início do experimento, sua população prejudicada pela ação desta planta no experimento de persistência. Além disso, os resultados de infectividade mostram que, apesar de não ter diferido dos demais tratamentos, o padrão de infectividade variou muito ao longo do tempo, não seguindo o mesmo padrão das demais plantas.

Vale ressaltar que estes resultados foram obtidos em um experimento no qual foi utilizada apenas uma planta de *T. erecta* por vaso, sendo que o prejuízo sobre a população do NEP pode ser potencializado em situações onde há mais plantas presentes e onde uma maior quantidade de α -tertienil é liberada. Outro agravante para a população de *H. amazonensis*, aplicado inundativamente em áreas onde estão presentes plantas de *T. erecta*, é que este nematoide tem preferência por se deslocar horizontalmente e na região mais superficial do solo (ANDALÓ et al., 2012). Porém, é na região de superfície do solo onde *T. erecta* tem o maior efeito nematicida sobre os fitonematoides, podendo este efeito alcançar nematoides em até 70 cm de profundidade (REYNOLDS; POTTER; BALL-COELHO, 2000).

Além da ação dos compostos secundários liberados pelas plantas, estas podem ter afetado o NEP devido a outros fatores aos quais estes organismos são sensíveis, como composição, umidade, temperatura do solo e radiação solar (KAYA, 1990). A composição, temperatura e umidade do solo, mesmo que padronizadas para a montagem do experimento, são fatores moderados pela planta cultivada, pois, além de alterar a incidência de radiação solar no solo, modifica o movimento do ar e a quantidade de água nele (LAWRENCE; HOY; GREWAL, 2006). Esta influência sobre os NEP varia de acordo com a espécie de planta e a espécie do entomopatígeno (HOY et al., 2008; LAWRENCE; HOY; GREWAL, 2006; STUART et al., 2006; SUSURLUK; EHLERS, 2008).

O deslocamento do nematoide em direção a um hospedeiro não foi influenciado pelas plantas nem pela presença do adulto do predador *C. granulatum*. Tanto as larvas quanto os adultos deste predador, em testes preliminares de laboratório, foram considerados bons agentes de dispersão forética do nematoide. Porém, não se pode concluir se estes resultados se devem à não-influência dos tratamentos sobre o deslocamento ou se o número de dias (percorrer 20 cm em cinco dias) foi suficiente para que os nematoides superassem qualquer fator imposto pelas plantas, que limitassem o seu deslocamento em direção ao hospedeiro.

Além de *H. amazonensis* ter grande capacidade de deslocamento horizontal em busca do hospedeiro (ANDALÓ et al., 2012), eles são atraídos pelo CO₂ liberado no solo pelo inseto hospedeiro e pelas raízes das plantas (BOFF; ZOON; SMITS, 2001; BOFF; TOL; SMITS, 2002), sendo que a presença de *G. mellonella* no solo influencia a distribuição de certas espécies de NEP (BOFF; ZOON; SMITS, 2001). No experimento realizado por Andaló et al. (2012), em seis dias, o nematoide *H. amazonensis* causou 80% de mortalidade das lagartas de *G. mellonella* que estavam a 40 cm de distância do ponto de inoculação em uma coluna de areia. A mortalidade obtida por estes autores, em um experimento com os nematoides, provavelmente está relacionada com a influência que o tipo de solo (areia × solo) exerce sobre o deslocamento do nematoide, como já comprovado em demais trabalhos (CHOO; KAYA, 1991; GEORGIS; POINAR, 1983; SCHROEDER; BEAVERS, 1987).

Os resultados mostram a importância de estudos a respeito das interações que plantas utilizadas para beneficiar o sistema agrícola com outros agentes de controle de insetos-praga. Deve-se considerar que plantas que beneficiam os nematoides podem também servir como áreas de refúgio para eles, na ausência da planta cultivada (PREISSER et al., 2006), além de atrair hospedeiros alternativos à praga-chave, que vão atuar na reciclagem e

multiplicação e, desta forma, beneficiam também a sua persistência a longo prazo no ambiente (KAYA, 1990; SHAPIRO-ILAN; STUART; MCCOY, 2006).

Com isso, concluiu-se que as plantas podem interferir no número de nematoides recém-inoculados no solo, sem afetar a sua infectividade nem o seu deslocamento em direção a um hospedeiro. Confirmou-se a possibilidade do cultivo de plantas como *C. spectabilis*, juntamente às de interesse econômico, que, no caso da adoção do controle biológico inundativo com nematoides, irão manter a população recém-inoculada viável no solo por mais tempo, aumentando a eficiência do controle. Porém, mais estudos são necessários para avaliar o efeito destas plantas em campo, e se a planta *T. erecta* é capaz de reproduzir os resultados de rápida supressão populacional de *H. amazonensis* em um sistema agrícola.

REFERÊNCIAS

- ADEKUNLE, O. K. Amendment of soil with African marigold and sunn hemp for management of *Meloidogyne incognita* in selected legumes. **Crop Protection**, v. 30, p. 1392-1395, 2011.
- ANDALÓ, V. et al. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1860-1866, 2010.
- ANDALÓ, V. et al. Movement of *Heterorhabditis amazonensis* and *Steinernema arenarium* in search of corn fall armyworm larvae in artificial conditions. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 3, p. 226-230, 2012.
- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. N.; MOINO-JR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brasil. **Nematology**, v. 8, p. 853-867, 2006.
- AYRES, M. et al. **BioEstat** – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: Ong Mamirua, 2007.
- BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung von *Ancylostomum* (Nematoden) larven in erdproben. **Geneeskunding Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië**, v. 57, p. 131-137, 1917.
- BAKKER, J. et al. Photoactivation of the nematocidal compound α -terthienyl from roots of marigolds (*Tagetes* species). **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 6, p. 1841-1841, 1979.
- BARBERCHECK, M. E.; WANG, J.; HIRSH, I. S. Host plant effects on entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 86, p. 169-177, 1995.
- BATISTA, E. S. de P. et al. Screening of entomopathogenic nematodes to control *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 37, n. 2, p. 198-202, 2011.
- BOFF, M. I. C.; TOL, R. H. W. M. van; SMITS, P. H. Behavioural response of *Heterorhabditis megidis* towards plant roots and insect larvae. **BioControl**, v. 47, p. 67-83, 2002.

- BOFF, M. I. C.; ZOON, F. C.; SMITS, P. H. Orientation of *Heterorhabditis megidis* to insect hosts and plant roots in a Y-tube sand olfactometer. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 98, p. 239-337, 2001.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 221-249, 2002.
- CHOCOROSQUI, V. R.; PASINI, A. Predação de pupas de *Alabama argillacea* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) por larvas e adultos de *Calosoma granultum* Perty (Coleoptera: Carabidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 65-70, Mar. 2000.
- CHOO, H. Y.; KAYA, H. K. Influence of soil texture and presence of roots on host finding by *Heterorhabditis bacteriophora*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 58, p. 279-280, 1991.
- CURRAN, J.; HENG, J. Comparison of three methods for estimating the number of entomopathogenic nematodes present in soil samples. **Journal of Nematology**, College Park, v. 24, p. 170-176, 1992.
- DUNCAN, L. W. et al. Incidence of endemic entomopathogenic nematodes following application of *Steinernema riobrave* for control of *Diaprepes abbreviatus*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 35, n. 2, p. 178-186, 2003.
- DUNCAN, L.W.; MCCOY, C. W. Hydraulic lift increases herbivory by *Diaprepes abbreviatus* larvae and persistence of *Steinernema riobrave* in dry soil. **Journal of Nematology**, College Park, v. 33, n. 2-3, p. 142-146, 2001.
- 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, p. 417-422, 1964.
- ENNIS, D. E.; DILLON, A. B.; GRIFFIN, C. T. Simulated roots and host feeding enhance infection of subterranean insect by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 103, p. 140-143, 2010.
- GALBIERI, R. et al. Desempenho de genótipos de algodoeiro na presença ou não de rotação de cultura com *Crotalaria spectabilis*, em área infestada com *Meloidogyne incognita*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 5, p. 303-307, 2011.

GASSMANN, A. J. et al. Tritrophic effects of host plants on a herbivore-pathogen interaction. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, n. 3, p. 371-378, 2010.

GEORGIS, R. Present and future prospects for entomopathogenic nematode products. **Biocontrol Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 83-99, 1992.

GEORGIS, R. et al. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 103-123, 2006.

GEORGIS, R.; POINAR, G. O. Jr. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Nematology**, College Park, v. 15, n. 3, p. 329-332, 1983.

HASS, B.; GRIFFIN, C. T.; DOWNES, M. J. Persistence of *Heterorhabditis* infective juveniles in soil: comparison of extraction and infectivity measurements. **Journal of Nematologists**, v. 31, n. 4, p. 508-516, 1999.

HOOKS, C. R. R. et al. Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 307-320, Nov. 2010.

HOY, C. W. et al. Canonical correspondence analysis demonstrates unique soil conditions for entomopathogenic nematode species compared with other free-living nematode species. **Biological Control**, Orlando, v. 46, n. 3, p. 371-379, Sept. 2008.

JABBOUR, R.; BARBERCHECK, M. E. Soil and habitat complexity affects on movement of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in maize. **Biological Control**, Orlando, v. 47, n. 2, p. 235-243, Nov. 2008.

KANAGY, J. M. N.; KAYA, H. K. The possible role of marigold roots and α -terthienyl in mediating host-finding by Steinernematid nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 42, n. 2, p. 220-231, 1996.

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

KAYA, H. K. Soil ecology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in Biological Control**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 93-115.

KUSHIDA, A. et al. Effects of *Crotalaria juncea* and *C. spectabilis* on hatching and population density of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* (Tylenchida: Heteroderidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 38, n. 3, p. 393-399, 2003.

LANDIS, D. A.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 175-201, 2000.

LAWRENCE, J. L.; HOY, C. W.; GREWAL, P. S. Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematodes in a heterogeneous vegetable production landscape. **Biological Control**, Orlando, v. 37, p. 247-255, 2006.

LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. A conservation approach to using entomopathogenic nematodes in turf and landscapes. In: Barbosa, P. (Ed.), **Conservation biological control**. New York: Academic, 1998. p. 235–254.

LEWIS, E. E. et al. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, Orlando, v. 38, p. 66-79, 2006.

MCGRAW, B. A.; KOPPENHÖFER, A. M. Population dynamics and interactions between endemic entomopathogenic nematodes and annual bluegrass weevil populations in golf course turfgrass. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 77-89, 2009.

NIVSARKAR, M.; CHERIAN, B.; PADH, H. Alpha-terthenyl: A plant-derived new generation insecticide. **Current Science**, v. 81, n. 6, p. 667-672, 2001.

OSEI, K. et al. Potential of leguminous cover crops in management of a mixed population of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Journal of Nematology**, College Park, v. 42, n. 3, p. 173-178, 2010.

PARKMAN, J. P. et al. Dispersal of *Steinernema scapterisci* (Rhabditida: Steinernematidae) after inoculative applications for mole cricket (Orthopeta: Gryllotalpidae) control in pastures. **Biological Control**, Orlando, v. 3, p. 226-232, 1993.

PARRA, J. R. P. Raising insects for studies of pathogens. In: Alves, S.B.; ed. **Microbial control of insects**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1015-1037.

PASINI, A. **Biologia e técnica de criação do predador *Calosoma granulatum* Perty, 1830 (Coleoptera: Carabidae) em *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), lagarta-da-soja.** 1995. 67 p. Tese (Doutorado em Entomologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, 1995.

PREISSER, E. L. et al. Plant facilitation as a belowground predator. **Ecology**, v. 87, n. 5, p. 1116-1123, 2006.

RATNADASS, A. et al. Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 273-303, 2012.

REYNOLDS, L. B.; POTTER, J. W.; BALL-COELHO, B. R. Crop rotation with *Tagetes* sp. in an alternative to chemical fumigation for control of root-lesions nematodes. **Agronomy Journal**, v. 92, p. 957-966, 2000.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. et al. Horse bean (*Canavalia ensiformis*) for the management of *Meloidogyne* spp. **Nematropica**, v. 22, p. 29-35, 1992.

SANTANA S. M. et al. Manejo de *Pratylenchus zeae* por plantas antagonistas, em solos de áreas de cultivo de cana-de-açúcar. **Nematropica**, v. 42, p. 63-71, 2012.

SANTOS, V. et al. Virulence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the control of *Diabrotica speciosa* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1149-1156, 2011.

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

SHAPIRO-ILAN, D. I.; STUART, R. J.; MCCOY, C. W. A comparison of entomopathogenic nematode longevity in soil under laboratory conditions. **Journal of Nematology**, College Park, v. 38, n. 1, p. 119-129, 2006.

SCHROEDER, W.J.; BEAVERS, J.B. Movement of the entomogenous nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae in soil. **Journal of Nematology**, College Park, v.19, n.2, p.257-259, 1987.

STUART, R. J. et al. Population biology of entomopathogenic nematodes: concepts, issues, and models. **Biological Control**, Orlando, v. 38, n. 1, p. 80-102, July 2006.

SUSURLUK, A.; EHLERS, R.-U. Field persistence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* in different crops. **BioControl**, v. 53, p. 627-641, 2008.

TAVARES, W. S. et al. Soil organisms associated to the weed suppressant *Crotalaria juncea* (Fabaceae) and its importance as a refuge for natural enemies. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 473-479, 2010.

TURLINGS, T. C. J.; HILTPOLD, I.; RASMANN, S. The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. **Plant Soil**, v. 358, p. 51-60, 2012.

WANG, K.-H.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. Suppression of *Rotylenchulus reniformis* by *Crotalaria juncea*, *Brassica napus* and *Tagetes erecta*. **Nematropica**, v. 31, p. 237-251, 2001.

WANG, K.-H.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: a review. **Nematropica**, v. 32, p. 35-57, 2002.

WILSON, M.; GAUGLER, R. Factors limiting short-term persistence of entomopathogenic nematodes. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, n. 4, p. 250-253, 2004.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: hand book of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin. **Arkansas Agricultural Experimental Station**, Fayetteville, v. 331, p. 1-30, 1988.

1 CONCLUSÕES GERAIS

- Os nematoides *Heterorhabditis amazonensis* isolado RSC 5 e *H. amazonensis* isolado JPM 4 causam mortalidade apenas nas larvas de primeiro ínstar de *Calosoma granulatum* e, em concentrações superiores a 150 JI/mL, elevando a mortalidade com o aumento das concentrações de nematoides. Observou-se que o nematoide *H. amazonensis* foi mais prejudicial às larvas de primeiro ínstar em concentração de 300 e 600 JI/mL;
- As larvas de terceiro ínstar e os adultos do predador atacam e consomem, aleatoriamente, lagartas de *S. frugiperda* vivas saudáveis e recém-infectadas pelos nematoides *H. amazonensis* isolado RSC 5 e *H. amazonensis* isolado JPM 4, mas não consomem as lagartas mortas por eles. Isto provoca um efeito deterrente quando o predador morde o cadáver infectado e ele passa a consumir a lagarta morta por congelamento (saudável). Estas características indicam que o predador é capaz somente de distinguir a lagarta contaminada quando a bactéria simbiote do nematoide já causou septicemia do hospedeiro.
- As larvas de terceiro ínstar, quando possuem apenas cadáveres infectados pelos nematoides como alimento, durante seis dias, sofrem grande mortalidade, sendo que, com o nematoide *H. amazonensis* isolado RSC 5, as larvas passam a morrer a partir do segundo dia de alimentação. Os adultos consomem pequena quantidade dos cadáveres de lagartas contaminadas pelos nematoides, mas não sofrem mortalidade quando esta é a única opção de alimento durante seis dias.
- As larvas (de terceiro ínstar) e adultos do predador são capazes de carregar o nematoide *H. amazonensis* isolado RSC 5, por forésia, em concentrações 600 JI/arena. Porém, a capacidade de carregamento deles (principalmente dos adultos) eleva-se com o aumento das concentrações de nematoides no

sistema. O adulto carrega maior quantidade de nematoides quando a distância percorrida por ele é pequena, de 10 cm. Mas é capaz de carregar nematoides mesmo quando percorre uma distância de 40 cm, indicando que *C. granulatum* é um bom agente de dispersão forética do nematoide *H. amazonensis*.

- As plantas *Crotalaria spectabilis*, *C. breviflora* e *Tagetes erecta* não afetaram a persistência nem a infectividade de juvenis infectantes de *H. amazonensis* em longo prazo. Porém, em curto prazo, a planta *C. spectabilis* obteve os melhores resultados de persistência dentre as demais;
- As plantas e o predador não afetaram o comportamento de busca do nematoide *H. amazonensis* isolado RSC 5 em direção ao hospedeiro, no período de cinco dias em casa-de-vegetação.